



Université des Sciences et Technologies de Lille

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par

Safa OUERGHEMMI

Le 14 décembre 2016

ÉLECTROSPINNING DU CHITOSAN POUR L'ÉLABORATION DE RÉSEAUX DE NANOFIBRES À ACTIVITÉS ANTIBACTÉRIENNE ET ANTITHROMBOTIQUE

Membres du Jury :

Dr. Véronique COMA	Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr. Guy SCHLATTER	Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Christine CAMPAGNE	ENSAIT- Roubaix	Examinateur
Dr. François ESTOUR	Université de Rouen	Examinateur
Pr. Bernard MARTEL	Université de Lille 1	Directeur de thèse
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN	Université de Lille 2	Co-Directeur
Dr. Stéphanie DEGOUTIN	Université de Lille 1	Membre invité

*« Lorsque je tends vers un but,
je me fais porter par l'espoir
et oublie toute prudence;
Je n'évite pas les chemins escarpés
et n'appréhende pas la chute
dans un feu brûlant.
Qui n'aime pas gravir la montagne,
vivra éternellement au fond des vallées ».*

La volonté de vivre - Abou Kacem Chebbi

Remerciements

Ce travail n'aura pas été possible sans l'accueil et le soutien de monsieur le Président de l'université Lille1 sciences et Technologies et de la région Haut de France, c'est pour moi l'occasion de leur adresser mes remerciements les plus sincères.

*Je remercie également le Pr. **Alexandre Legris**, directeur de l'UMET de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Dr. **Véronique COMA**, Maître de Conférences à l'université de Bordeaux, au Pr. **Guy Schlatter**, Professeur à Université de Strasbourg, au Pr. **Christine Campagne** Professeur à l'École Nationale Supérieure des Arts et Industries Textiles de Roubaix et au Dr. **François Estour** Maître de Conférences de l'université de Rouen qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je remercie particulièrement le Pr. **Bernard Martel**, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, pour m'avoir fait confiance pour accomplir ce travail, pour son encadrement, sa bienveillance, sa disponibilité et ses précieux conseils.*

*Mes remerciements vont également au Dr. **Nicolas Blanchemain**, mon co-directeur de thèse, de m'avoir donné accès aux ressources du laboratoire GRB pour accomplir ce travail, pour ses précieux conseils, son investissement et son encadrement.*

*Merci à mon encadrante de thèse Dr. **Stéphanie Degoutin**, Maître de conférences à Lille 1 pour sa disponibilité et son suivi. Je te remercie aussi pour ta sympathie et ton aimabilité.*

*Merci infiniment au Dr. **Nicolas Tabary** Maître de conférences à l'université de Lille1, sa disponibilité, ses conseils, merci pour ta bonne humeur, merci de m'avoir remonté le moral dans les moments difficiles.*

*Je tiens à remercier également Mr. **Benoit Hue**, Asissant Ingénieur, à l'UMET, sans lui la mise en place de la machine d'électrospinning n'aurait pas été possible ! Merci d'avoir été présent tout au long de ce travail, de m'avoir accompagné dans la prise en main de la machine et d'en avoir assuré la maintenance.*

*Merci à Dr. **Frédéric Cazaux** Maître de Conférence à l'université de Lille1, merci pour ta collaboration dans cette thèse et pour ta sympathie. Je remercie également Dr **Ludovic Janus** pour sa collaboration.*

*Un grand merci au Dr **Laurent Leclerq** de l'Université de Montpellier 1 de l'équipe IBMM (UMR CNRS 5247) pour sa collaboration, ses connaissances en chromatographie et son service et sa rapidité à répondre à la correction des articles et du manuscrit.*

*Je remercie également Pr. **Valérie Gaucher** pour sa collaboration et ses connaissances et sa gentillesse.*

*Je remercie également **Ahmed Addad**, ingénieur de recherche à l'UMET pour les observations par MET et pour sa disponibilité.*

*Je souhaite également remercier chaleureusement les membres de l'équipe du laboratoire GRB qui ont contribué à ce travail, particulièrement **Mickaël Maton**, Dr **Christel Neut** et Dr **Feng Chai** qui m'ont aidé à la réalisation des essais biologiques et microbiologiques.*

*Je remercie tous les membres de l'équipe de recherche de l'UMET (ISP), Pr **Maryse Bacquet**, **Jean-Noël Staelens**, **Aurélië**, **Anne-Marie** mes collègues **Syrine**, **Jatupol**, **Dyha** pour les bons moments, sans oublier les doctorants, postdoctorants et stagiaires, **Maria**, **Claudia**, **Malika**, **Khaled**, **Nérimel**, **William**, **Déiphine**, **Marco**, **Pierre** et à l'ensemble du personnel de l'UMET pour leur bonne humeur et leur amitié*

*Je remercie mes amis **Fatma**, **Douda**, **Hatem**, **Dhekra**. Que notre amitié continue de plus belle.*

*Un énorme merci à mes parents, qui sans leur présence et soutien je ne serai pas là en ce moment, à ma sœur **Marouchti** et mon frère **Hamouchi**. Je remercie ma famille et ma belle-famille de m'avoir soutenue et encouragée. Et enfin, je remercie à mon cher mari, merci pour ta patience, ton soutien.*

Table des matières

Remerciements	4
Principales abréviations	11
Introduction générale	13
PARTIE I: Etude Bibliographique	16
I. Les nanofibres	17
I.1 Généralités	17
I.2 Procédés de fabrication des NFs	18
I.2.1 Electrospinning et dérivés	19
I.2.2 Autres techniques de fabrication	32
I.2.3 Conclusion	36
I.3 NFs pour applications biomédicales.....	38
I.3.1 NFs pour la libération de principe actif	38
II. Elaboration de nanofibres à base de chitosan	62
II.1 Le chitosan.....	62
II.2 Le chitosan sulfonique.....	63
II.3 Electrospinning du chitosan	63
II.4 Stabilité des nanofibres de chitosan	65
II.5 Activité antibactérienne des nanofibres de chitosan.....	69
II.6 Activité anti-thrombotique du chitosan sulfoné	70
II.7 Travaux antérieurs du laboratoire.....	73
III. Objectifs de la thèse	76
Partie II : Matériels & Méthodes	78
I. Nanofibres à base de chitosan à activités antibactériennes	79
I.1 Polymères utilisés.....	79
I.1.1 Le chitosan.....	79
I.1.2 Le polyHP β CD ou le poly β CD	80
I.1.3 Polyéthylène oxide	83
I.2 Le triclosan	83
I.3 Caractérisations du complexes CD/TCL.....	84
I.3.1 Etude de a solubilité	84
I.3.2 Caractérisation d'un complexe solide	85
I.4 Electrospinning.....	86
I.4.1 Préparation des solutions.....	86
I.4.2 Dispositif d'électrospinning.....	89

1.4.3	Conditions d'électrospinning.....	90
1.4.4	Caractérisations des solutions.....	90
1.4.5	Caractérisations des nanofibres	91
1.4.6	Stabilité des nanofibres de chitosan	92
1.5	Etude de la libération	94
1.5.1	En mode statique (en batch)	94
1.5.2	En mode dynamique.....	94
1.5.3	Mécanisme de libération : modèle de Korsmeyer-Peppas	95
1.6	Etude biologique	96
1.6.1	Culture des cellules.....	96
1.6.2	Adhésion cellulaire	96
1.6.3	Viabilité cellulaire	96
1.7	Activité antibactérienne- Test de Kirby-Bauer	98
1.8	Analyse statistique	99
II.	Nanofibres à base de chitosan sulfoné à activité anti-thrombotique.....	99
II.1	Matériels.....	99
II.2	Synthèse des polymères.....	100
II.3	Techniques de caractérisation	101
II.3.1	RMN.....	101
II.3.2	Analyse élémentaire.....	102
II.3.3	Potentiométrie couplée à la conductimétrie	102
II.3.4	Spectroscopie Infrarouge	102
II.3.5	Mesure du potentiel Zeta en fonction du pH.....	102
II.3.6	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la diffusion de la lumière (MALS)	103
II.3.7	Analyse par dispersion de Taylor.....	103
II.4	Préparation de nanofibres par électrospinning	105
II.5	Etude de l'activité antithrombotique	106
II.5.1	Test d'hémolyse.....	107
II.6	Tests de coagulation.....	107
	Partie III : Résultats & Discussions.....	109
	Chapitre 1 : Nanofibres à base de chitosan/PEO	110
I.	Electrospinning et optimisation des paramètres d'électrofilage.....	110
I.1	Influence du solvant	110
I.2	Influence du rapport de masse CHT/PEO.....	111
II.	Réticulation et stabilisation des nanofibres de CHT/PEO	112

II.1	Stabilisation des nanofibres par voie thermique	113
II.2	Réticulation des nanofibres par voie chimique	114
II.3	Suivi de dégradation des nanofibres en milieu aqueux	114
II.3.1	Nanofibres traitées par voie thermique	114
II.3.2	Nanofibres traitées par voie chimique	115
II.4	Etude du gonflement des NFs	116
II.5	Observation au MEB	117
II.6	Etude par spectroscopie infrarouge	118
II.7	Conclusion	121
III.	Nanofibres de chitosan à activité antibactérienne	122
III.1	Morphologie des nanofibres obtenues	122
III.2	Etude et caractérisation des nanofibres CHT/TCL	123
III.2.1	Résistance du TCL au traitement thermique des nanofibres	123
III.2.2	Analyse thermogravimétrique des NFs chargées de TCL	123
III.2.3	Diffraction par rayons-X	125
III.3	Etude de la cinétique de libération du triclosan	125
III.3.1	Influence du taux de chargement en triclosan	126
III.3.2	Influence du rapport de masse CHT/PEO	127
III.3.3	Influence du procédé de stabilisation des NFs	128
III.3.4	Conclusion	129
IV.	Etude in vitro des propriétés biologiques et microbiologiques	129
IV.1	Etude de cytocompatibilité	129
IV.1.1	Test d'adhésion cellulaire	129
IV.1.2	Test de viabilité cellulaire	130
IV.2	Etude microbiologique	131
IV.2.1	Influence de la quantité du TCL	131
IV.2.2	Influence du procédé de réticulation	132
IV.3	Conclusion	133
Chapitre 2 : Nanofibres à base de chitosan et de polymère de cyclodextrine pour la libération prolongée de triclosan		
135		
I.	Etude du complexe CD/TCL	135
I.1	Diagramme de solubilité :	135
I.2	Résonance magnétique nucléaire du proton :	137
I.3	Analyse thermogravimétrique	138
I.4	Analyse par calorimétrie différentielle à balayage	139
II.	Elaboration de nanofibres antibactériennes à base de chitosan et polymère de cyclodextrine	
	141	

II.1	Nanofibres à base du mélange CHT/PCD pour la libération prolongée du TCL	141
II.1.1	Morphologie des nanofibres	142
II.1.2	Spectroscopie Infrarouge	144
II.1.3	Analyse thermogravimétrique.....	145
II.1.4	Diffraction par Rayons-X.....	146
II.1.5	Etude du comportement des nanofibres en milieu aqueux.....	146
II.1.6	Etude de la cinétique de libération du Triclosan :	149
II.1.7	Etude cinétique : Modèle Korsmeyer-Peppas	151
II.1.8	Conclusion :	152
II.2	Elaboration de nanofibres PCD-CHT en cœur-peau	154
II.2.1	Caractérisation des nanofibres coaxiales	155
II.2.2	Eude du comportement en milieu aqueux.....	159
II.2.3	Etude de Libération du TCL en mode batch	160
II.2.4	Modèle cinétique	161
II.2.5	Conclusion	162
III.	Etude microbiologique	162
IV.	Evaluation de la cytocompatibilité des membranes électrospinnées.....	164
IV.1	Cytotoxicité des NFs par la méthode d'extraction	164
IV.2	Cyctocompatibilité par contact direct.....	166
Chapitre 3 : Sulfonation du Chitosan pour l'électrofilage de nanofibres à propriétés antithrombotiques		
I.	Synthèse et caractérisations de chitosans sulfoniques :	167
I.1	Résonance magnétique nucléaire	168
I.2	Analyse élémentaire.....	171
I.3	Spectroscopie infra-rouge	173
I.4	Spectroscopie UV-visible	174
I.5	Potentiométrie couplée à la conductimétrie	175
I.6	Mesure du potentiel zêta	178
I.7	Chromatographie d'exclusion stérique	180
I.8	Analyse par dispersion de Taylor.....	183
I.9	Mesure des viscosités dynamiques par rhéologie	185
I.10	Conclusion	185
II	Electrospinning du chitosan sulfonique	186
II.1	Tests préliminaires	186
II.2	Optimisation des paramètres.....	187
II.3	Réticulation des nanofibres par la génipine.....	191

III	Etude des propriétés anti-thrombotiques du chitosan sulfonique	193
III.1	Test d'hémolyse.....	193
III.2	Test de coagulation	193
IV	Etude de la cytotoxicité du chitosan sulfoné	197
IV.1	Etude de la viabilité des poudres	198
IV.2	Etude de la viabilité des nanofibres	199
V	Conclusion	200
	Conclusion générale	202
	Perspectives.....	205
	Annexes	207
	Liste des travaux et des communications	217
	Références Bibliographiques.....	218

Principales abréviations

Produits, réactifs et polymères

CD ou HP β CD	: Hydroxypropyle- β - cyclodextrine
PCD ou polyHP β CD	: Polymère d'acide citrique et de Hydroxypropyle- β - cyclodextrine
β CD	: β - cyclodextrine
Poly β CD	: Polymère d'acide citrique et de β - cyclodextrine
CTR	: Acide citrique
CHT	: Chitosan
PEO	: Polyéthylène oxide
AA	: Acide acétique
NaOH	: Soude
Gnp	: Génipine
GA	: Glutaraldéhyde
TCL	: Triclosan
BZ1S	: Sel de sodium de l'acide 2-Formylbenzène sulfonique
BZ2S	: Sel de disodium de l'acide 4-formyl-1,3-benzène disulfonate
CHT1S	: Chitosan mono-sulfonique
CHT2S	: Chitosan di-sulfonique
PU	: polyuréthane
PVA	: Alcool Polyvinylique
PVP	: Pyrrolidone Polyvinylique
PMMA	: Polyméthacrylate de méthyle
PLA	: Acide Polylactique
PLLA	: Acide poly(L-lactique)
PLGA	: Acide poly(lactique-co-glycolique)
PGA	: Acide polyglycolique
PCL	: Polycaprolactone
PP	: Polypropylène
PE	: Polyéthylène
PS	: Polystyrène

HPC	: Hydroxypropylcellulose
GAG	: Glycosaminoglycane
DMF	: N,N-Diméthylformamide
DCM	: Dichlorométhane
TFA	: trifluoroacétique

Appareils et techniques

IR	: Infra-Rouge
UV-vis	: Spectroscopie Ultra-Violet visible
ATG	: Analyse thermogravimétrique
DSC	: Calorimétrie différentielle à balayage
DRX	: Diffraction par rayon-X
MEB	: Microscopie électronique à balayage
MET	: Microscopie électronique à transmission
¹ HRMN	: Résonance magnétique nucléaire du proton
SEC-MALS	: Chromatographie par extrusion stérique couplée à la dispersion de la lumière
TDA	: Analyse par dispersion de Taylor

Abréviation de langage

PA	: Principe actif
NFs	: Nanofibres
UMET	: Unité matériaux et transformations
CPE	: Complexe de polyélectrolytes
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
IH	: Index d'hémolyse
TCA	: Temps de céphaline
TP	: Temps de prothrombine
Anti-Xa	: Anti facteur X activé

Introduction générale

Les biomatériaux sont développés dans le but de renforcer, remplacer ou régénérer un organe déficient pour permettre au patient de retrouver un certain confort, notamment ceux qui sont victimes de maladies chroniques telles que les infections et les douleurs. De nos jours, la médecine est capable de traiter efficacement un large éventail de pathologies d'origine traumatique (fractures osseuses, hernie, rupture de ligaments, etc.) ou causées par des maladies (cancer, maladies cardiovasculaires, infections, douleurs, etc.). Des biomatériaux fonctionnalisés par des principes actifs (PA) sont souvent utilisés comme solutions thérapeutiques pour prévenir ces risques. L'enjeu de la recherche scientifique est donc d'assurer une libération de doses thérapeutiques de principes actifs de manière contrôlée.

En parallèle de leur fonctionnalité, les biomatériaux se doivent d'être biocompatibles et hémocompatibles. Toutefois, la recherche va maintenant bien au-delà de ces exigences car elle offre aux biomatériaux des propriétés supplémentaires qui visent :

1) à accélérer leur intégration dans le corps en activant le processus de développement de certaines cellules (endothéliales, osseuses, etc.)

2) au contraire, à inhiber le développement de certaines cellules à caractère pathologique (cancer, cellules musculaires lisses, etc.),

3) à empêcher le développement d'infections,

4) à servir d' « échafaudages » à la formation de néo-tissus (ingénierie tissulaire)

5) à réduire les phénomènes de thrombose.

Ces objectifs ont pu être atteints au cours des deux dernières décennies dans le domaine de la recherche sur les biomatériaux grâce à l'utilisation de polymères (très souvent d'origine naturelle) présentant certaines des propriétés requises, ou par la mise au point de systèmes de libération contrôlée de principes actifs pharmaceutiques.

Depuis les années 2000, le groupe du Pr Bernard Martel au laboratoire Unité Matériaux et Transformations (UMET) de l'Université de Lille 1 et en collaboration avec l'équipe du Dr Nicolas Blanchemain de l'Unité INSERM U1008 de Lille, étudient conjointement les systèmes à libération prolongée utilisés pour des implants vasculaires (1,2), viscéraux (3), parodontaux (4) ainsi que pour des pansements. Pour cela, de nombreuses approches ont été entreprises. Des surfaces textiles inertes ont été modifiées par des molécules-cages comme les cyclodextrines afin de transformer les dispositifs en réservoirs de molécules actives. En effet, les cyclodextrines présentent une cavité

hydrophobe pouvant inclure des molécules pour former des complexes d'inclusion qui permettent de ralentir la diffusion de molécules actives.

L'objectif de cette thèse est de concevoir un biomatériau à base de nanofibres (NFs) par électrospinning pour la libération prolongée de principe actif antibactérien. Les NFs seront formées à partir d'un mélange de chitosan et de polymère anionique de cyclodextrines formant un complexe de polyélectrolytes. Le chitosan est un polysaccharide cationique biodégradable très utilisé pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques. Le second polymère, issu d'une réaction de réticulation avec l'acide citrique, est choisi pour son caractère anionique mais surtout pour les propriétés de complexation des cyclodextrines et de libération de molécules thérapeutiques.

L'électrospinning offre la possibilité d'incorporer dans la matrice des NFs des molécules actives selon différentes stratégies afin d'obtenir des profils de libération variés. Dans cette thèse, deux stratégies ont été étudiées. Dans un premier temps, des nanofibres monolithiques ont été développées dans lesquelles la fibre est constituée d'un mélange des deux polymères et où le principe actif choisi est complexé avec les cyclodextrines. La deuxième stratégie consiste à préparer des nanofibres coaxiales composées d'un cœur en polymère de cyclodextrines complexant le PA et d'une peau en chitosan.

Par ailleurs, certains biomatériaux sont amenés à être en contact avec le sang notamment les biomatériaux implantables ce qui peut provoquer une thrombose. Ceci concerne les cathéters, les stents, les implants vasculaires, etc. Pour empêcher la formation de thrombose, des biomatériaux à activité antithrombotique ont été élaborés. L'héparine, qui est un glycosaminoglycane (GAG) sulfaté très utilisé pour ses propriétés anticoagulantes, a été immobilisée sur certaines surfaces textiles par exemple (5). D'autres ont fait appel à des polymères « heparin-like » liés par greffage chimique ou par adsorption sur le biomatériau. Ces polymères ont été modifiés en leur apportant des fonctions sulfates et/ou carboxyliques qui sont responsables de l'activité antithrombotique (6–9).

Le chitosan est un biopolymère qui a une structure similaire à celle des glycosaminoglycanes qui sont les principales macromolécules de la matrice extracellulaire. Ce polymère ne possède pas intrinsèquement des propriétés antithrombotiques. L'idée développer dans cette thèse a donc été de modifier le chitosan par des groupements sulfonates de manière à lui conférer la propriété anticoagulante recherchée. Nous avons élaboré ainsi un « GAG artificiel », dont nous avons étudié les propriétés sous forme de polymère et de nanofibres.

Cette thèse se divise en trois parties :

La première partie est dédiée à l'étude bibliographique sur les NFs et les différentes méthodes de fabrication mais également à l'application des NFs pour la libération prolongée de principe actif et les

Introduction Générale

différents facteurs qui influencent la libération. Cette étude est complétée par un état de l'art sur le chitosan et son électrofilage, ses dérivés sulfonés, ses activités antibactériennes et anticoagulantes.

La deuxième partie de ce manuscrit définit les réactifs, les produits, le matériel, les techniques de caractérisation et les méthodes qui ont été utilisés au cours de la thèse.

La troisième partie de ce document se présentera en trois chapitres :

- Le premier chapitre sera consacré à la préparation de nanofibres antibactériennes à base de chitosan sans cyclodextrines et chargées en triclosan et à l'étude de la libération de ce dernier.
- Le deuxième chapitre sera consacré à l'élaboration de nanofibres à base de chitosan et de polymère de cyclodextrine préparées selon différentes stratégies. L'étude de libération du triclosan à partir de ces nanofibres sera étudiée. Des résultats concernant une étude sur l'activité antibactérienne ainsi que la cytocompatibilité des nanofibres chitosan/polymère de cyclodextrines seront exposés.
- Finalement, un troisième chapitre sera consacré à la synthèse et à l'électrospinning du chitosan sulfoné et l'étude de son activité antithrombotique.

PARTIE I: Etude Bibliographique

I. Les nanofibres

I.1 Généralités

Les nanofibres (NFs) sont considérées comme des nanomatériaux dont les fibres ont un diamètre égal ou inférieur à 100 nm. Les nanofibres peuvent être préparées à partir de matériaux organiques comme les polymères (10) ou inorganiques tels les nanofibres de carbone (11) ou les nanofibres en céramiques (12).

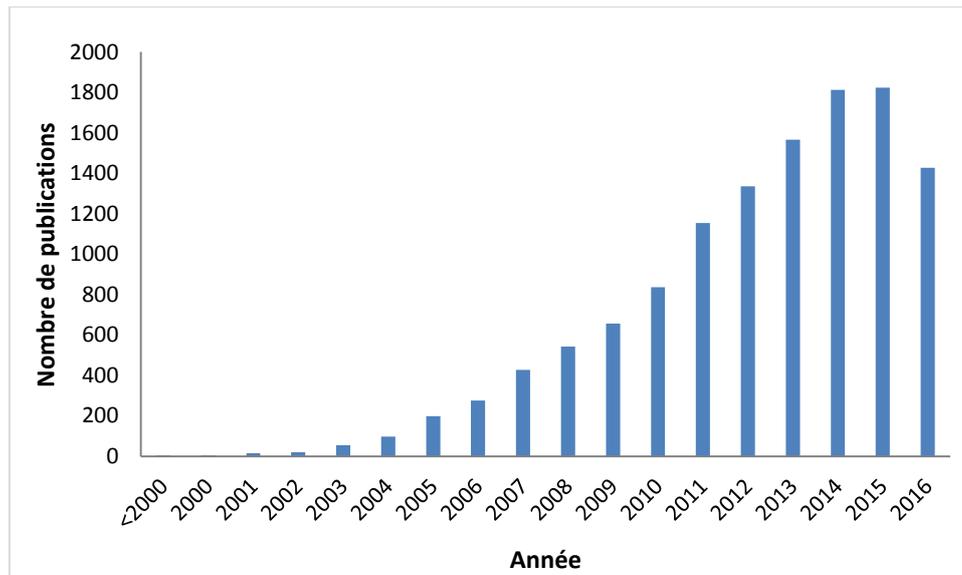


Figure 1: Nombre d'articles publiés entre 1996 et octobre 2016 sur la base de données science direct sur le mot « nanofibres »

Les nanofibres polymériques ont connu une attention particulière avec l'émergence des nanotechnologies dans les années 1990, depuis l'intérêt porté à ce type de matériaux ne cesse de croître. Les premières publications sur la fabrication de nanofibres ont vu le jour en 1995 avec Reneker (21,22) qui a exploité cette technologie pourtant brevetée quelques décennies plus tôt (1934,1939 et 1940). Dans les années 2000, le nombre de publications scientifiques a connu une forte expansion qui se poursuit jusqu'à aujourd'hui (**Figure 1**). Au fil du temps, les domaines d'applications se sont élargis et diversifiés allant de la photocatalyse à la filtration de l'eau et de l'air, jusqu'au domaine de la santé.

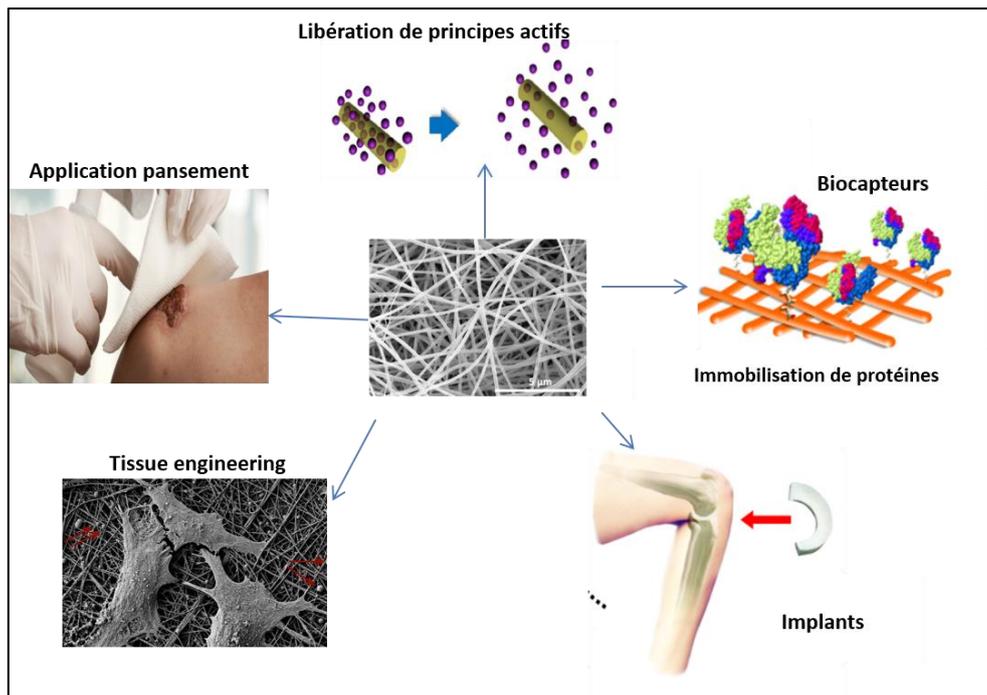


Figure 2 : Applications biomédicales des nanofibres

En effet, un grand intérêt est porté pour les nanofibres dans de nombreuses applications biomédicales telles que l'ingénierie tissulaire, les applications pansements, les biocapteurs, les systèmes à libération ou encore les implants (**Figure 2**). En 2006, apparaît la première étude démontrant la possibilité de faire adhérer des cellules musculaires sur des nanofibres en bicouches de gélatine-chitosan et polyuréthane (PU) (13). La même année une autre étude démontre la possibilité d'incorporer des cellules vivantes dans la matrice nanofibreuse de poly(diméthylsiloxane) (14). En 2007, des nanofibres à base de collagène ont été élaborées pour des applications pansements et pour la régénération des cellules de l'épiderme (15).

I.2 Procédés de fabrication des NFs

Les techniques qui sont reconnues pour la préparation de nanofibres sont: l'électrospinning et ses dérivés, l'auto-assemblage (self-assembly) et la séparation de phase (phase separation). D'autres techniques plus récentes ont émergées permettent de former des fibres de faibles diamètres qu'on abordera dans cette partie.

I.2.1 Electrospinning et dérivés

I.2.1.1 Electrospinning par simple aiguille

I.2.1.1.1 Généralités, Historique

L'électrospinning ou électrofilage est la technique la plus utilisée pour la fabrication de nanofibres. Ce procédé a été inspiré de l'électrospraying qui a été étudié par Lord Raleigh en 1882 (16). Il a étudié l'instabilité provoquée par un champ électrique sur des gouttes de liquide et a calculé la quantité de charges maximales nécessaire à appliquer sur la goutte pour surmonter sa tension de surface et provoquer ainsi un jet. Le premier brevet décrivant la formation de filaments synthétiques ayant des diamètres très fins en utilisant un haut champ électrique (10kV ou plus) a été publié qu'en 1934 par Formhals (17). Dans un second brevet publié en 1939, Formhals décrit un nouveau procédé où il utilise une distance aiguille-collecteur assez grande pour permettre l'évaporation complète du solvant et par la suite la formation d'un composite de fibres qu'on peut aisément détacher du collecteur (18). En 1940, Formhals dépose un troisième brevet où il décrit l'électrospinning d'une solution de polymère directement sur un système tournant (19). Formhals a déposé 22 brevets sur l'électrospinning. Quelques années plus tard, des travaux ont été publiés par Taylor entre 1964 et 1969 dans lequel le comportement d'une goutte de polymère soumis à un haut champ électrique a été étudié. Il a été conclu que la goutte se déforme en formant un cône (aujourd'hui appelé cône de Taylor) lorsque la tension de surface est surmontée par les forces électrostatiques. Il a été aussi démontré que le jet s'éjecte de la pointe du cône formant ainsi des fibres ayant des diamètres très petits de l'ordre de quelques centaines de nanomètres. Le terme « electrospinning » précédemment appelé « electrostatic spinning » a été proposé par Reneker et Chun dans les années 1990 (20).

I.2.1.1.2 Principe de l'électrospinning

Le principe de l'électrospinning est schématisé sur la **Figure 3**. Une solution de polymère est conduite jusqu'à une aiguille. A la sortie de cette aiguille une tension électrique très intense (une dizaine de kV) est appliquée sur la goutte de polymère qui va se déformer en forme de cône de Taylor seulement si la différence de potentiel arrive à surmonter la tension de surface de la goutte. A la pointe du cône un jet s'éjecte. La répulsion des charges à la surface du jet provoque l'étirement de la solution conduisant ainsi à la formation de nanofibres qui viennent se déposer sur un support conducteur dit collecteur.

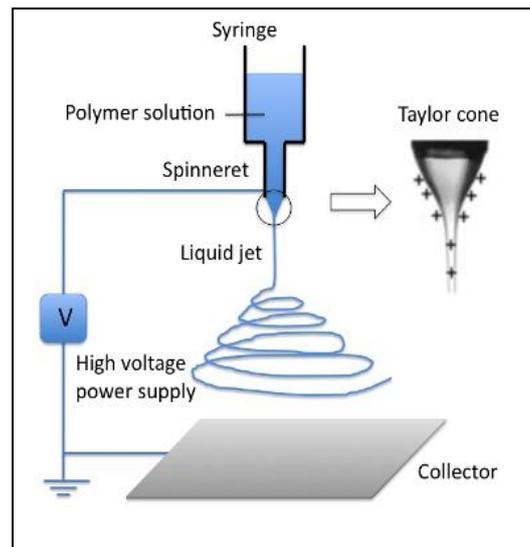


Figure 3 : Schéma du dispositif d'électrospinning

Bien que le principe paraisse simple, la compréhension du processus de formation du jet et toutes les forces qui y sont impliquées est une tâche assez complexe. Reneker et Yarin sont les premiers à avoir publié des études approfondies sur la formation du jet (21,22). Ils ont alors conclu que le jet traverse trois zones avant la formation complète de nanofibres (16) (**Figure 4**): 1) **La zone de Taylor** où un cône se forme suite à l'application d'un champ électrique de haute tension surmontant la tension de surface de la goutte de polymère ; 2) **Une zone de stabilité** où un jet est étiré à partir du cône de Taylor et 3) Une troisième zone qui est la **zone d'instabilité** qui a la forme d'un fouet. A l'extrémité de cette zone le jet subit encore plus d'instabilité et se frise avant de se déposer sur un collecteur. A l'impact du collecteur, le solvant s'évapore jusqu'à ce que la fibre se solidifie.

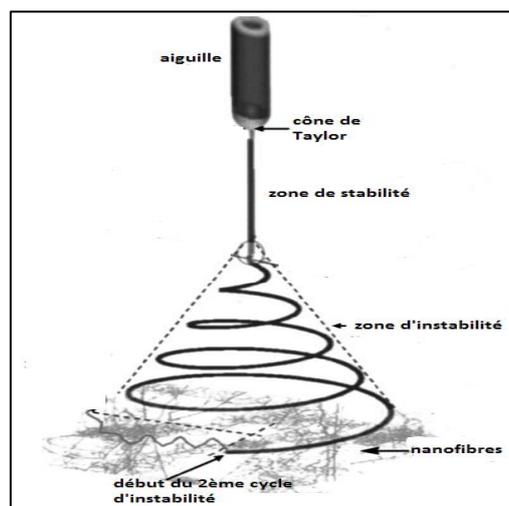


Figure 4 : Schéma de la trajectoire du jet avant la formation des nanofibres

Le procédé d'électrospinning est gouverné par un ensemble de forces : les forces de Coulomb appliquées entre les charges présentes à la surface du jet, les forces électrostatiques induites par le champ électrique externe, les forces viscoélastiques induites par la viscosité de la solution, la tension de surface, les forces gravitationnelles et finalement les forces de l'air (22).

1.2.1.1.3 Paramètres de fabrication

L'obtention de nanofibres avec une morphologie adéquate nécessite le contrôle d'un certain nombre de paramètres. Tout d'abord, il y a les paramètres relatifs à la solution, les paramètres liés à la technique et enfin, les paramètres environnementaux.

1.2.1.1.3.i Paramètres de solution

Les paramètres de solution les plus importants à contrôler sont le choix du solvant, du polymère, de la concentration et du poids moléculaire du polymère. En effet, ces quatre paramètres ont une influence directe sur les propriétés de la solution à électrofiler telles que la conductivité, la tension de surface et la viscosité et par conséquent sur la formation du cône de Taylor et sur la morphologie des nanofibres.

Le choix du solvant a une influence directe sur la tension de surface qui influence à son tour la formation du cône de Taylor ainsi que la morphologie des fibres obtenues. Yang et *al.* ont démontré que des nanofibres sans billes (ou beads en anglais) ont été formées à partir d'une solution de polyvinyle pyrrolidone (PVP) dissous dans de l'éthanol, alors que des fibres avec des billes allongées et des billes plus rondes ont été obtenues lorsque la (PVP) était dissoute respectivement dans du dichlorométhane (DCM) et du *N,N*-diméthylformamide (DMF) (**Figure 5**) (24).

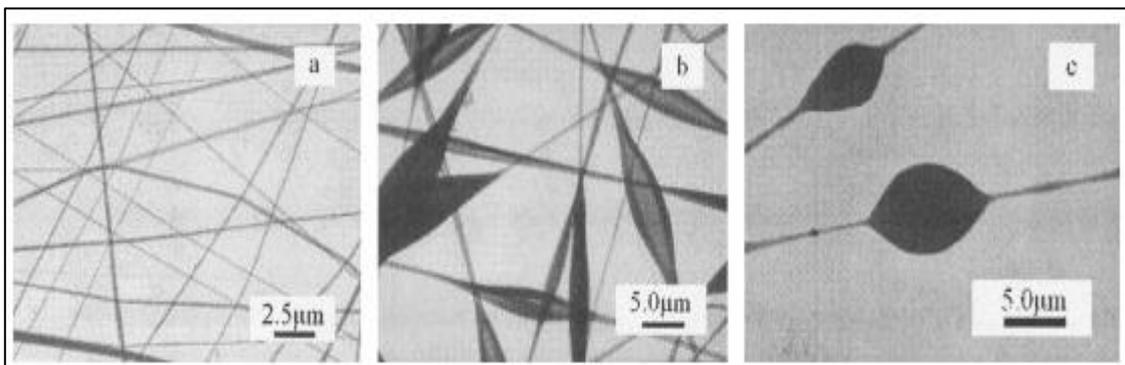


Figure 5: Images MEB de nanofibres de PVP électrospinnées à une concentration de 4 wt% et dissout dans a) l'éthanol b) le DCM et c) le DMF [29]

Le solvant a également un impact sur la conductivité de la solution qui à son tour influe sur la formation du cône de Taylor. En effet, lorsque la conductivité de la solution est faible, il y a très peu

de charges sur la surface de la goutte et par conséquent le cône aura du mal à se former et la goutte finit par tomber sur le collecteur sans formation de fibres. En augmentant la conductivité, on facilite la formation du cône de Taylor.

Le solvant a également un impact sur la conductivité de la solution qui à son tour influe sur la formation du cône de Taylor. En effet, lorsque la conductivité de la solution est faible, il y a très peu de charges sur la surface de la goutte et par conséquent le cône aura du mal à se former et la goutte finit par tomber sur le collecteur sans formation de fibres. En augmentant la conductivité, les charges s'accumulent à la surface de la goutte ainsi la formation du cône devient possible ainsi que le départ du jet.

La **viscosité** est un autre paramètre clé pour l'obtention de nanofibres uniformes et sans billes. La viscosité d'une solution est liée à la concentration choisie. Colby et al. ont identifié quatre régimes de concentrations en mesurant la viscosité en fonction de la concentration d'un polymère en solution(25): dilué, semi-dilué non enchevêtré, semi-dilué enchevêtré et concentré. Les régimes semi-dilué non enchevêtré et enchevêtré sont délimités par une concentration dite d'enchevêtrement (C_e) (voir **Figure 6**). Cette concentration est la concentration minimale limite pour électrofiler une solution. De nombreuses études ont démontré que la concentration idéale pour l'obtention de nanofibres sans billes est une concentration qui se situe au-delà la concentration C_e (26).

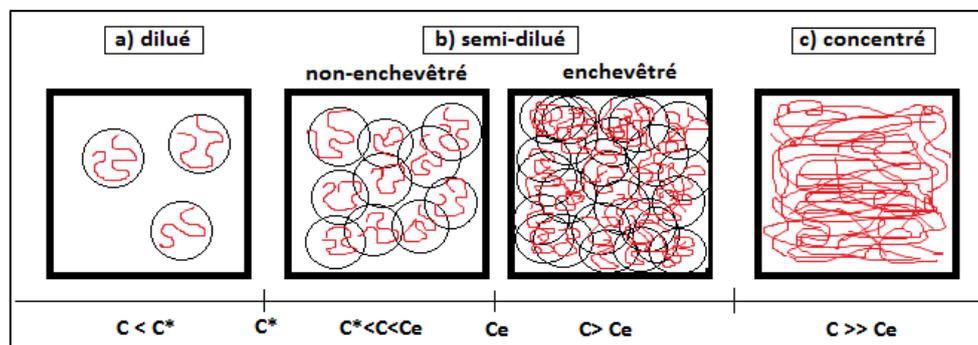


Figure 6 : Effet de l'augmentation de la concentration sur la pelote des polymères en solution

D'autre part, l'augmentation du **poids moléculaire** permet d'augmenter l'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires, ce qui induit une augmentation de la viscosité. Par conséquent un ajustement de la concentration est nécessaire afin d'obtenir une solution « électrofilable » (30,31). Par exemple, Tan et *al.* ont rapporté qu'en augmentant le poids moléculaire de l'acid poly (L-lactique) (PLLA) de 100kDa à 300kDa, une diminution de la concentration de 10% à 4,5% était nécessaire afin d'obtenir des nanofibres ayant le même de diamètre (31).

1.2.1.1.3.ii Paramètres liés à l'instrument

Certains paramètres d'électrospinning sont contrôlés de manière systématique dans les études retrouvées dans la littérature tels que : le voltage appliqué entre l'aiguille et le collecteur, le débit avec lequel la solution est injectée et la distance entre l'aiguille et le collecteur. Ces paramètres ont un effet direct sur la morphologie des nanofibres.

L'effet du **voltage** sur la formation des nanofibres a été largement étudié dans la littérature. Il a été démontré qu'à un voltage relativement faible, le cône de Taylor a du mal à se former provoquant ainsi la formation d'une goutte qui finit par tomber sur le collecteur (**Figure 7**). En revanche, à très haut voltage le cône de Taylor est complètement absorbé et le jet est éjecté rapidement laissant parfois très peu de temps au solvant pour s'évaporer. Zong *et al.* ont démontré qu'en électrofilant de l'acide polylactique (PLA) à 20kV, le jet est éjecté du cône de Taylor et quelques billes seulement se forment. En augmentant le voltage jusqu'à 25kV, le volume de la goutte à l'extrémité de l'aiguille diminue et le nombre de billes augmente. A 30kV, le cône de Taylor disparaît complètement et les billes se multiplient et deviennent plus sphériques (32).

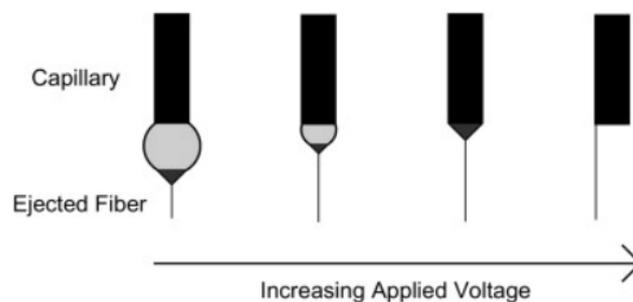


Figure 7: Effet de la variation du voltage sur la formation du cône de Taylor. A un voltage relativement faible la goutte formée à la sortie de l'aiguille pend (schématisée en gris clair). Le cône de Taylor (schématisé en gris foncé) est alors formé à la pointe de la goutte qui pend. En revanche, en augmentant le voltage (de gauche à droite) le volume de la goutte diminue jusqu'à formation du cône de Taylor à la pointe de l'aiguille. Augmenter le voltage encore résulte en la formation d'un jet sans apparition du cône ce qui augmenterait la formation de billes (33)

L'ajustement voltage est également dépendant du réglage du débit avec lequel la solution est injectée. En effet, plus le voltage sera élevé, plus le débit à appliquer sera important (34).

Le débit est un paramètre qui peut aussi avoir des effets sur la morphologie des nanofibres. Il a été reporté que plus le débit était faible, plus les fibres étaient fines et avec un minimum de défauts (32). Un débit trop élevé induit la formation de billes car le solvant ne s'évapore pas complètement lors de l'étirement du jet entre l'aiguille et le collecteur (35). De plus, un débit trop élevé peut déformer les

nanofibres. Megelski et *al.* ont démontré qu'à très haut débit, des fibres ayant la forme de rubans sont formées (35).

En plus du débit et du voltage, le diamètre des nanofibres peut être affecté par **la distance entre l'aiguille et le collecteur** car celle-ci détermine la durée du trajet du jet, et peut avoir un effet sur l'évaporation du solvant (36). En effet, plus la distance est grande, plus le jet est étiré et plus le diamètre sera faible. En contrepartie, plus la distance est faible, moins le jet sera étiré, ce qui conduit à la formation de billes et des problèmes d'évaporation du solvant (37–39).

Il est possible également, grâce à la technique d'électrospinning de contrôler l'orientation des nanofibres en modifiant le **type de collecteur**. Les plus fréquemment utilisés sont les collecteurs plans et les tambours rotatifs. D'autres formes de collecteurs sont utilisées permettant de former des nanofibres alignées comme les disques tournant à très haute vitesse (40) et les électrodes parallèles (41) ou pour obtenir d'autres formes comme les nanofibres sous forme de nid d'abeilles (42). Les nanofibres peuvent aussi être déposées sur du textile (43) ou encore sur des stents métalliques (44). La **Figure 8** représente toutes les formes de collecteurs et supports pour les nanofibres qui viennent d'être cités. Il a été démontré dans de nombreuses études que l'orientation des nanofibres a une influence sur le comportement des cellules. En effet, le développement des cellules est orienté selon la direction des fibres. Par exemple, Fee et *al.* ont démontré que des fibroblastes prolifèrent parallèlement à la direction des nanofibres et adoptent une forme allongée (45). De plus, l'alignement favorise la migration des cellules (46). Il est également possible de former des nanofibres tubulaires permettant la prolifération des cellules endothéliales et ainsi le remplacement des vaisseaux sanguins chez les personnes souffrant de maladies cardiovasculaires (47,48).

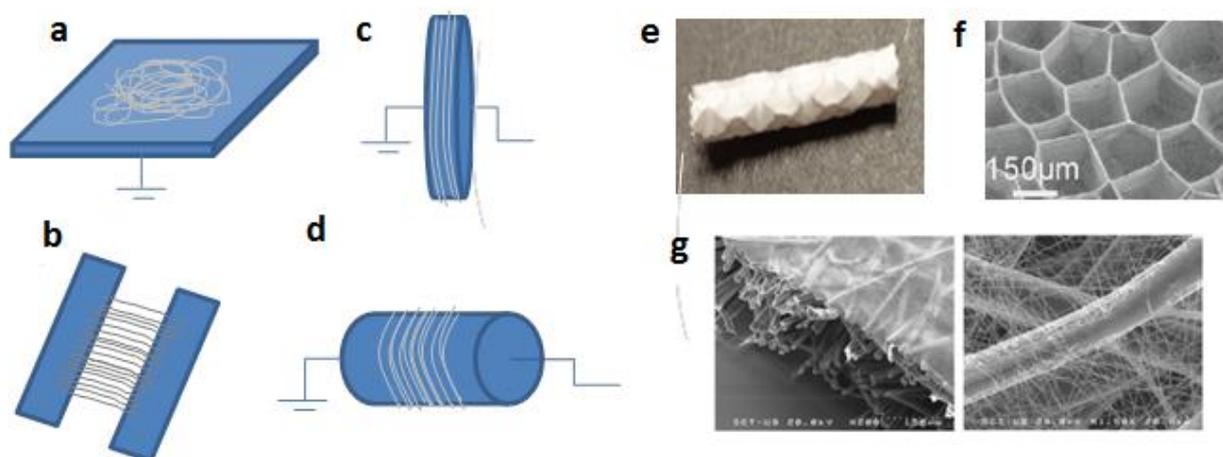


Figure 8 : Exemples de collecteurs utilisés pour l'orientation des nanofibres utilisés pour l'ingénierie tissulaire a) collecteur plan, b) électrodes parallèles c) disque fin d) tambour e) stent f) nid d'abeille g) textile non-tissé

D'autre part, il a été démontré que le **diamètre de l'aiguille** utilisée pour l'électrofilage a un impact sur le diamètre des nanofibres. Mo *et al.* ont rapporté qu'un diamètre d'aiguille de 1.2 mm (jauge 16) conduit à des nanofibres avec billes mais aussi à la formation de bouchon à la sortie de l'aiguille, alors qu'avec un diamètre d'aiguille plus petit (0.4 mm (jauge 26)) des nanofibres sans billes se sont formées (49).

1.2.1.1.3.iii Les paramètres environnementaux

Deux paramètres liés à l'environnement de l'électrospinning sont importants à contrôler : la température et l'humidité relative.

La **température** est un paramètre qui a une influence importante sur l'évaporation du solvant. Lorsque le solvant est évaporé rapidement des nanofibres avec billes peuvent se former.

L'**humidité relative** est aussi un paramètre important à contrôler car il permet de moduler le diamètre des nanofibres ainsi que leur aspect. Il a été démontré qu'en baissant l'humidité relative, le diamètre des nanofibres augmente (50,51) car le jet se solidifie rapidement, ce qui réduit son temps d'étirement et ainsi de grosses fibres se forment (50).

Par ailleurs, l'humidité et la température ont une influence sur la formation de nanopores à la surface des nanofibres (voir **Figure 9**) qui sont d'autant plus grands et importants que l'humidité et la température sont élevés. Ces nanopores sont l'empreinte des gouttes d'eau provoquées par l'humidité et la chaleur et condensées à la suite du refroidissement créé par l'évaporation du solvant. Ou encore, ces pores peuvent être provoqués par la formation de deux phases : une riche et une pauvre en polymère (52).

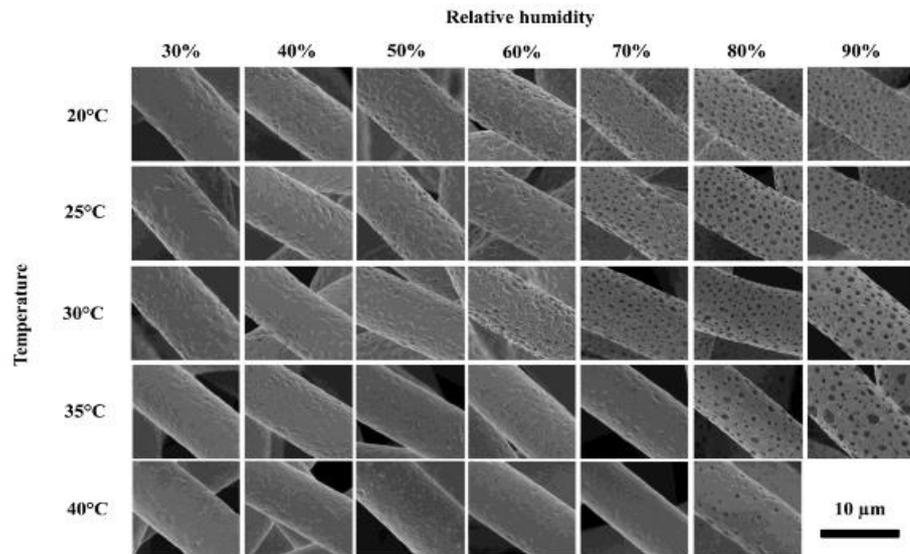


Figure 9 : Photos MEB de fibres électrospinnée à partir d'une concentration de 15% de poly(caprolactone) (PCL) dissout dans du chloroforme à différentes valeurs de température et humidité relative (52)

1.2.1.2 Conclusion

La technique d'électrospinning nécessite le contrôle d'un grand nombre de paramètres ayant chacun son influence sur le produit final. Le **Tableau 1** résume l'influence des différents paramètres sur le diamètre des fibres obtenues.

Tableau 1 : Influence des paramètres de solution et d'électrospinning sur le diamètre des nanofibres (↗ augmente; ↘ diminue)

Paramètres	Impacts
Conductivité	conductivité ↗ diamètre des fibres ↘
Tension de surface	tension de surface ↗ problème à former un cône
Viscosité	viscosité ↗ diamètre ↗
Poids moléculaire	poids moléculaire ↘ viscosité ↘ diamètre ↘
Voltage	Voltage ↗ diamètre ↘
Débit	débit ↘ diamètre ↘ et si débit ↗ risque d formation de billes ↗
Distance aiguille-collecteur	distance ↗ diamètre ↘
Type de collecteur	orientation de nanofibres, réseau structuré
Diamètre d'aiguille	diamètre de l'aiguille ↗ risque d formation de billes ↗
Température et Humidité	formation de nanopores à la surface des fibres en augmentant l'humidité.

1.2.1.3 Variantes de l'électrospinning

La technique d'électrospinning classique à simple aiguille permet d'obtenir des non-tissés avec un temps de productivité relativement long (1mL/h). De ce fait, de nombreux efforts ont été fournis afin d'améliorer la productivité. La partie qui suit décrit les différentes techniques dérivées de l'électrospinning classique pour l'obtention de réseaux tridimensionnels.

1.2.1.3.1 Electrospinning coaxial

L'électrospinning coaxial consiste à utiliser une aiguille coaxiale à deux capillaires dont chacun est relié à un réservoir de solution une pour le cœur et une pour la peau (**Figure 10.a**). Cette méthode a été utilisée pour la première fois par Loscertales et *al.* au début des années 2000 (53). Une étude plus approfondie a été ensuite publiée par Sun et *al.* en 2003 (54). A travers leur études, ils ont montré qu'il était possible d'électrofiler deux polymères identiques, un en cœur et l'autre en peau, en ajoutant un agent comme le bromophénole afin de pouvoir les distinguer par microscopie électronique à transmission. L'électrospinning coaxial offre aussi la possibilité de former des NFs à partir de polymères difficilement électrofilables seuls tels les polysaccharides comme le chitosan (55), l'alginate (56) ou encore l'acide hyaluronique(57).

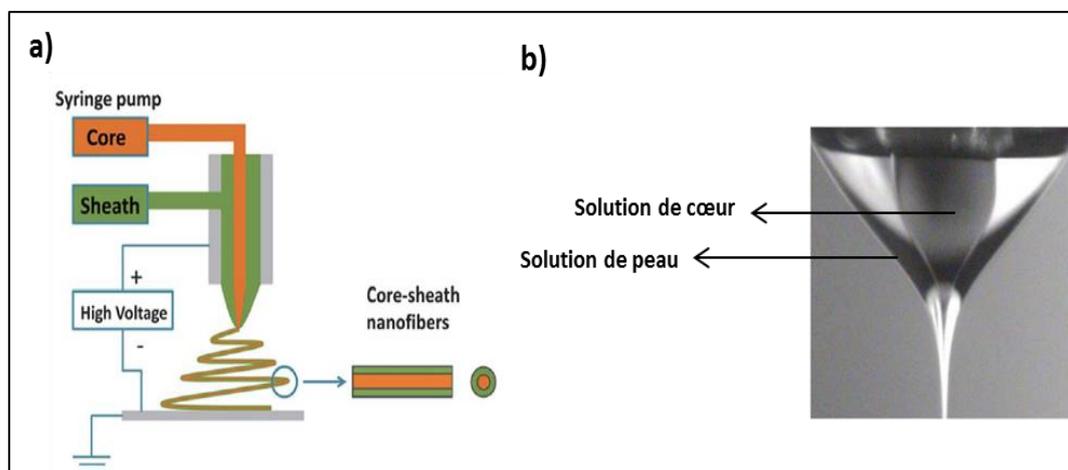


Figure 10: a) Schéma du montage de l'électrospinning de nanofibres coaxiales (58), b) Cône de Taylor formé par la solution de cœur et celle de la peau

Le même principe d'électrofilage décrit pour l'électrospinning à simple aiguille s'applique aussi pour l'électrospinning coaxial. A la sortie de l'aiguille coaxiale, la solution de cœur est enveloppée par la solution de peau formant une seule goutte. En appliquant une haute tension, la goutte se déforme en formant le cône de Taylor identique à celui observé avec l'aiguille simple (**Figure 10.b**). Les charges électriques sont générées à la surface de la goutte donc à la surface de la solution de peau.

Le mouvement de la solution de cœur est alors entraîné par celui de la solution de peau via la viscosité de celle-ci et par friction de contact. La solution de cœur prend ainsi la forme d'un cône. Un jet coaxial est alors éjecté de la pointe du cône. Comme pour l'électrospinning simple aiguille, le jet traverse des zones d'instabilité et subit une déformation à l'approche du collecteur au cours de laquelle les deux solvants s'évaporent et des NFs coaxiales se forment. Cependant, ces instabilités pourraient perturber la formation d'interphase entre le cœur et la peau.

Pour la formation de nanofibres par électrospinning coaxial, il est préférable que la solution de peau soit plus visqueuse que la solution de cœur afin de pouvoir apporter l'enchevêtrement nécessaire pour l'étirement du jet. La solution de cœur ne doit pas obligatoirement être très visqueuse mais doit avoir une viscosité minimale pour permettre au jet de ne pas se rompre lorsqu'il traverse la zone d'instabilité. Une viscosité trop élevée risque de provoquer un colmatage à la sortie de l'aiguille et empêcher les fibres de se former.

Par ailleurs, il est important que les deux solutions soient miscibles afin d'éviter les risques de séparation de phase dus aux tensions interfaciales (59). Pour cela le choix du solvant pour les deux solutions est important.

En outre, la solution de peau doit être conductrice, ce qui n'est pas une obligation pour la solution de cœur.

1.2.1.3.2 Electrospinning à multiples aiguilles

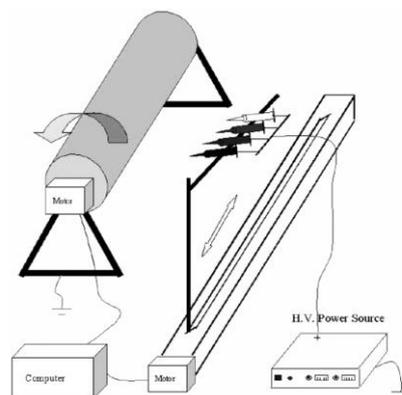


Figure 11 : Schéma du dispositif d'électrospinning à multiples aiguilles sur un collecteur rotatif (60)

En 2004, Ding *et al.* ont imaginé un système avec plusieurs aiguilles distancées de 3 cm placées sur un banc qui fait des mouvements de va-et-vient sur toute la longueur d'un tambour rotatif (Figure 11). Ils ont électrofilé séparément des NFs d'acétate de polyvinyle et d'acétate de cellulose sans avoir à mélanger les polymères dans la même solution (60). Plus tard, Varesano *et al.* ont électrospinné une solution de PEO en utilisant un système à multiples aiguilles en plaçant plusieurs aiguilles côte à

côte. Ils ont observé une répulsion entre les différents jets due aux forces de Coulomb. Ils ont alors obtenu des dépôts séparés (61). Pour remédier à ce problème, Theron *et al.* proposent de rapprocher les aiguilles ainsi un dépôt plus homogène a été obtenu (62). Kim *et al.* proposent une autre alternative en entourant les aiguilles par un cylindre permettant ainsi de concentrer le dépôt (63). Certes, cette technique permet d'améliorer la productivité car le nombre d'aiguilles est multiplié, mais des problèmes dus aux forces de Coulomb freinent le processus de formation d'un dépôt unique. Ceci rend la tâche encore plus laborieuse.

1.2.1.3.1 **Electrospinning par voie fondue**

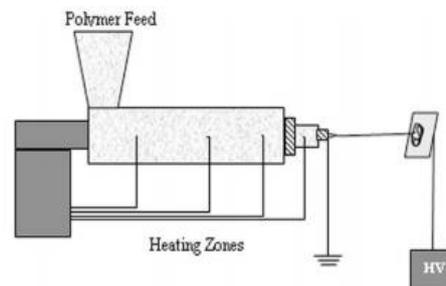


Figure 12: Schéma du dispositif du melt-électrospinning (64)

L'électrospinning par voie fondue ou le « melt-electrospinning » en anglais, est une technique qui dérive de l'électrospinning classique et de l'extrusion par soufflage (appelée meltblown en anglais). Le dispositif du « melt-electrospinning » est schématisé sur la **Figure 12**. En « melt-electrospinning » le polymère est à l'état fondu comme son nom l'indique. Ceci est un avantage pour certains polymères synthétiques tels que le polypropylène (PP) qui sont insolubles à froid et ne peuvent donc pas être électrospinnés par voie liquide classique ou encore les polyesters qui sont également largement exploités. La connaissance des propriétés thermiques des polymères est primordiale avant d'utiliser cette technique car ils doivent être stables à haute température. En revanche, certains polymères de synthèse sont plus complexes à étudier, particulièrement ceux qui contiennent des unités non-dégradables et ceux qui se décomposent à la chaleur engendrant parfois un produit toxique. Les polymères naturels ne sont malheureusement pas utilisés car ils se dégradent avant d'atteindre leur température de fusion. Grâce à cette technique, les problèmes liés à la solubilité des polymères à froid et à l'évaporation du solvant sont écartés.

La taille des fibres obtenues avec cette technique n'est pas de l'ordre du nanomètre mais plutôt du micromètre. Lyons *et al.* ont rapporté la fabrication de fibres de PP par « melt-electrospinning » à une température de 200°C présentant des diamètres < 10µm (64). De plus, la mise en place d'une

machine pour le « melt-electrospinning » est plus complexe qu'une machine pour l'électrospinning classique (65).

I.2.1.3.2 Electrospinning par soufflage d'air

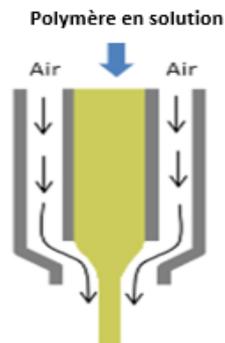


Figure 13: Schéma de l'orifice de l'électroblowing (66)

L'électrospinning par soufflage d'air (electroblowing en anglais) est une technique dérivée de l'électrospinning classique (**Figure 13**). La taille des fibres obtenues est de l'ordre de 80-950 nm. Cette technique permet de faciliter le départ du jet et d'assurer sa continuité mais également d'augmenter la productivité (67). En effet, les forces de l'air ajoutées permettent d'accélérer le départ du jet et par conséquent le rendement de la production augmente. Liu *et al.* ont augmenté la productivité de nanofibres de PVA de 0,2mL/h (électrospinning classique) jusqu'à 2,2mL/h (électroblowing) soit 11 fois plus (66).

I.2.1.3.3 Electrospinning sans aiguilles

Le « roller electrospinning » est une méthode développée en 2003 à l'université technique de Liberec en République Tchèque par Jirsak *et al.* [59]. La première machine à être commercialisée porte le nom de Nanospider™, elle est mise sur le marché par la compagnie ElMarco à Liberec (République Tchèque). Le dispositif du « roller electrospinning » est schématisé sur la **Figure 14**. Il contient une électrode en rotation appelée « roller » semi immergée dans un bain de polymère. Un collecteur lié à la masse est placé en hauteur en face du roller. La spécificité de cette technique est qu'elle permet de former un jet sans l'utilisation d'aiguille. Yener *et al.* démontrent que pour une concentration de 10% de poly(butyril vinylique) (PVB), la productivité est de 2g/min/m [60].

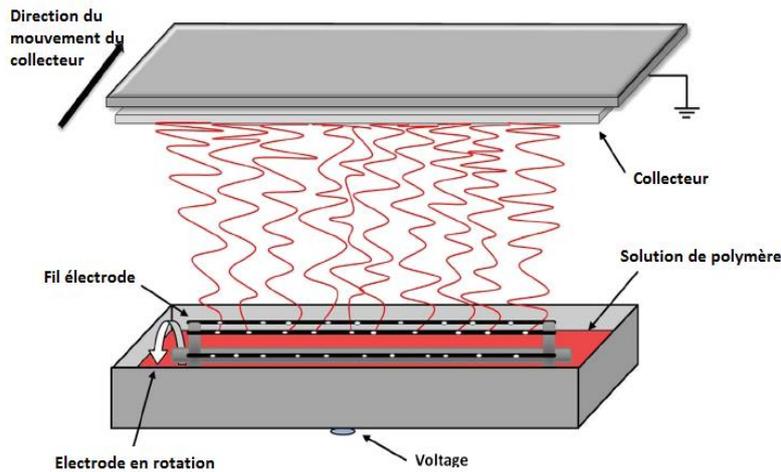


Figure 14: Schéma du dispositif du roller électrospinning (44)

L'**électrospinning à bulles** ou le « bubble electrospinning » est un procédé qui a été inventé en 2007 en imitant le Nanospider™. La solution à électrofiler est placée dans un récipient faisant office de réservoir. Cette solution est soumise à haute tension électrique et à une pression de l'ordre de 0.1 bar. A la surface de la solution, des bulles sont créées et étirées formant ainsi des fibres qui seront déposées sur un collecteur conducteur.

Le dispositif schématisé sur la **Figure 15**, se compose d'un générateur haute tension, d'une pompe à air et d'un réservoir cylindrique ayant une ouverture en haut. Un tube placé en bas du réservoir permet l'entrée d'air dans la solution créant ainsi des bulles. Une haute tension électrique est appliquée sur la solution grâce à une électrode reliée au cylindre par le bas permettant le passage de courant. Ainsi, les bulles créées à la surface se déforment et s'étirent en formant un cône similaire au cône de Taylor. De multiples jets s'éjectent alors des extrémités des bulles formant des nanofibres ayant des diamètres pouvant aller jusqu'à 200 nm (68). Le nombre de jets dépend du nombre de bulles formées qui dépendent de la pression d'air appliquée à la solution de polymère. Les mêmes problèmes liés à l'instabilité du jet sont rencontrés avec cette technique. L'avantage est sa haute productivité comparée à l'électrospinning classique. Hernández-Navarro *et al.* ont démontré que la productivité de nanofibres de polyfluorure de vinylidène (PVDF) par la technique bubble-electrospinning était de 13,93 mL/h, alors que par électrospinning classique elle ne dépassait pas les 5 mL/h (69). Malgré tous ces points positifs, cette technique est peu exploitée car le montage d'une machine à l'échelle du laboratoire est plus complexe et laborieux qu'une machine de l'électrospinning classique.

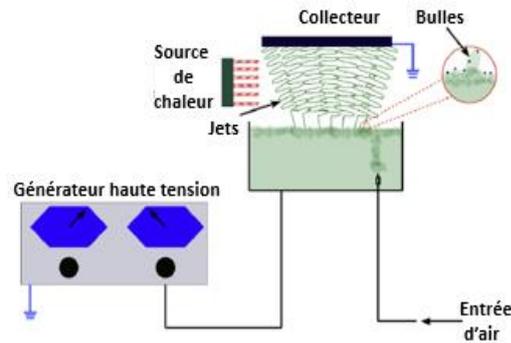


Figure 15: Schéma du dispositif du Bubble-electrospinning (69)

1.2.2 Autres techniques de fabrication

1.2.2.1 L'auto-assemblage

Le principe de l'auto-assemblage consiste à organiser de manière spontanée, sans aucune intervention extérieure, des chaînes moléculaires désordonnées. Cette organisation se fait par des liaisons de faibles énergies non covalentes de type hydrogènes, électrostatiques ou de Van der Waals. Lorsque ces trois types d'interactions sont combinées, un assemblage supramoléculaire très stable peut être formé (70). La **Figure 16** schématise les différentes étapes de préparation de nanofibres avec cette technique.

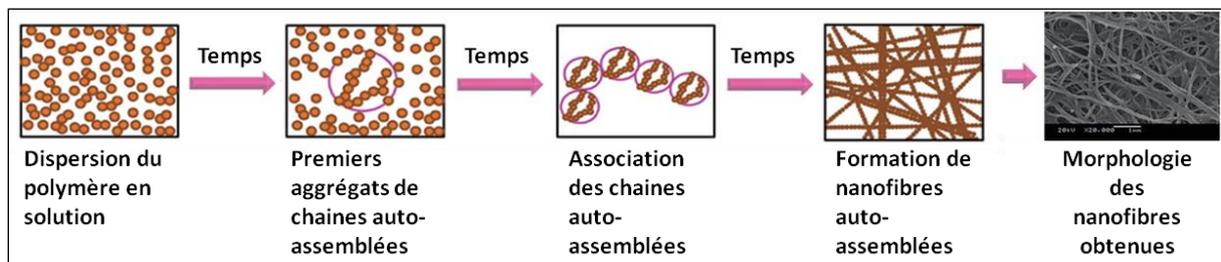


Figure 16: Schéma représentant les différentes étapes de formation de nanofibres de chitosan auto-assemblées (71)

L'auto-assemblage des peptides amphiphiles a été largement étudié (72–77). Hartgerink *et al.*, ont obtenu des nanofibres à partir de peptides amphiphiles de 5 à 8 nm de diamètre et 1 μm de longueur (76). Des nanofibres à base de polymères naturels comme la chitine ou le chitosan, ont également pu être formées par auto-assemblage. Rolandi et Rolandi ont rapporté la préparation de nanofibres à base de chitine obtenue par auto-assemblage en solubilisant le polymère dans un solvant organique (n-hexafluoro-2-propanol (HFIP)) ce qui provoque la rupture des liaisons hydrogènes du polymère (78). Une fois le solvant évaporé, des nanofibres longues de quelques microns et avec des diamètres inférieurs à 10 nm sont obtenues (**Figure 17**). Des nanofibres à base d'un dérivé de chitosan ont

également pu être préparées par auto-assemblage en utilisant une concentration de polymère à 3.33 mg/ml dispersé dans de l'eau distillée. Les fibres obtenues avaient un diamètre de $112.32 \text{ nm} \pm 11.96 \text{ nm}$ (71).

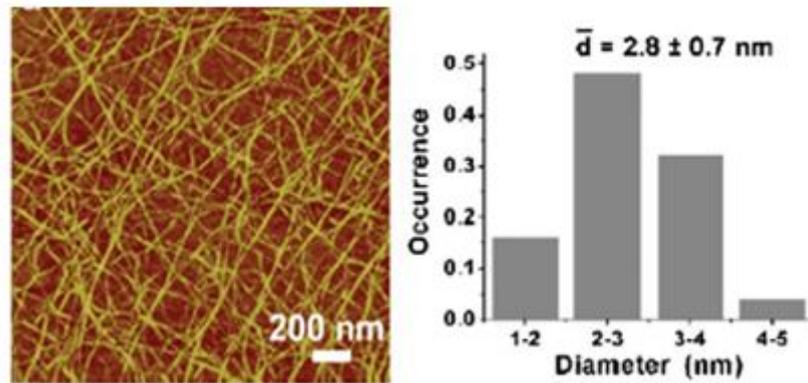


Figure 17 : Images AFM de nanofibres obtenues par auto-assemblage et distribution des diamètres (78)

Cette technique permet d'obtenir des nanofibres très fines de quelques nanomètres de diamètre (79). Cette caractéristique convient parfaitement à produire pour des substrats imitant la matrice extracellulaire. En revanche, le procédé de fabrication est assez complexe et long.

1.2.2.2 Séparation de phase

Il s'agit d'une séparation thermodynamique d'un polymère en solution en une couche riche et une couche pauvre en polymère. Elle nécessite la dissolution du polymère dans une solution à haute température suivie d'une étape de séparation de phase liquide-liquide ou solide-liquide provoquée par une baisse de la température (Figure 18)

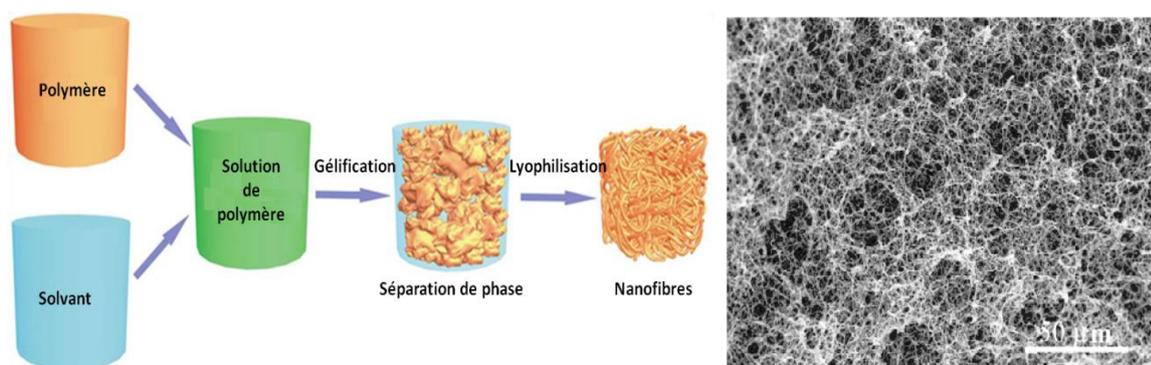


Figure 18: Schéma du procédé de séparation de phase pour la préparation de nanofibres (80)

Le polymère passe par une étape de gélification, qui est l'étape clé pour l'obtention de structures poreuses. Par la suite, le gel formé est séparé du solvant puis lyophilisé (81). L'obtention de

nanofibres avec cette technique nécessite un contrôle minutieux de certains paramètres tels que le système de solvant, la concentration du polymère, le temps de gel et la température. Dans le cas contraire une structure spongieuse avec des pores sphériques sera obtenue. Cette méthode est surtout utilisée pour la préparation de « scaffolds » en trois dimensions pour l'ingénierie tissulaire (81). Des structures hautement poreuses sont ainsi obtenues (98%) avec des diamètres de fibres d'environ 160 nm et une longueur de fibres entre 1 et 2 μm (82). Cette structure permet une bonne diffusion des cellules au cœur du matériau. Différents polymères ont été utilisés par ce procédé tels que le PLLA (82), le poly(3-caprolactone)-*block*-poly(L-lactique) (PCL-b-PLLA), le poly(3-caprolactone)-*block*-acide poly(L-lactique-co-3-caprolactone) (PCLA), le polyhydroxyalkanoate, le chitosan et la gélatine.

Ce procédé de fabrication ne nécessite pas d'équipements très coûteux. Cependant, le nombre d'étapes nécessaires rend le procédé assez long.

1.2.2.3 Filage basé sur les forces centrifuges

Les machines de filage par force centrifuge sont destinées initialement à la production de barbe à papa datant du 19^{ème} siècle (83). Il s'agit d'une technique qui permet la production de masse de nanofibres. Le principe basé sur les forces électrostatiques en électrospinning est ici remplacé par des forces centrifuges. En s'affranchissant des problèmes liés au champ électrique, des solutions conductrices et non-conductrices peuvent être filées. Des polymères à l'état fondu peuvent également être filés (84).

Le système est composé d'un moteur faisant tourner une chambre en plastique qui est munie d'un ou plusieurs orifices. Autour de cette chambre, des barres parallèles se dressent permettant la collecte des fibres. La distance entre ces barres et la chambre est ajustable. Une languette flexible est attachée à la chambre faisant barrage à l'air et facilitant ainsi le filage. Le schéma du dispositif est donné sur le **Figure 19**. Le principe de filage consiste à injecter de manière continue la solution à filer à un certain débit dans une chambre qui sera ensuite conduite jusqu'à un orifice. Lorsque les forces centrifuges provoquées par la rotation du moteur excèdent les forces capillaires exercées par la solution dans la paroi interne de l'orifice, le fluide va s'étirer et un jet va s'éjecter de la chambre en rotation. Le jet s'étire et s'affine grâce aux forces de cisaillement générées par une combinaison entre les forces centrifuges, la résistance à l'air et l'évaporation du solvant. Il a été démontré que les forces centrifuges augmentent avec la vitesse de rotation angulaire. Des fibres de PLLA, de PVP ou

encore des fibres à base de polymère et céramique ont pu être électrofilées (85,86), (87). Le diamètre des fibres est de l'ordre de quelques micromètres (entre 1 μ m et 5 μ m).

L'entreprise américaine Fiberio est la première à avoir commercialisé cette méthode sous le nom de Forcespinning™, développée par un groupe de recherche de l'université de Texas Pan American.

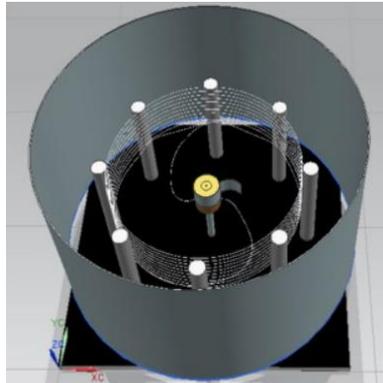


Figure 19: Dispositif du Forcespinning™

1.2.2.4 Magnétospinning

Cette technique a été développée en 2015 par des chercheurs américains de l'Université de Géorgie, dans le Laboratoire des Matériaux Nanostructurés. Le principe de cette technique est basé sur les forces d'attraction magnétiques. Le dispositif est muni d'une boule magnétique collée à un plateau tournant (**Figure20**). La solution de polymère est mélangée à des nanoparticules magnétiques et elle est dirigée vers la sortie d'une aiguille qui est placée en face de la boule magnétique. Lorsque l'aimant est suffisamment proche de la goutte de polymère, celle-ci s'étire et un « pont » de polymère se forme entre l'aimant et l'aiguille. La rotation du plateau permet d'étirer le fil de polymère ainsi, une fibre se forme entre l'aiguille et l'aimant (88). Des fibres à base de polymères comme le PCL, le Nylon 6 ou encore l'alginate ont pu être élaborées. Leur diamètre est de l'ordre du micromètre (>5 μ m) (88)

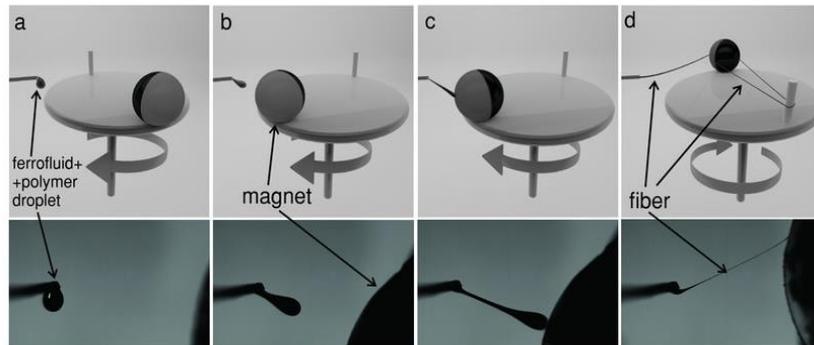


Figure 20: Schéma du dispositif du magnétospinning a) Une goutte pointe de l'aiguille pendant que l'aimant tourne sur un plateau circulaire. Les deux zones grise et noire définissent respectivement le pôle nord et sud de l'aimant. b) Lorsque l'aimant s'approche de la goutte, celle-ci est attirée par les forces magnétiques vers l'aimant. c) Un pont de fluide se forme entre l'aimant et l'aiguille. d) L'aimant continue à tourner et emporte les fibres avec lui en laissant le solvant s'évaporer [68].

I.2.3 Conclusion

Le **Tableau 2** résume les avantages et inconvénients des différentes techniques de fabrication des nanofibres. Parmi les trois techniques de fabrication de nanofibres, la technique d'électrospinning est la plus avantageuse pour la formation de nanofibres polymériques. En effet, le contrôle des différents paramètres permet de mieux maîtriser le diamètre et la morphologie des nanofibres obtenues. Il est également possible d'obtenir des nanofibres poreuses, en cœur-peau obtenues à partir de différents polymères. De plus, il est possible d'avoir des nanofibres ayant des orientations isotropes ou anisotropes. Toutes ces caractéristiques permettent d'adapter les nanofibres électrofilées à un nombre très large d'applications.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de fabrication de nanofibres

Techniques de fabrication	Avantages	Inconvénients
Electrospinning et dérivés :		
Aiguille simple	<ul style="list-style-type: none"> -Aiguille modulable -Machine modifiable et adaptable -Jet continu et nanofibres régulières -Equipement peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> -Faible productivité
Electrospinning coaxial	<ul style="list-style-type: none"> -incorporation d'un polymère non électrofilable -Meilleures propriétés mécaniques -Réservoir de principes actifs 	<ul style="list-style-type: none"> -Paramètres supplémentaires à contrôler
Aiguilles multiples	<ul style="list-style-type: none"> -Meilleure productivité -Possibilité d'électrospinner différents types de polymères en même temps 	<ul style="list-style-type: none"> - problèmes de répulsion entre les différents jets
Roller electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> Productivité élevée 	<ul style="list-style-type: none"> -Diamètre difficilement contrôlable -Equipements coûteux
Melt electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> -Pas d'utilisation de solvant -Nanofibres super alignées 	<ul style="list-style-type: none"> -Limité à quelques polymères -Diamètres plus gros de l'ordre de quelques micromètres
Bubble electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> - productivité élevée 	<ul style="list-style-type: none"> -Equipements plus complexes -Faible contrôle sur la taille des du diamètre
Electroblowing	<ul style="list-style-type: none"> -productivité élevée -Départ du jet facilité 	<ul style="list-style-type: none"> - Paramètre de plus à contrôler (puissance du jet d'air) -Montage plus complexe
Autres techniques		
Auto-assemblage	<ul style="list-style-type: none"> -Diamètres très fins pouvant atteindre les 10 nm 	<ul style="list-style-type: none"> -Temps d'expérience très long -Economiquement non rentable -Procédé assez complexe
Séparation de phase	<ul style="list-style-type: none"> -Structures poreuses -Equipement peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> -Procédé relativement long -Limité à quelques polymères
Par centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> -Possibilité d'utiliser ou non le solvant -Productivité très élevée (g/min) 	<ul style="list-style-type: none"> -Plus complexes et coûteuse -Contrôle limité sur la taille des nanofibre -Diamètres de l'ordre du micromètre
Magnétospinning	<ul style="list-style-type: none"> -pas d'utilisation de tension électrique 	<ul style="list-style-type: none"> -L'ajout d'élément magnétique dans la solution est indispensable -Très peu de données sur cette technique -diamètres allant jusqu'à 10µm

I.3 NFs pour applications biomédicales

I.3.1 NFs pour la libération de principe actif

I.3.1.1 Généralités

Les systèmes nanométriques à libération de PA révolutionnent aujourd'hui le domaine biomédical, car ils permettent aux agents thérapeutiques d'être libérés de façon contrôlée. La libération contrôlée permet d'éviter les risques de toxicité liés à la libération immédiate d'une grande quantité de principe actif (**Figure 21**) mais également de se situer le plus longtemps possible au-dessus du seuil d'activité. Dans notre étude nous allons nous intéresser à la libération prolongée de principes actifs via des systèmes nanofibreux pour remédier à différentes pathologies telles que les douleurs chroniques, les infections, les thromboses tardives, etc., selon le choix du principe actif.

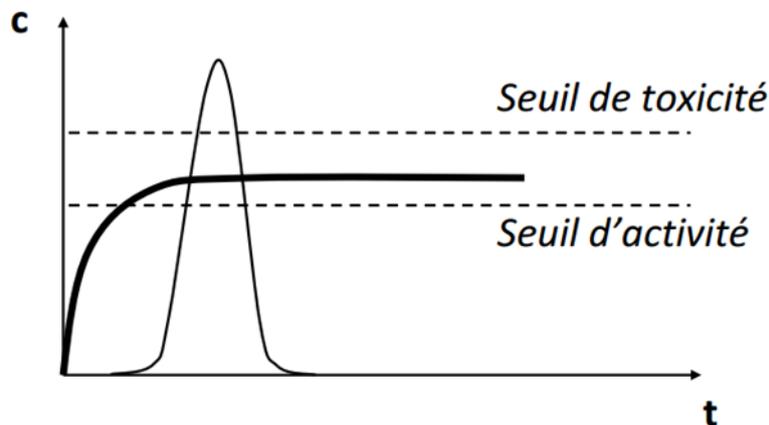


Figure 21 : profils de libération types représentant une libération immédiate dépassant le seuil de toxicité et une libération prolongée au dessus du seuil d'activité

Dans la littérature, de nombreux systèmes nanométriques existent : les nanoparticules, les liposomes, les micelles et les nanofibres (89).

Notre attention portera au cours de ce travail sur les nanofibres électrospinnées de par le grand nombre d'avantages qu'elles présentent :

- 1) Importante capacité d'encapsulation de principe actif jusqu'à 60% par rapport à la masse du polymère (90)
- 2) Amélioration la solubilité de principes actifs lipophiles (PA dispersé dans la matrice de NFs à l'état amorphe), ce qui permet d'augmenter leur biodisponibilité et par conséquent leur efficacité thérapeutique
- 3) Grande diversité de polymères biocompatibles avec d'excellentes propriétés mécaniques,
- 4) Possibilité de moduler la libération en contrôlant les différents paramètres (concentrations, diamètre des NFs, etc...)

- 5) Grande surface spécifique permettant l'absorption de grandes quantités de principes actifs
- 6) Morphologie similaire à celle de la matrice extracellulaire des tissus humains pour l'ingénierie tissulaire

1.3.1.2 Les mécanismes de libération

Les mécanismes de libération, appelés aussi phénomènes de transport de masse, permettent de comprendre comment le principe actif se libère à partir de la matrice polymère. Ces mécanismes dépendent essentiellement de la nature du polymère (hydrophile ou non), de la solubilité du principe actif et du milieu de libération. On distingue trois mécanismes de libération : la diffusion, le gonflement et l'érosion/ dégradation

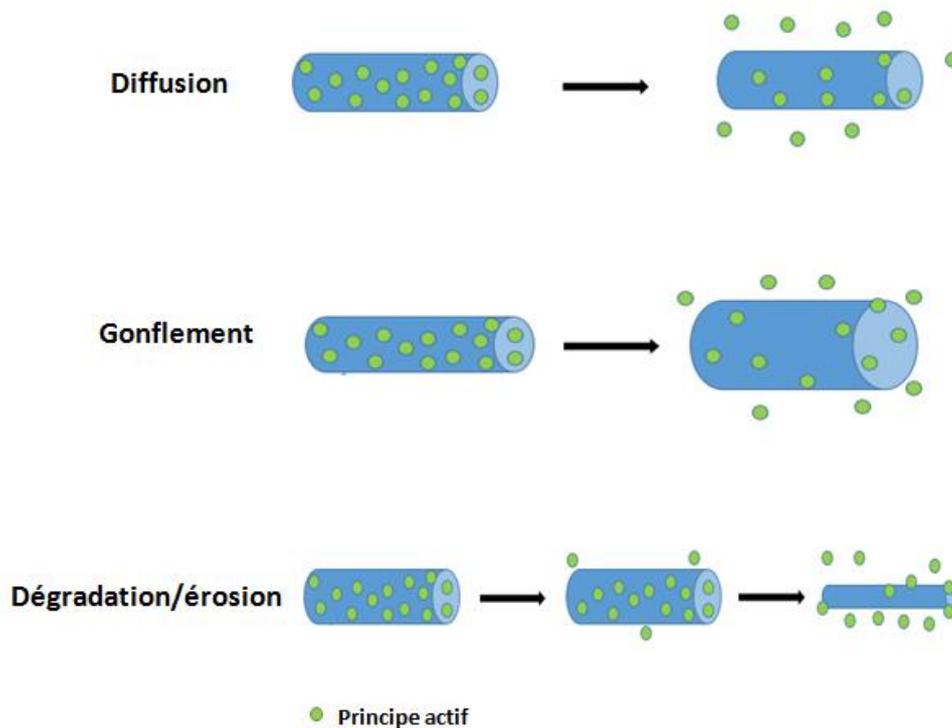


Figure 22: Schéma des différents mécanismes de libération

La diffusion a généralement lieu quelle que soit la nature du polymère. Le PA diffuse d'abord à travers la matrice du polymère pour ensuite diffuser dans le milieu de libération. Le profil de libération par diffusion dépend de la nature du PA, de sa solubilité dans le milieu de libération, de sa diffusion au sein de la matrice polymère, mais aussi du taux de chargement et de son état physique (amorphe ou cristallin) (91). Le **Figure22** présente un schéma du mécanisme de libération par diffusion.

La libération par **gonflement** a lieu lorsque le solvant pénètre dans la matrice polymérique et provoque la relaxation des chaînes de polymère. Cette relaxation permet la libération du principe actif. Le mécanisme par gonflement inclut les dispositifs dont le gonflement est l'étape la plus importante de la libération mais où d'autres phénomènes de transport de masse peuvent avoir lieu tels que la diffusion et la dégradation du polymère. La **Figure 22** représente un schéma du mécanisme de libération par gonflement.

La **dégradation** se produit suite à une rupture des chaînes polymériques en oligomères ou monomères, par dégradation enzymatiques ou par érosion où le polymère se dégrade suite à une abrasion. La vitesse de libération du principe actif dépend ici de la vitesse de dégradation du polymère. Généralement la libération par dégradation est précédée par une diffusion du principe actif. Ce mécanisme diffusion + dégradation et/ou érosion est le plus décrit dans la littérature (92). La **Figure 22** représente un schéma du mécanisme de libération par dégradation.

1.3.1.3 Choix du polymère

La vitesse et le mécanisme de libération du principe actif sont modulés principalement par la nature du polymère, sa forme physique, sa masse moléculaire. Une sélection appropriée du polymère qui constituera le support nanofibreux est donc nécessaire pour atteindre un profil de libération prolongée. On distingue deux grandes familles de polymères pour lesquels les mécanismes de libération seront différents: les non-(bio)dégradables et les (bio)dégradables.

1.3.1.3.1 Polymères non-(bio)dégradables

Les nanofibres préparées à partir de polymères non-dégradables sont généralement très peu influencées par le milieu environnant, la libération est alors assurée par diffusion. Parmi ces polymères, on cite le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le silicone, le polyéthylène acétate de vinyle (EVA), le nylon-6 et le polycarbonate. Ces polymères sont biocompatibles et ont une bonne durabilité avec d'excellentes propriétés mécaniques (93). Ils sont destinés à des usages de longue durée comme pour une utilisation en tant que ciments orthopédiques (94) ou comme implants dentaires (95) ou l'enrobage de stents métalliques pour l'obtention de stents actifs (96).

Des études ont été menées également sur des nanofibres électrofilées en polyuréthane (PU) fonctionnalisées par des nanoparticules d'argent (97), de l'acétate de chlorhexidine (98), du kétoprofène (99) ou encore du paclitaxel (100). Sohrabi *et al.* ont électrospinné des nanofibres en cœur-peau avec du Nylon 6 comme polymère de peau et du PMMA en cœur chargé avec différentes

concentrations d'ampicilline, démontrant qu'un effet « *burst* » se produit pendant les premières 6 heures suivi d'une libération prolongée par diffusion du PA jusqu'à 12 jours (voir **Figure 23**) [83].

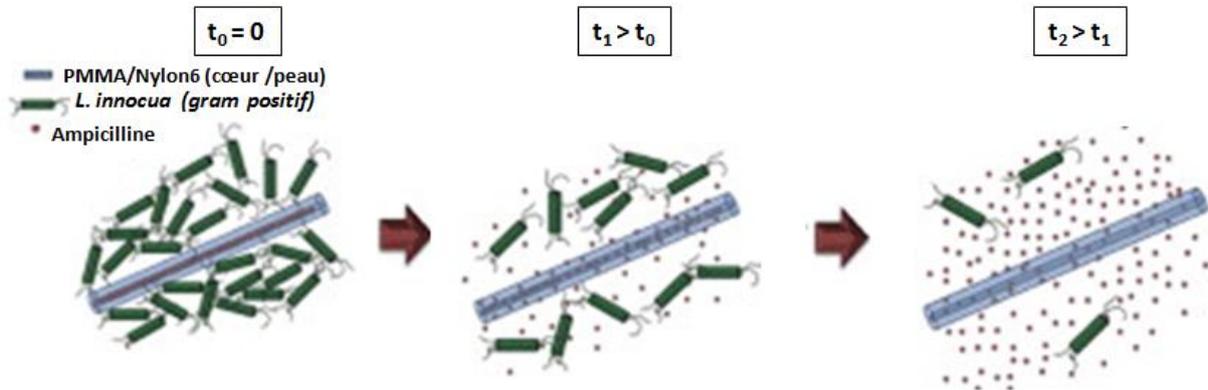


Figure 23: Schéma d'une libération prolongée de l'ampicilline incorporé dans le cœur de nanofibres coaxiales [83]

En revanche, ces polymères présentent un certain nombre d'inconvénients. Leur non (bio)dégradabilité implique leur retrait après libération du PA et donc, une seconde opération chirurgicale est nécessaire, ce qui peut provoquer des complications supplémentaires subies par patient. Par ailleurs, comme dans le cas des stents actifs enrobés de polymère non résorbable, des risques d'inflammation peuvent se produire conduisant à des thromboses tardives aiguës.

1.3.1.3.2 Polymères (bio)dégradables

Les polymères (bio)dégradables représentent la classe la plus importante des polymères utilisés pour la libération de principes actifs. Les nanofibres biodégradables peuvent être composées de polymères naturels (protéines, polysaccharides), synthétiques (PLA, PCL, etc) ou d'un mélange des deux types de polymères. La libération du principe actif dépend de la vitesse de dégradation de la membrane nanofibreuse. Un phénomène de diffusion peut se produire dans un premier temps où le principe actif présent à la surface de la membrane se libère. Ensuite, au fur et à mesure que le polymère se décompose le principe actif présent à l'intérieur de la fibre se libère.

1.3.1.3.2.i *Polymères naturels*

Les polypeptides, les polysaccharides, les polynucléotides et les lipides sont les polymères naturels les plus utilisés dans la fabrication des biomatériaux nanofibreux. L'intérêt porté à ce type de polymères provient essentiellement de leurs structures chimiques qui ressemblent à certaines macromolécules de la matrice extracellulaire. D'autre part, ces polymères peuvent avoir des activités

biologiques intéressantes comme des propriétés antibactériennes ou hémostatiques (e.g chitosan) ou encore anticoagulantes (e.g l'héparine).

Les polysaccharides de type polyélectrolytes sont parmi les polymères les plus utilisés pour contrôler la libération de principe actif. En effet, grâce à leur caractère polyélectrolyte, il est possible de contrôler la libération d'un PA notamment en faisant varier le pH. Par exemple, Ardeshirzadeh *et al.* ont chargé des nanofibres de chitosan avec de la doxorubicine encapsulée dans de l'oxyde de graphène. Ils ont démontré que la vitesse de libération de la doxorubicine était moins rapide dans un milieu neutre qu'en milieu acide (voir **Figure 24.a**) (101). De même Laha *et al.* ont étudié la libération de la pipérine à partir de nanofibres de gélatine dans différents pH. Ils ont démontré que plus le pH était acide, plus le principe actif était retenu dans la matrice. En effet, à pH acide les groupements hydrophiles du polymère sont protonés, ce qui empêche la formation de liaison hydrogène avec les molécules d'eau (voir **Figure 24.b**). (102).

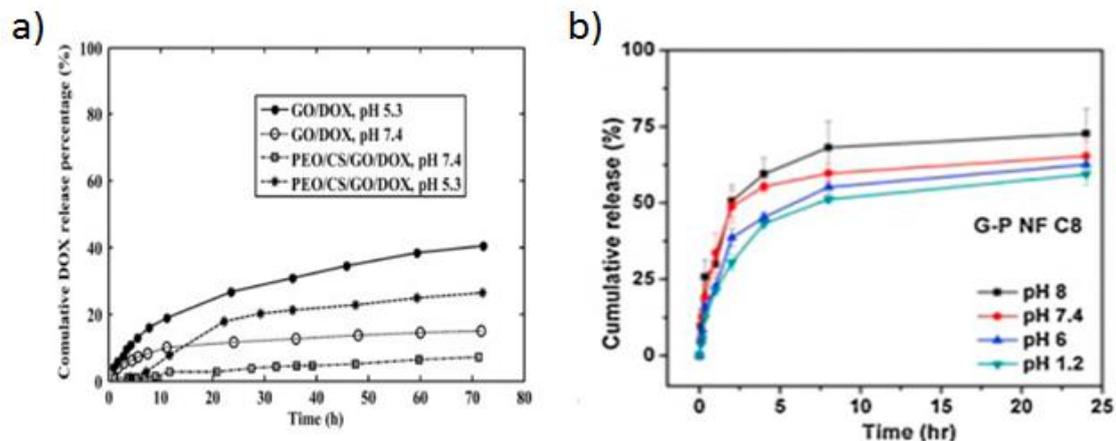


Figure 24: Suivi de libération en fonction du pH de la a) doxorubicine encapsulée dans des nanofibres de chitosan (101) b) pipérine encapsulée dans des nanofibres de gélatine (102)

L'interaction entre deux polyélectrolytes de charges opposées résulte en la formation d'un complexe de polyélectrolytes (CPE). La formation de nanofibres à partir de ces complexes ioniques évite le recours aux agents de réticulation souvent synonyme de toxicité et autres effets indésirables relatifs à ces agents. Les principes actifs se libèrent à partir des CPE essentiellement par phénomène de gonflement des chaînes ou par diffusion, ou encore par décomplexation ou rupture et dissolution du complexe (103). Le taux de gonflement des CPE varie en fonction du pH ce qui permet de moduler la cinétique de libération (103–105). Les CPE ont été étudiés et élaborés sous différentes formes : micro/nanoparticules, gels, films et autres membranes (voir **Figure 25**) (106), mais à notre connaissance, jamais de nanofibres formées à partir d'une solution contenant un mélange de polyélectrolytes n'ont été élaborées pour la libération d'un principe actif. Cependant, une étude récemment publiée a rapporté l'électrofilage de nanofibres antibactériennes de poly(3-

hydroxybutyrate) incorporée d'acide de caféine qui ont été immergées alternativement dans des solutions de triméthyle de chitosan et d'alginate afin de former un CPE en surface (107).

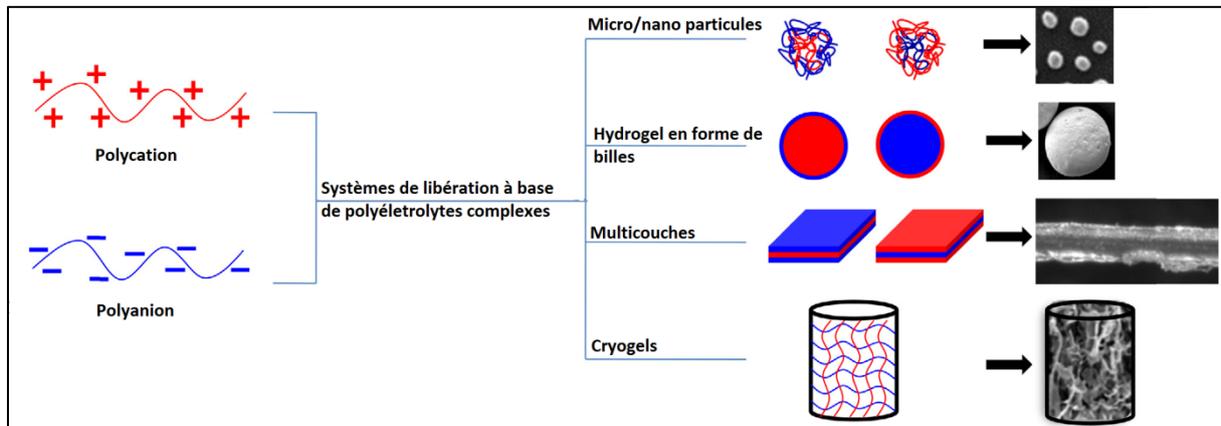


Figure 25 : Différentes formes de systèmes de libération à base de complexes de polyélectrolytes (106)

1.3.1.3.2.ii Polymères synthétiques

Parmi les biomatériaux synthétiques et biodégradables les plus utilisés, on retrouve les polyesters.

L'acide polyglycolique (PGA) est un polyester très peu utilisé dans les applications nécessitant une libération prolongée à cause de sa faible stabilité dans les milieux aqueux. Il se dégrade au bout de 24 jours environ (108).

L'acide polylactique (PLA) est un autre polyester biosourcée. Des nanofibres à base de PLA ont montré de bonnes capacités à libérer des principes actifs, notamment des antibiotiques (109), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (110) ou encore des agents anticancéreux (111), sur le long terme. Le PLA est un polymère qui se dégrade très lentement (e.g 5% de perte de masse après 45 jours (112)), ainsi le mécanisme de libération dominant est la diffusion.

L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), un copolymère du PLA et du PGA, est le polyester biodégradable le plus couramment utilisé et étudié dans le domaine biomédical. Il est connu pour sa biocompatibilité et surtout pour sa dégradation modulable en fonction du ratio entre le PLA et le PGA (113). Le PLGA est un bon candidat pour la libération de principe actif. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'il assurait une libération prolongée. Par exemple, des nanofibres de PLGA pour le traitement des infections cérébrales ont montré une libération de vancomycine maintenue *in vivo* chez le rat pendant 8 semaines suite auxquelles la membrane nanofibreuse s'est complètement dégradée (Figure 26) (114).

Le PLGA a été le premier polymère synthétique électrospinné pour des applications destinées à l'ingénierie tissulaire. Il a été utilisé pour la régénération de nombreux types de tissus : osseux (115–

118), cartilagineux (119), nerveux (120–122), cérébraux (114,123), cutanés (124,125), vasculaires (126,127), viscéraux (128,129).

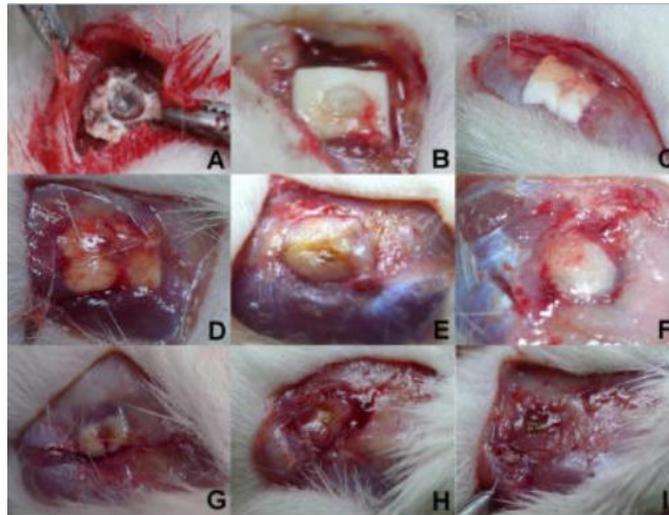


Figure 26: Etude *in vivo* d'une infection cérébrale chez un rat traitée par des nanofibres de PLGA chargées en vancomycine. (A) 3 jours; (B) 1 semaine; (C) 2 semaines; (D) 3 semaines; (E) 4 semaines; (F) 5 semaines; (G) 6 semaines; (H) 7 semaines; (I) 8 semaines. Après 8 semaines les nanofibres de PLGA étaient quasiment dégradées (114)

Le PCL a été également largement étudié pour la libération prolongée de PA (130–132). Il s'agit aussi d'un polyester très sollicité pour la libération de principes actifs grâce à sa structure semi-cristalline et sa biodégradabilité. Le PCL a souvent été électrospinné en mélange avec d'autres polymères tels que le PLA (133), le poly(triméthylène carbonate) (131) ou des polysaccharides comme le chitosan (134) pour un meilleur contrôle de la libération. Des nanofibres de PCL ont été utilisées pour la libération de curcumine pour la fabrication de pansements. Ces nanofibres ont montré une libération *in vitro* prolongée jusqu'à 72h (130).

1.3.1.4 Nanofibres chargée en principe actif

1.3.1.4.1 Nature du principe actif

L'affinité du PA avec le milieu de libération, sa miscibilité avec la solution de polymère, sa cristallinité dans les nanofibres, sa masse molaire et son taux de chargement ont une grande influence sur son profil de libération.

Le principe actif peut être hydrophile ou lipophile. Les principes actifs **hydrophiles** se libèrent généralement très rapidement dans le milieu de libération induisant un effet *burst* important qui peut conduire à dépasser la limite toxique. La stratégie souvent adoptée pour prolonger la libération d'un principe actif hydrophile est de l'incorporer dans une matrice nanofibreuses à base d'un polymère hydrophobe inerte tel que le PMMA. A titre d'exemple, Zupanacic et *al.* ont rapporté qu'il

était possible de prolonger la libération d'un PA hydrophile (la ciprofloxacine hydrochloride (CFX-HCL)) en choisissant le polymère ou le mélange de polymères adéquat. En effet, ils montrent que 46% de CFX-HCL se sont libérés à partir de nanofibres de polycaprolactone (PCL) et seulement 1.5% se sont libérés à partir de nanofibres de polyméthylméthacrylate PMMA au bout 40 jours(92).

Au contraire, les principes actifs **hydrophobes** se libèrent très lentement à cause de leur faible solubilité dans le milieu de libération. En revanche, les quantités libérées ont peine à dépasser le seuil d'efficacité. Pour augmenter sa biodisponibilité, le pourcentage de PA incorporé dans les nanofibres est souvent augmenté. Néanmoins, plus la quantité de PA dans les nanofibres est élevée plus l'effet *burst* est élevé et plus la libération est rapide. Ceci s'explique par la présence d'une plus grande quantité de PA à la surface des nanofibres qui se libère dans un premier temps. Le PA libéré crée alors des pores à la surface des fibres ce qui la fragilise et provoque l'accélération de la dégradation de la fibre et la libération du PA. Natu et al. ont comparé la libération de l'acétazolamide et de timolole à partir de nanofibres à base de PCL fortement et faiblement chargées en PA. Ils ont constaté que 90% de PA se libère après 2 jours dans le cas où le principe actif est en grande quantité alors que seulement 50% se sont libérés après 52 jours lorsque le PA est faiblement chargé(135).

L'**état cristallin** du PA dans la matrice nanofibreuse peut aussi influencer la libération de ce dernier. La présence de cristaux à la surface des nanofibres peut être à l'origine d'une immiscibilité entre le polymère et le PA, ce dernier va alors préférentiellement se déposer à la surface de la fibre ce qui provoque un effet *burst* trop important. En revanche, lorsque le PA est à l'état amorphe il va être inclus à l'intérieur de la fibre et il va ainsi être libéré de manière prolongée (135). Une étude menée par Seif *et al.* montre que lorsque la caféine est introduite sous forme de cristaux dans des nanofibres de PCL, 100% se sont libérés en moins de 20 minutes. A l'inverse, lorsque celles-ci ont été introduites dans les nanofibres à l'état amorphe, seulement 30% de caféine se sont libérés pendant les 20 premières minutes (136).

I.3.1.4.2 Modes d'incorporation du PA dans les nanofibres

La technique d'électrospinning offre la possibilité de varier les modes d'incorporation du PA dans les nanofibres. En effet, il est possible d'incorporer le PA dans les nanofibres :

- 1) en le solubilisant ou en le dispersant dans la solution de polymère
- 2) en immobilisant le PA à la surface des nanofibres par imprégnation des NFs dans une solution de PA
- 3) en créant des nanofibres en cœur-peau par i) électrospinning coaxial ou ii) électrospinning en émulsion

- 4) en encapsulant le PA dans des micro/nano particules qui seront par la suite incorporées dans les nanofibres,
- 5) en formant des multicouches de nanofibres où le PA sera inclus dans la couche interne

La cinétique de libération dépendra ainsi de la façon dont le PA est incorporé dans les nanofibres. La

Figure 27 regroupe toutes les méthodes citées ci-dessus.

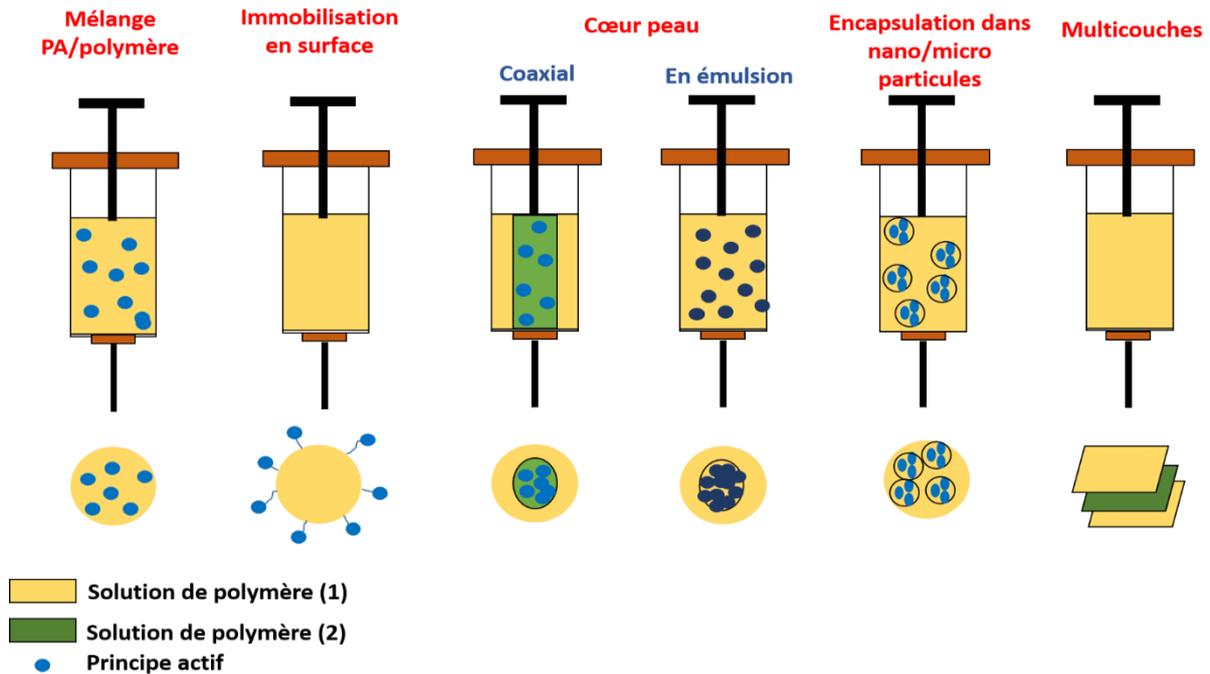


Figure 27 : Techniques d'incorporation des molécules actives dans les nanofibres

1.3.1.4.2.i Mélange polymère-PA

La méthode du co-electrospinning est la plus utilisée pour incorporer des principes actifs dans les nanofibres et sans doute la moins sophistiquée. Néanmoins certains facteurs sont à prendre en considération comme la miscibilité entre le polymère et la molécule active. En effet, il est important que le polymère et le PA soient solubles dans le même solvant afin d'éviter la formation d'agrégats qui viendront boucher l'aiguille ou bien d'obtenir un faible taux d'incorporation de principe actif dans les nanofibres. A partir de ce système le principe actif se libère soit par diffusion (27,137), soit par diffusion et dégradation du polymère (90,114,132). Dans la plupart des cas, la libération est accompagnée d'un effet *burst* important qui est souvent expliqué par la libération rapide du principe actif présent à la surface de la fibre (114,132).

1.3.1.4.2.ii Immobilisation des PA en surface

L'immobilisation de PA à la surface des nanofibres déjà électrospinnées peut se faire par voie chimique ou physique. Cette stratégie permet d'éviter les risques de dénaturation du PA à cause du haut voltage appliqué lors de l'électrospinning.

L'immobilisation physique des principes actifs peut s'effectuer grâce aux interactions électrostatiques, aux interactions hydrophobes, aux liaisons hydrogènes ou aux forces de Van der Waals (138). Dans le cas d'une immobilisation physique sur des nanofibres électrospinnées, une grande quantité de principe actif est retenue grâce à la surface spécifique très élevée des nanofibres. En revanche, la libération des PA est immédiate car les forces sont de faibles énergies pour retenir le PA. Ce type de surface peut être favorable à des applications nécessitant une libération rapide comme pour la prévention des infections postopératoires (139).

L'immobilisation chimique de PA sur des nanofibres nécessite une modification de surface des fibres pour obtenir des groupements amines, hydroxyles, carboxyles ou thiol. Il existe différentes techniques de modification de surface comme le traitement plasma ou encore le greffage de monomère sur la surface. Cette stratégie a été utilisée pour immobiliser : i) des protéines à la surface de nanofibres afin de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules (140–144), ii) de l'ADN pour le traitement des ulcères chez des diabétiques (145).

1.3.1.4.2.iii Micro/nano particules

Les systèmes nanofibreux à libération de principes actifs ne cessent d'évoluer. Des systèmes hybrides montrant l'association de nanofibres avec des micro/nano particules ont été étudiés (**Figure 28**) (146–149).

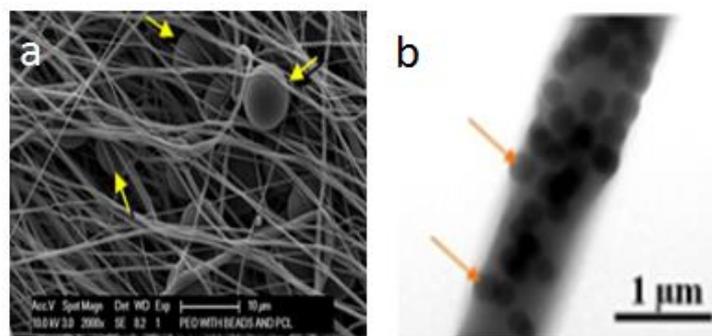


Figure 28 : Association de nanofibres à des nanoparticules

Ces systèmes hybrides présentent de nombreux avantages. Ils permettent tout d'abord de protéger la molécule active des risques de dégradation au contact de solvant organique ou parfois de la lumière. De plus, des études ont démontré qu'à partir de ces systèmes la libération était prolongée.

Les nanoparticules de silices méso-poreuses sont fréquemment utilisées comme systèmes à libération contrôlée grâce à leur grande surface spécifique et leur volume hautement poreux. Ces nanoparticules ont par exemple été incorporées dans des matrices nanofibreuses de PLLA afin de ralentir la libération du PA et créer un effet réservoir permettant l'inhibition de la croissance de tumeur mammaire (150).

Les nanoparticules peuvent également être formées à partir de polymères où le PA est incorporé. Wang et *al.* ont montré la libération prolongée pendant plus de 70h du naproxène et de la rhodamine B à partir de nanoparticules de chitosan incorporées dans des nanofibres de PCL (151).

Par ailleurs, à travers ces systèmes, il est possible d'encapsuler plusieurs principes actifs dans les nanoparticules et dans les nanofibres (152), ou bien incorporer différentes nanoparticules comportant des molécules différentes (153).

1.3.1.4.2.iv Les multicouches

Les systèmes nanofibreux en multicouches permettent également de libérer une ou plusieurs molécules actives de façon prolongée. La formation de multicouches de nanofibres consiste à déposer de manière successive de couches de nanofibres électrofilées à partir de différents polymères. Cette méthode offre la possibilité de libérer plusieurs PA.

La **Figure 29** représente schématiquement quelques exemples trouvés dans la littérature de nanofibres en multicouches.

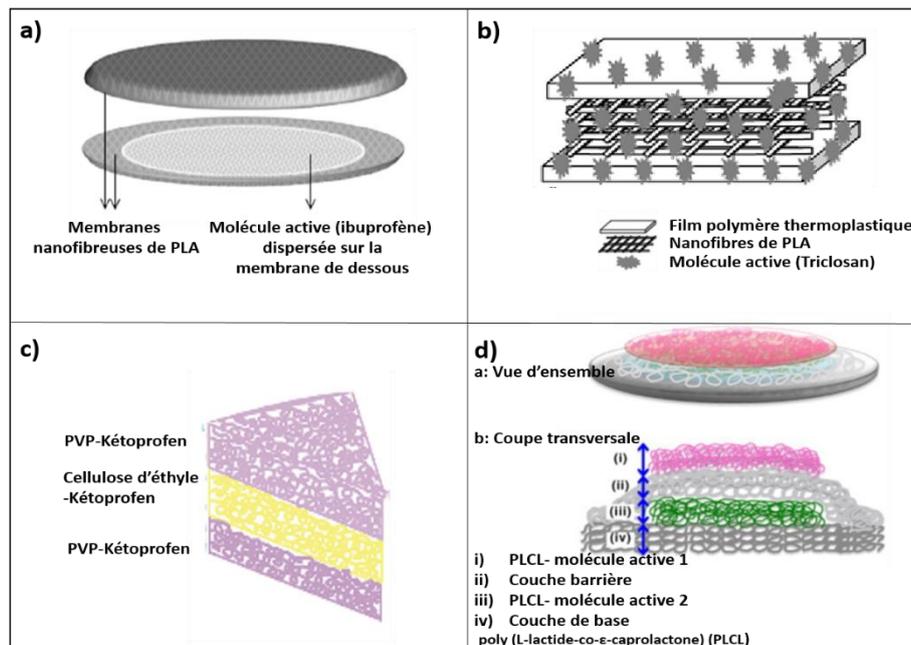


Figure 29: Systèmes de libération en multicouche a)(109), b)(154), c) (155), d)(156)

Plusieurs exemples ont déjà été rapportés dans la littérature. Alhusein *et al.* ont montré qu'une libération prolongée de la tetracycline hydrochloride à partir de NFs de EVA comprises entre deux couches de nanofibres de PCL. (157). De même, Huang *et al.* ont reporté l'encapsulation de kétoprofène dans un tri-couches de NFs composé d'une couche interne en éthyle de cellulose et deux couches externes de polyvinyle pyrrolidone (PVP) (155). On remarque que les différentes couches sont composées de polymères ayant des hydrophobicités différentes ce qui influence considérablement la libération du PA. En effet, le choix des polymères peut être fondamental pour certaines applications comme l'ont démontré Javanmard *et al.* dans une étude récemment publiée où ils présentent l'électrospinning de trois couches de polymères différents pour former un tube destiné à remplacer les artères de petit diamètre. Ils ont choisi comme couche interne le PCL pour sa biocompatibilité avec les cellules endothéliales et les cellules musculaires. Le collagène a été introduit comme couche intermédiaire pour sa capacité à améliorer l'adhésion et la prolifération de cellules et la synthèse de protéines. Le PLLA a été choisi en tant que couche externe pour ses propriétés mécaniques (158).

L'épaisseur des couches nanofibreuses, liée au temps d'électrospinning est un paramètre pris en considération dans de nombreuses études lors de la construction de systèmes multicouches (109,155,156). Serafini Immich *et al.* ont rapporté également qu'en augmentant le temps d'électrospinning de 10 à 20 min, le temps nécessaire pour libérer la totalité d'ibuprofène pris entre deux couches de PLA augmente d'environ 20% (109).

On retrouve quelques exemples dans la littérature reportant la formation de systèmes multicouches hybrides formant un composite nanofibres/films où les nanofibres jouent le rôle de renfort, souvent placées dans la couche interne. Dans ce cas, le maintien des nanofibres entre les films se fait en pressant mécaniquement les différentes couches (154).

1.3.1.4.2.v Nanofibres en cœur-peau

L'élaboration de nanofibres en cœur-peau est possible grâce à l'électrospinning en coaxial ou par émulsion.

La formation de NFs en cœur-peau est surtout utilisée pour étudier la libération de molécules actives et solubles dans l'eau afin de freiner leur libération. Cette technique est aussi utilisée pour la libération de protéines (159–161), de facteurs de croissances (162,163) ou encore d'organismes vivants tels que des cellules(14,164), des bactéries(165) ou des virus (166). Le plus souvent, l'agent actif est incorporé dans la solution de cœur afin d'obtenir un effet réservoir et assurer une libération prolongée. D'autre part, Yu et *al.* ont démontré que l'électrospinning coaxial de NFs de zéine/kétoprofène en cœur et zéine en peau a permis de réduire l'effet *burst* retrouvé régulièrement avec les nanofibres simples (voir **Figure 30**) (167).

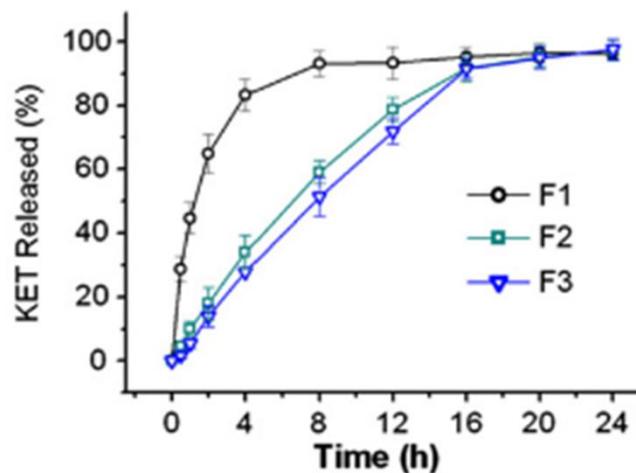


Figure 30 : Profils de libération de Kétoprofène à partir de NFs coaxiales (F2 et F3) (cœur zéine 28%/KET3%) dans éthanol/eau (80/20) et peau zéine (1%, éthanol/eau (80/20)) et de NFs simples formée avec la solution de cœur (F1) (167)

Dans la même étude, il a également été mis en évidence qu'en faisant varier le débit de la solution de peau, un meilleur contrôle du profil de libération est obtenu. En effet, l'épaisseur de la peau augmente avec le débit, ceci permet d'obtenir une libération prolongée car le milieu met plus de temps à pénétrer au cœur de la fibre et à dissoudre le PA. De plus, lors d'une libération par diffusion, le PA mettra plus de temps à passer à travers les chaînes moléculaires du polymère de peau ce qui

Partie I : Etude Bibliographique

ralentirait sa diffusion. Dans une autre étude menée par Maleki *et al.*, le contrôle de la libération de la tétracycline hydrochlorate, encapsulée dans le cœur de nanofibres de PLGA, a été étudié en modifiant le débit. Ils ont alors conclu que plus le débit de cœur était élevé plus l'effet *burst* était important (168). Plusieurs types de polymères ont été associés pour préparer des NFs en cœur-peau, mais, très peu d'études rapportent l'électrospinning coaxial de deux polyélectrolytes de charges opposées (169), probablement à cause des problèmes liés à la complexation qui a lieu à la sortie de l'aiguille qui inhiberait la formation de jet.

Le **Tableau 3** présente quelques études trouvées dans la littérature rapportant l'élaboration de nanofibres en cœur-peau par électrospinning coaxial pour la libération de principe actif.

Tableau 3 : Liste d'études rapportées dans la littérature sur l'électrofilage de nanofibres en cœur-peau par électrospinning coaxial

Peau		Cœur		Principe actif	Application	Réf
Polymère	Solvant	Polymère	Solvant			
PBS		PEG		TCL et curcumine		
Acétate de cellulose (AC)	Acétone	PVP	Ethanol/ eau	(-) Epicatechine	Ingénierie Tissulaire	(170)
-	Acide acétique	zéine	Ethanol/eau 80/20 v/v)	acide furélique	Libération prolongée	(171)
PLGA	Chloroform/DMF (8/2)	PLGA + TCH	Chloroform/DMF	TCH	Libération prolongée	(168)
PMMA	Acide acétique+ formique 3/1	PVA	Acide acétique+ formique 3/1	CFX	Libération prolongée	(172)
Gélatine	TFE/eau (80/20)	PCL	TFE	métronidazole	Libération d'anti-inflammatoire	(137)
PLA	DCM/DMAc 90/10	PEG	DCM/DMAc 90/10	Acide salicylique	Libération prolongée	(55)
CHT	Acide Acétique (AA)/TFA (10/90)	PLA	TFA	-	Non spécifié	(55)
CHT/PEO (7/3)	Eau/AA (1M) (7/3)	Alginate/ PEO (6/4)	Eau/éthanol (5%) (1/1)	-	Non spécifié	(169)
Glycerol +enzymes		PU		-	biocapteur	(173)
Zéine	Ethanol/eau 80/20 v/v)	zéine	Ethanol/eau 80/20 v/v)	kétoprofène	Etude de libération	(167)
-	Acétone/DMAc/Ethanol (4/1/1) (v/v/v)	AC	Acétone/DMAc/Ethanol (4/1/1) (v/v/v)	kétoprofène	Etude de libération	(174)

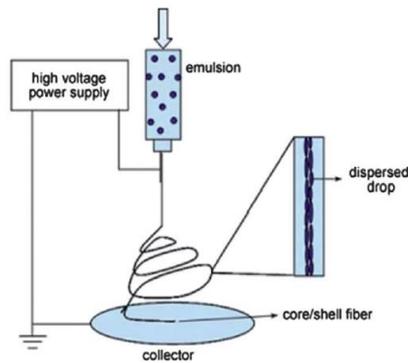


Figure 31: Schéma de montage de l'électrospinning par émulsion

Il existe une autre approche permettant la formation de nanofibres en cœur-peau : l'électrospinning par émulsion, qui repose sur le mélange d'un polymère en phase aqueuse et un autre en phase organique avec l'ajout d'un émulsifiant qui va assurer le mélange des deux phases. Cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille coaxiale mais tout simplement d'une aiguille traditionnelle. Le produit qui forme le cœur est en général le produit minoritaire. Lorsque la goutte formée à la sortie de l'aiguille est éjectée, le produit minoritaire s'agglomère constituant ainsi le cœur de la fibre (**Figure 31**). Cette stratégie a été utilisée pour la libération d'agent anticancéreux (175–177), d'anti-arythmiques (178) ou encore de protéines (179).

1.3.1.5 NFs à base de complexe d'inclusion de PA-Cyclodextrine

Une autre stratégie pour prolonger la libération des principes actifs est l'utilisation des molécules cages. Ces molécules ont la capacité de piéger des molécules actives en formant des complexes d'inclusion. C'est grâce à cette complexation que la libération sera prolongée et que le PA sera protégé des facteurs extérieurs. Il existe différents types de molécules cages parmi lesquelles on cite les calyxarènes, l'éther-couronne, le cucurbituril, les cyclodextrines, etc.

Les molécules cages les plus utilisées dans le domaine pharmaceutique sont les cyclodextrines (CDs). Cette molécule est étudiée depuis plusieurs années déjà au sein du laboratoire UMET de l'Université de Lille1 pour former des dispositifs médicaux à libération prolongée.

1.3.1.5.1 Généralités sur les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont produites après une dégradation enzymatique de l'amidon issu des pommes de terre, du riz, du maïs et bien d'autres sources. Elles ont été découvertes par le scientifique français Villiers en 1891 qu'il l'appela à l'époque « Cellulosine » du fait de sa similitude chimique à la

Partie I : Etude Bibliographique

cellulose. Dix ans après, le microbiologiste autrichien Scharinger a poursuivi l'étude et la caractérisation de la cyclodextrine d'où l'appellation « dextrine de Scharinger ».

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composées d'unités glucopyranoses reliées entre elles par des liaisons α -1-4. Ces liaisons confèrent à la cyclodextrine une forme conique. Les fonctions hydroxyles sont orientées vers l'extérieur du cône avec les groupements hydroxyles primaires sur la partie la plus étroite du cône et les groupements hydroxyles secondaires sur la partie la plus large (**Figure 32**).

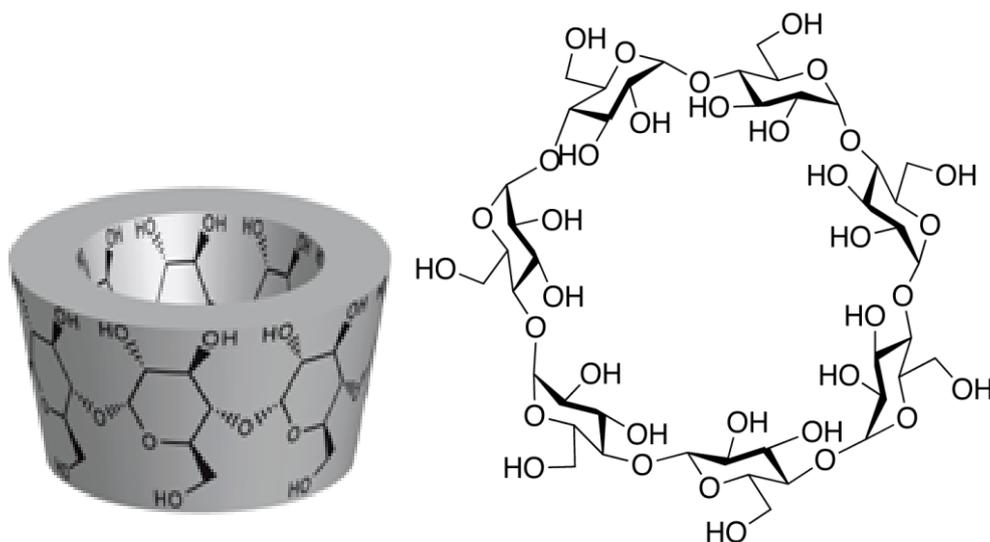


Figure 32 : Représentation de la β -cyclodextrine

La cyclodextrine peut contenir plus de 15 unités de glucopyranose mais pas moins de 6. Les cyclodextrines les plus connues et les plus utilisées sont les α , β et γ CD, qui contiennent 6, 7 et 8 unités glucose respectivement. Le **Tableau 4** regroupe les différentes caractéristiques de ces cyclodextrines natives.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des trois cyclodextrines natives

	α -CD	β -CD	γ -CD
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Nombre d'unité glucose	6	7	8
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Solubilité (H_2O à $25^\circ C$) (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Diamètre interne de la cavité (nm)	0,5	0,63	0,79
Volume de la cavité (nm^3)	0,174	0,262	0,427

Le principal caractère de la cyclodextrine est sans nul doute son caractère à la fois hydrophile et lipophile. En effet, la cyclodextrine possède une cavité hydrophobe apolaire due à la présence d'atomes d'oxygène, d'hydrogène reliant les unités glucoses et un extérieur hydrophiles dû à la présence de fonctions hydroxyles.

Il existe plus de 1500 dérivés de cyclodextrine. Ils sont généralement obtenus après estérification, éthérification ou amination des groupes hydroxyles primaires ou secondaires de la cyclodextrine.

Les propriétés physicochimiques des dérivés de cyclodextrine y compris leur solubilité et leur capacités de complexation, dépendent non seulement du substituant ajouté mais aussi de leur localisation, et de leur nombre. Les dérivés les plus utilisés dans l'industrie sont l'hydroxypropylCD (HP- β CD et HP- γ CD), la méthyl β CD (Me β CD).

Ces dérivés de cyclodextrine ont permis d'élargir le champ d'application des cyclodextrines car ils présentent une meilleure solubilité dans l'eau que les cyclodextrines natives.

Grâce à leur cavité hydrophobe et leur extérieur hydrophile, les cyclodextrines ont la capacité de piéger des molécules hydrophobes dans leur cavité formant ainsi des complexes hôte-invité dit aussi complexes d'inclusion comme représenté en **Figure 33**.

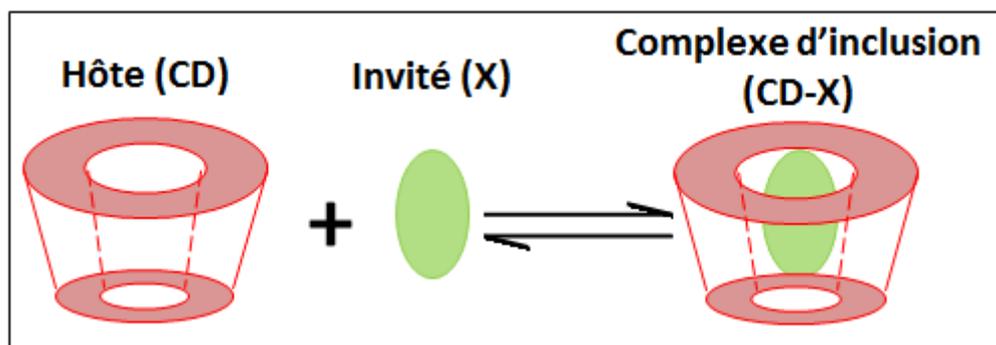


Figure 33 : Formation du complexe d'inclusion entre la cyclodextrine et une molécule invitée

Dans une solution aqueuse des molécules d'eau occupent la cavité de la CD. Cet état est énergétiquement défavorable. Ainsi, des molécules invitées moins polaires que l'eau vont chasser les molécules d'eau et former alors un complexe d'inclusion. Les forces responsables de cette inclusion sont : les forces de Van der Waals qui peuvent être complétées par des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation des complexes d'inclusion comme le type de cyclodextrine, la taille de cavité, la variation de température, la méthode de préparation du complexe.

Par ailleurs, les cyclodextrines et leurs dérivés ont été modifiés afin de développer une large variété de polymères. La synthèse de ces polymères de cyclodextrines est basée soit sur la réactivité de leurs groupes OH, ou sur leurs propriétés à former des complexes hôte-invité avec des chaînes de polymères par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes. Leur synthèse usuelle repose sur :

- i) leur réticulation avec un agent bi-fonctionnels ou multifonctionnels (**Figure 34.a**)
- ii) la combinaison d'un polymère et d'une CD par liaison covalente ou par association physique (**Figure 34.b (1)**)
- iii) la polymérisation d'un monomère acrylique contenant une cyclodextrine pendante (Figure 34.b (2))
- iv) par assemblage supramoléculaire basé sur les complexes d'inclusion hôte-invité tels que la formation des poly(pseudo)rotaxanes (**Figure 34.c**) (180–182).

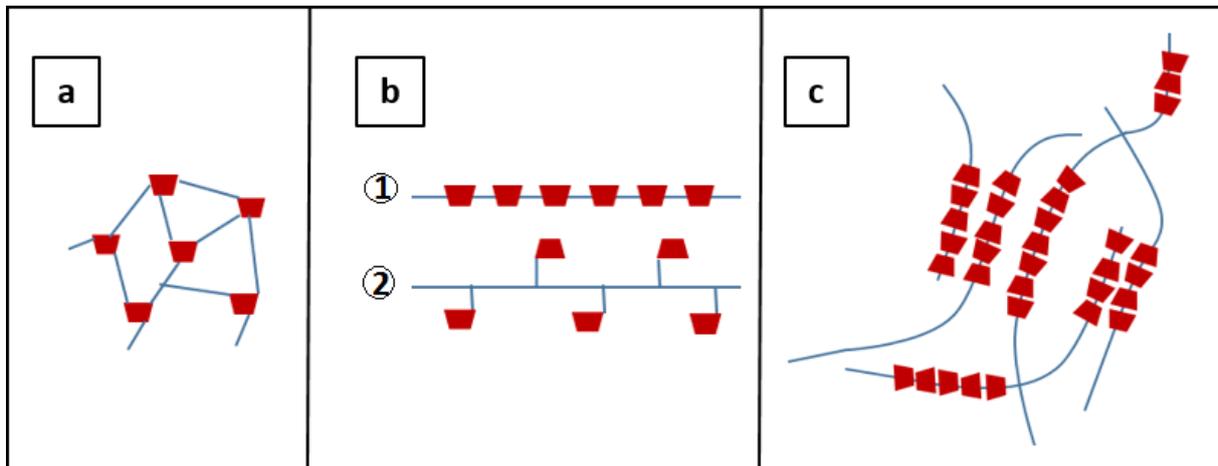


Figure 34 : Les différentes structures possibles du polymère de cyclodextrine a) réticulé, b) linéaire et c) poly(pseudo)rotaxanes

Par ailleurs, des polyélectrolytes réticulés de cyclodextrines ont pu être synthétisés puis étudiés pour de nombreuses applications. On distingue les polyCD cationiques et les polyCD anioniques. Ces polymères ont la caractéristique de former à la fois des complexes d'inclusion avec des principes actifs et de disposer de charges pouvant interagir avec des molécules ou polymères de charges opposées.

Il existe dans la littérature des méthodes très variées pour la synthèse de polyélectrolytes de cyclodextrine. Le plus souvent pour la synthèse du polymère cationique ou anionique, l'épichlorohydrine est utilisée comme agent réticulant. Un polymère neutre est alors formé. Ensuite, afin de donner le caractère anionique ou cationique au polymère, un agent substituant est ajouté tels que le chlorure de choline (183,184), le glycidyltriméthylammonium (GTMAC) (185) ou encore le

Partie I : Etude Bibliographique

chlorure de 2,3-époxypropyl-triméthylammonium (186) qui permettent de former le polymère cationique d'une part, ou l'acide chlorosulfonique (186), l'acide chloroacétique (187), l'anhydride succinique (188) pour former le polymère anionique d'autre part.

Au cours de la dernière décennie, l'UMET a développé une méthode innovante et biocompatible pour synthétiser un polymère de cyclodextrine anionique. La stratégie adoptée repose sur la réticulation des cyclodextrines en utilisant un polyacide carboxylique comme agent réticulant. Cet agent réticulant doit porter au moins 3 fonctions acides. Tout d'abord un anhydride est formé après déshydratation de l'acide sous l'effet de la chaleur et d'un catalyseur, puis, celui-ci réagit avec une fonction hydroxyle de la cyclodextrine par estérification. Par la suite chaque fonction libre de l'acide va former un nouvel anhydride qui réagira à son tour avec une cyclodextrine jusqu'à formation d'un réseau réticulé tridimensionnel. Ce réseau comporte des fonctions carboxylates libres et les cavités de la cyclodextrine (**Figure 35**) (189,190).

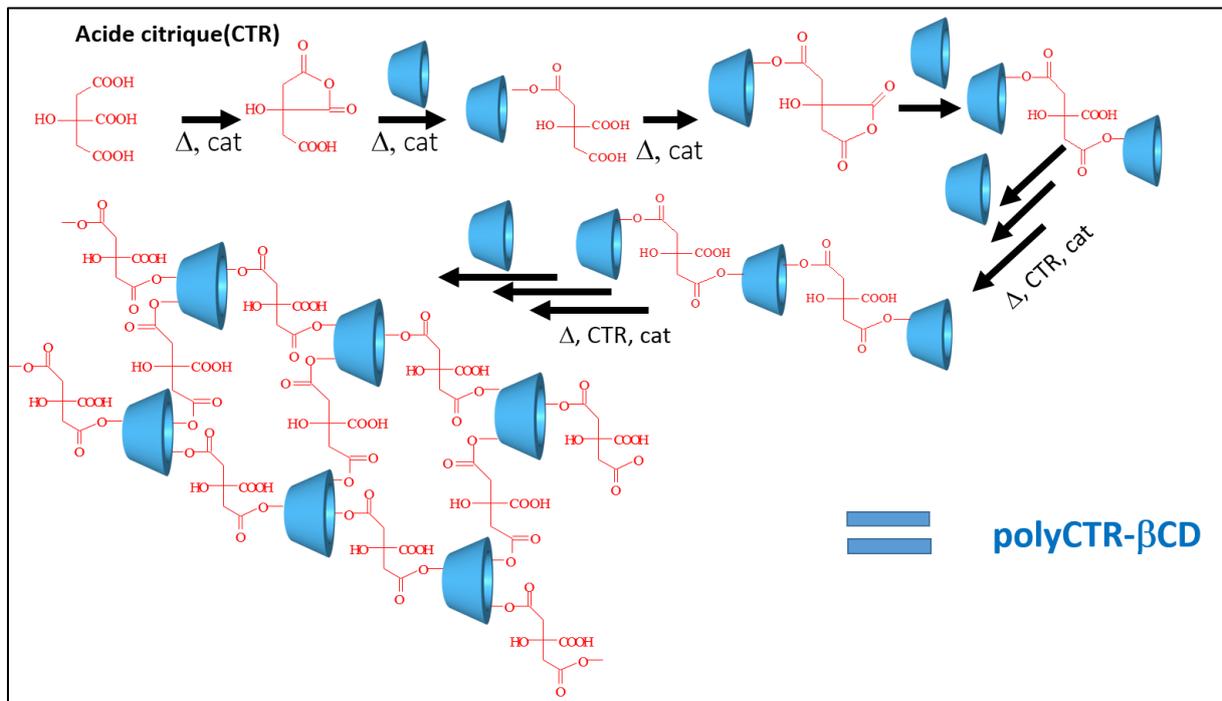


Figure 35 : Mécanisme de synthèse du polymère anionique de cyclodextrine (polyCTR-βCD)

Ce polymère de cyclodextrine a fait l'objet de nombreuses études pour la modification de surface destinées à des applications biomédicales pour la libération prolongée de PA. Des textiles enrobés de polymère de cyclodextrine ont été également utilisés pour les prothèses vasculaires (1,2,191), les implants viscéraux (3,192) ou parodontaux (4,193). Des supports de nature céramique ont également été fonctionnalisés par ce polymère tels que les matériaux de comblement osseux en hydroxyapatite poreuse et des prothèses de hanche recouvertes d'hydroxyapatite(194,195). Ces supports ont été

activés par des antibiotiques (ciprofloxacine, vancomycine, rifampicine, gentamicine)(191) et des agents antiseptiques tels que la Chlorhexidine(196), le bleu de méthylène(197), le carvacrol(198).

1.3.1.5.2 Recensement des systèmes NF/CD existants

La technique d'électrospinning nécessite l'utilisation de polymères ayant des masses molaires élevées et des solutions concentrées afin que les chaînes moléculaires du polymère s'enchevêtrent entre elles, suffisamment pour que le jet soit continu et que les nanofibres obtenues soient uniformes. De plus, l'élasticité et le temps de relaxation du polymère sont tout aussi importants pour la faisabilité et l'électrofilage de la solution de polymère. La cyclodextrine n'étant pas un polymère, elle possède de faibles masses moléculaires, il est donc difficile de créer un réseau enchevêtré avec une élasticité lui permettant de former des fibres.

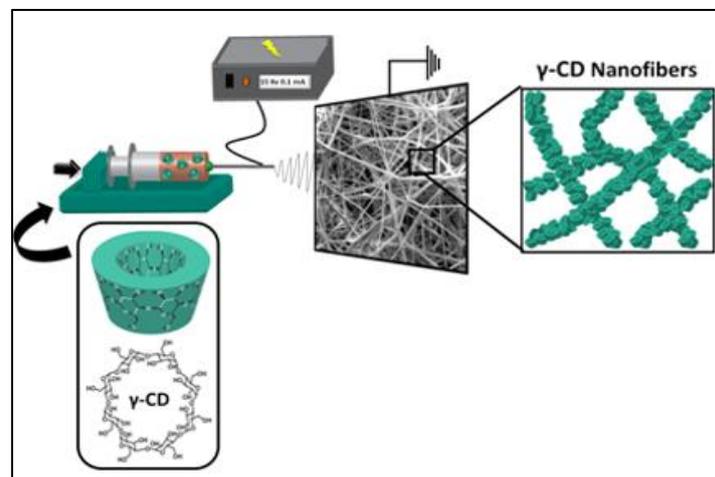


Figure 36 : Schéma de l'électrospinning de nanofibres de γ -cyclodextrines avec l'organisation en chaînes des cyclodextrines au sein de la fibre

Le groupe d'Uyar a néanmoins électrofilé des nanofibres à partir d'une solution contenant uniquement des CD (**Figure 36**). Pour cela, ils ont utilisé des concentrations très élevées pouvant aller jusqu'à 160% (masse/volume)(w/v) afin d'obtenir des solutions très visqueuses et permettre ainsi la formation d'agrégats via des interactions hydrogènes qui vont assurer l'étirement du jet (199–203). La β CD a été électrofilée à des concentrations élevées allant jusqu'à 150%(w/v) et dissoute dans du NaOH à 10% (**Figure 37**) ou dans des solvants organiques tels que le DMF, le DMAc, DMSO. Ils ont obtenu des fibres ayant des diamètres variant respectivement entre 250-1780 nm et 310-1860 nm. Manasco *et al.* ont également reporté l'électrofilage de la CD sans polymère. Ils ont électrofilé de l'HP β CD à des concentrations inférieures à celles utilisées par le groupe Uyar (204). Des caractérisations de la solution de CD ont été effectuées afin de mieux comprendre comment des petites molécules ont pu être électrospinnées. Tout d'abord, il a été démontré que la conductivité diminue en augmentant la concentration de CD en solution, inversement à la viscosité qui elle augmente par la formation d'agrégats (200).

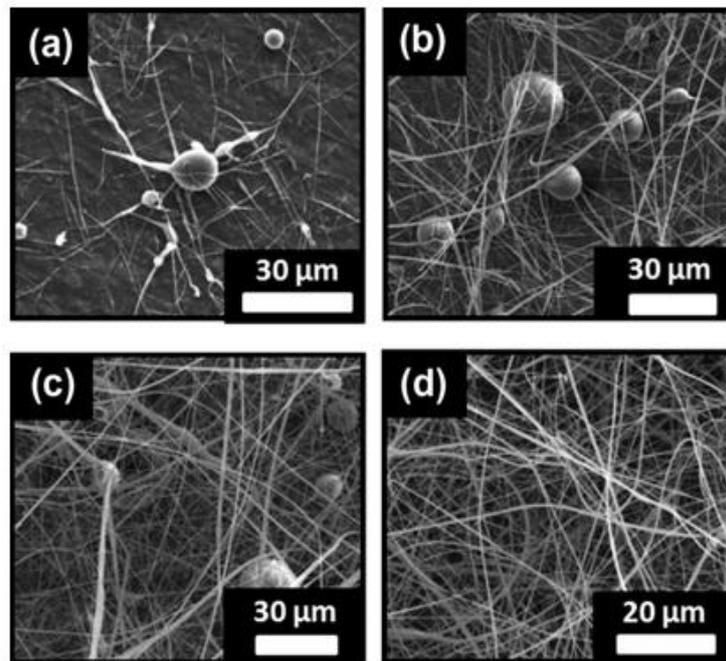


Figure 37: Photo prise par microscopie électronique à balayage de nanofibres de β CD obtenues à partir de a) 120% (w/v) b) 130%(w/v) c) 140%(w/v) et d) 150%(w/v) dans 10% de NaOH (205)

Des nanofibres à base de complexes d'inclusion seul ont également pu être élaborées (199,206,207). Cependant, ces nanofibres ont une très faible tenue et stabilité dans les milieux aqueux ce qui limite leur domaine d'application. De plus, les concentrations utilisées peuvent présenter une certaine toxicité étant donné qu'elles sont extrêmement élevées, notamment pour des applications biomédicales. Du fait de ces risques ici cités, d'autres études ont reporté l'électrospinning des CDs ou des complexes d'inclusion en mélange avec des polymères synthétiques tels que le PCL (208,209), le PVA (202,210,211), le PLA (212), le PS (213), etc. Cette nouvelle stratégie a permis i) l'utilisation de concentrations moins élevées et ii) d'avoir une meilleure stabilité des nanofibres notamment dans les milieux aqueux. Ceci a élargi leur champ d'applications, comme par exemple pour la libération de PA.

La capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion en fait d'excellentes candidates en tant que système à libération prolongée de principes actifs. En effet, cette complexation assure la stabilité et augmente la solubilité des principes actifs ce qui améliore leur biodisponibilité. Ce caractère est conservé même lorsque ces complexes sont inclus dans des nanofibres électrospinnées. Ceci démontre que le procédé d'électrospinning n'impacte pas la structure de la cyclodextrine ni la stabilité du complexe. Ceci a été démontré à plusieurs reprises grâce à l'utilisation de techniques de caractérisations diverses telles que l'ATG, la FTIR, la DSC ou encore la DRX (212,214,215). D'autre part, le fait d'inclure des complexes d'inclusion dans des nanofibres n'inhibe pas les propriétés du principe actif piégé dans les cavités des cyclodextrines. Par exemple, des nanofibres de PLA chargées

Partie I : Etude Bibliographique

avec un complexe de triclosan et de cyclodextrine ont montré une activité antibactérienne contre *S.aureus* et *E.coli* (212). De même, la molécule α -Tocopherol complexée avec la cyclodextrine a gardé son caractère antioxydant après être introduite dans des nanofibres de PCL (216).

Le **Tableau 5** regroupe quelques études concernant l'électrospinning de nanofibres de CDs mélangées à un autre polymère et leurs applications potentielles, ainsi que les études trouvées sur l'électrofilage de polymères de cyclodextrine.

Tableau 5: Nanofibres à base de cyclodextrines mélangées à un polymère rapportées dans la littérature

Type de CD	Polymère ajouté	Agents actifs	Applications	Réfs.
<i>CD natives ou dérivés</i>				
HP β CD	PVA	Nanoparticules d'argent	Surfaces antibactériennes	(202)
α CD, β CD, γ CD	PLA	Triclosan		(212)
β CD	PVA	Vanilline	Conservation et stabilité d'arômes	(211)
α CD, β CD, γ CD	PS	Menthol		(214)
HP β CD	PLA	Acide gallique	Mesure de l'activité anti-oxydante des nanofibres	(217)
β CD	PCL	α -Tocopherol		(216)
HP β CD	PCL-HPC	Sulfisoxzole	Etude de la libération de molécule très peu soluble	(218)
β CD	PCL	Naproxène		(208)
β CD	PS	-	Filtration de molécules en phase gazeuse	(213)
β CD	PMMA	Nanoparticules de Nickel	Catalyse	(219)
β CD	PVA	-	Capture de molécules invitées	(220)
β CD	PCL	-	Elimination des odeurs des plaies	(221)
<i>Polymères de CD</i>				
Pseudo-Polyrotaxanes			Fonctionnalisation de surface	(182)
			Non spécifiée	(222)
			Non spécifiée	(223)
bCD/PAA/CTR		Bleu de méthylène	Adsorption et séparation du BM	(224)
PAA/ β CD		Quercetin	Mesure de l'activité anti-oxydante	(225)
β CD greffée à du CHT	PVA	-	Elimination de colorants à partir d'effluents	(226)
β CD-épichlorohydrine	PMMA	propranolol	Libération prolongée	(227)
	PCL ou PVA	fluconazole	Libération prolongée d'agent antifongique	(228)

Partie I : Etude Bibliographique

On retrouve dans la littérature quelques études sur l'électrofilage de polymères de cyclodextrines. Des polymères linéaires ont été obtenus par greffage d'une cyclodextrine sur un polymère (226) ou bien des CDs et d'acide polyacrylique dont la polymérisation s'est fait *in situ* par traitement thermique (224,225). Des poly(pseudo)rotaxanes (182,222,223) ont également été électrofilés. Oster *et al.* ont préparé des nanofibres coaxiales à base de pseudopolyrotaxanes de PCL ayant une organisation sous forme de nano-plaquettes formées via une complexation entre le PCL en étoile et des α CD ; ce complexe formait la peau tandis que le cœur était formé de PCL linéaire (**Figure 38** Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Ils ont démontré que la surface des nanofibres était ouverte de fonctions hydroxyles de cyclodextrine, permettant ainsi une post-fonctionnalisation (182).

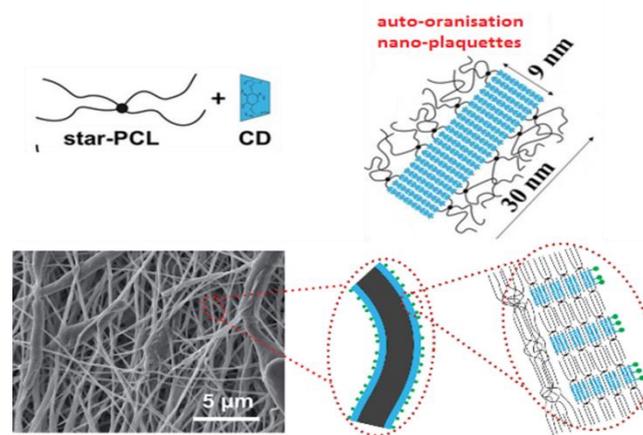


Figure 38 : Schéma du PCL en étoile et le CD formant des nano-plaquettes de pseudopolyrotaxanes (pPRs) et l'image MEB des nanofibres coaxiales obtenues à partir d'un cœur en PCL et d'une peau en pPRs (182)

Oliveira *et al.* ont reporté l'électrospinning d'un polymère neutre de cyclodextrine synthétisé à partir de β CD et d'épichlorohydrine mélangé à un polymère synthétique (PMMA) pour former des nanofibres uniaxiales et coaxiales chargées de chlorhydrate de propranolole. Les nanofibres obtenues sont traitées thermiquement à 170°C afin d'activer la réaction de polyesterification entre les groupements carboxyliques du polymère acrylique et les fonctions alcool du polymère de cyclodextrine assurant ainsi la stabilité des nanofibres. libération des nanofibres non traitées thermiquement a montré une dissolution rapide alors que celles qui sont traitées montrent une libération plus lente avec un pourcentage de PA libéré entre 15 et 35% pendant les premières heures et une libération plus prolongée dans le cas des nanofibres coaxiales, où seulement 20% de principe actif se libère après 168 heures (227).

Plus récemment, une étude a également rapporté l'électrofilage d'un polymère neutre de α CD et un de β CD en utilisant aussi l'épichlorohydrine comme agent réticulant. Des complexes d'inclusion de ces polymères avec un agent antifongique, le fluconazole ont été préparés puis mélangés avec du PCL ou du PVP. Suite à l'élaboration des nanofibres, celles-ci ont été traitées par plasma froid ce qui a

Partie I : Etude Bibliographique

permis de les enrober de polyhexaméthylsiloxane afin d'améliorer leur biocompatibilité et de leur apporter un caractère anti-adhérent. La libération à partir des nanofibres non traitées par plasma froid a révélé qu'un effet *burst* jusqu'à 85% se produit au bout de 15 minutes. En revanche, avec celles qui sont traitées et notamment celles avec du PCL, l'effet *burst* est réduit à 53% et est suivi d'une libération plus prolongée jusqu'à 24 heures (voir **Figure 39**) (228).

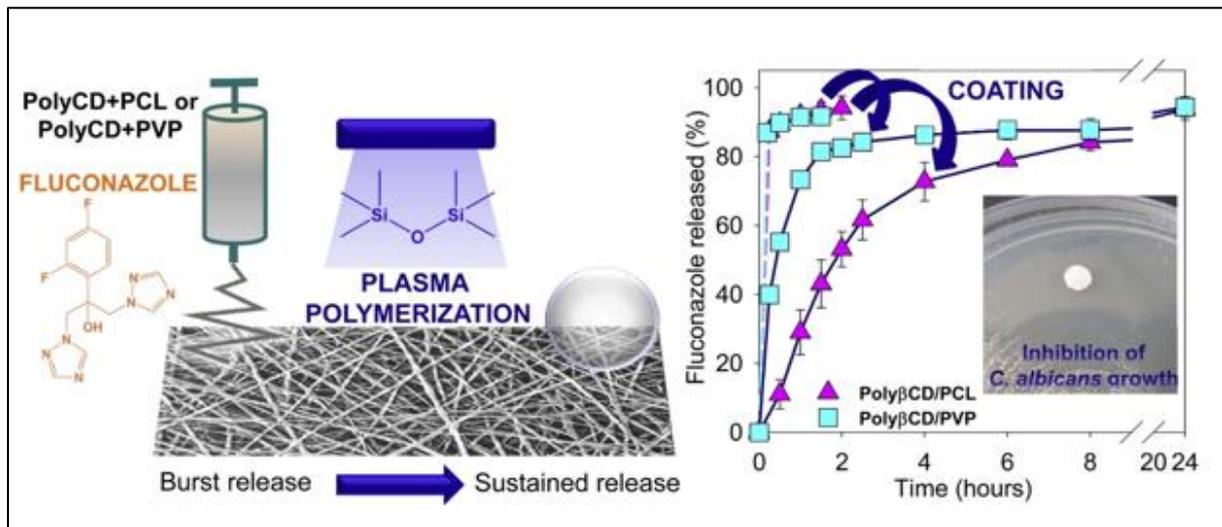


Figure 39 : Electrofilage de NFs à base de polymère de cyclodextrine mélangé à du PCL ou du PVA activées par du Fluconazole puis traitées au plasma pour la libération prolongée d'agent antifongique(228)

II. Elaboration de nanofibres à base de chitosan

II.1 Le chitosan

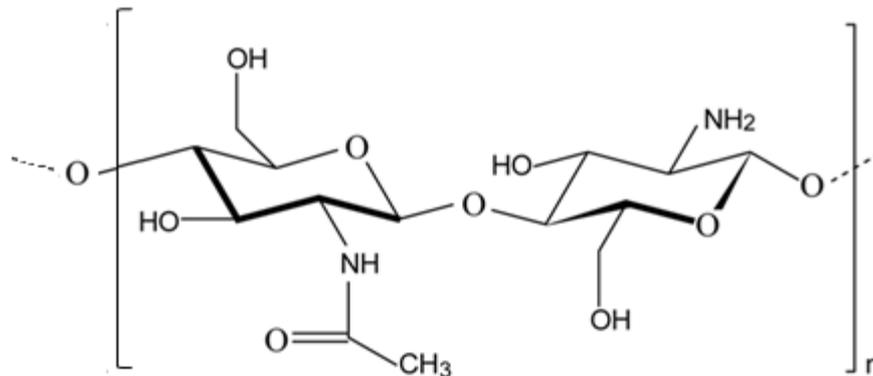


Figure 40: Structure chimique du chitosan

Le chitosan (CHT) est un polysaccharide obtenu après désacétylation de la chitine, qui est extraite des carapaces de crustacés ou extrait directement de champignons. Le CHT présente un degré de désacétylation (DD) supérieur à 50%. Il s'agit d'un copolymère constitué d'unités 2-amino-2-désoxy- β -D-glucopyranose (unité glucosamine) et 2-acétamido-désoxy- β -D-glucopyranose (unité N-acétylglucosamine) (**Figure 40**).

Le chitosan est très utilisé dans les applications biomédicales (229) car il est biocompatible (230) et présente des propriétés bioactives intrinsèques : antimicrobiennes (231), cicatrisante (232) et hémostatique (233,234). De plus, le chitosan est biodégradable et son produit de dégradation n'est ni toxique ni cancérogène.

Par ailleurs, grâce à la présence de deux types de groupements réactifs dans la structure du chitosan, les fonctions amines libres des unités désacétylées et les hydroxyles présents sur les carbones C-3 et C-6 des unités acétyles et/ou désacétyles, il est possible d'améliorer sa solubilité et d'élargir ses applications. Des modifications chimiques du chitosan ont été rapportées telles que son alkylation (235), carboxyméthylation (236), quaternization (237–239) ou sulfonation (240–242).

Dans cette partie, nous nous intéressons à la sulfonation du chitosan afin de préparer des nanofibres à propriétés anticoagulantes.

II.2 Le chitosan sulfonique

Il existe différents mécanismes de sulfonation du chitosan reportés dans la littérature.

Le chitosan sulfoné peut être formé en modifiant son unité de répétition au niveau des positions 3-O ou/et 6-O en utilisant un complexe SO₃-pyridine (243), ou de l'acide chlorosulfonique/formamide (244), ou en utilisant l'acide 2-chloroethanesulfonique (245). Il peut être modifié également au niveau de sa position N en utilisant du sulfonate de vinyle (246), du sulfate de propane, du 3-chloro-2-hydroxy propanesulfate, ou du triméthylamine-sulfur trioxide (247).

Afin de sélectionner la position à substituer, la régiosélectivité de la réaction a été contrôlée en utilisant la protection/déprotection des groupements amines (247,248). Le choix du site à substituer peut se révéler important selon l'application visée. Par exemple Nishimura *et al.* ont démontré que la sulfonation sélective de la position O-2 et/ou O-3 permet d'avoir un agent antirétroviral avec un effet d'inhibition plus élevé sur les infections causées par le virus du SIDA que l'effet obtenu par un dérivé sulfoné au niveau de la position O-6 (243). En revanche, la régiosélectivité permettant l'introduction des groupements sulfates en position O-2 et/ou O-3 a peu d'effet sur l'activité anticoagulante du produit, alors que la position O-6 inhibe fortement la coagulation du sang (243).

De plus, le chitosan sulfoné peut être obtenu par amination réductrice. Cette méthode a été appliquée sur le chitosan pour la première fois par Hall et Yalpani en 1980 (249). Elle consiste à faire réagir dans un premier temps le chitosan avec un groupement carbonyle, ici un aldéhyde, formant ainsi une imine ou un intermédiaire base de Schiff. Cet intermédiaire est alors réduit en amine secondaire à l'ajout de l'agent réducteur le cyanoborohydrure. Muzzarelli a adopté cette méthode sur le chitosan en 1992, en utilisant le 5-formyl-2-furansulfonique (250).

La littérature montre que le chitosan sulfoné est un polymère à propriétés multiples. Il posséderait une activité anticoagulante, anti-sclérotique, antivirale, antimicrobienne et antioxydante (243,251–257). Il a également été utilisé dans d'autres types d'application tels que l'adsorption d'ions métalliques (242,257).

II.3 Electrospinning du chitosan

L'électrospinning du chitosan seul est limité à cause de son caractère cationique, sa structure chimique rigide et ses interactions inter et intra moléculaires. De plus, la formation de fortes liaisons hydrogènes empêche le mouvement des chaînes de polymères qui sont soumises au champ électrique ce qui entraîne une rupture ou non formation du jet (258,259). En outre, la répulsion entre les groupements ioniques sur le squelette du chitosan empêche l'enchevêtrement des chaînes qui

permet au jet de s'étirer et former des fibres et par conséquent des billes se forment au lieu de nanofibres.

Afin de remédier à ces problèmes, la solution la plus couramment utilisée est de mélanger le chitosan avec un polymère naturel ou synthétique qui s'électrospinne facilement tels que le PEO (27,101,260–268), le PVP (269–273) (264,274), différents polyesters le PCL (134,275–277), poly(D,L-lactide) (PDLL)[27], la soie (29,278). Le PEO a été souvent utilisé notamment parce qu'il s'agit d'un polymère largement étudié dans le domaine biomédical(279,280). La formation de fortes liaisons hydrogènes entre le chitosan et le PEO est ce qui rend le mélange électrofilable (281) (**Figure 41**). De nombreuses études ont rapporté l'électrospinning du CHT/PEO avec différentes conditions d'électrofilage. En effet, ce qui caractérise le chitosan c'est son degré de désacétylation, son poids moléculaire et son origine (crustacés ou fongique). En fonction de ses trois paramètres, le choix des paramètres de solution et ceux liés à la technique varient. Pour cela, une étude de faisabilité est à envisager à chaque changement de lot de chitosan.

Le chitosan a pu être électrofilé seul en le solubilisant dans un solvant organique comme le acide trifluoroacétique (TFA) (282) ou en effectuant préalablement un traitement à la soude dans le but de diminuer sa masse molaire (259).

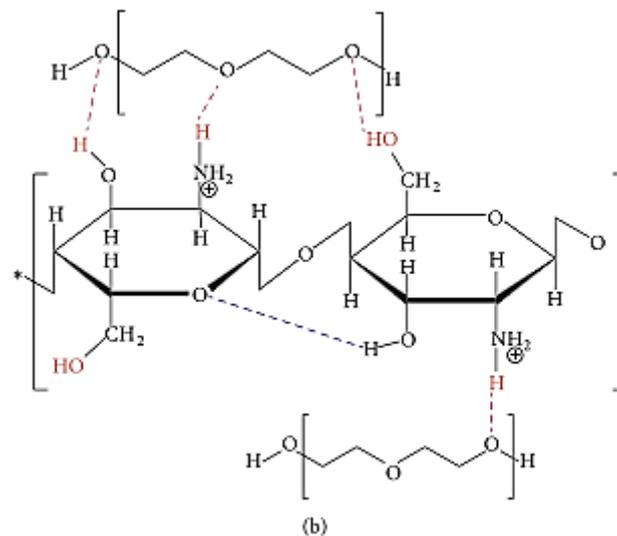


Figure 41 : Structure chimique des chaînes de CHT/PEO et leurs liaisons hydrogènes (281)

Le **Tableau 6** regroupe quelques études trouvées dans la littérature décrivant l'électrofilage du chitosan en présentant les applications potentielles des nanofibres obtenues.

Tableau 6: Liste non exhaustive de nanofibres à base de chitosan destinées à l'ingénierie tissulaire et à la libération de PA

Polymère(s)	DD %	Rapport(s) de masse (w/w)	Solvant	Agent actif	Applications potentielles	Réf
Chitosan/Sericin	–	1/1 ; 2.5/1 ; 4/1 ; 5/1	TFA	–	Pansements	(283)
Chitosan/Hydroxyapatite	75-85	–	TFA	–	Régénération osseuse	(282)
Chitosan/PEO	>60	5/5 ; 3/7 ; 7/3	AA (à 90%)/Eau	Nanoparticules d'argent	–	(265)
	94	~9/1	~6% AA	–	Régénération de la peau	(284)
Chitosan/PVA	–	1/9 ; 2/8 ; 3/7 ; 4/6	Diacide ; triacide ; tetracide à 0.2M	–	Ingénierie tissulaire	(269)
Chitosan/PVA	–	1/9 ; 3/7	Eau/2%AA	Acétate de mafénide	Pansement avec une activité antibactérienne	(274)
Chitosan/PVA	75-85	6/84 ; 8/92 ; 4/96	Eau/2%AA	Lidocaine et des nanoparticules de gélatine chargé d'erythromicine	Pansement avec une activité antibactérienne	(285)
Chitosan/PCL	–	5/5 ; 3/7 ; 7/3	AA/AF 30/70	–	Ingénierie tissulaire	(134)
Chitosan/soie	75-85	8/2 ; 5/5 ; 2/8	HFIP/TFA	–	Pansement	(278)
Chitosan/PEO/oxyde de graphène	75-85	9/1	2% AA	Doxorubicine	Libération contrôlée d'un agent anticancéreux	(101)
Chitosan/gélatine	90	1/1	70% AA	Fe ₃ O ₄	Pansement	(286)
Chitosan/Collagène	95		AA à 0.5M	–	Pansement	(287)

II.4 Stabilité des nanofibres de chitosan

Les nanofibres de chitosan sont souvent amenées à être réticulées afin d'améliorer leur stabilité dans les milieux aqueux, notamment lorsque le pH est inférieur au pKa du chitosan (6,5) comme par exemple l'environnement d'une plaie (pH proche de 5.5). Dans la littérature, on peut trouver de nombreux procédés de réticulation ou de stabilisation des nanofibres : *i)* traitement thermique, *ii)* réticulation chimique, *iii)* photo-réticulation. Le **Tableau 7** rapporte une liste non-exhaustive d'exemples de réticulation de nanofibres de chitosan.

Le **traitement ionique** est une réticulation non-covalente qui fait appel à des agents réticulants tels que l'acide citrique ou l'acide tannique. Dans certains cas, un traitement thermique est nécessaire afin d'activer la réaction entre le chitosan et l'agent ajouté (288,289).

La **réticulation chimique** est un processus à travers lequel les chaînes moléculaires sont liées entre elles par des liaisons covalentes via une réaction chimique entre un polymère et l'agent réticulant.

Grâce à ses fonctions amines et hydroxyles, le chitosan peut réagir avec un grand nombre d'agents réticulants. La **Figure 42** illustre la réaction des groupements fonctionnels du chitosan avec des agents de réticulation chimique en précisant à chaque réaction le groupe mis en jeu.

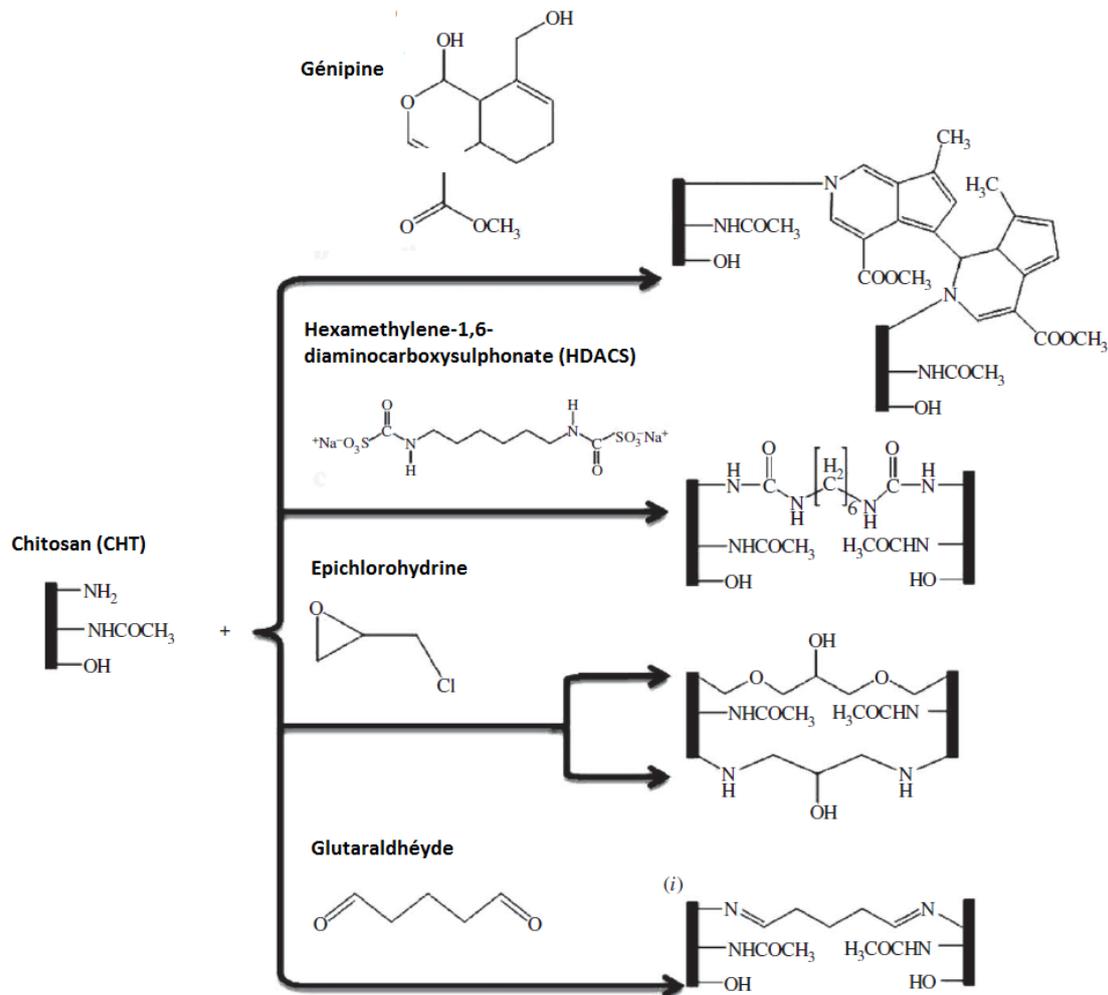


Figure 42 : Réaction de réticulation du Chitosan avec différents agents de réticulation agissant avec différentes fonctions présentes dans la structure du chitosan (NH_2 , $NHC(O)CH_3$ et OH) (290)

Les agents réticulants les plus récurrents pour la réticulation du chitosan sont les dialdéhydes tels que le glutaraldéhyde (GA). Il y a deux méthodes très souvent utilisées pour réticuler des nanofibres de chitosan par du GA : soit en l'introduisant directement dans la solution, soit en exposant les nanofibres aux vapeurs d'une solution de GA pendant 24 heures maximum. Certes, cet agent est très réactif mais il demeure très toxique pour les cellules et même pour l'opérateur. La génipine est un autre agent réticulant d'origine naturelle moins toxique que le GA est aussi efficace pour améliorer la

stabiliser les nanofibres. De même, elle a été employée en l'introduisant dans la solution à électrifiler ou par immersion des nanofibres de chitosan dans une solution de génipine dissoute dans l'éthanol (282). D'un point de vue biologique, la réticulation à la génipine a démontré une meilleure biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* que celle à la glutaraldéhyde (291).

Bien que les procédés de réticulation chimiques demeurent les plus efficaces, ils peuvent présenter certains inconvénients, comme la présence de traces d'agents réticulant n'ayant pas réagi qui sont généralement toxiques.

La **photo-réticulation** est un autre moyen de réticulation. Un agent photo-réticulant et un amorceur sont généralement introduits dans la solution à électrospinner en mélange avec le polymère. Après formation des nanofibres, celles-ci sont mises sous UV. Jin *et al.* ont démontré que l'agent réticulant incorporé 50% dans des nanofibres de chitosan ne présente pas de toxicité envers des cellules de fibroblastes (292).

Partie I : Etude Bibliographique

Tableau 7: Les propriétés ajoutées sur des nanofibres réticulées par voie thermique, chimique ou photochimique

Méthode de réticulation ou de stabilisation	Polymères	Propriétés apportées	Réf
Réticulation ionique 145°C pendant 15 minutes	chitosan/PEO/ acide citrique	-Stabilité des nanofibres dans l'eau pendant plus de 2 mois	(270)
Ajout de l'agent réticulant 2 min avant l'électrospinning puis traitement à 60°C pendant 24h Ou Introduction des nanofibres dans une solution contenant l'agent réticulant pendant 5h	Chitosan/ glycerol phosphate (GP), tripolyphosphate (TPP) acide tannique (TA)	-Stabilité des nanofibres traitées avec le TA avec la première méthode dans 1M d'acide acétique pour plus de 72 h - Stabilité des nanofibres dans l'eau pendant plus de 72h	(293)
Réticulation chimique			
Glutaraldéhyde (GA): l'aldéhyde réagit avec les groupements amines pour former des liaisons imides	chitosan	-Contrôle de la libération de la ciprofloxacine ou la moxifloxacine	(27)
Génipine : réaction avec les fonctions amines	Chitosan/PEO	-La présence de génipine n'empêche pas l'adhésion, la prolifération et la différenciation de cellules d'ostéoblastes sur les nanofibres de chitosan	(294)
		-Meilleure propriétés mécanique que la réticulation au GA	(295)
Epichlorohydrine réagit avec les groupements amines ou hydroxyle du chitosan	Chitosan dans du TFA	-Faible tenue mécanique comparée aux nanofibres réticulées à la génipine mais meilleur que celle du GA	(296)
hexaméthylène-1,6-diaminocarboxysulphonate (HDACS) réagit avec les groupements amines du chitosan à pH basique ou haute température	Chitosan dans du TFA	-Meilleure tenue des nanofibres à pH 3 qu'à pH basique	(297)
Photoréticulation			
poly(éthylène glycol)-600-diméthacrylate (PEGDMA), 2-hydroxy-1-[4-(2-hydroxyéthoxy)phényl]-2-méthyl-1-propanone (HEPK)	Chitosan	-L'agent de réticulation ne présente pas de toxicité envers les cellules de fibroblaste	(292)

II.5 Activité antibactérienne des nanofibres de chitosan

Plusieurs études ont rapporté l'incorporation d'agents antibactériens tels les antibiotiques, les antiseptiques et les ions métalliques dans des nanofibres à base de chitosan (voir **Tableau 8**).

Les nanofibres à activité antibactérienne sont généralement destinées au traitement des plaies à risques infectieux où la présence et l'accès facile aux bactéries entrave le processus de guérison. L'administration systémique d'antibiotiques, l'application de pommade ou encore de bandages/gazes sur la plaie sont les thérapies utilisées actuellement. Malheureusement, ces voies d'administration ne sont pas très bien contrôlées. Par voie systémique, il est difficile d'atteindre la concentration locale requise sans risque de toxicité et dans le cas des applications de crèmes le temps de séjour de l'agent antibactérien est souvent trop court (entre 2 et 3 h) ce qui nécessite un renouvellement fréquent des applications (298). Par conséquent, des pansements à base de nanofibres combinées avec des agents antibactériens avec une libération prolongée ont été proposés. Grâce à ces pansements antibactériens, le risque de toxicité est réduit et un meilleur confort est apporté au patient car il n'a pas besoin de faire des changements fréquents du pansement.

Les nanofibres de chitosan ont démontré leur efficacité pour traiter les plaies chroniques car elles favoriseraient la prolifération des cellules de la peau et stimulerait leur migration et différenciation. Ceci s'explique par les propriétés de surface des nanofibres (proche matrice extra cellulaire) mais aussi aux propriétés antibactériennes intrinsèques du chitosan. Tchemtchoua et al. ont démontré que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes, trois types cellulaires directement impliqués dans la régénération du tissu dermique et épidermique, ont parfaitement adhéré puis proliféré sur des nanofibres de chitosan, alors que les mêmes cellules ne prolifèrent et n'adhèrent pas sur des films de chitosan (284). Leur étude *in vivo* sur des souris a démontré que les nanofibres de chitosan favorisent la régénération de la peau. En effet, après deux semaines la plaie s'est complètement fermée sur la couche épidermique qui est une propriété critique pour limiter les risques d'infection.

En outre, le chitosan a montré son intérêt pour cette application non seulement pour ses propriétés antibactériennes intrinsèques mais aussi pour ses propriétés de vectorisation de principes actifs. En effet, la stratégie la plus retrouvée dans la littérature pour le traitement des infections chroniques est l'incorporation d'agents antibactériens dans des nanofibres de chitosan (298,299). Dans ce cas, la libération des principes actifs est contrôlée de façon à ce qu'elle soit prolongée dans le temps et que les quantités libérées soient efficaces.

Tableau 8 : Exemples d'agents antibactériens incorporés dans des nanofibres à base de chitosan

Molécules actives	Exemples	Polymères	Méthode d'insertion	Temps de Libération	Réf.
<u>Antibiotiques</u>	Tetracycline hydrochloride	PLA/Chitosan	Mélange	50% après 120h	(299)
	Amoxicilline	PCL	Intercalé entre deux couches de hydroxide	80% après 1000 h	(300)
	Gentamicine	Chitosan	Inséré dans des liposomes	Libération prolongée jusqu'à 24h	[265]
	Levofloxacin (LVF)	PCL (peau)/ Chitosan (cœur)	Coaxial	50% après 150h	(301)
	Ciprofloxacine (CFX)	Chitosan/PEO	Mélange	Pour 5% et 10% de CFX incorporée, 11% et 25.5% se sont libérés respectivement après 3 h.	(27)
<u>Antiseptiques</u>	Poly(hexaméthylène biguanide) hydrochloride	Chitosan/PEO	Mélange	85% après 24 heures	(302)
	curcumine	Chitosan/PLA	Mélange	Fermeture complète de la plaie après 21 jours	(303)
<u>Les ions métalliques</u>	Nanoparticules d'argent	CHT modifié	Mélange	Non précisé Après 7jours 16mg/g de nanoparticules d'argent se sont libérées	(304)
		CHT	Mélange		(305)
		CHT/PVA	Mélange		Non précisé
		Chitosan/ PEO	Mélange	Non précisé	(265)

II.6 Activité anti-thrombotique du chitosan sulfoné

La coagulation sanguine est la transformation du fibrinogène (une protéine initialement présente dans le sang et est synthétisée par le foie) par le biais d'une enzyme appelée thrombine en fibrine (une protéine fibreuse insoluble) qui conduit à la formation d'un caillot. La coagulation est donc une cascade de réactions enzymatiques manœuvrées par des facteurs de coagulation permettant la formation de thrombine dans un premier temps, qui permet la transformation du fibrinogène en fibrine.

La **Figure 43** schématise la cascade de la coagulation sanguine. La cascade de la coagulation est décrite classiquement par trois voies de coagulation : une voie extrinsèque initiée par une lésion endothéliale et une voie intrinsèque purement sérique, qui se rejoignent au niveau de l'activation du

Partie I : Etude Bibliographique

facteur de coagulation X en facteur Xa qui représente la voie commune. Ce dernier joue un rôle important dans la formation de la thrombine.

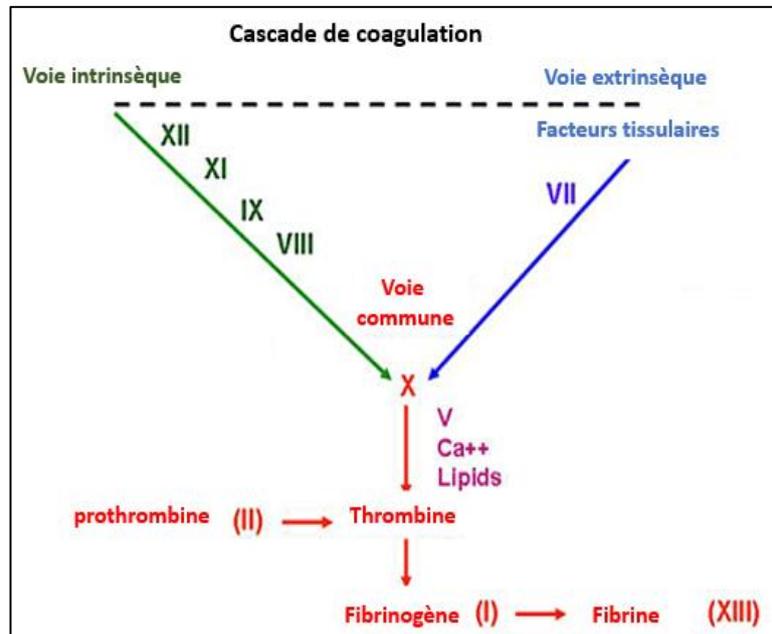


Figure 43: Diagramme de la cascade de la coagulation sanguine

L'héparine, est un glucosaminoglycane hautement sulfoné (cf. **Figure 44**), est largement utilisée comme agent anticoagulant dans les applications cliniques.

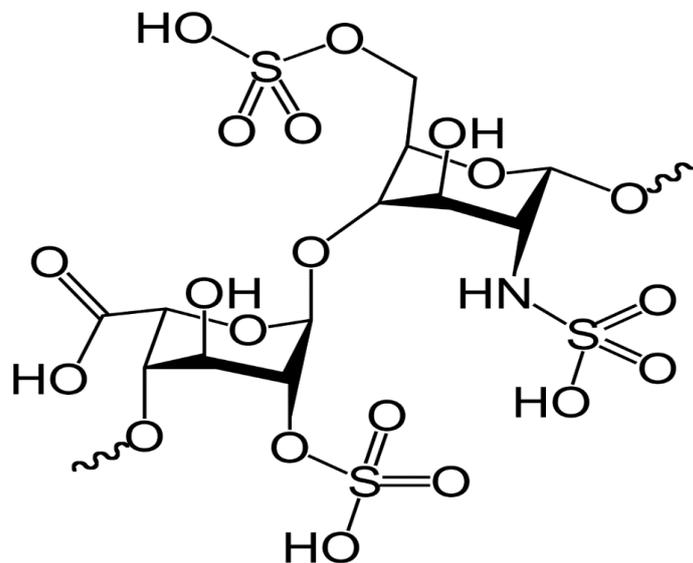


Figure 44 : Structure chimique de l'héparine

Le chitosan sulfoné présente une composition chimique similaire aux glucosaminoglycannes sulfatés (GAG) présents dans la matrice extracellulaire, notamment celle de l'héparine.

De nombreuses études ont démontré l'efficacité du chitosan sulfoné à inhiber la coagulation sanguine (9,253,307,308).

Dans la plupart des études, le chitosan sulfoné montre un effet sur la voie intrinsèque de la cascade de la coagulation sanguine. En revanche, son effet sur la voie extrinsèque et sur l'inhibition du facteur Xa dépend d'un certain nombre de paramètres tels que le pourcentage de soufre (252), la position des groupements sulfates et le poids moléculaires du polymère (253,307,309). A titre d'exemple, Hirano *et al.* ont démontré qu'un N,O-sulfoné avec une M_v de 12000 g/mol n'a pas d'activité anti-facteur Xa (253), alors que le même polymère étudié par Vongchan *et al.* avec une masse molaire plus élevée M_v 19000-71000 g/mol a un effet sur ce même facteur de coagulation (9). A l'inverse, G. Vikhoreva *et al.* ont démontré qu'un chitosan sulfoné qui a une faible masse molaire (8000-10000 g/mole) a un effet sur le facteur Xa (310), mais à condition qu'il soit hautement substitué. Le **Tableau 9** regroupe quelques études sur le chitosan sulfoné ayant une activité anticoagulante. On constate à travers ces études que l'activité anticoagulante dépend en effet du pourcentage de soufre, du degré de substitution, de la masse molaire mais aussi de la méthode de préparation du chitosan sulfaté, autrement dit de la position du soufre dans la structure du polysaccharide.

Tableau 9 : Exemples de Chitosans sulfonés rapportés dans la littérature utilisés pour des applications antithrombotiques

Agent sulfaté	Milieu	Chitosan sulfaté			Effet sur la cascade de coagulation	Réf
		M _w (10 ³) (g/mol)	DS	S (%)		
Phthaloylaté chitosan sulfaté		n.d	0.96	3.44	Voie intrinsèque	(308)
acide chlorosulfurique	DMF	186.5	n.d	14.2	Voie intrinsèque	(256)
acide chlorosulfurique	DMF	6.87	n.d	10.90	Voie intrinsèque	(307)
acide chlorosulfurique	DMF	71	n.d	n.d	Voie intrinsèque Activité anti-facteur Xa	(9)
acide chlorosulfurique	DMF	61	1.58	15.6	Voie intrinsèque Pas d'activité anti-facteur Xa	(252)
Caproic anhydride ou propanoic anhydride	méthanol	5.95	0.81	9.13	Voie intrinsèque	(307)
Chlorure de 2,3-epoxypropyltriméthylammonium	eau	7.90	0.72	7.44	Voie intrinsèque	(307)
Trioxide de soufre N,N-diméthylformamide	DMF	12	2.6	-	Voie intrinsèque Pas d'activité anti-facteur Xa	(253)
oléum	DMF	10	1.63	15.7	Activité anti-facteur Xa	(310)

A notre connaissance, aucune étude n'a reporté l'utilisation du chitosan sulfoné pour la préparation de nanofibres. On retrouve des études reportant l'utilisation de chondroïtine sulfate dans les nanofibres mélangée à du PVA (311) ou à la gélatine (312).

Néanmoins, des films à base de chitosan sulfoné ont été préparés et ont démontré une bonne activité anticoagulante (308). Campelo *et al.* ont modifié un film à base de chitosan en un film de chitosan sulfoné (240). Ils ont introduit le film de chitosan dans une solution contenant de l'acide (-formyl-2-furansulfonic) dissout dans du méthanol. Un agent réducteur a été ensuite ajouté afin de neutraliser la base de Schiff. Leur film de chitosan sulfoné a démontré une bonne capacité à réduire le dépôt de calcium et l'adhésion plaquettaire sur la surface comparé au film de chitosan non modifié.

II.7 Travaux antérieurs du laboratoire

Le chitosan est un polymère bien connu au laboratoire UMET. Il a été utilisé dans le cadre de la thèse du Docteur Adeline Martin effectuée soutenue en 2013, dont l'étude consistait à élaborer un assemblage multicouche (en anglais Layer-by-Layer) sur un support textile en PET par superposition alternée de deux polyélectrolytes (PE) de charges opposées : le chitosan et le polymère anionique de cyclodextrine (présenté dans le paragraphe I.3.1.5.1) (voir **Figure 45**). Les deux polyélectrolytes

Partie I : Etude Bibliographique

interagissent ensemble en formant un complexe de polyélectrolytes qui assurera la stabilité du système multicouche. L'application visée était les systèmes à libération prolongée qui a été assurée par la présence de complexes d'inclusion entre le principe actif et les CD présentes dans le PCD.

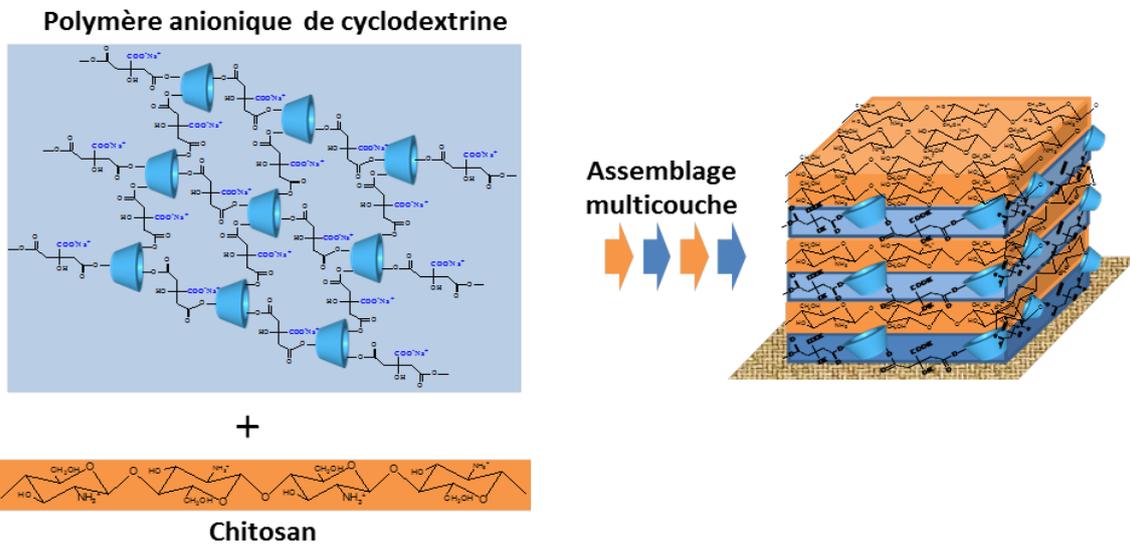


Figure 45 : Schéma de l'association du CHT et du polymère de cyclodextrines pour la formation d'assemblage multicouche

La technique utilisée pour la préparation de ces assemblages est une technique de trempage « dip-coating ». Elle consiste à tremper successivement le substrat dans différents bains de PE (voir **Figure 46**). Des assemblages allant jusqu'à 20 couches ont été réalisés et caractérisés par différentes techniques telles que la spectroscopie optique par guide d'onde (OWLS) qui a permis de suivre *in situ* la construction des assemblages. Afin d'améliorer la stabilité de l'assemblage dans différents milieux (eau, acide acétique, milieux physiologiques), une réticulation à la génipine a été effectuée. Ces assemblages ont démontré une bonne capacité à libérer de manière prolongée différents modèles de principes actifs, tels que le bleu de méthylène qui a gardé son activité microbiologique pendant 96 h. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications (197,313) et ont servis de base pour deux autres projets visant également à réaliser des assemblages multicouches (185,314,315).

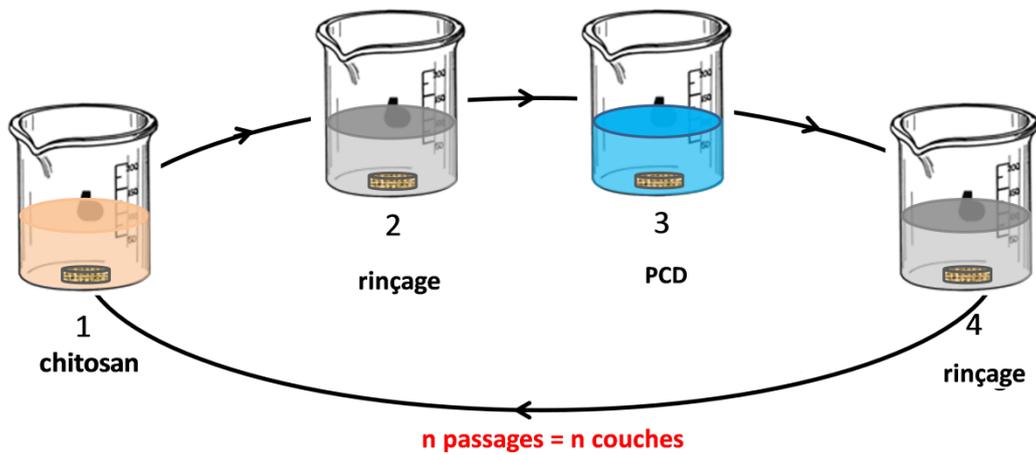


Figure 46 : Principe de la technique de trempage pour la formation d'assemblage multicouche

Ces travaux ont mis en évidence la formation de complexes polyélectrolytes entre le PCD et le CHT. C'est ce qui nous a alors inspiré à élaborer des NFs constituées du CPE CHT/PCD pour une libération prolongée de principe actif.

III. Objectifs de la thèse

Ces travaux de thèse se divisent en deux parties :

La première partie de la thèse concerne **l'élaboration de nanofibres de chitosan à activité antibactérienne**.

Un premier chapitre portera sur l'étude de l'électrospinning de nanofibres (NFs) de chitosan. La stabilité des NFs dans deux pH différents (pH 7.4 et pH 5.5) sera investiguée. Celles-ci seront chargées avec un agent antibactérien : le Triclosan (TCL). L'étude de sa cinétique de libération sera étudiée et l'activité antibactérienne de ces NFs sera également évaluée.

Un second chapitre portera sur l'élaboration de membranes nanofibreuses à activité antibactérienne à base d'un mélange de polyélectrolytes de chitosan et du polymère anionique de cyclodextrines. L'originalité de notre stratégie réside d'une part dans l'association de deux polyélectrolytes de charges opposées afin de former un complexe de polyélectrolytes. Ce complexe a pour rôle d'assurer la stabilité des nanofibres dans les milieux aqueux, d'une part, et d'autre part, le polymère anionique utilisé comporte des cyclodextrines qui auront pour rôle de piéger le TCL pour former des complexes d'inclusion. Ainsi, le principe actif sera bloqué et pourra être libéré de manière prolongée. Deux différentes approches ont été utilisées afin d'associer le triclosan aux nanofibres (cf. **Figure 47**) :

- Dans la première stratégie, nous avons préparé des nanofibres à base d'un mélange de chitosan (CHT) et du polymère anionique de cyclodextrines (PCD) complexé avec le principe actif (**Figure 47.I**).

- Dans deuxième stratégie, nous avons formé des nanofibres en cœur-peau avec la technique de l'électrospinning coaxial où le cœur sera composé du complexe PCD/TCL, qui sera enveloppé par une peau en chitosan (**Figure 47.II**).

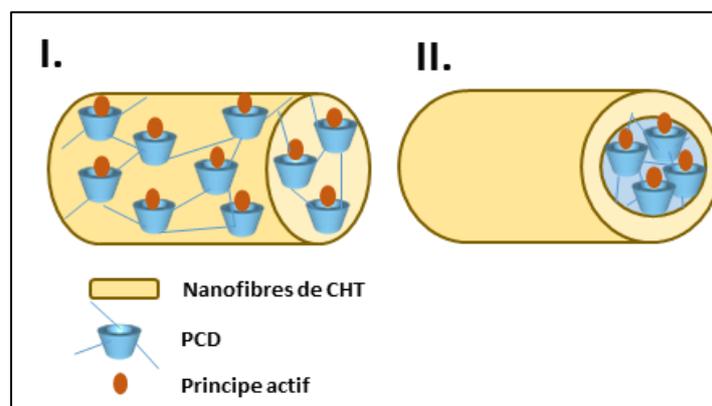


Figure 47 : Schéma des deux approches adoptées pour la formation de nanofibres à base de CHT/PCD à libération prolongée : I) nanofibres monolithiques II) nanofibres coaxiales

Les propriétés biologiques telles que la cytotocompatibilité et l'activité antibactérienne des nanofibres à base chitosan/ PCD nanofibres seront évaluées.

La deuxième partie de cette thèse concernera la synthèse d'un **chitosan sulfoné** (CHTS) qui sera utilisé pour élaborer des **nanofibres à activité antithrombotique**.

Pour la synthèse du CHTS nous avons appliqué un protocole décrit et publié par notre groupe en 1995 et qui consiste à utiliser une amination réductrice en employant des sels de sodium de l'acide 2-formyl benzène sulfonique (BZ1S) et de l'acide 2,4-formylbenzène disulfonique (BZ2S) pour modifier un textile enduit de chitosan, afin d'obtenir un filtre d'échange de cations appliqué à l'élimination des métaux lourds dans les milieux acides (316). En parallèle, cette voie a également été appliquée à une solution de chitosan et les chitosans mono et disulfonés résultants ont été caractérisés par des techniques de RMN et utilisés pour piéger les métaux lourds en milieu aqueux (242,317,318).

Dans le cadre des matériaux pour des applications environnementales, un excès molaire d'aldéhydes sulfonique par rapport aux groupements amines du chitosan a été utilisé dans le but de greffer la quantité maximale de groupements sulfonates et d'atteindre la capacité d'échange de cations maximale. Toutefois, pour l'application du chitosan dans les biomatériaux, les groupements amines primaires libres sur l'unité de répétition glucosamine sont considérés comme le caractère majeur qui confère des propriétés biologiques particulières au chitosan (319). Par conséquent, le taux de modification du chitosan sur la position N doit être contrôlé afin de maintenir suffisamment de groupements amines libres. De ce fait, nous avons contrôlé les conditions de la réaction d'amination réductrice afin de modifier partiellement les groupements amines du chitosan avec des groupements benzènesulfonates. Pour atteindre cet objectif, des rapports variables des deux aldéhydes sulfoniques (BZ1S ET BZ2S) par rapport aux groupements amines du chitosan ont été appliqués. Différents degrés de substitution et taux de soufres ont été trouvés qui nous ont permis de définir le meilleur compromis entre les groupements amines et les groupements sulfonates qui offre les meilleures propriétés biologiques d'une part et la meilleure activité anti-thrombotique d'autre part.

Des nanofibres ont été élaborées en employant un polymère soit mono, soit disulfoné. Une optimisation des paramètres qui permettent d'obtenir des nanofibres régulières a été réalisée suivie d'une étude de stabilité par réticulation des NFs à la génipine. L'évaluation de la cytotoxicité ainsi que l'activité anti-thrombotique des NFs a également été investiguée.

Partie II : Matériels & Méthodes

I. Nanofibres à base de chitosan à activités antibactériennes

I.1 Polymères utilisés

I.1.1 Le chitosan

Le chitosan est un polysaccharide obtenu après par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine qui est lui-même un polymère présent dans les carapaces de crustacés. La structure chimique du chitosan présentée sur la **Figure 48** a une unité D-glucosamine liée en β -(1-4) dite unité désacétylée et une unité N-acétyl-D-glucosamine dite unité acétylée.

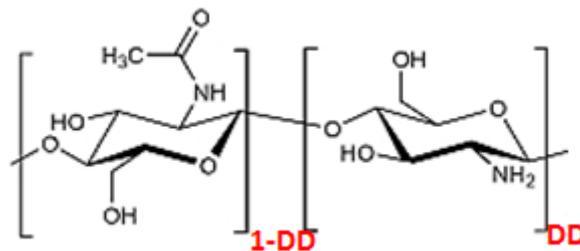


Figure 48 : Structure chimique du chitosan

Le chitosan est souvent caractérisé par son degré de désacétylation (DD) (>50%) sa viscosité et sa masse molaire. C'est un polymère à caractère cationique grâce à la présence de groupements amines. Le DD permet de connaître la densité de ces groupements.

Le DD a été mesuré dans la littérature à l'aide de nombreuses techniques telles que la spectroscopie (RMN, l'IR), les dosages potentiométriques ou colorimétriques (ninhydrine) ou encore par spectrophotométrie UV.

Deux lots de chitosan différents ont été utilisés au cours cette thèse. Leur DD a été mesuré par IR et par RMN du proton. Les deux protocoles de mesures sont détaillés en **Annexe 1**.

Les masses molaires des deux chitosans utilisés ont été mesurées par viscosimétrie capillaire (SHOTT Gerate) à une température de 20°C en utilisant un capillaire ayant un diamètre de 53 mm. Une solution mère de chitosan a été préparée à $C_0 = 10\text{g/L}$ dissout dans de l'acide acétique et l'acétate de sodium (0.3M et 0.2M respectivement). Quatre dilutions ont été réalisées ($C_1 = C_0/2$, $C_2 = 2C_0/5$, $C_3 = C_0/3$ et $C_4 = 2C_0/7$). Pour chaque solution 4 points de mesure du temps d'écoulement sont réalisés.

Les courbes des équations $\frac{t-t_1}{t_1 \cdot C_i}$ et $\frac{1}{C_i} * \ln\left(\frac{t_i}{t_0}\right)$ sont ensuite tracées. Deux droites linéaires sont obtenues dans les deux cas : $y_1 = ax_1 + b$ et $y_2 = cx_2 + d$. La viscosité cm^3/g est ensuite obtenue par l'équation suivante :
$$[\eta] = \frac{y_1 + y_2}{2}$$

Partie II : Matériels & Méthodes

La relation de Mark-Houwink a permis de calculer la masse viscosimétrique des polymères suivant

$$\text{l'équation : } Mv = \frac{\alpha \sqrt{[\eta]}}{K}$$

Où α et K sont les paramètres prédéterminés par Rinaudo et *al.* pour des chitosan de degré d'acétylation de 21% et dans les conditions opératoires précédemment décrites ($\alpha=0.76$ et $K= 74 \cdot 10^{-5}$ dL/g) (320).

Afin de vérifier la validité de ces résultats, le k' est calculé selon l'équation : $k' \cdot [\eta]^2 = \alpha$. Cette valeur doit être la plus proche possible de 0.5 afin de confirmer les résultats.

Le **Tableau 10** présente les résultats obtenus comparés aux données fournisseurs (Sigma-Aldrich).

Tableau 10 : Données fournies par Sigma-Aldrich et résultats expérimentaux concernant les deux lots de chitosan étudiés

		CHT94 Lot n° MKBL7900V	CHT80 Lot n° SLBG1673V
Données	DD (%)	94.3	80.3
	M_v (g.mol ⁻¹)	50000-190000	50000-190000
Expérimental	DD (%)	94 (RMN) ; 97 (IR)	76 (RMN) ; 85 (IR)
	M_v (g.mol ⁻¹)	95 000	130 000

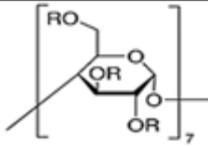
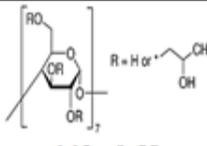
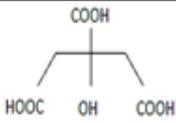
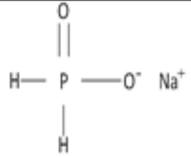
1.1.2 Le polyHP β CD ou le poly β CD

1.1.2.1 Synthèse

Le polymère anionique hydrosoluble de β CD ou de HP β CD (poly β CD) ou (polyHP β CD) est synthétisé à partir du monomère de cyclodextrine, l'acide citrique (CTR) utilisé comme agent réticulant et de l'hydrophosphite de sodium (NaH₂PO₂.H₂O) utilisé comme catalyseur (190). Les principales caractéristiques de ces produits sont données dans le **Tableau 11**.

Partie II : Matériels & Méthodes

Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques des produits utilisés pour la synthèse du polyHP β CD et le poly β CD

Produits	β -Cyclodextrine β CD	Hydroxypropyl- β - Cyclodextrine HP β CD	Acide citrique CTR	Hydrophosphite de sodium monohydrate NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O
N° CAS	7585-39-9	7585-39-9	5949-29-1	10039-56-2
Formules				
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	1135	1396	192	105.99
Point de fusion (°C)	-	255-265	153-159	90
Solubilité (g/L à 20°C, H ₂ O)	15.5	225.5	592	Librement soluble dans l'eau
Provenance	Roquette (Lesterm, France)	Roquette (Lesterm, France)	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich

La synthèse du polymère anionique contient trois grandes étapes : la dissolution des trois composants en proportion massique (CTR : catalyseur :CD = 10g :3g :10g) dans 100 mL d'eau, l'évaporation de l'eau jusqu'à l'obtention d'un dépôt sec sur la paroi du ballon avant la réticulation entre la β CD ou la HP β CD et le CTR à 140°C pendant 30 minutes sous vide. Le polymère obtenu est ensuite solubilisé dans l'eau puis filtré sur fritté (porosité 2) puis le filtrat est dialysé (Spectra/Por1 (6-8kDa)) pendant 72 heures. Enfin, le polymère hydrosoluble est obtenu sous la forme d'une poudre blanche après lyophilisation du dialysat. La structure du polyHP β CD est donnée en **Figure 49**.

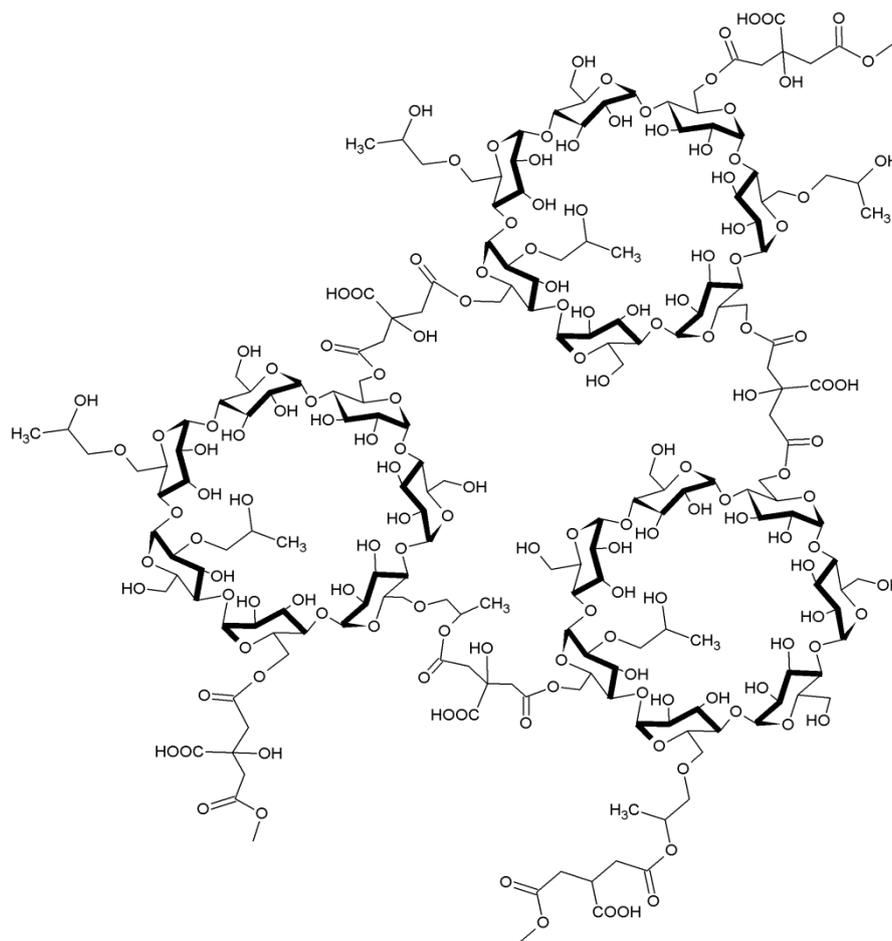


Figure 49 : Structure de polyHPβCD sous la forme déprotoné

1.1.2.2 Caractérisations

La masse molaire du polyHPβCD a été caractérisée par chromatographie d'exclusion stérique. Pour cela, un ensemble DIONEX série Ultimate 3000 équipé d'un détecteur statique de diffusion de la lumière aux miniDAWN TREOS 3-angle (Wyatt Techn.) et équipé d'un réfractomètre différentiel SCHAMBECK 2000 a été utilisé. La lumière incidente de longueur d'onde du détecteur MALS était de 658 nm et les trois angles de diffusion sont respectivement à 41,5°, 90° et 138,5°. Deux colonnes montées en série (SHODEX SB 806M HQ, 8 mm × 300 mm) et une pré-colonne (SHODEX OH-PAK SB-G, 6 mm × 50 mm) ont été utilisées. La solution a été chauffée à 35°C pendant 2h et filtrée (0.45 μm) (concentration du polymère=4.5 g/L, débit= 0.8 ml/min, phase mobile=0.15 M de phosphate tamponné 1M de NaCl et 0.03% de NaN₃ à pH 7.4, $dn/dc = 0.105$).

Les pourcentages massiques de la βCD et la HPβCD dans le polymère ont été estimés par 1HRMN dans le D₂O par calcul des rapports d'intégration du signal proton H1 anomérique de l'unité

d'anhydroglucose de la cyclodextrine et de celui des groupes méthylènes des groupes citratés (cf. **Annexe 2**).

La charge anionique a été déterminée par un dosage acido-basique où 100 mg de polymère ont été dissout dans 0.1M de NaCl et dosés par une solution de soude à 0.05 M.

Le **Tableau 12** regroupe les résultats de caractérisation concernant le polyHP β CD et le poly β CD.

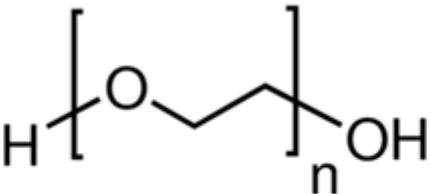
Tableau 12 : Caractéristiques de deux polymères anioniques de cyclodextrines

	M_w (g.mol. ⁻¹)	M_n (g.mol. ⁻¹)	M_w/M_n	CD (% massique)	COO ⁻ (mmol/g)
polyHPβCD	64650	13700	4.8	51	4.15 \pm 0.10
polyβCD	32900	13500	2.4	50	4.15 \pm 0.10

1.1.3 Polyéthylène oxide

Le PEO a été l'un premier polymère à être étudié pour la formation de nanofibres car il est facilement filable. Dans notre étude, on a eu recours au PEO pour faciliter le filage du chitosan. Nous avons choisi une masse molaire de 900000 g/mol. C'est un polymère qui est largement utilisé dans le domaine biomédical. Ses caractéristiques sont données dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Caractéristiques physico-chimiques du PEO

Polyéthylène oxide (PEO)	
	
N° CAS	25322-68-3
Masse molaire (g/mol)	900000
Point de fusion	65°C
Solubilité	
Provenance	Sigma-Aldrich

1.2 Le triclosan

Le triclosan (TCL) (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol) est un agent antimicrobien à large spectre. Il s'agit d'une molécule hydrophobe avec une très faible solubilité intrinsèque dans l'eau (10mg/l à 25°C). Nous avons mesuré sa concentration minimale inhibitrice (CMI) contre le *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (CiP224) et *Escherichia coli* (*E.coli*) (K12) et nous avons trouvé une

CMI de 0.78 mg/l. La méthode de mesure de la CMI est donnée dans l'**Annexe 3**. Les caractéristiques du TCL sont données dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Caractéristiques du Triclosan

Triclosan (TCL)	
N° CAS	3380-34-5
Masse molaire (g/mol)	289.5
Point de fusion	54-57.3°C
Solubilité	10
Provenance	Sigma-Aldrich

I.3 Caractérisations du complexes CD/TCL

I.3.1 Etude de a solubilité

L'étude de la solubilité permet d'évaluer la quantité de principes actifs en solution en fonction de la concentration de CD. Cette évaluation permet de déterminer la stœchiométrie des complexes formés et la constante d'association. Le diagramme de phase se construit en traçant la concentration du principe actif solubilisé en fonction de la CD (**Figure 50**). Higuchi et Connors (321), ont classifié les diagrammes de solubilité pouvant être obtenus sous deux différents types : Types-A et Types-B. Les types A informent sur la formation d'un complexe soluble. Tandis que les types-B indiquent qu'un complexe d'une faible solubilité s'est formé.

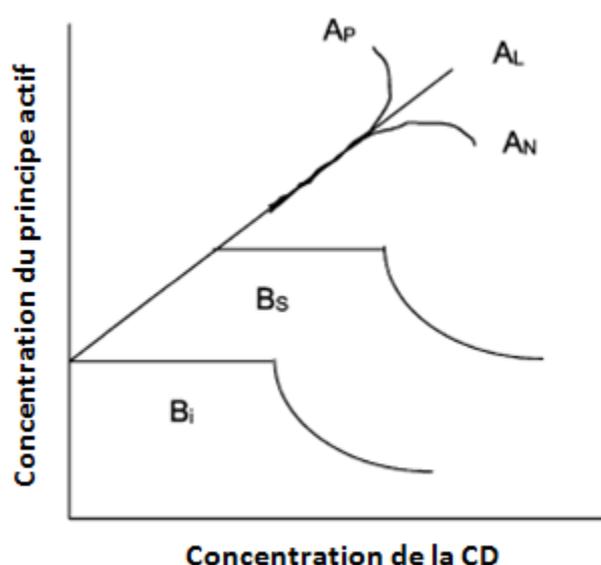


Figure 50: Différents types de diagramme de phase décrits par Higuchi et Connors (321)

La mesure de solubilité de principes actifs est effectuée dans une solution aqueuse. Un excès de principe actif est ajouté à une solution de polymère de cyclodextrine ou de cyclodextrine dans la gamme de concentration de 0 à 30 g/L de CD pour le polyHP β CD, poly β CD ou HP β CD et de 0 à 18 g/L de CD pour la β CD. Les mélanges sont agités à 25°C à 100 tr/min pendant 72h (jusqu'à l'équilibre) et ensuite filtrés (0.45 μ m Nylon®). La concentration du principe actif dans le surnageant est déterminée par spectroscopie UV-visible à 282 nm (Shimadzu UV-1800). Chaque expérience est réalisée en triplicata. Dans le cas de la formation d'un complexe 1 :1, la constante de complexation $K_{1:1}$ est calculée à partir l'équation décrite par Higuchi et Connors :

$$K_{1:1} = \frac{Pente}{S_0 * (1 - Pente)}$$

où S_0 représente la solubilité intrinsèque du TCL (10mg/L)

L'efficacité de complexation (traduit de l'anglais « complexation efficiency » (CE)) a été également mesurée à partir de la pente selon l'équation suivante : $CE = \frac{Pente}{(1 - Pente)}$

I.3.2 Caractérisation d'un complexe solide

I.3.2.1 Préparation du complexe

Le TCL et la HP β CD (CD) ou le polyHP β CD (PCD) ont été introduits dans l'eau en quantités équimolaires (25mM :25mM). Les mélanges ont été laissés sous agitation (100 tr/min) à 37°C pendant un temps d'équilibre de 72h préalablement déterminé. Par la suite, les solutions ont été filtrées (0.45 μ m, Nylon®), puis congelées et enfin lyophilisées. Une poudre blanche est alors obtenue. Le complexe solide a été caractérisé par différentes techniques (RMN, ATG, DSC).

I.3.2.2 Résonance magnétique nucléaire du proton 1H

La RMN du proton a été réalisée afin de mettre en évidence la complexation entre le principe actif et la cyclodextrine. Les spectres des polymères seuls, des PA ainsi que des complexes d'inclusion formés ont été réalisés dans l'eau deutérée (D₂O) sur un appareil Haute Résolution 300MHz (Bruker AC300) au centre commun des mesures de l'Université de Lille. 10 mg du complexe préparé ou des produits purs ont été solubilisés dans 1 mL de D₂O.

I.3.2.3 Analyse calorimétrie différentielle à balayage

Les complexes ont également été caractérisés par DSC (DSC Q100, TA instruments) sous azote ultra pur à 10°C/min entre -80 °C à 200°C. Trois cycles ont été effectués (-80°C à 200°C, puis de refroidissement à -80°C et enfin un 2^{ème} chauffage jusqu'à 200°C).

I.3.2.4 Analyse thermogravimétrique

Les complexes ont été caractérisés par ATG sur un appareil TGA Q50 (TA Instruments) à partir de la température ambiante jusqu'à 500°C avec une vitesse de chauffage de 5°C/min. Les échantillons ont été placés dans un creuset en alumine (oxyde d'aluminium) sous azote (balance 10mL/min, four 90mL/min).

I.4 Electrospinning

I.4.1 Préparation des solutions

I.4.1.1 CHT/PEO avec ou sans principe actif

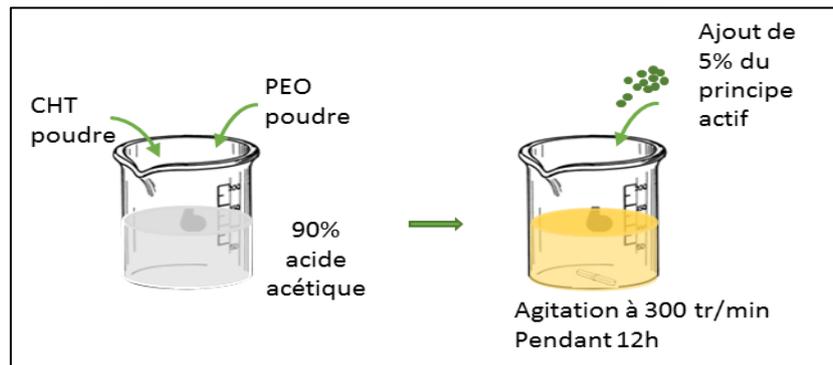


Figure 51 : Schéma de la préparation de la solution Du mélange CHT/PEO dissout dans 90% d'AA

Le chitosan et le PEO en poudre ont été mélangés ensemble à différents rapports de masse (50/50, 70/30, 80/20 et 90/10 w/w) puis ils ont été dissous dans une solution aqueuse d'acide acétique à 90% (v/v). La concentration choisie pour l'électrofilage est de 3.5 (w/v) %. La **Figure 51** schématise les étapes de préparation. La solution est laissée sous agitation (300 tr/min) pendant une nuit jusqu'à complète dissolution des polymères. Le TCL étant soluble dans des solutions aqueuses fortement acides alors ce dernier a été introduit dans la solution à électrofiler.

I.4.1.2 CHT-PCD/TCL

I.4.1.2.1 En mélange

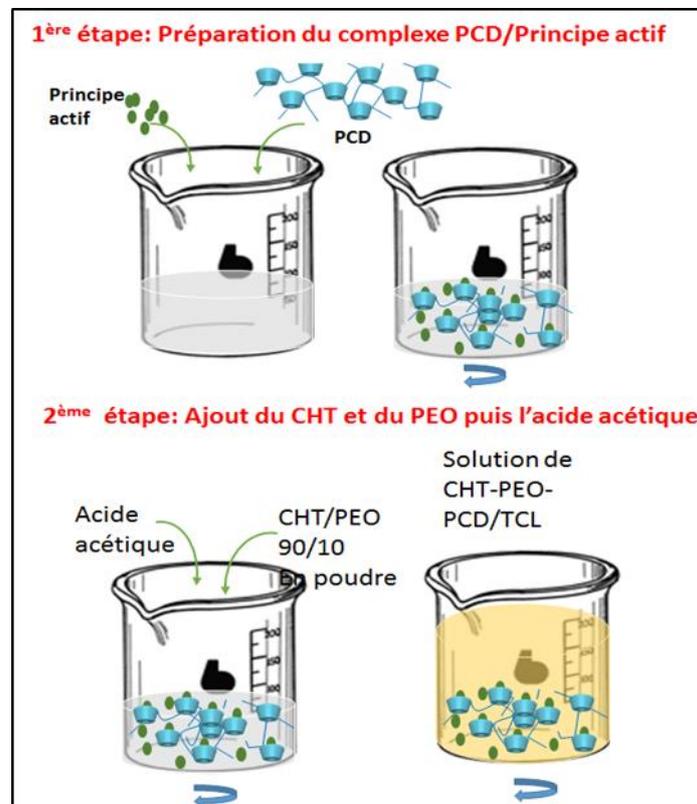


Figure 52 : Etape de préparation de la solution du mélange CHT-PCD

La préparation de la solution du mélange CHT-PCD incluant le PCD a nécessité un produit en 2 étapes (Cf. **Figure 52**).

La première étape était de préparer le complexe entre le PCD et le TCL dans l'eau. Pour cela, 1.75%, 3.5% et 8% ont été dissout dans l'eau puis une quantité bien précise du TCL a été alors ajoutée de façon à ce que sa concentration totale en masse sèche soit de 5wt% dans les NFs. Le mélange PCD/TCL a été mis sous agitation pendant 72h qui est le temps nécessaire pour que le complexe se forme.

La deuxième étape, consiste à mélanger le complexe PCD/TCL avec le CHT/PEO. Pour ce faire, le mélange CHT/PEO en poudre à 90/10 w/w ont été introduit dans la solution de complexe formé dans l'eau. L'acide est ajouté à la fin dans la solution aqueuse de façon à obtenir une concentration de 90% v/v.

Partie II : Matériels & Méthodes

La même solution a été préparée avec le monomère du CD utilisé comme témoin. Le **Tableau 15** regroupe les concentrations des solutions préparées.

Tableau 15 : Concentrations des solutions de CHT/TCL, CHT-CD/TCL, CHT-PCD1.75-3.5-8/TCL

	Concentrations des solutions			
	CHT (w/v)	PEO (w/v)	PCD or CD (w/v)	TCL (wt%)
CHT/ TCL	3.15	0.35	-	5
CHT- CD/TCL	3.15	0.35	4	5
CHT -PCD1.75/TCL	3.15	0.35	1.75	5
CHT-PCD3.5/TCL	3.15	0.35	3.5	5
CHT-PCD8/TCL	3.15	0.35	8	5

1.4.1.2.2 Coaxiale

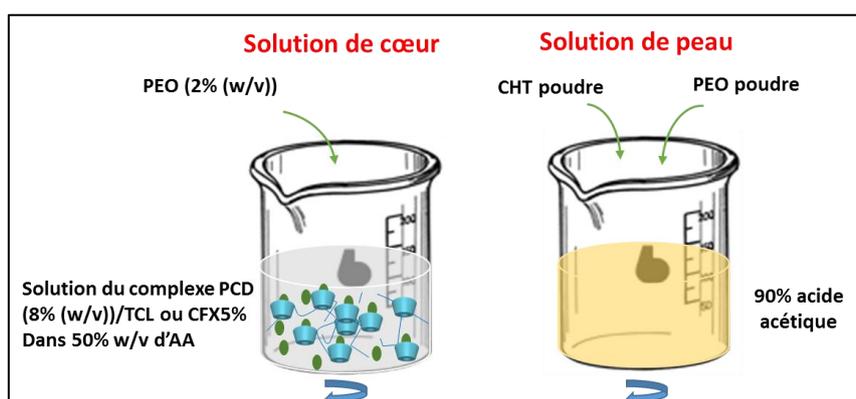


Figure 53 : Schéma de la préparation des solutions de peau et de de cœur pour l'électrospinning coaxial

Deux solutions ont été préparées, une pour le cœur et une pour la peau (cf. **Figure 53**).

La solution de cœur se compose du complexe d'inclusion du PCD 8wt% (w/v)/TCL (5% par rapport à la concentration totale des polymères du cœur + peau) mélangé à du PEO (2wt% (w/v)) dissouts dans de l'acide acétique (AA) à 50% (w/v). La solution de peau est composée de 3.5wt% CHT/PEO (90/10) solubilisé dans de l'acide acétique à 90% (w/v). Le **Tableau 16** regroupe les compositions des concentrations de cœur et de peau.

Tableau 16: Compositions des concentrations de cœur et de peau pour l'électrospinning coaxial

Cœur		PEO	
Composition	Solvant	Composition	Solvant
PCD (8 % (w/v) PEO (2% (w/v) TCL (5 wt%)*	acide acétique (AA) à 50% (v/v)	3.5% (CHT/PEO) (8/2 w/w)	acide acétique (AA) à 90% (v/v)

*Par rapport à la masse totale des polymères cœur+peau

I.4.2 Dispositif d'électrospinning

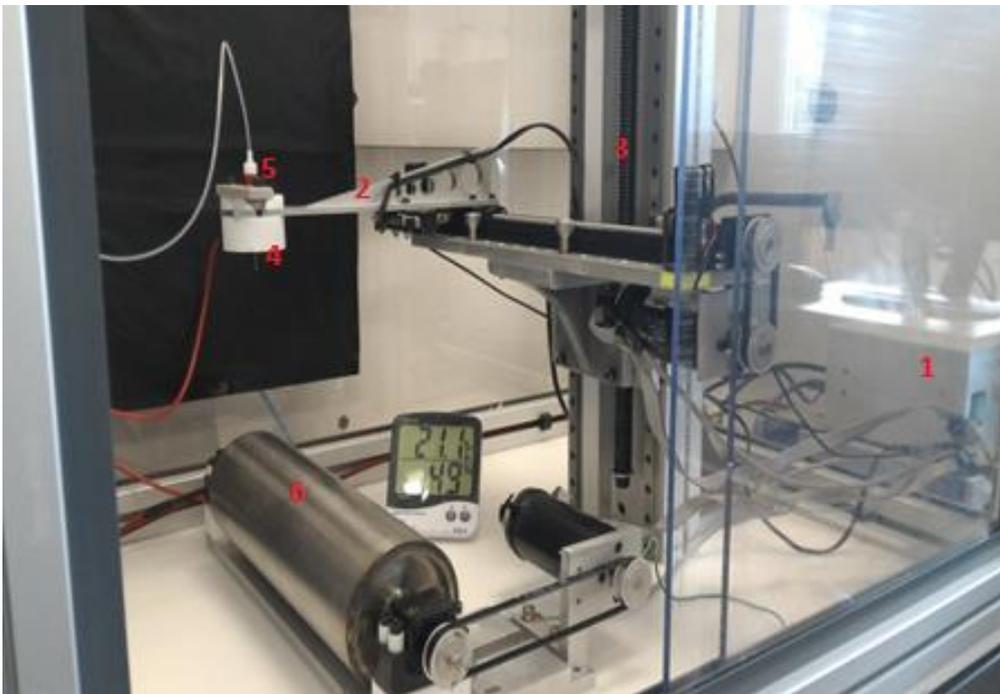


Figure 54 : Photographie du dispositif d'électrospinning de l'UMET

Le dispositif d'électrospinning dont dispose l'UMET est un appareil mis en place au sein du laboratoire (**Figure 54**). Il se compose d'un voltage de haute tension (1) (tension maximale 30kV), de deux pompes-pousse seringue (Fischer scientifique). L'aiguille (5) utilisée pour le filage est posée sur un support en téflon (4) qui lui aussi est posé sur un système de chariot (2) pouvant faire des allers-retours sur une longueur de x. Les nanofibres obtenues sont collectées sur un cylindre rotatif (6) ayant une vitesse maximale ajustée à 300 tr/min. La distance entre l'aiguille et le collecteur est réglée grâce un système d'élévation manuel (3). La machine est munie d'un logiciel de commande marche /arrêt du système de chariot et du cylindre rotatif. Il permet également de contrôler les vitesses du chariot et du cylindre.

I.4.3 Conditions d'électrospinning

La solution préparée est introduite dans une seringue de 5 mL puis posée sur la pompe pousse-seringue. La solution est alors conduite à travers une tubulure en polyéthylène (diamètre interne 1 mm, VYGON) vers l'aiguille (simple 21 jauge, TERUMO ou coaxiale cœur 0,51 peau 1,37, Linari Sarl). Lorsqu'une goutte sort de l'aiguille une haute tension est alors appliquée. La goutte se déforme en formant le cône de Taylor. Le jet s'étire et les nanofibres se déposent sur le collecteur. Les conditions hygrométriques pour le filage à l'intérieure de la cabine de filage sont fixés à : 35% ± 2% et 20°C ± 2°C. Le **tableau 17** regroupe les paramètres optimaux pour le filage.

Tableau 17 : Paramètres d'électrofilage optimaux pour la préparation de nanofibres de CHT/PEO, CHT-PCD en mélange ou en coaxial.

Paramètres	Nanofibres CHT-PEO	Nanofibres CHT-PCD (mélange)	Nanofibres coaxiales CHT-PCD	
			cœur	peau
Voltage (kV)	12-15	15	15	
Débit (mL/h)	0,3-0,5	0,5	0,3	0,4/ 0,7/ 0,9
Distance (mm)	200	200	200	
Aiguille diamètre interne (mm)	0,8	0,8	0,51	1,37
Vitesse du cylindre (tr/min)	100	100	100	
Vitesse du chariot (tr/min)	fixe	fixe	fixe	fixe

I.4.4 Caractérisations des solutions

I.4.4.1 Mesure de la viscosité dynamique

La viscosité des solutions a été mesurée à l'aide d'un rhéomètre (Anton Paar) équipé d'un accessoire plan/plan (PP25, d=25 mm) à 22°C et à un taux de cisaillement constant de 100 s⁻¹.

I.4.4.2 Mesure de la conductivité

La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre CDM120 (MeterLab ®) à température ambiante.

I.4.5 Caractérisations des nanofibres

I.4.5.1 Microscopie électronique à balayage

L'observation au microscope électronique à balayage, (MEB, Higuichi S-4700SEM FEG (Field Emission Gun)) opérant sous une tension de 5kV et un intensité de 10 μ A, a permis l'observation de la morphologie des nanofibres et la mesure des diamètres. Au préalable, une couche de carbone ou chrome (100 Å) a été déposée sur la surface des fibres.

Pour la mesure des diamètres de nanofibres, une cinquantaine de fibres sont sélectionnées et leur diamètre moyen, distribution ont été déterminées à l'aide du logiciel *ImageJ* afin de déterminer un écart type.

I.4.5.2 Microscopie électronique à transmission

L'observation au microscope électronique à balayage, (MET, tecnai G2 205FEI) opérant sous une tension de 200 kV a permis de caractériser les nanofibres coaxiales. Pour cela, des fibres ont été déposés durant 10 seconde sur une grille en cuivre 300 recouverte d'une mince couche de carbone. Un dépôt carbone a été ensuite effectué sur les nanofibres afin de rendre leur surface conductrice.

I.4.5.3 Spectroscopie Infrarouge

Un spectromètre Perkin Elmer (Spectrum One) équipé du logiciel Spectrum a été utilisé pour réaliser les analyses infrarouges en mode ATR (réflexion totale atténuée). Les spectres ont été enregistrés après 8 scans sur une échelle de nombre d'onde allant de 650 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

I.4.5.4 Analyse isothermique du TCL

Une analyse isothermique du TCL a été effectuée à l'aide du TGA Q50 apparatus (TA instruments) à des températures constantes de 90°C, 120°C ET 140°C. Les échantillons ont été placés dans un creuset en alumina (oxide d'aluminium) sous azote (90 mL/min).

I.4.5.5 Analyse thermogravimétrique

La même procédure décrite au I.3.2.4 a été appliquée sur les nanofibres.

I.4.5.6 Diffraction par Rayon-X

La forme physique des nanofibres a été déterminée par diffraction des rayons X à grands angles (WAXS) à l'aide d'un équipement de mesure Genix microsource (Xenocs) fonctionnant à 50kV et 1 mA. Le rayonnement Cu-K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) a été choisi et ciblé au moyen de miroirs FOX2S. La taille du faisceau a été enregistrée à l'aide de deux jeux de fente Scaterless[®]. Les modèles 2D-WAXS ont été enregistrés sur une caméra CCD Photonic science VHR. La distance de travail a été calibrée en utilisant un échantillon de PLA. Des corrections standards (dark current substraction and background

correction) ont été appliquées aux échantillons avant leur traitement. Les profils d'intensité ont été obtenus par intégration azimutale 360 des échantillons à l'aide du logiciel[®] fit2D.

I.4.6 Stabilité des nanofibres de chitosan

I.4.6.1 Réticulation à la génipine

La génipine (gnp) est obtenue à partir de la géniposide par hydrolyse enzymatique avec la β -glucosidase. La formule est représentée sur la **Figure 55**.

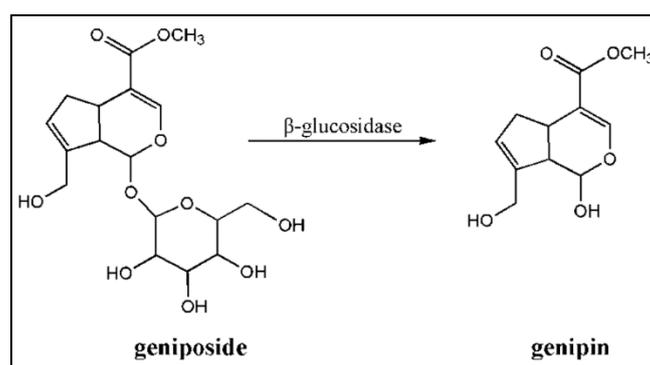


Figure 55 : Formule chimique de la géniposide et la génipine

La génipine est un agent réticulant non-toxique peut réagir spontanément avec les groupements amines du chitosan. Des liaisons covalentes se forment entre les deux composés et une coloration bleue apparaît après la réticulation. Le mécanisme de réaction entre le CHT et la Génipine est représenté sur la **Figure 55**. Deux réactions différentes se produisent sur deux sites différents de la génipine (atome carbone 3 et 11).

La première réaction (**Figure 56 (a)**) est la plus rapide et est portée sur l'atome de carbone C3 de la génipine. Ce carbone subit une attaque nucléophile par l'amine primaire $R-NH_2$ du chitosan qui conduit à l'ouverture du cycle dihydropyrane. Un intermédiaire aldéhyde se forme qui est réattaqué par l'amine secondaire. A la fin un composé hétérocyclique, lié de façon covalente au CHT, se forme. Cette réaction est à l'origine du changement de couleur des membranes (322).

La deuxième réaction est plus lente (**Figure 56 (b)**). Le carbone 11 de la génipine subit une substitution nucléophile (SN_2) de la fonction ester de la génipine par le groupement amine primaire du CHT pour former un amide secondaire et libérer une molécule de méthanol. Cette réaction est responsable de l'apparition de la coloration bleue qui dépend de la présence d'oxygène (323).

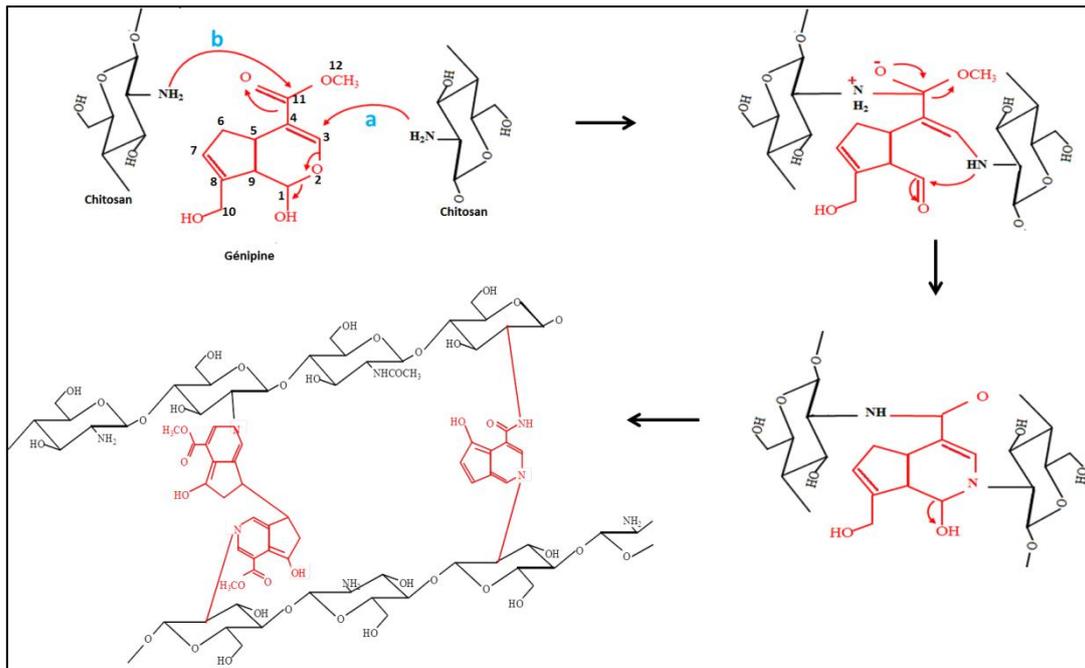


Figure 56 : Réaction de réticulation entre le chitosan et la génipine a) réaction rapide b) réaction lente

Les nanofibres ont subi une réticulation à la génipine. Pour cela, le protocole précédemment rapporté par (295) et qui consiste à introduire la génipine en mélange avec la solution de polymères a été appliqué. La génipine a été ajoutée à la solution à une concentration de 0.1wt% quelques minutes avant l'électrospinning. Suite à l'électrofilage des nanofibres celles-ci ont été exposées aux vapeurs d'eau à 37°C pendant 24h pour induire réaction de réticulation.

1.4.6.2 Traitement thermique

Une autre méthode pour stabiliser les nanofibres a été employée et qui est le traitement thermique. Les nanofibres ont été placées à plat dans une étuve thermostatée à 90°C et 140°C pendant 4h et 24h afin de permettre la formation de liaisons faibles par évaporation d'eau. Les nanofibres ont été par la suite placées dans une étuve sous vide à 37°C pendant minimum 24h.

1.4.6.3 Suivi de dégradation

La dégradation dans un milieu proche du milieu physiologique, à savoir le PBS 0.15M à pH 7.4 ou pH 5.5 (obtenu par ajout d'une solution d'HCl (0.05M) à une solution de PBS) a été évaluée sur des échantillons de nanofibres électrospinnées. 10 à 15 mg de NFs ont été découpés puis introduit individuellement dans 20mL de PBS sous une agitation de 100 tr/min sur un banc oscillant thermostaté à 37°C (Thermoshake, Gerhardt, Les Essart-le-Roi, France). A chaque intervalle de temps, l'échantillon est sorti du milieu puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les traces de sels puis séché à 37°C et enfin pesé. Les résultats donnés sont la moyenne d'un triplicata. La masse restante a été exprimée en fonction du temps qui a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Masse restante (\%)} = (M_0 - M_t) * 100 / M_0$$

Où M_0 est la masse de l'échantillon avant son immersion dans le PBS et M_t masse de l'échantillon après un temps t de dégradation.

L'analyse par RMN du proton du milieu de dégradation a été effectuée dans le but d'identifier la nature des composés libérés dans le milieu. Pour cela, le milieu de dégradation a été récupéré puis congelé et lyophilisé. Le solide obtenu a été ensuite solubilisé dans du D_2O .

1.4.6.4 Taux de gonflement

Le taux de gonflement a été évalué par méthode thermogravimétrique dans le PBS à pH 7.4 ou pH 5.5. Pour cela, les nanofibres sont découpées puis pesées (10 mg/ échantillon). Après 4h, 24 h d'agitation (100tr/min) à 37°C, les échantillons ont été retirés du milieu, rincés dans l'eau pendant 30 secondes, ensuite l'excès d'eau est absorbé par un papier absorbant. Après la pesée de l'échantillon, le taux de gonflement est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de gonflement (\%)} = (M_t - M_0) * 100 / M_t$$

1.5 Etude de la libération

1.5.1 En mode statique (en batch)

Les profils de libération des principes actifs à partir des nanofibres ont été mesurés dans un milieu physiologique (PBS, pH7.4 et pH5.5) en batch. Brièvement, les échantillons sont pesés (20 mg) et placés individuellement dans 150mL de PBS sous agitation (100 tr/min) dans une étuve oscillante thermostatée à 37°C (Thermoshake, Gerhardt, Les Essart-le-Roi, France). Pour chaque temps prédéterminés, 3 mL de cette solution sont prélevés puis transférés dans des cellules en quartz (1 cm). La solution est ensuite remise dans le milieu. La quantité de principe actif libéré est déterminée par spectroscopie UV-vis (Shimadzu UV-1800) à 282 nm après avoir réalisé une courbe d'étalonnage propre à chaque milieu.

1.5.2 En mode dynamique

La libération en mode dynamique est mesurée à l'aide d'un appareil de dissolution à flux continu entièrement automatisé (Sotax®USP4, Suisse) dans une configuration en circuit fermé associé à un spectromètre UV-visible (perkin Elmer Lambda 25) et une pompe à piston (30 mL/min) dont dispose le laboratoire INSERM U1008 de l'université de Lille. Le principe de cet appareil est schématisé sur la **Figure 57**.

Les échantillons (20 mg) ont été placés dans une cellule d'écoulement cylindrique (22.6 mm) en présence d'une bille (6 mm de diamètre) ajoutée afin de réguler le flux. Le milieu de dissolution contenant 200 mL de PBS (pH 7.5 ou pH 5.5, filtré au préalable) est placé dans des bouteilles de 500

mL sous agitation 300 tr/min. La circulation est assurée par une pompe à piston avec un débit de 35mL/min. Un bain marie permet de maintenir la température à 37°C pendant l'expérience. Une mesure a été relevée chaque cinq minute pendant les premières 4 heures puis chaque 30 minutes jusqu'à la fin de la libération. La quantité de principe actif libérée est quantifiée par spectroscopie UV-visible à 282 nm grâce à une courbe d'étalonnage préliminaire propre à chaque milieu.

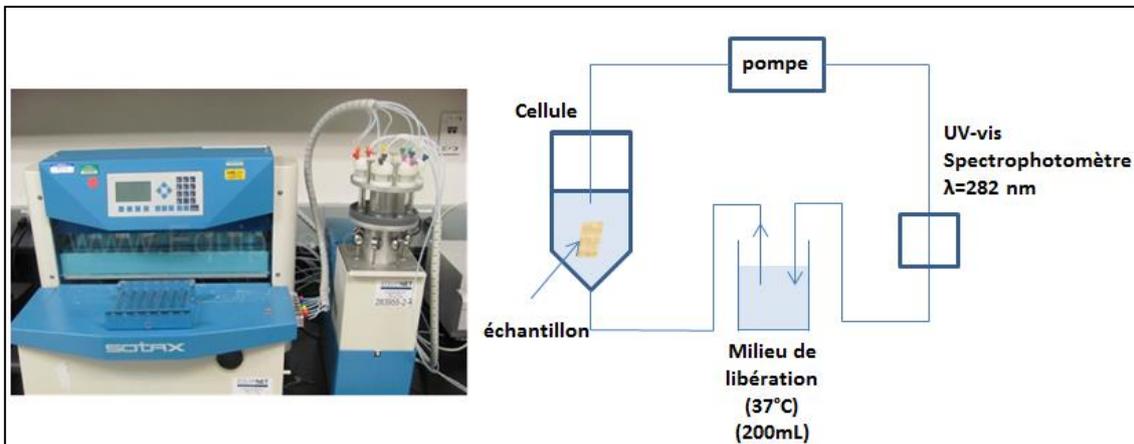


Figure 57 : Appareillage Sotax USP4 et sa schématisation

I.5.3 Mécanisme de libération : modèle de Korsmeyer-Peppas

Le modèle Korsmeyer-Peppas permet de savoir si le mécanisme de libération suit la loi de Fick ou non. C'est-à-dire de savoir si le PA se libère par une simple diffusion ou par une diffusion combinée avec une perte de masse ou un gonflement. Il est basé sur une relation simple qui décrit la libération du PA à partir d'un système polymère. Nous avons utilisé ce modèle sur les résultats de libération du TCL obtenus en appliquant l'équation suivante :

$$M_t/M_\infty = kt^n$$

Où M_t/M_∞ est le pourcentage de PA cumulé pendant un temps t , n est l'exposant de la libération et k est la constante de libération. Cette équation n'est applicable que pour des temps très faibles et une portion de la courbe de libération où $M_t/M_\infty < 0.6$.

Ce modèle classe les cinétiques de libération en se basant sur l'exposant n qui est estimé à partir de la droite de régression du $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction du $\ln(t)$. Dans le cas des matrices cylindriques, si $0.45 \leq n$ alors le modèle correspond à un mécanisme de diffusion dit Fickian, si les valeurs sont entre $0.45 < n < 0.89$ ou $n=0.89$ ou $n > 0.89$ alors il s'agit d'un phénomène de transport de masse non-Fickian c'est-à-dire le principe actif diffuse accompagné d'un phénomène de gonflement ou d'érosion.

I.6 Etude biologique

Les évaluations biologiques ont été réalisées au sein des laboratoires INSERM U1008 et INSERM U995 à l'Université de Lille.

I.6.1 Culture des cellules

Des cellules épithéliales pulmonaires embryonnaires (L132) et ostéoblastes (MC3T3-E1) sont utilisées. Les cellules sont cultivées dans le Milieu Essentiel Minimum de Eagle (MEM, Gibco®, LifeTechnology) contenant 50 µg/mL de gentamicine (Panpharma), 250 µg/mL de fungizone (Gibco BRL) et 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio). L'utilisation de ces cellules est justifiée par leur sensibilité à la cytotoxicité et leur reproductibilité. Les expériences sont menées selon la norme ISO 10993-5.

I.6.2 Adhésion cellulaire

Les nanofibres ont été découpées en disques de 15 mm de diamètre puis laissées sous vide à 25°C pendant 24h. Un traitement UV a ensuite été réalisé sur les nanofibres en exposant chaque face pendant 1h. Elles ont été placées par la suite dans des plaques 24 puits en les maintenant au fond à l'aide d'un anneau en caoutchouc biocompatible (Viton®, radiospare). Trois plaques ont été préparées pour les trois temps de l'adhésion 30, 60 et 120 minutes. Les manipulations sont répétées 6 fois.

Dans un premier temps, 600 µL de milieu de culture ont été déposés dans chaque puit contenant les échantillons. Ensuite, 400 µL de la suspension de cellules ont été ajoutés de façon à obtenir 40000 cellules par puits. Les trois plaques ont été mises en incubation pendant 30, 60 et 120 minutes.

Pour chaque temps, le milieu de culture a été retiré, les puits ont été rincés deux fois au PBS puis 300 µL d'une solution de Para-nitrophénylphosphate (pNPP, 3 mg dissout dans 1 mL d'une solution tampon à pH 5.5) ont été introduits dans chaque puit. Les plaques ont été recouvertes d'aluminium et placées en incubation pendant 3 heures. La réaction a été arrêtée avec 150 µL de soude (1N). Par la suite, 200 µL de chaque puits ont été transférés dans une plaque à 96 puits. Enfin, l'absorbance des solutions a été mesurée au lecteur ELISA à une longueur d'onde de 405 nm.

I.6.3 Viabilité cellulaire

I.6.3.1 Préparation des échantillons

Les nanofibres ont été découpées en disques de 15 mm de diamètre puis laissées sous vide à 25°C pendant 24h. Un traitement UV a été réalisé sur les nanofibres en exposant chaque face pendant 1h. Par la suite les membranes ont été placées dans une plaque à 24 puits contenant 1 ml du MEM

pendant 24h. Le test d'extraction pour évaluer la toxicité du milieu d'extraction et donc la migration d'un agent cytotoxique a été réalisé sur le milieu. Le test en contact direct pour évaluer la cytocompatibilité ou l'aptitude des cellules à proliférer a été réalisé sur les membranes (**Figure 58**).

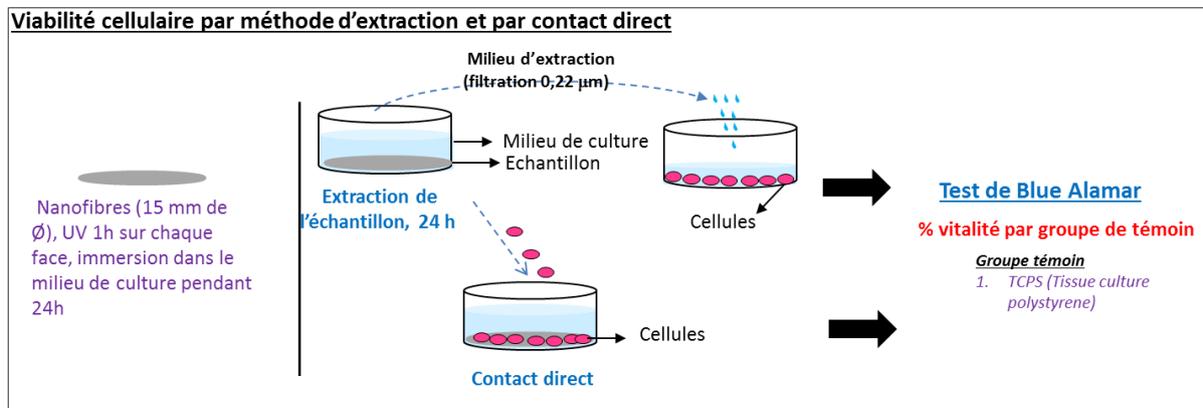


Figure 58 : Représentation schématique du test de viabilité par méthode d'extraction ou par contact direct

1.6.3.2 Méthode d'extraction

Les cellules sont préalablement repiquées dans une plaque à 96 puits à une densité de 6×10^3 cellules par puits puis placées dans un incubateur (Binder, 37°C, 5% de CO₂ et 100% d'humidité relative) afin d'établir une monocouche de cellules recouvrant 80% de la surface du puit. Le milieu de culture est remplacé par le milieu d'extraction dans lequel ont séjourné les échantillons pendant 24h.

Après 24 h d'incubation, la viabilité des cellules est évaluée par dosage fluorimétrique en utilisant le Bleu Alamar (Interchim, Montluçon, France) qui est un indicateur fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire (324). Le changement de couleur ne peut intervenir que dans le cas des cellules vivantes et son intensité est proportionnelle à l'activité cellulaire. Pour ce faire, le milieu de culture a été extrait de chaque puit, puis remplacé par 200 µL de milieu de culture supplémenté avec 10 % (v/v) de Bleu Alamar. Après 3 heures d'incubation, 150 µL du surnageant est transféré dans une plaque 96 puits. L'intensité de la fluorescence est mesurée à l'aide d'un fluoromètre (TWinkle LB970, Berthold Technology, Bad Wildbad, Allemagne) à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm (n=6).

1.6.3.3 Par contact direct

Les échantillons placés dans les plaques à 24 puits et qui ont servi pour le test d'extraction ont étéensemencés de cellules. La culture a été réalisée pendant 3 et 6 jours sans changement de milieu. Après 3 et 6 jours d'incubation, le milieu est remplacé par du MEM supplémenté à 10% de Bleu Alamar Bleu et la fluorescence à 590 nm est mesurée comme décrit précédemment.

La viabilité cellulaire est également exprimée en pourcentage par rapport à la culture témoin qui est le TCPS (Tissue Culture PolyStyrene). (n=6)

I.7 Activité antibactérienne- Test de Kirby-Bauer

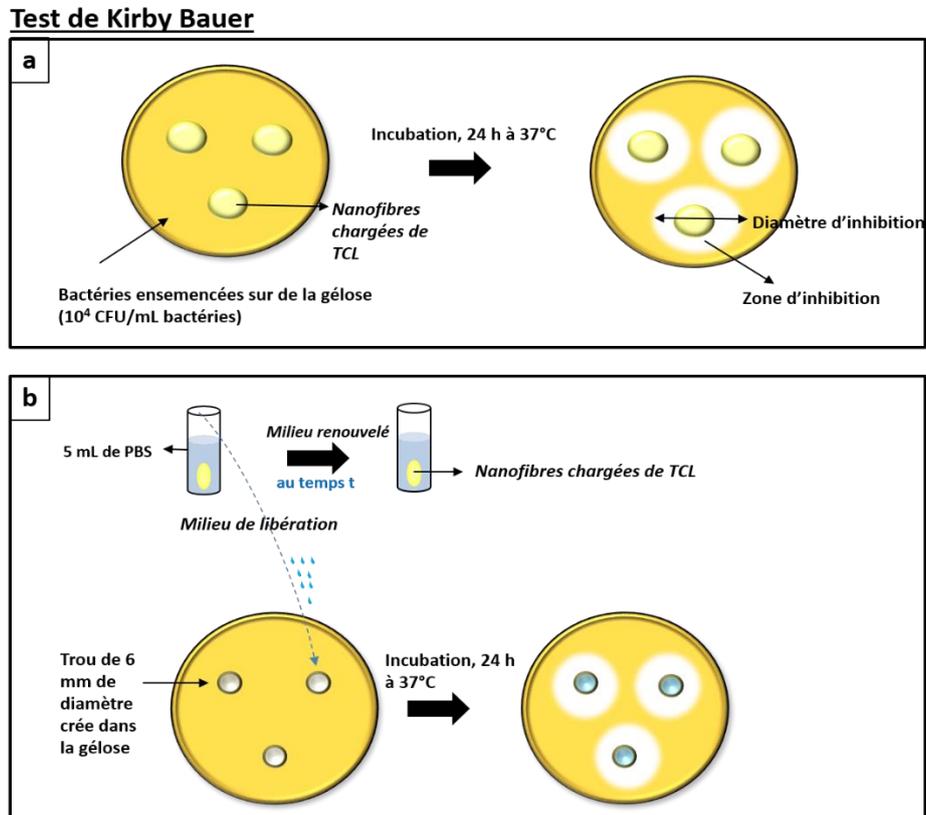


Figure 59 : Représentation schématique du test de Kirby Bauer a) test de diffusion simple b) Test par mesure de milieu de libération

La méthode employée pour évaluer l'activité antibactérienne des nanofibres chargées en TCL ou non est adaptée de celle décrite par Kirby-Bauer(197).

Un test de diffusion simple a été réalisé sur des nanofibres de chitosan chargées en TCL (**Figure59.a**). Les nanofibres ont été découpées en disque de 15 mm de diamètre. Une désinfection pendant 1h sur chaque face sous UV a été appliquée sur les échantillons. Ces derniers ont été déposées par la suite sur une gélose de type Mueller Hinton Agar (MHA) préalablement ensemencée par une culture de bactéries (10^4 CFU/mL). Après une incubation pendant 24h à 37°C, une zone d'inhibition a été observée, le diamètre est alors mesuré afin d'évaluer l'activité antibactérienne. Les mesures ont été réalisées en triplicata

Un autre test de diffusion a été également réalisé en mesurant l'activité antibactérienne du milieu de libération (**Figure59.b**). Ce test nous permettra d'évaluer la durée de l'activité de nos nanofibres chargées en TCL. Pour ce faire, les nanofibres, préalablement découpées et pesées (5 mg) et passées

sous UV pendant 15 minutes pour chaque face, ont été introduites dans 5 mL de PBS stérile. Après un temps t , le milieu de libération est renouvelé afin d'éviter la saturation du milieu en principe actif. Le milieu récolté au temps t est ensuite déposé dans des puits (\varnothing 6 mm) creusés dans la géloseensemencée de bactéries. Après incubation pendant 24 h à 37°C le diamètre d'inhibition est mesuré représentant l'activité du milieu de libération au temps t . Cette procédure est renouvelée sur une durée de 360 heures toutes les heures pendant 8 heures puis tous les jours jusqu'à 15 jours. Les mesures ont été réalisées en triplicata.

I.8 Analyse statistique

Les calculs statistiques ont été effectués comme suit : Pour la comparaison de deux groupes le test de Student a été appliqué. Pour la comparaison de plusieurs groupes le test de Student suivi d'une correction Bonferroni post hoc a été réalisé. La signification statistique est $p \leq 0.05$, 0.01 et 0.001. Les résultats ont été traités par Excel.

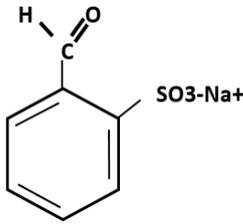
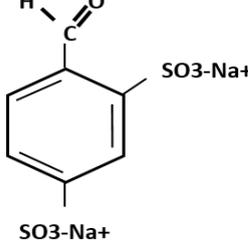
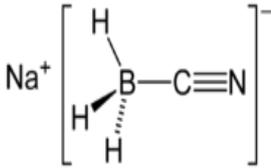
II. Nanofibres à base de chitosan sulfoné à activité anti-thrombotique

II.1 Matériels

Le chitosan utilisé pour la synthèse du chitosan sulfoné a un DD de 80,3 % de chez Sigma Aldrich. Sa masse molaire mesurée à l'aide d'un viscosimètre capillaire est de 130000 g.mol⁻¹ (cf. **Tableau 10**).

Les autres produits utilisés pour la synthèse sont présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 : Caractéristiques des produits utilisés pour la synthèse des chitosan mono et di-sulfoné

Produits	Sel de sodium de l'acide 2-formylbenzène sulfonique	Sel de disodium de l'acide 4-formylbenzène 1,3-disulfonique	Cyanoborohydrure de sodium
Abréviations	BZ1S	BZ2S	NaBH ₃ CN
Structure			
N° CAS	1008-72-6	207291-88-1	25895-60-7
Masse molaire (g/mol)	208.17	310.21	62.84
Solubilité H ₂ O 25°C (g/L)	100	Non soluble	100

II.2 Synthèse des polymères

La synthèse a été décrite précédemment par Martel *et al* (316). Elle consiste à préparer du chitosan mono ou di-sulfonique par amination réductrice en employant des sels de sodium de l'acide 2-formyl benzène sulfonique (BZ1S) et du sel du disodium de l'acide 4-formylbenzène 1,3 disulfonique (BZ2S). Pour cela, 450 mL de méthanol ont été ajoutés à une solution contenant 5g de chitosan dissout dans 500 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique (1% (v/v)). Le BZ2S ou le BZ1S ont été dissout respectivement dans 50 mL de méthanol ou d'eau. La quantité de BZ1S et BZ2S ajoutée a été calculée en se basant sur le rapport molaire (R) entre les aldéhydes sulfoniques (BZ1S et BZ2S) et les groupements amines libres du chitosan. Deux séries de chitosans sulfonés ont été obtenues appelé CHT1S et CHT2S. Le rapport molaire R a été fixé à 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 et 2 pour chaque série. 3 minutes après de l'ajout de la solution du BZ1S ou de BZ2S à la solution de chitosan, la viscosité de cette dernière a diminué et un précipité blanc est apparu. 30 minutes plus tard, 3 g de cyanoborohydrure de sodium (agent réducteur) ont été ajoutés à la solution sous agitation continue qui a été maintenue pendant une heure. La suspension a été ensuite introduite dans des poches de dialyse (SpectraPor 12-14kDa, diamètre 50 mm). Les échantillons ont été dialysés pendant 7 jours puis lyophilisés. Une poudre de couleur blanc cassé est obtenue.

La **Figure 60** représente le schéma de la réaction d'amination réductrice. x , y , y' et z correspondent respectivement aux proportions relatives en unités acétyl glucosamine, glucosamines libres avant ($y=0.803$) et après réaction et aux glucosamines substituées par les groupes benzyle sulfonates. Le degré de substitution (DS) est la valeur de z .

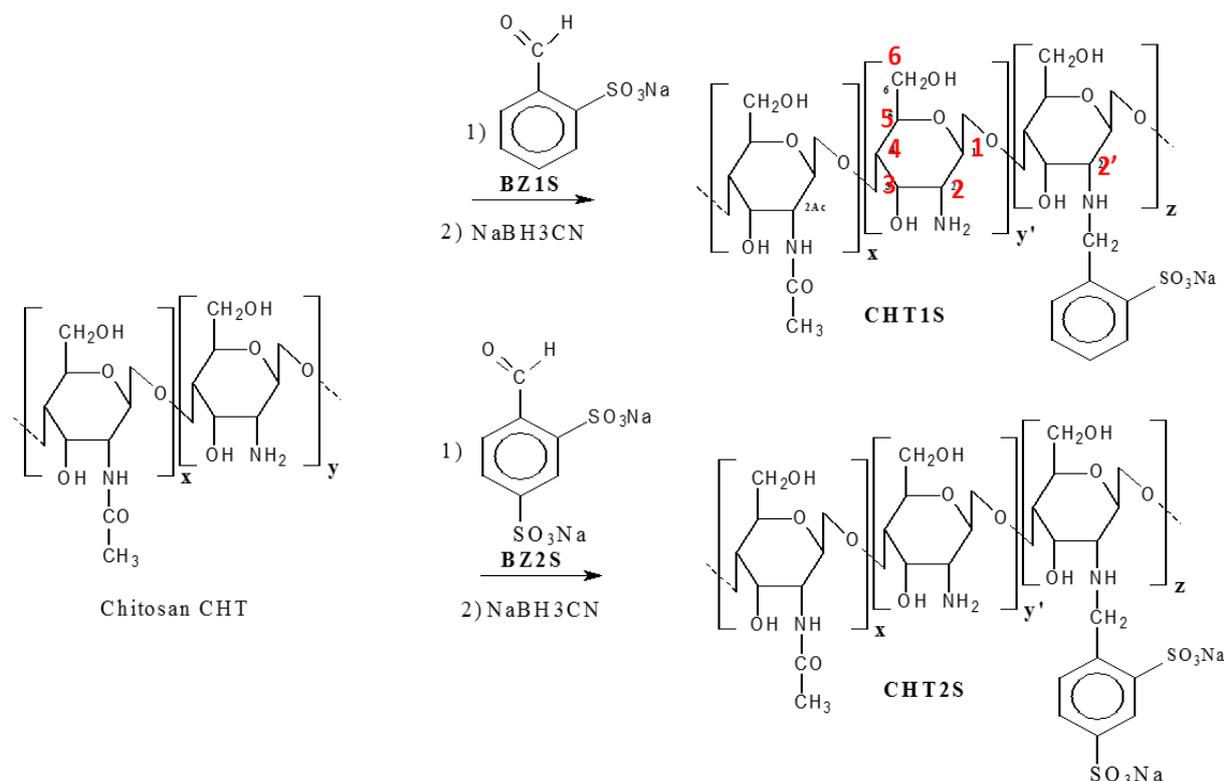


Figure 60 : Mécanisme de réaction entre le CHT et le BZ1S ou BZ2S par amination réductrice en présence du NaBH₃CN et présentation des schémas des structures chimiques des chitosan modifiés le CHT1S et le CHT2S

II.3 Techniques de caractérisation

II.3.1 RMN

La RMN du proton a été réalisée sur un spectromètre à 300 MHz (Bruker AC300). 9 mg de CHT1S et CHT2S ont été dissout dans 1mL d'une solution aqueuse de NaOD à 0.1M. Toutes les mesures ont été effectuées à 338 K. Une étude a reporté dans des travaux antérieurs une analyse détaillée sur la RMN proton 1H et carbone 13C des dérivés CHT1S et CHT2S avec l'attribution de chaque signal aux carbones et protons observés sur la structure chimique des deux dérivés (242,317,318). Dans cette étude seul le rapport R=4 avait été utilisé pour la synthèse des deux chitosan mono et disulfoniques.

Les spectre 1H RMN ont permis de calculer le DS grâce aux mesures d'une part d'intégrales des protons H₂ et H_{2'} (indiqué sur la **Figure 60**) qui appartiennent respectivement à l'unité de répétition

de glucosamine non substitué et substitué, et d'autre part de l'intégrale des protons aromatiques du benzyle mono et di-sulfonate observée entre 7 et 8 ppm. Les degrés de substitutions ont donc été calculés selon les équations suivantes relatives à chaque chitosan :

$$DS_{(CHTS)} = \frac{\left(\frac{\text{Aire Haroma}}{4}\right)}{\text{Aire } H2+H2'} * 0.803 \quad ; \quad DS_{(CH2S)} = \frac{\left(\frac{\text{Aire Haroma}}{3}\right)}{\text{Aire } H2+H2'} * 0.803$$

II.3.2 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du carbone, de l'hydrogène et les teneurs en azote et en soufre ont été effectués (Elementar Analysensysteme GmbH-MICRO vario) à l'école nationale supérieure de chimie de Lille (ENSCL). Le pourcentage de soufre (%S) déterminé par analyse élémentaire a été utilisé pour le calcul du degré de substitution (DS) qui est défini comme étant le rapport molaire entre l'unité de répétition du CHT et les groupements arylsulfoniques et qui représente la variable z dans la **Figure 60**. Deux relations théoriques entre le DS et le pourcentage de soufre %S ont été établies : (la Figure a été placée en **Annexe 4**)

$$DS = 5.4 \cdot 10^{-3} \%S^2 + 4.59 \cdot 10^{-2} \%S \quad (\text{équation 1})$$

$$DS = 3.10 \cdot 10^{-3} \%S^2 + 1.77 \cdot 10^{-2} \%S \quad (\text{équation 2})$$

A partir de ces deux relations, connaissant le %S, il est possible donc de remonter au DS des polymères. Le %S est le pourcentage théorique de soufre.

Pour l'établissement de ces deux lois, la masse molaire du glucosamine acétylée, du glucosamine et du glucosamine substituée par le BZ1S et le BZ2S sont respectivement de 203 g.mol⁻¹, 161 g.mol⁻¹, 339 g.mol⁻¹ et 455 g.mol⁻¹.

II.3.3 Potentiométrie couplée à la conductimétrie

Environ 100 mg de CHT1S ou CHT2S ont été solubilisés dans la soude à (0.01M) + KCl (0.2M). La titration a été réalisée par HCl (0.1M) en mesurant en simultanée le pH (inolab (WTW)) et la conductance (MeterLab®, CDM210). Un facteur de dilution a été appliqué sur les données avant de tracer la conductance en mS par rapport au volume ajouté de la solution de HCL.

II.3.4 Spectroscopie Infrarouge

La même procédure décrite au I.4.5.3 a été appliquée sur les CHT1S et CHT2S.

II.3.5 Mesure du potentiel Zeta en fonction du pH

Le potentiel zêta a été mesuré à l'aide d'un zétamètre modèle Zetasizer nano Zs (Malvern). Les mesures ont été réalisées à différents pH (de 11 à 4).

Les solutions de CHT1S et CHT2S ont été préparées à une concentration de 2 mg.ml^{-1} dans NaOH (0.01M). Le pH a été ajusté par ajout HCl (0.05M).

La mesure du potentiel zêta du CHT non modifié a été également réalisée en solubilisant 2 mg.ml^{-1} dans une l'acide acétique à 0.1% (v/v) et le pH a été ajusté par ajout de NaOH (0.05M).

II.3.6 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la diffusion de la lumière (MALS)

La mesure par SEC-MALS a été réalisée à l'aide d'un Thermo Scientific Ultimate 3000 module équipé d'une précolonne OHPak SBG Shodex (50 X 6 mm) et de deux colonnes SB-806M-HQ Shodex (300 X 8 mm) montées en série en association avec un détecteur de diffusion de la lumière miniDawn-Treos à trois angles (41.5° , 90° et 138.5°) utilisant un laser de longueur d'onde 658 nm (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) et un détecteur RI (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) thermostaté à 35°C . L'éluent utilisé est composé d'un tampon borate 30 mM à pH 8.5 préalablement filtré en utilisant un filtre Durapore[®] (0.1 μm). Un volume de 100 μL d'une solution de polymère (à une concentration de 2 g.L^{-1}) a été injecté et le débit d'élution a été de 0.8 mL.min^{-1} . Les données ont été traitées en utilisant un logiciel Astra (v6.1.1.17, Wyatt Technology Corp.) en considérant un volume d'élution compris entre 15 et 23 mL pour tous les chromatogrammes.

L'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) relatif à chaque polymère testé a été déterminé avec le détecteur RI de la chaîne. Pour cela, une solution mère de chaque polymère a été préparée à une concentration de 2 g.L^{-1} dans le tampon borate en pesant la quantité totale de polymère (incluant les contre-ions). La quantité d'eau présente dans les polymères est considérée comme négligeable. Les solutions mères ont été ensuite dialysées (membranes Millipore[®], 100 Da) pendant la nuit contre le même éluant avant dilution pour des concentrations finales de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 et 2 g.L^{-1} . Le terme c dans le dn/dc représente la concentration des polyélectrolytes incluant les contre-ions. Tous les polymères ont été utilisés sous leur forme sodique.

II.3.7 Analyse par dispersion de Taylor

L'analyse par dispersion de Taylor (TDA) est une méthode absolue qui permet de déterminer le coefficient de diffusion D (et donc le rayon hydrodynamique, R_h) d'un soluté. Cette méthode est basée sur l'élargissement d'une bande de soluté sous un écoulement laminaire dans un tube ouvert (cf. **Figure 61**)

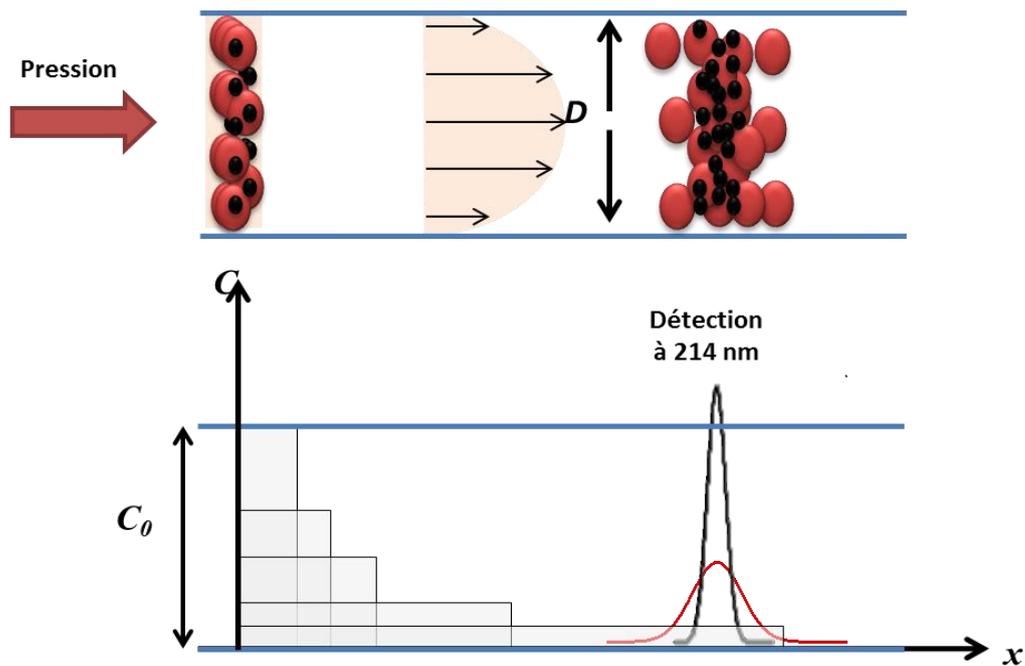


Figure 61 : Schéma descriptif du principe de l'analyse par dispersion de Taylor (TDA)

A cause du profil parabolique de la vitesse des molécules, la bande initiale du soluté est dispersée selon une combinaison de processus de convection/diffusion appelé aussi dispersion de Taylor-Aris (325). Les molécules sont ainsi redistribuées le long d'une coupe transversale grâce à la diffusion moléculaire. Lorsque le temps caractéristique de diffusion est négligeable devant le temps de détection moyen, la dispersion de Taylor conduit à un profil Gaussien pour un échantillon monodisperse. Le profil d'éluion est obtenu par une détection UV à travers un capillaire à une distance donnée de la sortie. Le coefficient de diffusion D du soluté et le rayon hydrodynamique R_h correspondant sont obtenus à partir des deux équations suivantes:

$$D = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma^2} \quad \text{(équation 3)}$$

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} = \frac{4\sigma^2 k_B T}{\pi\eta R_c^2 t_0} \quad \text{(équation 4)}$$

Avec k_B est la constante de Boltzmann, T est la température (en °K), R_c est le diamètre du capillaire, η est la viscosité de l'éluent, t_0 est le temps moyen d'éluion (temps de rétention) et σ^2 est la variance temporelle du profil d'éluion. Il est important de noter que plus le pic est large plus σ^2 est élevé et plus la valeur de R_h est grande.

Les équations 3 et 4 sont valides lorsque les deux conditions suivantes sont remplies (326). Premièrement, t_0 doit être plus grand que le temps caractéristique de diffusion du soluté dans la coupe transversale du capillaire, i.e. $t_0 \geq 1.25 R_c^2/D$ pour une erreur relative ϵ sur la détermination du

$D < 3\%$. Deuxièmement, la diffusion longitudinale doit être négligeable devant la convection (i.e. le nombre de Peclet $P_e = R_c u / D$ doit être supérieur à 40 pour une $\varepsilon < 3\%$ (avec u est la vitesse moyenne de la phase mobile) (326–328).

La TDA est une méthode très simple et rapide, elle n'utilise qu'une faible consommation d'échantillon (quelques nL), elle ne nécessite aucun étalonnage et il est possible de déterminer des dimensions moléculaires inférieures à l'angström. De plus, dans le cas d'un échantillon polydisperse, la TDA conduit au R_h moyen pondéral qui n'est pas biaisé par la présence d'agrégats ou de nanoparticules contenus dans l'échantillon comme c'est le cas pour le R_h moyen en intensité mesuré par diffusion de la lumière (moyenne en z) (329,330).

Les expériences de TDA ont été réalisées sur un appareil d'électrophorèse capillaire Agilent (Waldbronn, Allemagne) à 25 ° C en utilisant des capillaires de silice de 50 μm i.d. \times 38 cm (\times 29,5 cm jusque la fenêtre de détection) provenant de Composite Metal Services (Worcester, Royaume-Uni). Les polymères CHT1S et CHT2S ont été analysés par absorbance UV à 214 nm et en utilisant une pression de mobilisation de 20 mbar. Les capillaires ont préalablement été activés par un lavage à la soude de concentration 1 M. Chaque échantillon de polymère a été préparé à 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans 0.01 M NaOH. Avant l'analyse de l'échantillon, le capillaire a été préalablement rempli du même solvant. Toutes les mesures de TDA ont été réalisées en duplicata.

II.4 Préparation de nanofibres par électrospinning

Un polymère de chaque série CHT1S ou CHT2S a été sélectionné ($R=2$) pour l'électrospinning des nanofibres à base de chitosan sulfoné.

3.8% (w/v) et 4% (w/v) respectivement de CHT1S2 et CHT2S2, mélangés à du PEO à 80/20 (w/w) ont été dissout dans une solution de soude à 0.05M. La solution a été laissée sous agitation (250 tr/min) à température ambiante jusqu'à complète dissolution des polymères (24h environ). Quelques minutes avant l'électrofilage, 0.1% (w/v) de génipine ont été ajouté à la solution. La génipine dans ce cas va réagir avec les groupements amines libres restantes du chitosan sulfoné selon le mécanisme décrit par Mi et *al.* qui est légèrement différent de celui décrit dans le paragraphe I.4.6.1. En effet, ici la réaction ne se passe plus à pH acide mais plutôt à pH basique ($\text{pH} \sim 10$). En effet, à pH basique, la réaction d'ouverture du cycle de la génipine a lieu via une attaque nucléophile par des OH^- pour former un intermédiaire aldéhyde qui subit par la suite une aldo condensation. La génipine qui a formé une oligomère avec des terminaisons en aldéhydes (voir **Annexe 5**) subit une réaction de base de Schiff avec les groupements amines non substitués du CHT pour ainsi former un réseau réticulé (voir mécanisme **Figure 62**). La membrane nanofibreuse est exposée par la suite aux vapeurs d'eau à

50°C pendant 4 heures ce qui permet à la réaction de se produire caractérisée par l'apparition de la coloration bleue.

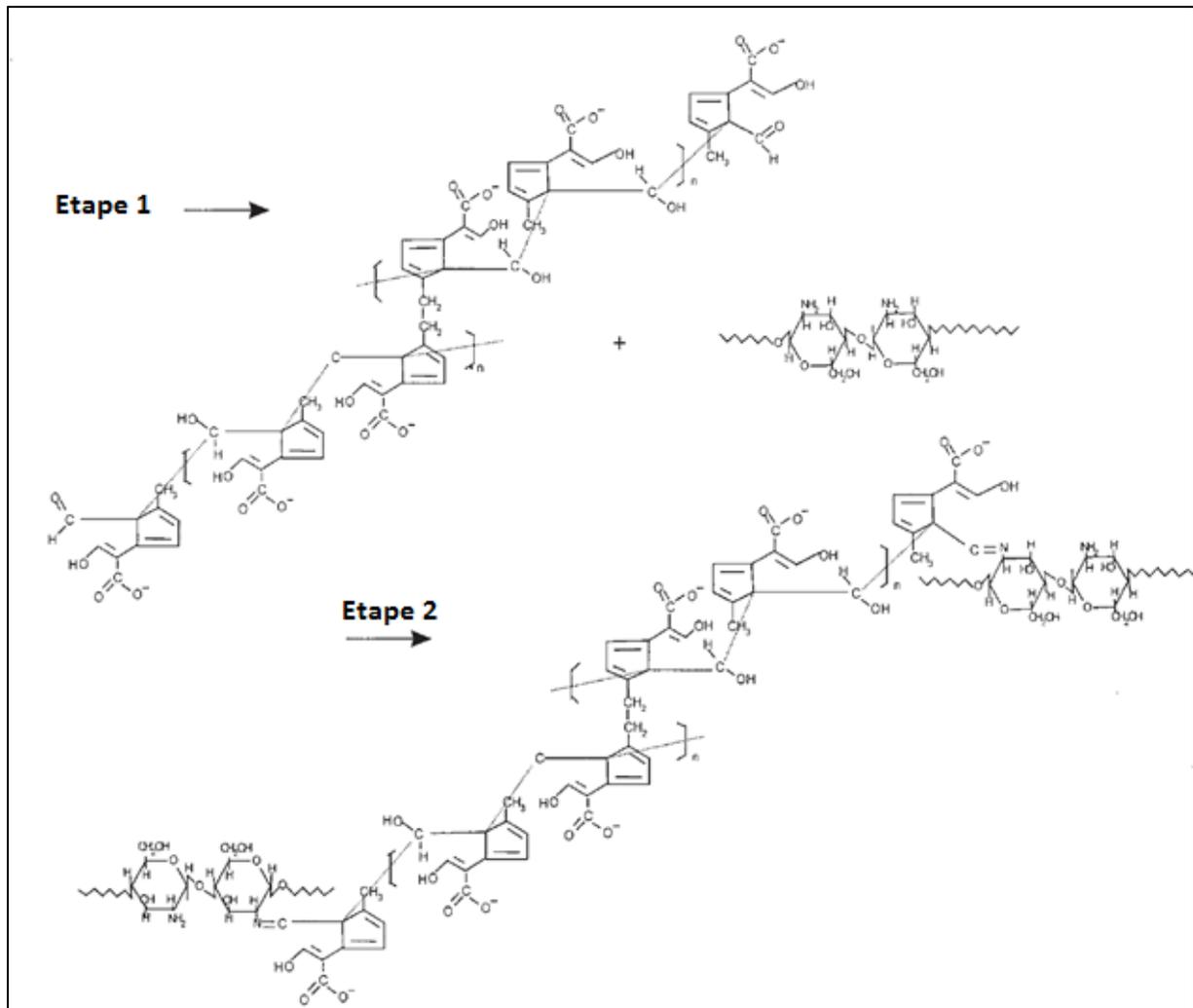


Figure 62 : Mécanisme de réaction entre les groupements amines du CHT et la génipine à pH basique, le mécanisme de l'étape 1 est donné en annexe 5 (322)

II.5 Etude de l'activité antithrombotique

Deux types de tests ont été réalisés sur les polymères obtenus : un test d'hémolyse qui nous permettra d'évaluer l'hémocompatibilité des polymères obtenus. Puis un second test de coagulation pour l'évaluation de l'activité antithrombotique des polymères. Le même test a été réalisé sur les nanofibres obtenues.

II.5.1 Test d'hémolyse

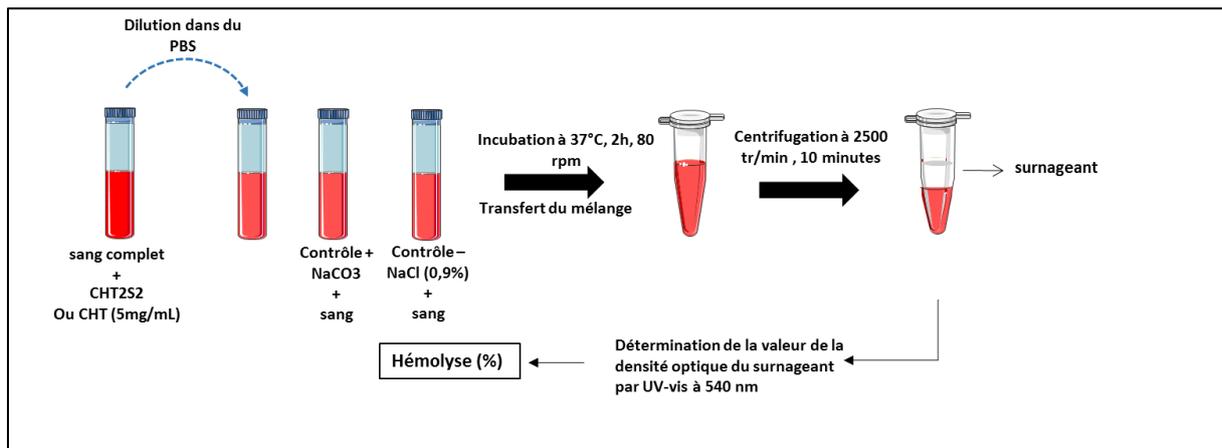


Figure 63 : Représentation schématique du test d'hémolyse réalisé sur le CHT et le CHT2S2

La propriété hémolytique a été étudiée en mesurant le pourcentage d'hémolyse. La **Figure 63** schématise le protocole suivi pour le test d'hémolyse. Les polymères testés (5mg) ont été introduit dans un 1 mL du sang complet prélevé d'un donneur adulte sain qu'on considèrera comme la solution mère. Des dilutions ont été réalisés en prélevant un certain volume de la solution mère et l'introduisant dans du PBS. Une solution de carbonate de sodium (0.01 %) a été utilisée comme contrôle positif (100% de lyse) et une solution de NaCl à 0.9% (w/v) a été utilisée comme contrôle négatif (0% de lyse). Après une incubation à 37°C pendant 2 heures sous agitation à 80 tr/min, les échantillons ont été centrifugés à 2500 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été ensuite analysé par spectroscopie UV-vis à 540 nm pour mesurer sa densité optique (OD). Le pourcentage d'hémolyse a été mesuré selon l'équation suivante :

$$\text{Hémolyse (\%)} = \frac{\text{OD (échantillon)} - \text{OD (control négatif)}}{\text{OD (control positif)} - \text{OD (control négatif)}}$$

D'après la norme ATM F756-00(2000), selon le IH% le matériau testé est classifié en trois catégories :

IH% > 5% alors le matériau est hémolytique ; 2% < IH% < 5% il est faiblement hémolytique ; IH% < 2% le matériau est non-hémolytique

II.6 Tests de coagulation

Les propriétés antithrombotiques des chitosan sulfoniques ont pu être déterminées en mesurant les temps spécifique de l'activation de la coagulation sanguine. Les mesures ont été réalisées au centre hospitalier universitaire de Lille. Trois mesures ont été effectuées :

Le temps de céphaline activée (TCA), en anglais ce test est appelé « activated partial thromboplastin time, aPTT » caractérise la voie intrinsèque et la voie commune de la cascade de coagulation en mesurant le temps de coagulation d'un plasma citraté décalcifié, déplaquetté en présence d'un

Partie II : Matériels & Méthodes

équivalent plaquettaire (la céphaline), d'un activateur des facteurs contacts et de calcium. Plus le temps est long plus l'activation est retardée et devient difficile. Un TCA long traduit une amélioration de l'activité anticoagulante du biomatériau. Un temps de coagulation normale est compris entre 28 et 30 s.

Le temps de Prothrombine (TP), en anglais « prothrombin time, PT » est un indicateur de l'activation de la voie extrinsèque et la voie commune. Il représente la durée à laquelle la voie extrinsèque a démarré. Un TP prolongé signifie que l'activité anticoagulante est améliorée. Les résultats s'expriment en ratio par rapport à un plasma témoin, sous forme soit de taux de prothrombine ou soit d'INR (International Normalized Ratio). L'INR d'un sujet normal est de 0,8 - 1,2.

Le test anti-Xa a un rôle central dans la cascade de la coagulation, puisqu'il transforme directement la prothrombine en thrombine, soit l'étape précédant la formation de fibrine et l'activation des plaquettes. L'activité anti-Xa est déterminée par méthode chromogène automatisée (BIOPHEN Facteur X).

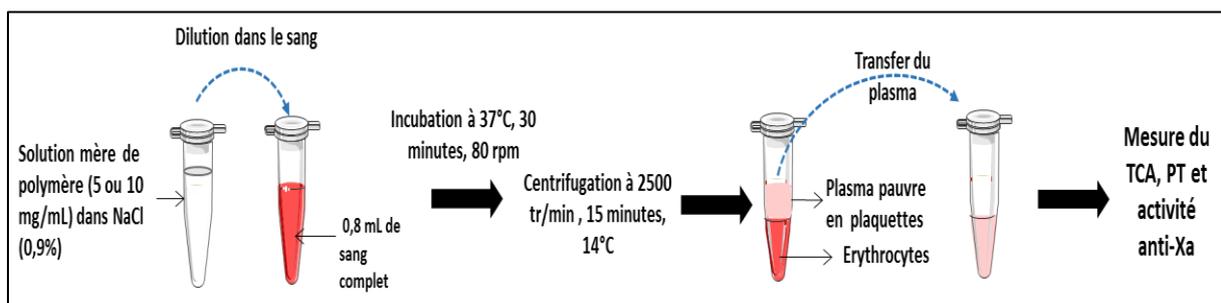


Figure 64 : Représentation schématique sur la méthode de préparation du plasma pour l'évaluation de l'activité anticoagulante des chitosan sulfonés à l'état poudreux ou en nanofibres

La **Figure 64** présente une schématisation de la préparation du plasma pour les tests de coagulation. Nous avons tout d'abord mis notre polymère en suspension à 5mg/mL ou 10mg/mL dans une solution aqueuse de NaCl (0.9%) (Solution mère). Dans 0,8 mL de sang complet prélevé d'un donneur adulte sain. Des solutions filles ont ensuite été préparées en diluant la solution mère dans le sang, avant d'être incubées à 37°C pendant 30 minutes puis centrifugées pendant 15 minutes à 2500 tr/minutes à 14°C. Le plasma a été ensuite séparé et transféré dans un nouvel eppendorff. Pour la mesure du TCA, un activateur phospholipidique et du chlorure de calcium (0.2mol/L) ont été ajouté au plasma. De la thromboplastine a été ensuite ajoutée au plasma pour la mesure du TP. Le même protocole a été appliqué pour les nanofibres.

Partie III : Résultats & Discussions

Chapitre 1 : Nanofibres à base de chitosan/PEO

Tout d'abord, une étude d'optimisation de certains paramètres liés à la solution et au procédé d'électrospinning a été réalisée dans le but d'obtenir des nanofibres sans défaut. Ensuite, une étude de réticulation des nanofibres en utilisant deux voies différentes (une voie chimique et une voie physique) a été effectuée pour améliorer la stabilité des nanofibres en milieu aqueux. Les nanofibres de chitosan ont été chargées par la suite de triclosan. La libération de cette molécule à partir des nanofibres a été modulée en faisant varier un certain nombre de paramètres tels que la quantité de triclosan incorporée dans les fibres, le rapport de masse entre le chitosan et le PEO, le pH du milieu de libération et enfin le type de réticulation effectué sur les nanofibres.

I. Electrospinning et optimisation des paramètres d'électrofilage

Les paramètres de solution et d'électrofilage de CHT-PEO sont donnés dans le **Tableau 19**. Tout d'abord, l'influence de la concentration de l'acide acétique dans l'eau a été évaluée. Ensuite, l'influence du rapport de masse CHT-PEO sur le diamètre des NFs a également été étudiée. Une fois ces paramètres fixés nous avons fixé les paramètres liés à l'appareillage à savoir le voltage, le débit et la distance. La température et l'humidité relative ont été fixés à $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et $35\% \pm 5\%$. En dehors de ces conditions hygrométriques l'élaboration de membranes nanofibreuses sans défaut n'est pas possible.

La concentration totale de CHT-PEO a été préalablement optimisée et a été fixée à 3.5wt%.

Tableau 19 : Paramètres de solution et d'électrospinning étudiés pour l'optimisation de l'électrospinning des nanofibres à base de chitosan

Nanofibres	Rapport massique (w/w)	% AA (v/v)	Concentration % (m/v)	Voltage (kV)	Débit (mL/h)	Distance (mm)	T (°C)	HR (%)
CHT-PEO	90/10	20	3.5	12-15	0.1-0.5	150-250	20 ± 3	35 ± 5
		50						
		90						
	80/20	90						
	70/30	90						
	50/50	90						

I.1 Influence du solvant

Une observation au MEB a révélé que des nanofibres avec des billes ont été obtenues lorsque la concentration d'acide acétique (AA) est de 20 et 50% (**Figure 65.a et 65.b**). Avec 90% d'AA, des

nanofibres homogènes et continues avec un diamètre moyen de $158 \text{ nm} \pm 36$ (**Figure 65.c**) ont été obtenues.

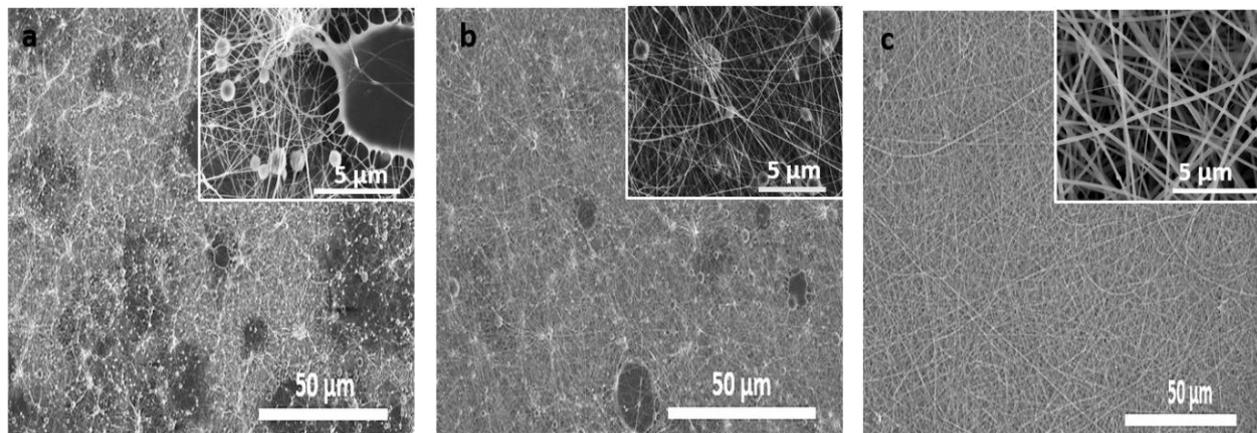


Figure 65 : Photos prises au MEB ($\times 10K$ et $\times 1K$) de nanofibres de CHT-PEO (90/10)(w/w) dans différentes concentrations d'acide acétique de gauche à droite : 20%, 50% et 90%

La **Figure 66**, montre que l'augmentation de la concentration d'acide acétique de 20% à 90% entraîne une baisse importante de la conductivité de 3.39 mS.cm^{-1} à 0.46 mS.cm^{-1} . En revanche, la viscosité varie très peu. C'est donc la conductivité qui permettrait la formation de nanofibres uniformes et sans billes. En effet, lorsque la conductivité est trop élevée, le cône de Taylor ne peut pas se former ou des jets multiples sont formés (331).

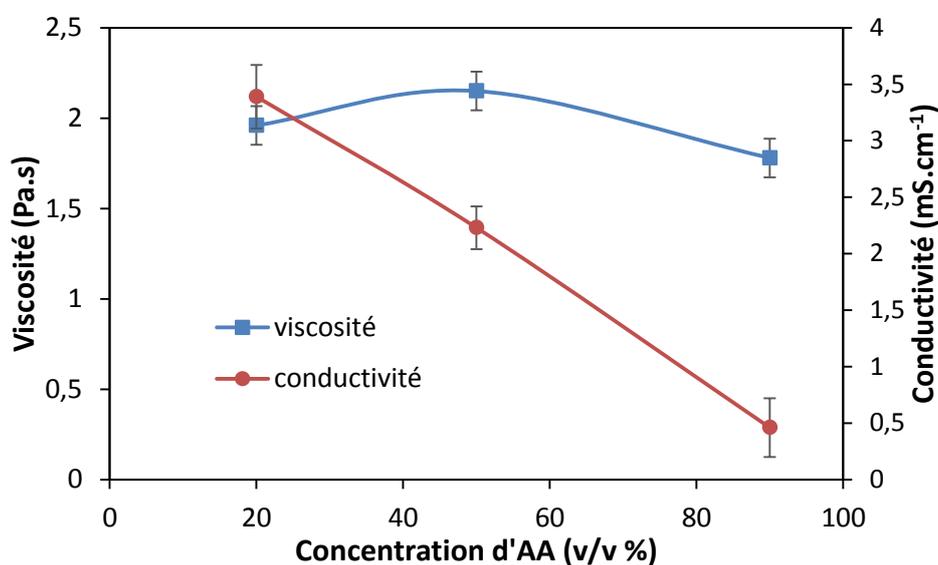


Figure 66 : Viscosité et conductivité en fonction de la concentration d'AA dans l'eau

1.2 Influence du rapport de masse CHT/PEO

La variation du rapport massique CHT-PEO entre 50/50 et 90/10 présente un impact sur le diamètre des nanofibres obtenues (**Figure 67**). Les nanofibres obtenues avec un ratio 90/10 en CHT-PEO dans l'AA à 90% ont un diamètre moyen de $158 \text{ nm} \pm 36$. En augmentant le rapport CHT/PEO à 50/50 le

diamètre moyen croît jusqu'à $304 \text{ nm} \pm 62$. Cette augmentation s'explique par une augmentation de la viscosité probablement due à un enchevêtrement plus important entre les chaînes de CHT et de PEO lorsque le rapport de masse varie de 90/10 à 50/50.(260).

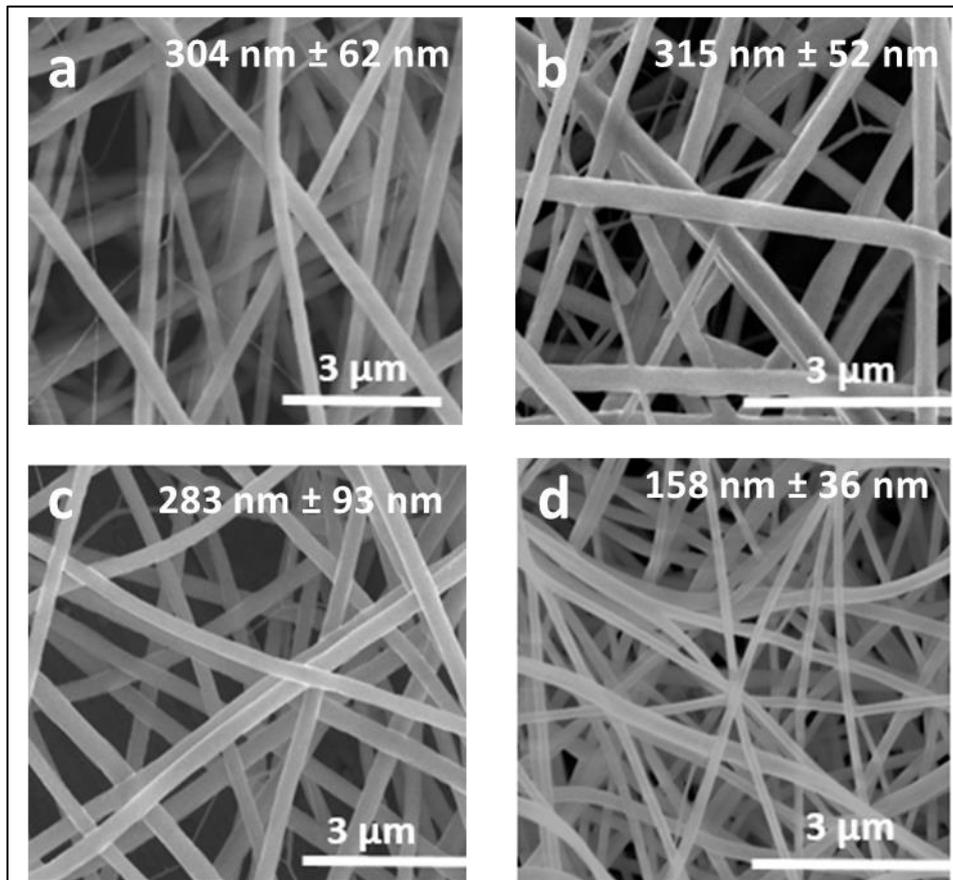


Figure 67 : Photos prises au MEB (x15K) de nanofibres de CHT-PEO à différents rapport massique a) 50/50 b) 70/30 c) 80/20 et d) 90/10

Pour la suite de notre étude, des nanofibres de CHT-PEO avec un rapport de 90/10 préparées dans de l'AA à 90% seront élaborées. Les paramètres liés à la machine comme le voltage, le débit et la distance aiguille-collecteur ont été fixés respectivement à 15kV, 0.3mL/h et 200 mm. Ces NFs ont un diamètre moyen de $158 \text{ nm} \pm 36 \text{ nm}$.

II. Réticulation et stabilisation des nanofibres de CHT/PEO

Les nanofibres obtenues à partir du CHT-PEO sont très peu stables dans les milieux aqueux. La **Figure 68** présente des photos prises au MEB montrant des nanofibres de chitosan avant et après immersion dans deux milieux à différents pH: PBS à pH 7,4 et pH 5,5. A pH 7.4, les nanofibres gonflent jusqu'à complète disparition de leur caractère fibreux. Après séchage, celles-ci sont déformées et ont perdu leur porosité. A pH 5.5, les nanofibres se désintègrent complètement au bout de 24 h.

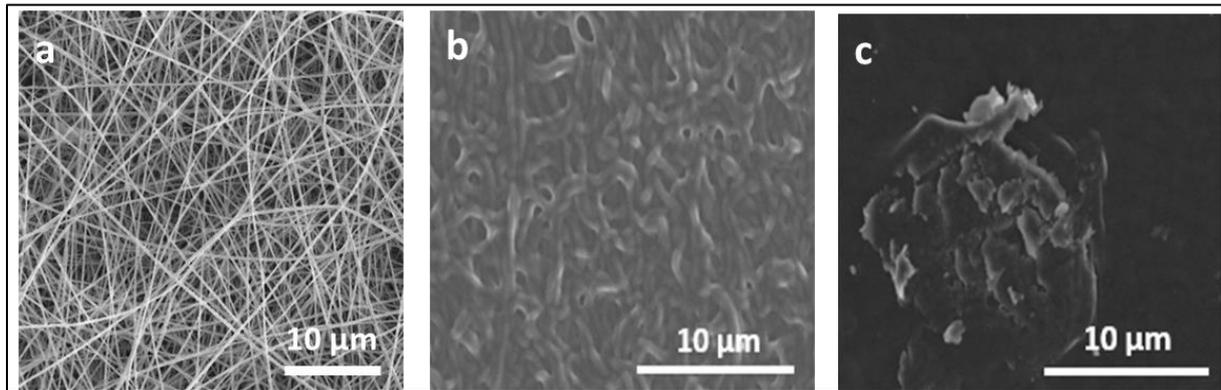


Figure 68 : Images MEB (x5K) de nanofibres de CHT-PEO a) après et après leur immersion pendant 24h dans du PBS à a) pH 7.4 et à b) pH 5.5

La réticulation des nanofibres est indispensable pour conserver leur morphologie en milieu aqueux. Plusieurs procédés de réticulation du chitosan ont été décrits dans la littérature. Pour nos membranes nous avons choisi de les traiter thermiquement en effectuant un simple recuit ou chimiquement par réaction avec la génipine utilisée comme agent réticulant.

II.1 Stabilisation des nanofibres par voie thermique

Le traitement thermique est une voie de stabilisation physique assez simple.

Tout d'abord, le temps et la température de chauffage ont été optimisés. Pour cela, les membranes ont été placées pendant 1h, 4h et 24h dans une étuve à 90°C et à 140°C. Visuellement, le traitement thermique a provoqué un jaunissement de la membrane qui s'intensifie lorsque la température et le temps de recuit augmentent (**Figure 69**).

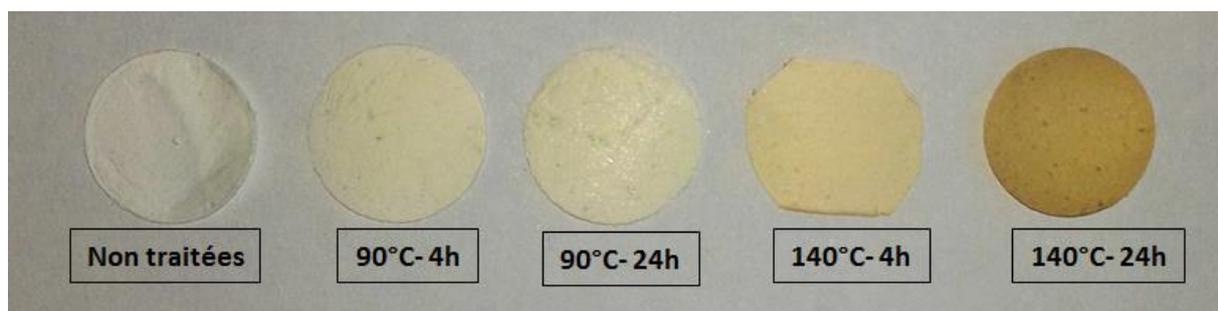


Figure 69 : Photos de nanofibres de CHT-PEO traitées à 90°C et 140°C différentes températures pendant 4h et 24h

II.2 Réticulation des nanofibres par voie chimique

Plusieurs agents réticulants ont été appliqués sur des nanofibres de chitosan ; le plus couramment utilisé est le glutaraldéhyde couramment utilisé pour la fixation des protéines et la stérilisation (332) mais ce dernier est toxique pour les cellules et non admis dans les procédés de fabrication d'implants médicaux (333).

La génipine (Gnp) est entre 5000 à 10000 fois moins toxique que le glutaraldéhyde (334). Elle réagit spontanément à température ambiante avec les groupements amines primaires du chitosan.

La réticulation par la génipine a été réalisée selon la méthode décrite par Mirezai et *al.* (295). Pour ce faire, la génipine (0.1 % (m/v)) a été introduite dans la solution cinq minutes avant le début de l'électrospinning.

Les nanofibres obtenues collectées n'étaient pas bleues (indicateur de la réaction de réticulation) et se désintégraient instantanément au contact d'un milieu aqueux confirmant que la réaction de réticulation ne s'est pas produite lors de l'électrospinning. Selon le procédé de Mirezai, les nanofibres ont été exposées aux vapeurs d'eau à 37°C pendant 24h, permettant l'apparition de cette couleur bleue et indiquant que la réaction de réticulation s'était bien produite (**Figure 70**).



Figure 70 : Apparition de la coloration bleue sur les nanofibres de CHT-PEO réticulées à la génipine (0.1%) après leur exposition aux vapeurs d'eau à 37°C pendant 24h

II.3 Suivi de dégradation des nanofibres en milieu aqueux

II.3.1 Nanofibres traitées par voie thermique

La **Figure 71** présente le suivi de perte de masse dans du PBS à pH7.4 et pH5.5 des nanofibres de CHT-PEO (90/10) (w/w) traitées à 90°C pendant 4h et 24h et à 140°C pendant 4h.

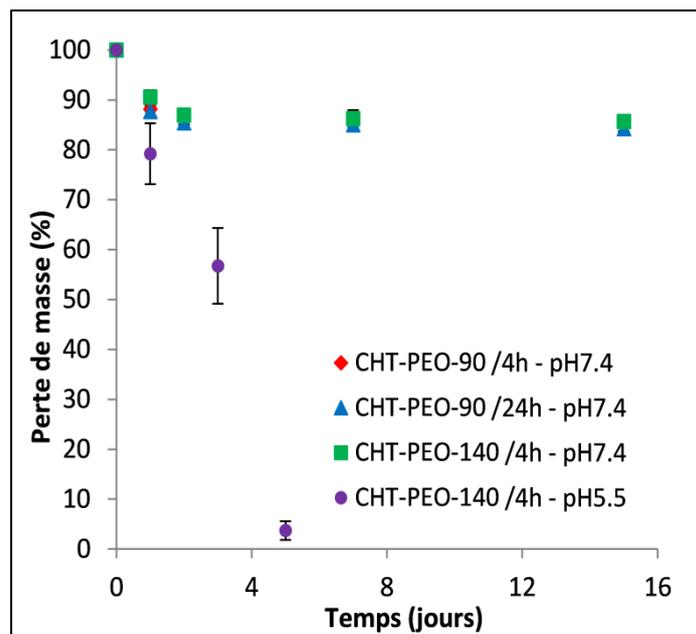


Figure 71 : Suivi de dégradation à pH 7.4 et pH 5.5 des NFs de CHT-PEO traitées à 90°C pendant 4h et 24h et à 140°C pendant 4h

Concernant le traitement thermique à 9°C, une amélioration non significative est observée entre 4h et 24h de traitement. Une différence de perte de masse d'environ 1% est en effet observée entre les deux membranes. Nous estimons alors qu'un traitement pendant 4 heures à 90°C est suffisant pour assurer la stabilité des nanofibres.

Dans un second temps, les NFs de chitosan ont été placées pendant 4h dans l'étuve à 140°C. Nous avons comparé par la suite la perte de masse au cours du temps de ces nanofibres immergées dans du PBS à pH 7.4 et pH 5.5. On remarque que la perte de masse observée à pH 7.4 entre les NFs traitées à 90°C et à 140°C est négligeable (entre 2 et 3%). En revanche, l'intérêt du traitement thermique à 140°C a été observé à pH 5.5. Les NFs traitées à 140°C sont restées stables jusqu'à 5 jours dans le milieu avec une perte de masse d'environ 20% après 1 jour suivi d'une perte de 43 % après 3 jours. Tandis que les membranes traitées à 90°C se sont désintégrées au bout d'un jour. Autrement dit, l'augmentation du traitement thermique de 90°C à 140°C permet d'améliorer la stabilité des nanofibres de chitosan dans un milieu acide qui est favorable à la dissolution du CHT. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'à 90°C de simples liaisons hydrogènes se sont formées entre les chaînes macromoléculaires et que celles-ci sont renforcées à 140°C ce qui a permis aux membranes de ne pas se solubiliser rapidement.

II.3.2 Nanofibres traitées par voie chimique

La stabilité des membranes de CHT-PEO-Gnp a été évaluée en suivant leur perte de masse à pH 7.4 et pH 5.5 (Figure 72).

A pH 7.4, les nanofibres perdent environ 15% de leur masse initiale après 4 jours qui serait dû à une dissolution du PEO et une dégradation partielle du CHT.

A pH 5.5, la même perte de masse est observée pendant les 4 premiers jours. Toutefois au bout du 7^{ème} jour les membranes commencent à se désintégrer en plusieurs morceaux ce qui a provoqué l'interruption de l'étude. Les nanofibres de chitosan restent stables dans ce milieu pH 5.5 pendant une semaine, bien que le chitosan soit soluble à ce pH d'où l'intérêt de la réticulation chimique par rapport au traitement thermique.

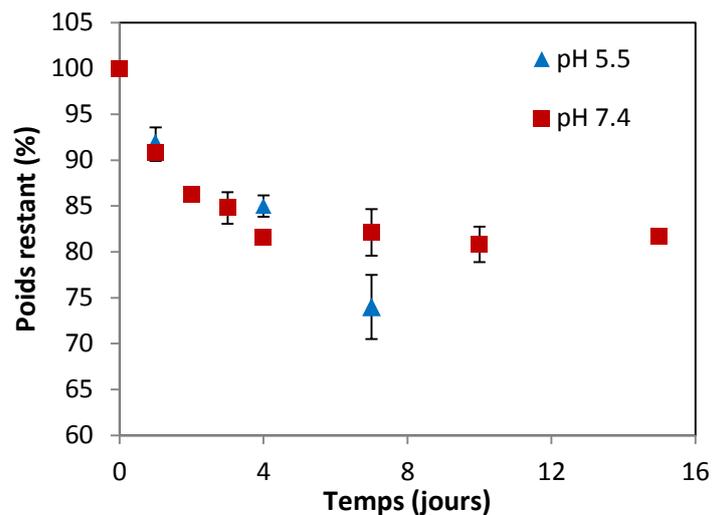


Figure 72 : Suivi de dégradation des nanofibres de CHT-PEO-Gnp dans le PBS à pH 7.4 et pH 5.5

II.4 Etude du gonflement des NFs

La mesure du taux de gonflement par gravimétrie a été utilisée pour évaluer l'effet de la réticulation. La réticulation des nanofibres augmente les interactions entre les chaînes polymères et provoque une diminution de l'absorption d'eau et donc du taux de gonflement du matériau.

Les taux de gonflement des nanofibres traitées thermiquement à 90°C pendant 4h et celles réticulées à la génipine à 0.1% après 4h d'immersion dans du PBS à pH 7.4 ou pH 5.5 ont été mesurés. Les résultats sont présentés dans les **Figure 73**.

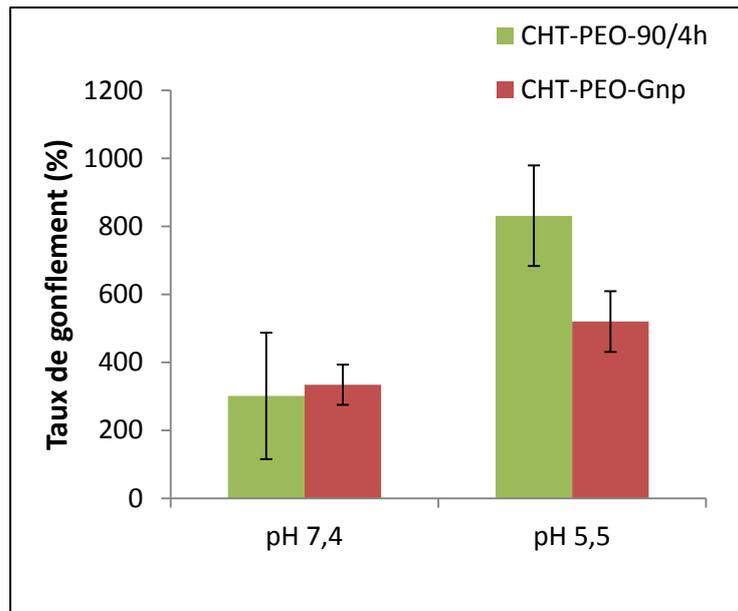


Figure 73 : Etude du taux de gonflement des nanofibres de CHT-PEO90/4h et CHT-PEO-Gnp après 24h d'immersion dans des milieux à différents a) pH7.4 b) pH 5.5

A pH 7.4, les NFs de CHT-PEO-90/4h et CHT-PEO-Gnp ont un taux de gonflement autour de 300%. Cela indique que les deux voies de stabilisation conduisent ont un effet similaire dans ces conditions.

En revanche, à pH 5.5, les nanofibres réticulées par la génipine gonflent moins que celles traitées à 90°C. Dans le cas de la génipine, la formation de liaisons de réticulation empêche le gonflement du réseau macromoléculaire. Alors que dans le cas du traitement thermique, les liaisons hydrogènes étant réversibles, l'eau peut pénétrer dans le réseau macromoléculaire, et provoque la désintégration de la nanofibre (24h dans notre cas). En effet, ce résultat est en accord avec les résultats de dégradation qui ont montré que les nanofibres réticulées à la génipine sont plus stables à ce pH acide que celles qui sont traitées thermiquement.

Par ailleurs, le taux de gonflement observé à pH 5.5 est beaucoup plus élevé qu'à pH 7.4 et atteint les 830% dans le cas des CHT-PEO-90/24h. Ceci s'explique à nouveau par le fait que le CHT est plus soluble à pH 5.5 qu'à pH 7.4.

II.5 Observation au MEB

La morphologie des NFs de CHT-PEO-90°C-4h et CHT-PEO-gnp, lavées dans un milieu aqueux à pH 7.4 et 5.5 puis séchées, a été observée au MEB. La **Figure 74** montre que les NFs traitées thermiquement restent stables à pH 7.4 et gardent leur aspect fibreux avec l'apparition des points de connexion entre les fibres. Initialement, ces NFs avaient un diamètre moyen de 158 nm, après réticulation thermique et lavage le diamètre des fibres a augmenté jusqu'à 284 nm soit un facteur de 1.8. Celles-ci se dégradent complètement à pH 5.5. Les NFs de CHT-PEO-gnp sont également stables à pH 7.4 et montrent également des points de jonction entre les fibres. Celles-ci ont un diamètre moyen de 164

nm ce qui signifie que les NFs réticulées à la génipine gonflent moins que celles réticulées thermiquement. Les NFs de CHT-PEO-gnp restent stables quant à elles à pH 5.5. Leur diamètre moyen est de 422 nm soit 2.6 fois plus élevé que le diamètre initial des NFs avant réticulation (158 nm) et plus élevé de 2.5 fois que celui des NFs réticulées à la gnp et lavées dans le PBS

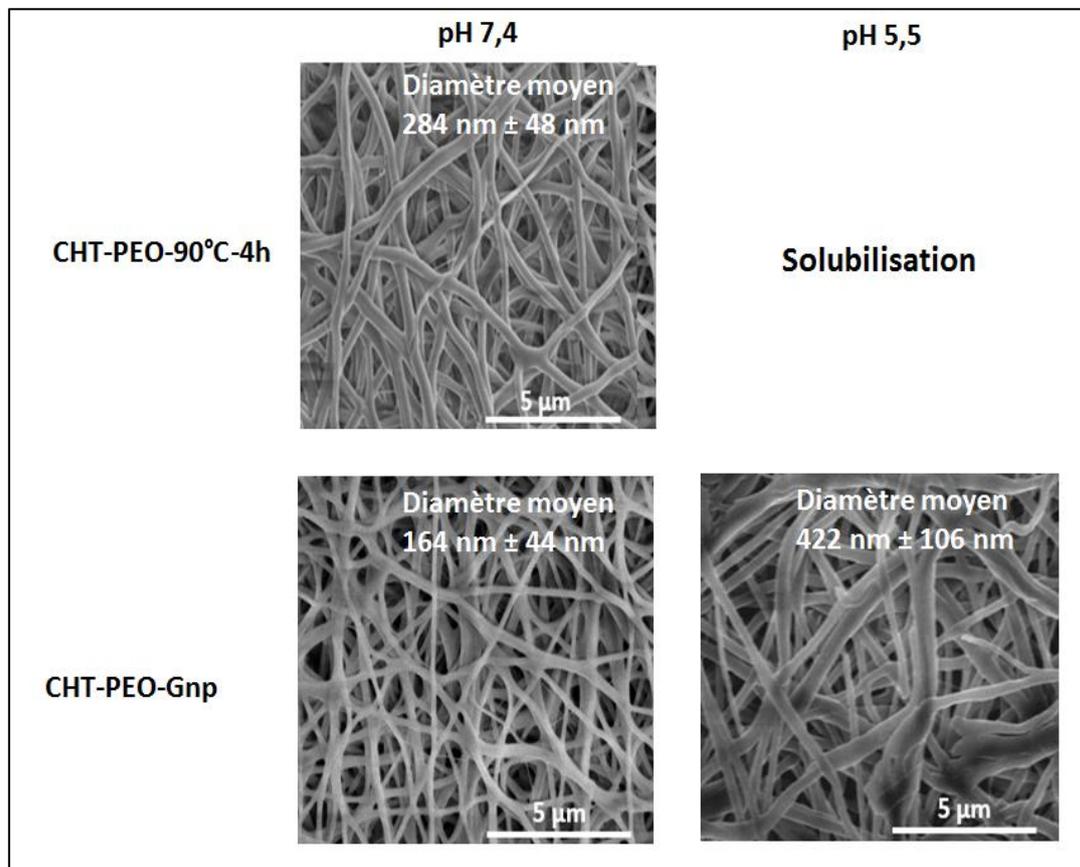


Figure 74 : Images MEB (x10k) de NFs de CHT-PEO-90°C-4h et CHT-PEO-gnp lavées à pH7.4 et pH5.5, les diamètres moyens des NFs sont indiqués sur les images

II.6 Etude par spectroscopie infrarouge

Afin de mieux comprendre les interactions formées lors du traitement thermique ou bien de mettre en évidence la réaction de réticulation entre le CHT et la Gnp, une étude par IR-ATR a été menée. Les spectres du PEO, du chitosan et des NFs de CHT-PEO, CHT-PEO-90, CHT-PEO-140 ET CHT-PEO-Gnp sont donnés sur la **Figure 75**.

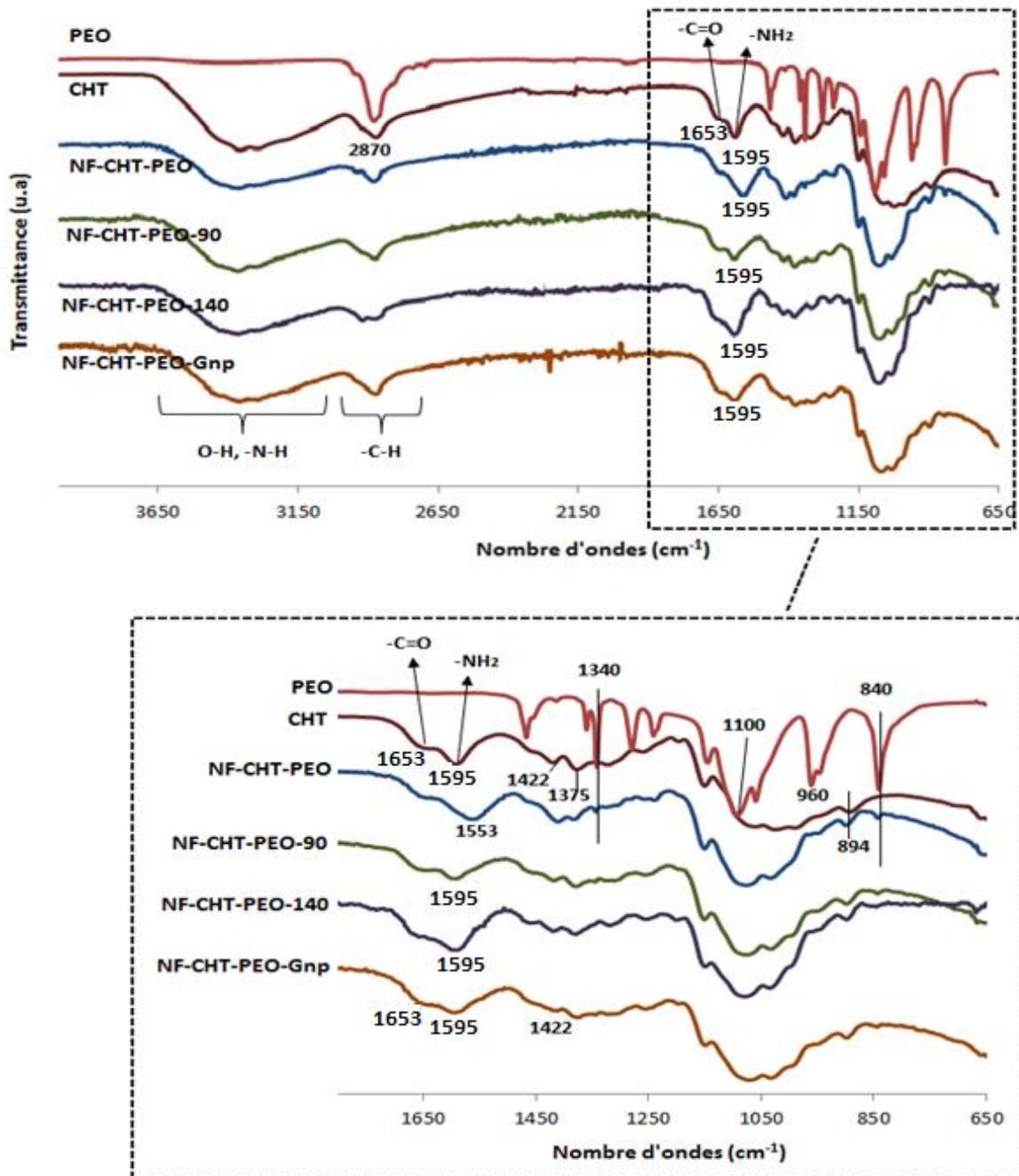


Figure 75: Spectres IR de PEO, CHT et des nanofibres de CHT-PEO, CHT-PEO, CHT-PEO-90°C, CHT-PEO-140°C et CHT-PEO-Gnp donnés entre a) 4000-650 cm^{-1} , b) 1800-650 cm^{-1}

Le chitosan se caractérise par un large pic situé entre 3500-3000 cm^{-1} qui correspond à l'élongation des -OH et des -N-H, un autre pic à 2872 cm^{-1} qui correspond à l'élongation des -C-H, les pics à 1653-1595 cm^{-1} sont associés à l'élongation des groupements carbonyle (-C=O) et des groupements amines (-NH₂). Le pic à 1375 cm^{-1} est attribué à la déformation symétrique des groupements méthyles (-CH₃). Les pics qui se situent entre 894 et 1150 cm^{-1} correspondent à la structure saccharidique du chitosan. Ces observations correspondent à celles trouvées dans la littérature (335,336).

Suite à l'électrofilage du CHT avec le PEO, il est possible d'observer sur le spectre des NFs CHT-PEO que le pic à 1595 cm^{-1} devient plus large et se décale à 1553 cm^{-1} . Ce décalage des groupements amines peut être attribué à la formation de liaisons hydrogènes entre les polyéthers du PEO et les amines du chitosan (260). Les pics relatifs au PEO sont très peu visibles à cause de la faible quantité de PEO présente dans les nanofibres. Il est possible d'observer de faibles pics à 1340 cm^{-1} et à 840 cm^{-1} et qui correspondent respectivement aux vibrations et à l'oscillation des groupements CH_2 . Les bandes d'absorption à $1100, 960\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux vibrations des C-O-C du PEO (337) et pourraient interférer avec celles du CHT, ce qui expliquerait le changement observé entre 1100 cm^{-1} et 900 cm^{-1} dans le spectre des NFs CHT-PEO.

Les spectres IR des NFs CHT-PEO-90 révèlent que le pic à 1553 cm^{-1} qui correspond aux groupements $-\text{NH}_2$ se décale vers 1595 cm^{-1} . De plus l'intensité du pic diminue. Ceci signifie qu'il y a eu une modification au niveau des groupements amines suite au traitement thermique. Ces changements peuvent être dus à une déshydratation des membranes. En augmentant la température à 140°C , on remarque des changements au niveau du pic à 1595 cm^{-1} qui devient plus intense alors que celui à 1653 cm^{-1} s'élargit. Il est donc possible que des liaisons hydrogènes entre les fonctions amines et les groupes hydroxyles du CHT se soient formés.

La réticulation par la génipine se produit par une formation de liaisons amides et des amines hétérocycliques entre la génipine et les groupements amines du chitosan (voir **Figure 76**). Sur le spectre NFs CHT-PEO-Gnp, on remarque que le pic à 1422 cm^{-1} s'élargit indiquant la présence d'élongation du noyau de l'amine hétérocyclique formé après réticulation (295,338). De plus, le pic observé à 1553 cm^{-1} sur le spectre NFs CHT-PEO se décale à 1595 cm^{-1} et la bande d'absorption de l'amide à 1653 cm^{-1} (C=O) devient plus large à cause de son chevauchement avec l'élongation des C=C dans la structure cyclique de la génipine (295). Ces observations confirment la réaction des groupements amines du CHT avec la Gnp qui conduit à la formation de liaisons amides et des amines hétérocycliques.

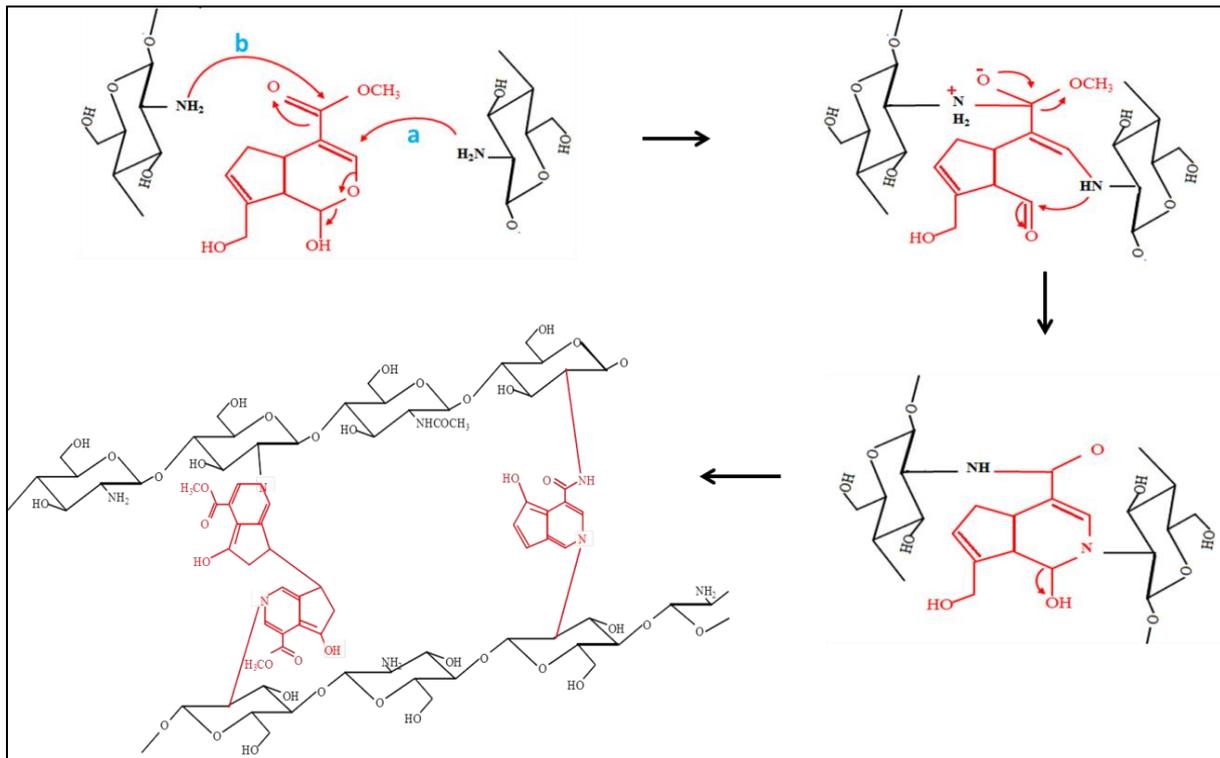


Figure 76 : Mécanisme de réaction du CHT avec la Gnp

En résumé, les changements au niveau des spectres des nanofibres réticulées à 90°C et 140°C ont permis de confirmer l'établissement de liaisons hydrogènes entre les chaînes du CHT qui est à l'origine de la stabilité des membranes dans les milieux aqueux. Dans le cas de la Gnp, l'étude a permis de confirmer la réaction de réticulation entre le CHT et la Gnp et la formation de liaisons covalentes qui permettent d'assurer la stabilité des nanofibres de chitosan.

II.7 Conclusion

L'élaboration de nanofibres de chitosan a été possible grâce à son mélange avec le PEO. Toutefois, les nanofibres obtenues n'étaient pas stables en milieux aqueux. Un traitement thermique provoquant la formation de liaisons hydrogènes et une réticulation chimique par réaction à la Gnp a été appliqués aux NFs. Ces deux voies ont permis d'améliorer la stabilité des nanofibres et de préserver leur structure fibreuse et leur porosité à pH 7.4. Par ailleurs, dans un milieu légèrement acide (pH 5.5) le traitement thermique à 90°C s'est avéré insuffisant mais une amélioration a pu être observée lors d'un traitement à 140°C. En milieu acide, les meilleurs résultats ont été obtenus grâce au traitement chimique à la Gnp où les NFs restaient stables.

III. Nanofibres de chitosan à activité antibactérienne

Après avoir étudié l'électrospinning des nanofibres à base de chitosan et leur stabilisation, le TCL a été incorporé dans le but de leur apporter une activité antibactérienne. Le TCL est soluble dans le système de solvant (90% v/v d'acide acétique) utilisé pour le chitosan. Ce détail est très important pour obtenir des nanofibres homogènes et un principe actif parfaitement dispersé dans le corps fibreux. Une caractérisation physico-chimique a été réalisée afin de mettre en évidence la présence de TCL dans les nanofibres.

III.1 Morphologie des nanofibres obtenues

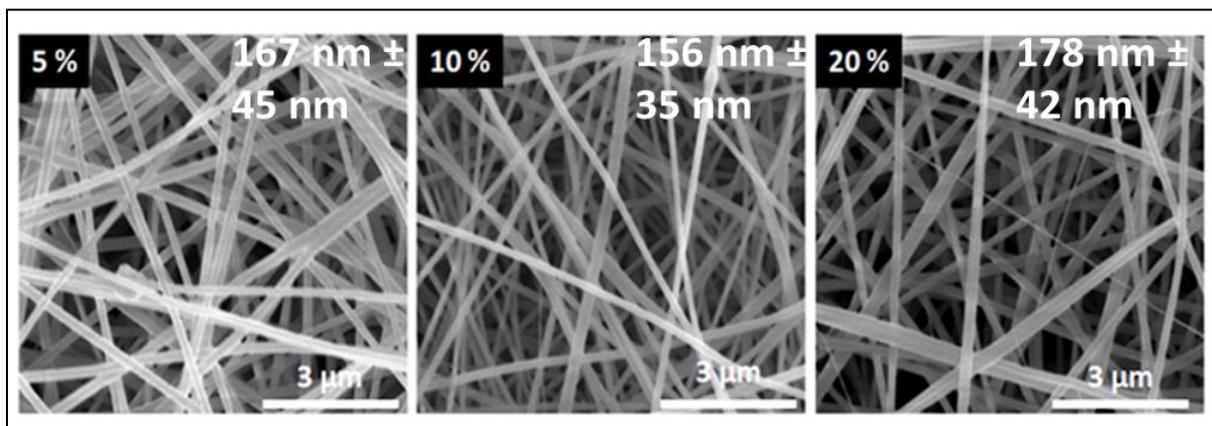


Figure 77: Photos MEB (x15) de Nanofibres de CHT-PEO-TCL contenant 5wt%, 10wt% ou 20wt% de TCL-Les diamètres moyens respectifs (en nm) sont indiqués sur les photos

La **Figure 77** montre qu'il n'y a pas de billes sur les nanofibres de CHT-PEO-TCL5, CHT-PEO-TCL10 et CHT-PEO-TCL20. Aucune forme cristalline n'a également été observée à la surface des nanofibres ce qui signifie que le TCL est bien dispersé dans la matrice du polymère. En effet, celui-ci était bien soluble dans la solution de départ. Ce facteur joue un rôle primordial dans l'obtention de nanofibres homogènes et sans billes.

La différence de diamètre entre les nanofibres qui ne contiennent pas de TCL et celles qui en contiennent est non significative (158 nm pour les NFs de CHT-PEO). De plus, l'augmentation de la quantité du TCL dans les NFs ne perturbe pas l'électrofilage et par suite les diamètres des fibres ne varient pas beaucoup. On peut constater que les diamètres moyens sont relativement proches avec un écart de quelques nanomètres (167 nm, 156nm et 178 nm pour respectivement CHT-PEO-TCL5 à 20). Ce qui traduit le fait que l'ajout du TCL n'a pas d'influence sur le diamètre des fibres.

III.2 Etude et caractérisation des nanofibres CHT/TCL

III.2.1 Résistance du TCL au traitement thermique des nanofibres

Afin de vérifier la stabilité du triclosan lors de la stabilisation des nanofibres par traitement thermique, celui-ci a été soumis à des isothermes à 90°C, 120°C et 140°C pendant 4h (**Figure 78**). La poudre de TCL a été placée dans la nacelle de l'ATG et nous avons enregistré la variation de masse en fonction du temps (pendant 4h) à différentes températures.

Une faible variation de la perte de masse du TCL à 90°C pendant 4h est observée (10%) alors qu'une perte de masse plus importante est obtenue avec 120 et 140°C. Compte-tenu de ces résultats, toutes les nanofibres obtenues ont été traitées thermiquement à 90°C pendant 4h.

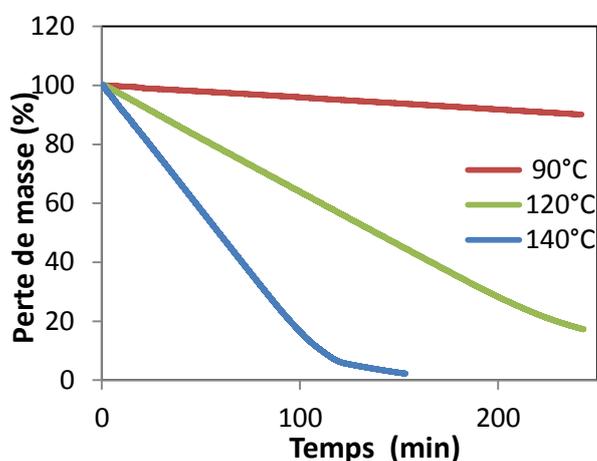


Figure 78 : Evolution de la masse du TCL pur à 90°C, 120°C et 140°C mesurée par ATG

III.2.2 Analyse thermogravimétrique des NFs chargées de TCL

Les NFs de CHT-PEO 90/10 (w/w) avec et sans TCL ont été analysées par ATG ainsi que les composés purs qui les constituent. Les thermogrammes sont donnés dans la **Figure 79**.

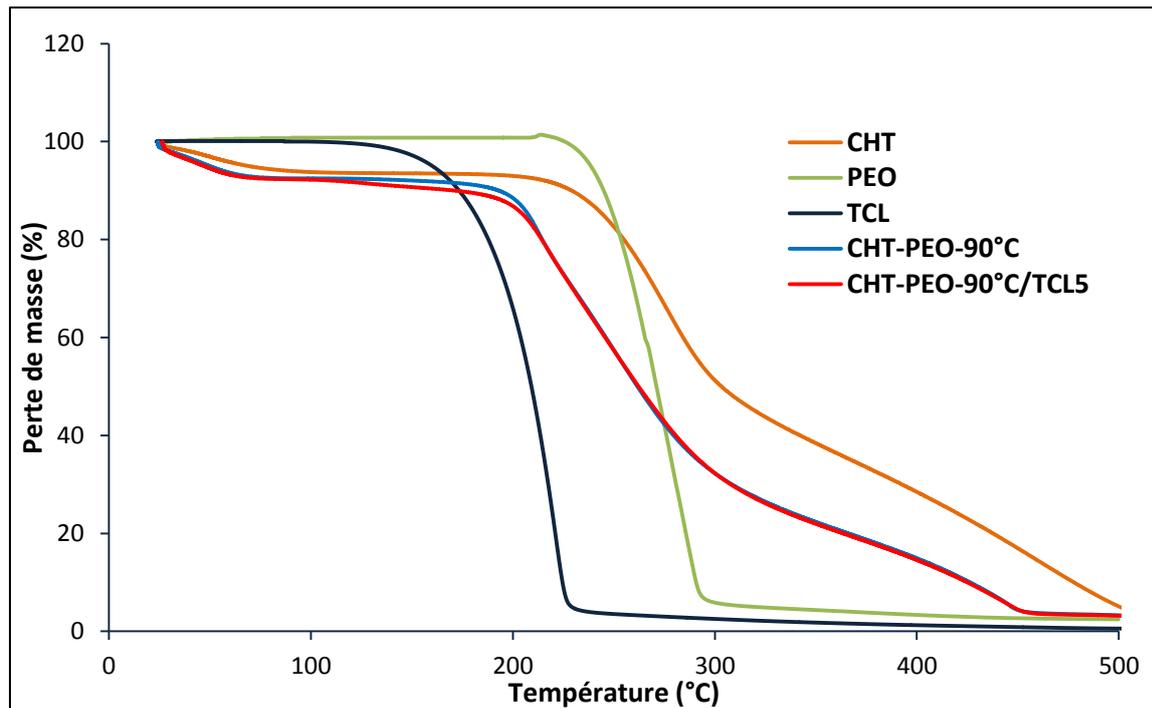


Figure 79 : Thermogrammes des NFs de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-90°C/TCL5, et des produits purs CHT, PEO, TCL obtenus entre 25°C et 500°C

Le CHT pur présente une perte de masse entre 25°C et 90°C qui correspond à la perte d'eau absorbée par les NFs. La 2^{ème} perte de masse qui débute à 200°C et qui correspond à la dégradation du CHT. La 3^{ème} perte de masse observée à partir de 378°C et qui est attribuée à la dégradation d'un résidu (« charbonné ») dû à la déshydratation du polysaccharide.

Le PEO présente une seule perte de masse à 225°C qui correspond à la dégradation du polymère. Le TCL reste stable jusqu'à 110°C puis se dégrade entre 110°C et 221°C.

Les NFs de CHT-PEO-90°C et de CHT-PEO-90°C/TCL5 présentent comme pour le CHT, une 1^{ère} perte de masse entre 25°C et 90°C attribuée à l'évaporation d'eau. Une 2^{ème} perte de masse est observée pour les deux échantillons, qui débute respectivement à 150°C et à 110°C. On remarque d'une part que les NFs de CHT-PEO sont moins stable à hautes températures que les produits purs, d'autre part les NFs avec du TCL ont une température de dégradation plus faible que celles sans TCL à cause de la présence du TCL qui lui se dégrade à partir de 110°C.

Cette étude permet démontrer, en outre, que les NFs avec TCL restent stables même après traitement thermique à 90°C.

III.2.3 Diffraction par rayons-X

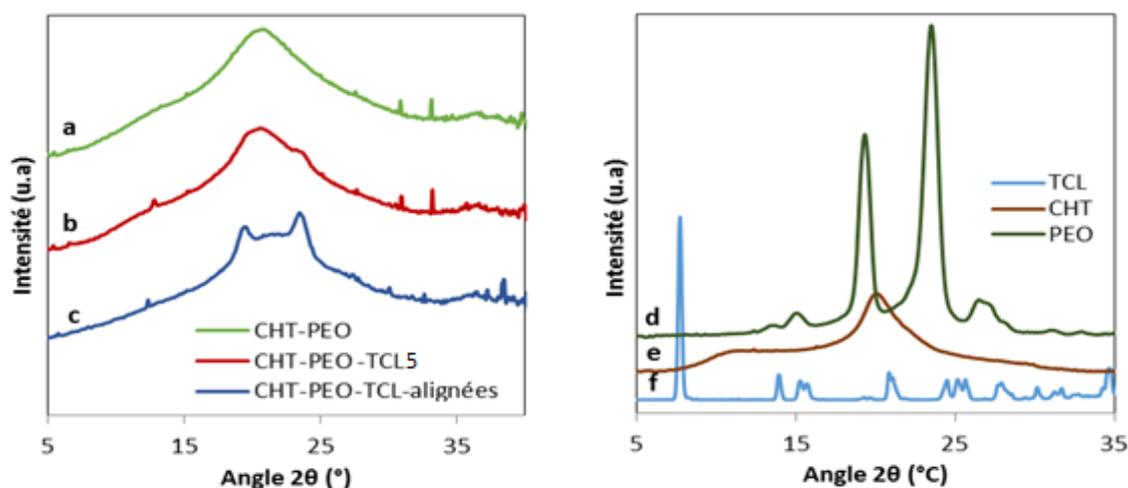


Figure 80 : Diffractogrammes de nanofibres de CHT-PEO CHT-PEO-TCL5 CHT-PEO-TCL5-alignées (à gauche) et des produits en poudre de TCL, CHT et PEO (à droite) obtenus par la technique de DRX

L'état physique du triclosan dans les nanofibres a été évalué par DRX. Le TCL en poudre présente une structure cristalline caractérisée par un pic de diffraction intense à $2\theta = 7.7^\circ$ et d'autres pics d'intensité plus faible entre $2\theta = 14^\circ$ et $2\theta = 35^\circ$ (**Figure 80.f**). L'absence de ces pics dans le spectre de nanofibres (**Figure 80.b**) révèle que le TCL n'est pas présent à l'état cristallin à l'intérieur des nanofibres. Ceci indique que le TCL ne forme pas de cristaux à l'intérieur des nanofibres lors de leur formation, il est dispersé à l'état amorphe dans la matrice polymère de la NF en formant une « solution solide ». Cet état est favorable à l'amélioration de la libération du PA et par conséquent de sa biodisponibilité. Des résultats similaires ont été reportés dans la littérature par (27,339).

D'autre part, des nanofibres alignées avec TCL ont été préparées en plaçant deux électrode métalliques en parallèle à la place du tambour distancées de 2 cm. Des NFs alignées ont été alors collectées (Figure présentée en **Annexe 6**) et analysées par DRX afin d'évaluer l'effet de l'alignement sur la cristallinité du principe actif et des polymères. Leurs thermogrammes sont représentés sur la **Figure 80.a** Deux pics de réflexion à $2\theta = 19.8^\circ$ et 23.6° ont été observés et qui, d'après le thermogramme du PEO, sont deux pics caractéristiques de ce polymère. L'alignement favoriserait alors la cristallinité du PEO.

III.3 Etude de la cinétique de libération du triclosan

L'objectif de cette étude est de suivre la cinétique de libération du TCL à partir de nanofibres de CHT-PEO et d'évaluer l'impact de certains paramètres (concentration du TCL, type de réticulation, rapport de masse CHT-PEO) sur la cinétique de libération.

L'étude de la libération a été réalisée en mode statique en introduisant les échantillons dans du PBS (pH 7.4) à 37°C. A chaque intervalle de temps la quantité de TCL libéré a été déterminée en mesurant l'absorbance du milieu à 282 nm.

III.3.1 Influence du taux de chargement en triclosan

Les profils de libération dans le PBS à pH 7.4 présentant le pourcentage de TCL cumulé (%) et la quantité de TCL (mg/g) à partir de NFs de CHT-PEO (90/10) (w/w) contenant 5%, 10% et 20% de TCL et traitées thermiquement à 90°C sont donnés la **Figure 81**. Un agrandissement sur les 6 premières heures a été présenté.

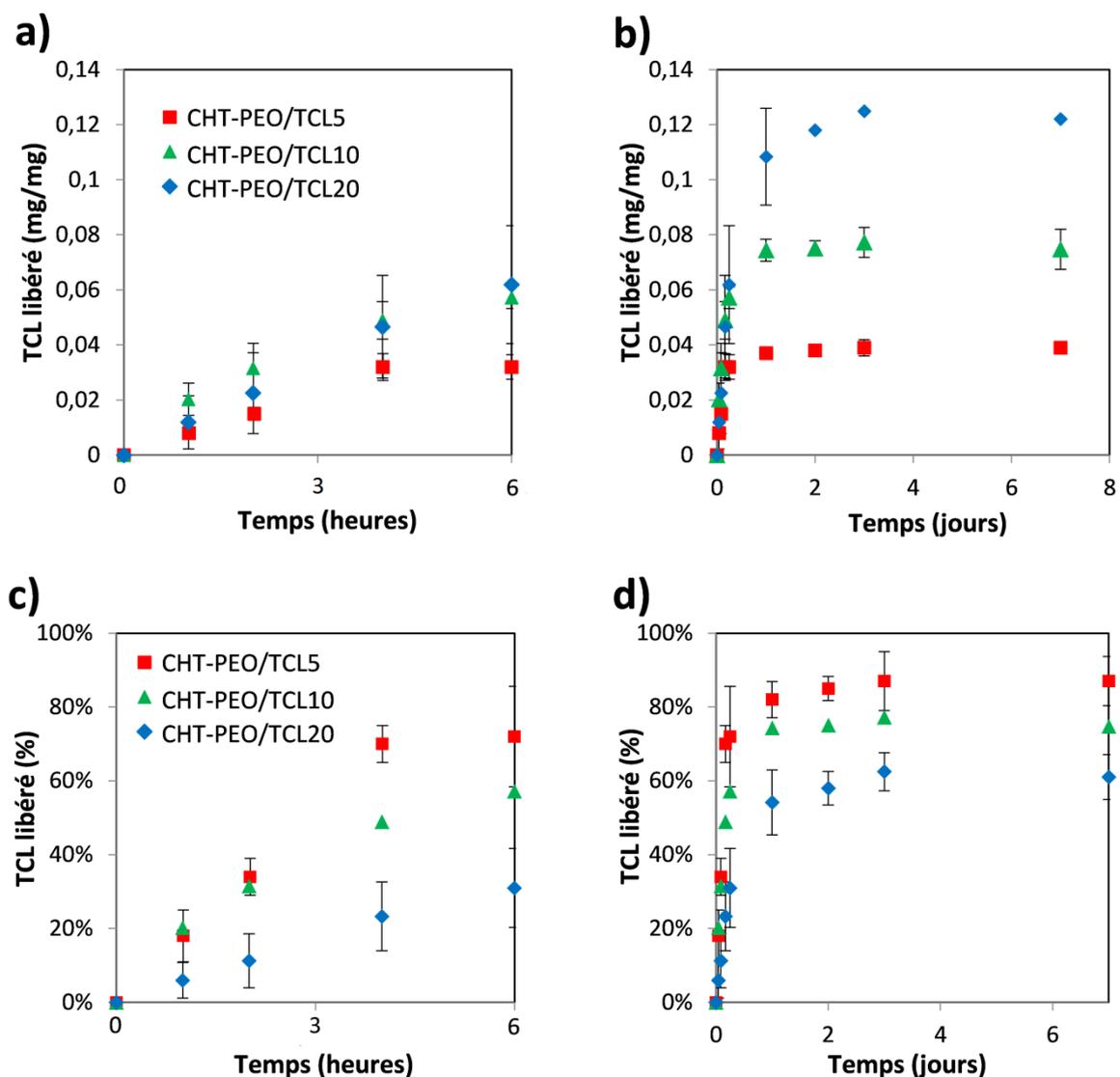


Figure 81 : Cinétique de libération dans le PBS à pH7.4 du TCL incorporé dans des nanofibres de CHT-PEO-TCL5-10-20 à (n=3) et où les résultats sont exprimés en a) et b) mg/g et c) et d) %

Les profils de libération montrent qu'une quantité importante de TCL est libérée au cours des premières heures appelée effet *burst*. Celle-ci est d'environ 0.032 mg/g, 0.060 mg/g et 0.062 mg/g

pour respectivement CHT-PEO-TCL5, CHT-PEO-TCL10 et CHT-PEO-TCL20 au cours des 6 premières heures (0.25 jours) (**Figure 81.a**), ce qui représente respectivement 72%, 57% et 31% de la quantité totale de TCL introduite dans les NFs au départ (**Figure 81.c**). Par ailleurs, on remarque que plus les nanofibres contiennent de TCL, plus l'effet *burst* est important. Le TCL continue ensuite de se libérer pour atteindre un plateau avec une quantité libérée de 0.039 mg/g, 0.070 mg/g et 0.122 mg/g après 7 jours pour respectivement les NFs de CHT-PEO-TCL5, CHT-PEO-TCL10 et CHT-PEO-TCL20 (**Figure 81.b**) ce qui correspond respectivement à 87%, 75% et 61% de TCL libéré au plateau (**Figure 81.d**). On remarque que la quantité libérée des NFs de CHT-PEO-TCL10 est 1.8 fois plus grande que celle libérée des NFs de CHT-PEO-TCL5 et 1.7 fois plus faible que celles qui contiennent 20%. Il y a alors une proportionnalité entre les quantités libérées et les quantités initiales de TCL incorporées dans les NFs. De plus, on constate que lorsque la quantité de TCL est de 20%, un effet *burst* important se produit mais la libération est la plus prolongée. L'effet *burst* pourrait être provoqué par la présence d'une quantité importante de PA à la surface des nanofibres qui se libère rapidement dans les premières heures (340).

III.3.2 Influence du rapport de masse CHT/PEO

La libération du TCL dans le PBS à pH 7.4 à 37°C à partir de NFs de CHT-PEO-TCL5 à différents rapports massiques de CHT-PEO (90/10, 80/20 et 70/30) (w/w) a été évaluée et les données sont présentées dans la **Figure 82**.

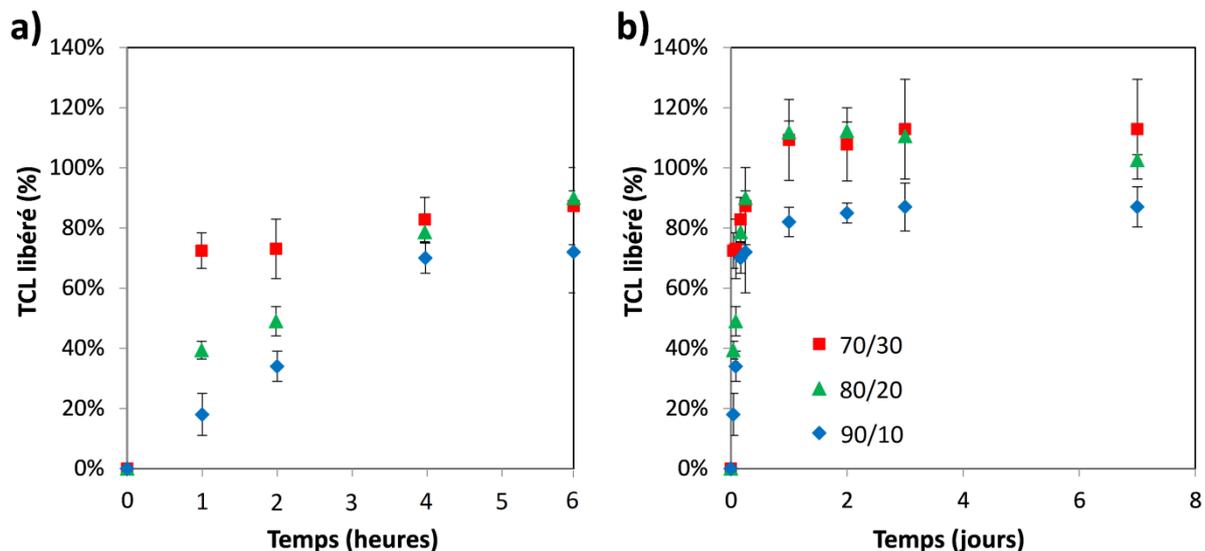


Figure 82 : Cinétique de libération du TCL 5% dans le PBS à pH 7.4 à partir de nanofibres de CHT-PEO à différents rapports de masse : 70/30, 80/20 et 90/10 (n=3) et où dans a) les premières 24h sont affichées et b) libération sur 7 jours

La libération la plus rapide a été observée dans le cas des NFs de CHT-PEO à 70/30 où 72% de TCL sont libérés lors de la 1^{ère} heure puis 18% dans les 5 heures qui suivent pour ainsi atteindre 90% de

TCL libéré en 6 heures. En revanche, les NFs avec un rapport de 80/20 en CHT/PEO ont démontré un effet *burst* moins important où 39% de TCL sont libérés au bout d'une heure et seulement 18% se sont libérés des NFs avec 10% de PEO. Le PEO favorise alors la libération plus ou moins rapide du TCL. En effet, le PEO est un polymère hydrophile et par conséquent plus le pourcentage de celui-ci est élevé plus la libération est rapide.

III.3.3 Influence du procédé de stabilisation des NFs

Afin d'étudier l'influence de la réticulation, le TCL a été incorporé (5%) dans des membranes de CHT-PEO 90/10 traitées thermiquement à 90°C pendant 4h (CHT-PEO-90-TCL5) et réticulées à la génipine (CHT-PEO-Gnp-TCL). La **Figure 83**, présente les pourcentages cumulés de TCL libéré en fonction du temps exprimé en jours.

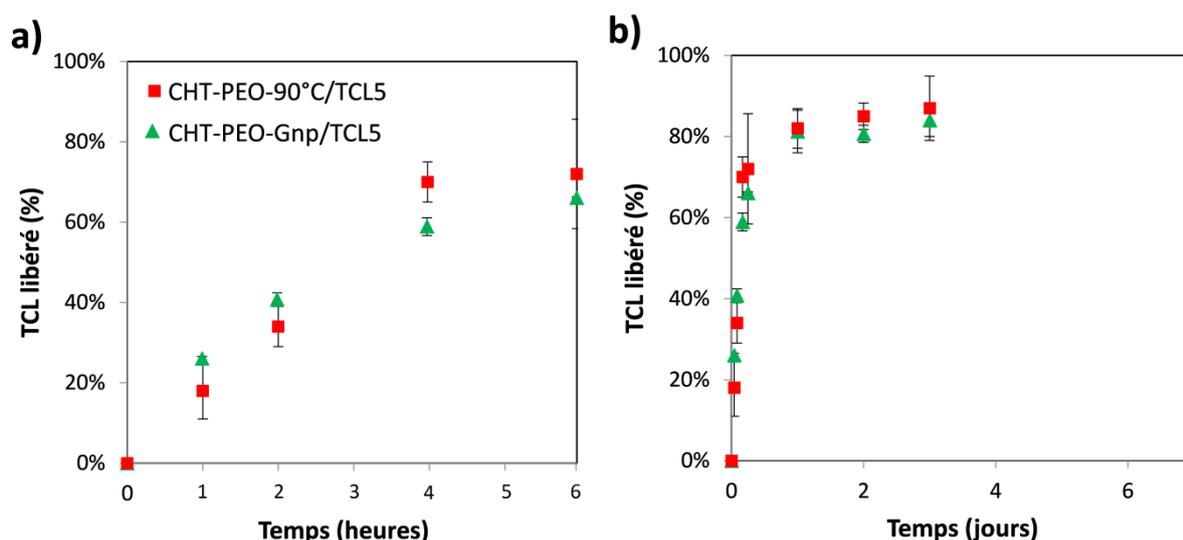


Figure 83 : Cinétique de libération dans le PBS à pH 7.4 du TCL à partir des nanofibres de CHT-PEO-90-TCL5 et CHT-PEO-Gnp-TCL5

On remarque que les deux membranes ont des profils de libération proches. Les deux types de réticulation permettent d'avoir un effet *burst* dépassant les 60% de TCL libéré après seulement 6 heures de libération, puis une libération plus lente jusqu'à 7 jours arrivant à un plateau (90%). Ceci implique que la diffusion du TCL à travers les nanofibres réticulées à la génipine ou traitées thermiquement se produit de la même manière. En effet, ce résultat confirme les résultats de dégradation et de gonflement où il a été démontré que les nanofibres de CHT-PEO perdaient environ 15 % de leur masse initiale et ce quel que soit le procédé de réticulation appliqué. De plus, le taux de gonflement des deux membranes était quasiment identique.

III.3.4 Conclusion

A travers cette étude, il a été démontré que la cinétique de libération peut être contrôlée en modulant plusieurs paramètres.

Tout d'abord, il a été observé que plus la quantité de TCL incorporé dans les fibres était importante plus la libération était prolongée. En effet, le TCL étant très peu soluble, sa diffusion à travers les membranes dont la dégradation est relativement lente se fait progressivement. Afin de moduler la cinétique de libération il est possible de faire varier le rapport CHT-PEO. Le PEO étant hydrophile, alors plus les nanofibres en contiennent plus la libération du TCL sera prolongée et inversement. L'effet du procédé de réticulation a été également évalué et dans le cas du TCL, il a été démontré que dans le cas du traitement thermique à 90°C pendant 4h ou de la réticulation à la génipine à 0.1%, les deux cinétiques de libération se ressemblaient, ce qui confirme les études de dégradation et de gonflement réalisées dans le même milieu de libération étudié (PBS à pH 7.4).

IV. Etude in vitro des propriétés biologiques et microbiologiques

L'évaluation *in vitro* des propriétés biologiques des nanofibres à base de chitosan a consisté à réaliser deux tests biologiques complémentaires. Dans un premier temps, nous avons évalué l'adhésion des cellules (lignée épithéliale L132) puis la viabilité cellulaire au contact des membranes.

L'étude microbiologique permet de mettre en évidence l'activité antibactérienne de nanofibres chargées en TCL par test de diffusion en suivant la méthode de Kirby-Bauer sur des bactéries de gram positif (*S.aureus*) et de gram négatif (*E.coli*).

IV.1 Etude de cytocompatibilité

IV.1.1 Test d'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est une étape importante qui permet le maintien des cellules sur les NFs afin d'assurer par la suite leur prolifération. L'adhésion des cellules L132 au contact de NFs de CHT-PEO-90°C et de NFs de CHT-PEO-Gnp réticulées à la génipine à 0.1wt% a été évaluée.

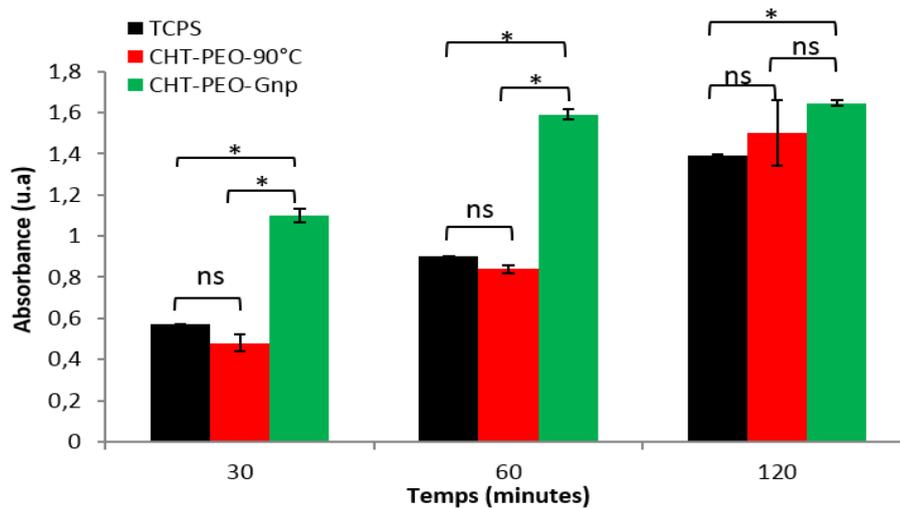


Figure 84 : Adhésion des cellules épithéliales L132 après 30, 60 et 120 minutes de contact de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp (n=6). Le témoin est le fond de la boîte de culture : TCPS (Tissue Culture PolyStyrene). Significativité statistique : ns : non significatif, *p<0.001

Les résultats présentés dans la **Figure 84** montrent une adhésion progressive des cellules sur tous les échantillons testés entre 30 et 120 minutes. Par ailleurs, une différence significative ($p < 0.001$) après 30 et 60 min entre les échantillons de CHT-PEO-Gnp et CHT-PEO-90°C ainsi qu'entre le contrôle et ceux réticulés à la génipine a été observée. En revanche, après 120 min, la différence s'atténue et l'adhésion est pratiquement équivalente pour les deux échantillons testés. Les cellules adhèrent alors plus rapidement sur les membranes réticulées par la génipine.

Il est à noter que les nanofibres de CHT-PEO-90°C commencent à se dégrader après 120 minutes dans le milieu à pH 5.5 (milieu servant à l'analyse des protéines d'adhésion - pNPP) ce qui est conforme à ce qui a été observé lors de l'étude de dégradation (paragraphe II.3.1). C'est ce qui expliquerait alors l'écart type assez important de ces échantillons à 120 min.

IV.1.2 Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire mesurée par la méthode dite du Bleu Alamar par contact direct après 24h et 72h a été évaluée sur des nanofibres de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp. Selon la norme ISO 1993-5, on considère que des échantillons sont toxiques quand la viabilité est inférieure à 70%.

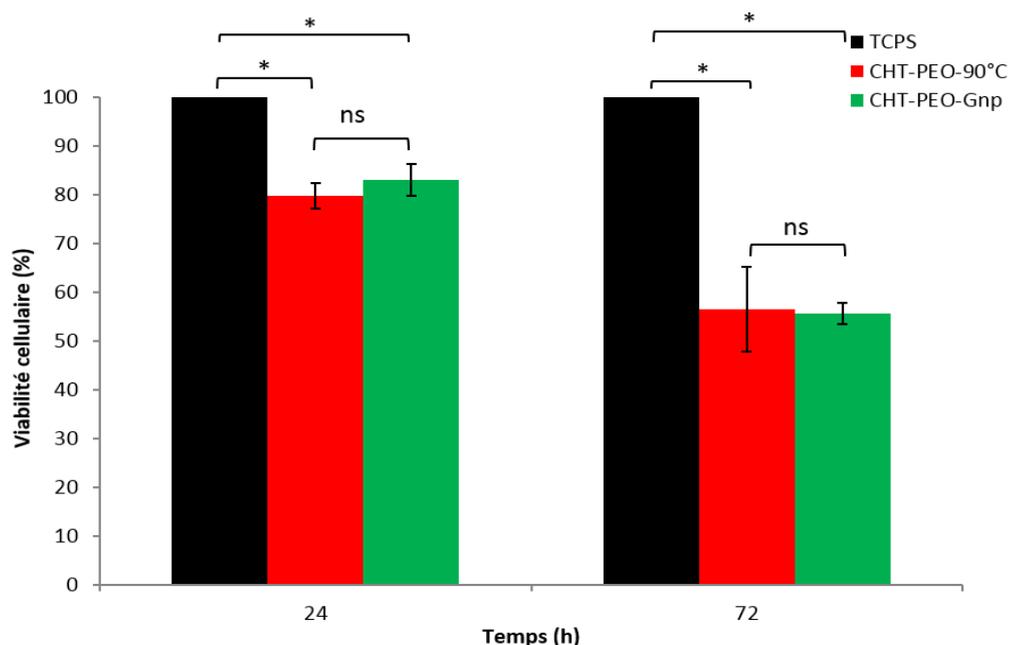


Figure 85: Viabilité des cellules épithéliales L132 après 24h et 72h d'incubation sur des nanofibres de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp (n=6). Le témoin est le fond de la boîte de culture : TCPS (Tissue Culture PolyStyrene). Significance statistique : ns : non significatif, * $p < 0.001$

La **Figure 85** montre les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus après 24h et 72h par rapport au contrôle TCPS. Une viabilité cellulaire acceptable est obtenue après 24h de contact des échantillons CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp qui atteint respectivement les 79.8% et 83%. Après 72h, la viabilité chute en dessous des 70%. Les études statistiques ont montré que la différence est non significative entre les deux échantillons mais elle l'est par rapport au contrôle. Par conséquent, le problème lié à la baisse de viabilité est commun aux deux types d'échantillons qui proviendraient d'un défaut de neutralisation lié à la présence de traces d'acide acétique.

IV.2 Etude microbiologique

IV.2.1 Influence de la quantité du TCL

L'objectif de cette étude est de déterminer et comparer l'activité antibactérienne des membranes nanofibreuses contenant différentes concentrations de TCL vis-à-vis des bactéries *S.aureus* (gram positif) et de *E.coli* (gram négatif) selon la méthode de diffusion de Kirby-Bauer.

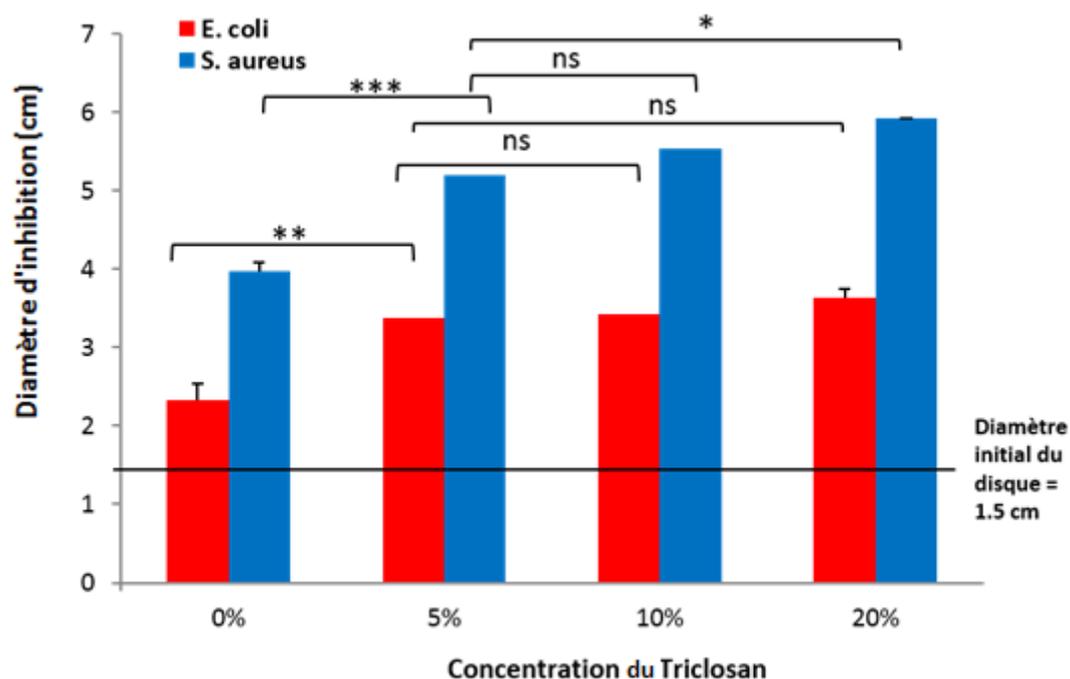


Figure 86 : Test de diffusion sur *S.aureus* et *E.coli* de nanofibres CHT-PEO (90/10) (w/w) à différentes concentrations de TCL (0 wt%, 5 wt%, 10 wt% et 20 wt%). Significance statistique : ns : non significatif, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$

La **Figure 86** montre que tous les échantillons testés ont une activité antibactérienne par diffusion car les diamètres d'inhibitions sont supérieurs au diamètre initial des échantillons (1.5 cm). Les nanofibres de chitosan sans TCL ont également démontré une activité qui est relative au chitosan. En effet, ce polymère est connu pour avoir une activité antibactérienne intrinsèque (341). D'une part, si on compare les valeurs des diamètres d'inhibition on constate que le *S.aureus* est plus sensible que l'*E.coli* au TCL. Ce résultat est en accord avec des études trouvées dans la littérature (342).

D'autre part, on remarque qu'une différence non significative est observée entre les différentes quantités de TCL incorporées dans les NF. En effet, l'écart entre les barres relatives à chaque concentration de TCL n'est pas significatif notamment dans le cas de l'*E.coli*. Ceci traduit le fait que 5 % de TCL suffirait pour avoir une activité antibactérienne prolongée.

IV.2.2 Influence du procédé de réticulation

L'évaluation du procédé de réticulation sur l'activité antibactérienne des nanofibres de CHT-PEO (90/10) (w/w) a été réalisée par la même méthode de diffusion par Kirby-Bauer sur le *S.aureus* et *E.coli* après 24h d'incubation.

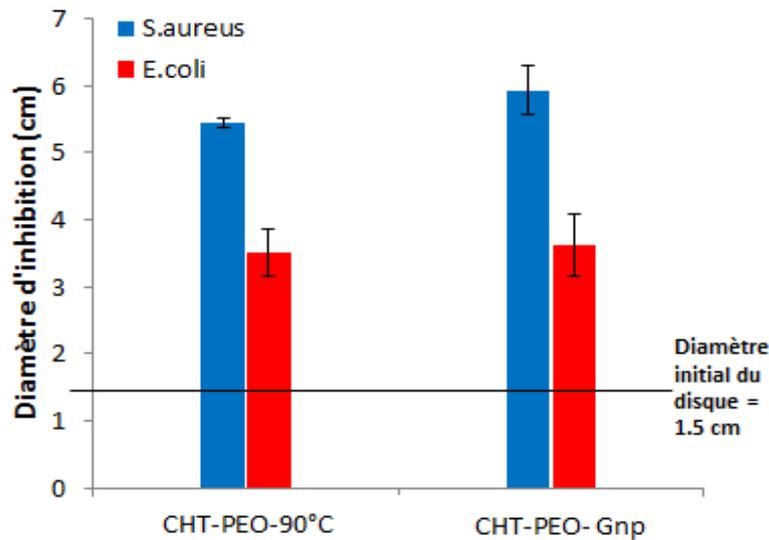


Figure 87 : Activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli* des nanofibres contenant 20 wt% de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp (n=3)

La **Figure 87**, montre que dans le cas du *S.aureus* les nanofibres réticulées à la génipine ont une activité légèrement supérieure à celles traitées thermiquement, qui d'après les analyses statistiques n'est pas significative. Dans le cas d'*E.coli*, les deux échantillons ont le même diamètre d'inhibition. Ces résultats concordent avec l'étude de libération en fonction du procédé de stabilisation utilisé où les résultats ont montré que le TCL diffuse à la même vitesse quel que soit le procédé utilisé. De plus, ces résultats prouvent encore une fois que le TCL reste sous sa forme active dans les nanofibres électrofilées quel que soit la méthode de stabilisation utilisée.

IV.3 Conclusion

Les expériences menées ont permis de conclure que les cellules L132 adhèrent sur les nanofibres notamment après 120 minutes de contact. En revanche, l'étude de viabilité a montré qu'après 24 heures, la viabilité était acceptable mais diminue après 72 heures. Il sera donc nécessaire de poursuivre les études biologiques afin de déterminer la cause de la chute du pourcentage de viabilité (probablement due à des résidus d'acide acétique ou viscosité du CHT...)

Les NFs de CHT-PEO-TCL ont démontrées une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif (*S.aureus*) et Gram négatif (*E.coli*). Les études ont montré que 5% de TCL permettait d'avoir un effet équivalent par rapport à 10% ou 20%. Par conséquent nous avons choisi 5% comme concentration dans la suite de notre étude. De plus, des risques de toxicité peuvent être provoqués par un dispositif qui contiendrait 20% de TCL.

En outre, une étude comparative entre les échantillons de CHT-PEO-90°C et CHT-PEO-Gnp a révélé que les deux procédés de stabilisation ont des profils de libération et une activité bactérienne identiques.

Chapitre 2 : Nanofibres à base de chitosan et de polymère de cyclodextrine pour la libération prolongée de triclosan

I. Etude du complexe CD/TCL

I.1 Diagramme de solubilité :

L'étude de la solubilité permet d'évaluer la quantité de principes actifs en solution en fonction de la concentration de CD. Cette évaluation permet de déterminer la constante d'association et l'efficacité de complexation de la CD testée. Les diagrammes de solubilité du TCL dans des solutions aqueuses de β CD, poly β CD, HP β CD et polyHP β CD sont présentés dans la **Figure 88**.

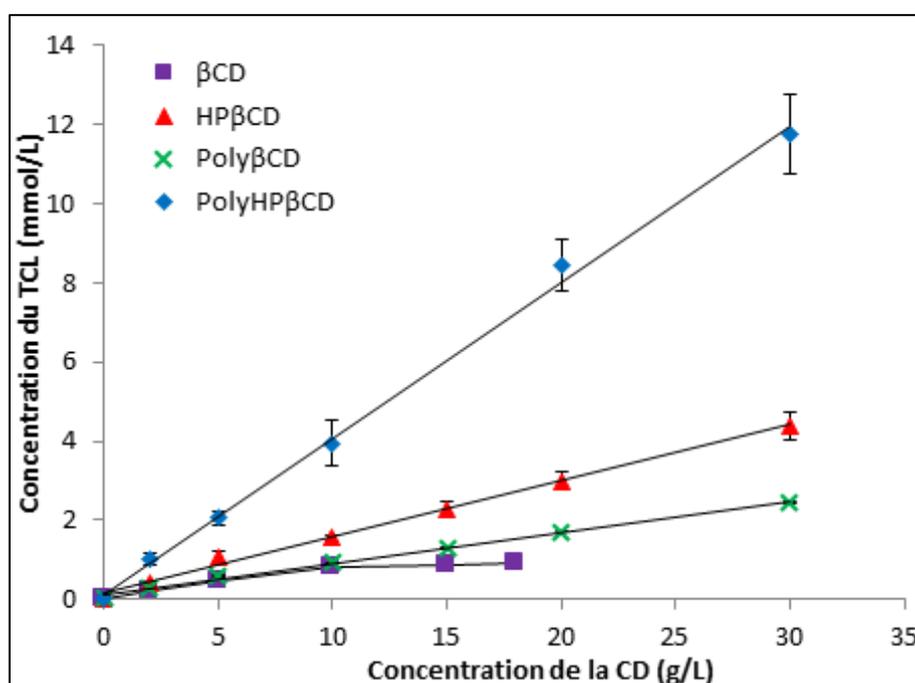


Figure 88 : Solubilité du TCL dans la β CD, HP β CD et leurs polymères respectifs

Les profils obtenus sont de type A_L pour la HP β CD, le poly β CD et le polyHP β CD, ce qui indique que la solubilité apparente du triclosan augmente en fonction de la concentration de CD et que des complexes solubles dans l'eau ont été formés. Cependant, le diagramme obtenu en présence de la β CD est de type B_s , car une augmentation linéaire suivie d'un plateau indiquant qu'un complexe d'inclusion de faible solubilité dans l'eau s'est formé (343,344). La solubilité intrinsèque du TCL dans l'eau à 25°C est de 0.034 mmol/L (10mg/L). Sa solubilité augmente considérablement en présence de CD et des polymères de CD notamment en présence du polyHP β CD pour atteindre une concentration de 11.7 mmol/L (3400 mg/L) soit 344 fois plus élevée pour une concentration de 30 g/L en unités CD (c'est-à-dire 60 g/L de polyHP β CD).

Les constantes d'association apparentes et les valeurs correspondantes pour chaque CD et leurs polymères ont été calculées à partir des pentes de chaque droite et de la solubilité intrinsèque du TCL (la méthode de calcul est donnée dans la partie matériels et méthodes). Les valeurs sont rapportées dans le **Tableau 20**.

Tableau 20 : Valeurs des constantes d'association ($K_{1:1}$) et des efficacités de complexation (CE) correspondant à chaque type de CD étudié

Agent solubilisant	$K_{1:1}(M^{-1})$	CE
β CD	2634	0.09
Poly β CD	3119	0.1
HP β CD	6247	0.62
PolyHP β CD	22567	2.60

On constate que la β CD native possède la constante d'association la plus faible indiquant qu'elle a la capacité la plus faible à solubiliser le TCL (CE =0.09), comparé à la HP β CD qui permet de solubiliser 2.4 fois plus de TCL ($K_{1:1} = 2363 M^{-1}$ pour la β CD contre $6247 M^{-1}$ pour la HP β CD). Veiga *et al.* ont trouvé des constantes de solubilité pour la β CD et la HP β CD dans l'eau respectivement de $750 M^{-1}$ et $8100 M^{-1}$. Jug *et al.* ont trouvé également une constante d'association de $2526 M^{-1}$ en réalisant l'étude dans la salive artificielle (343). En outre, on peut également observer sur la **Figure 88** que les polymères de cyclodextrine ont un effet solubilisant beaucoup plus élevé que leurs monomères de cyclodextrines respectifs, en particulier lorsque l'on considère la HP β CD et le polyHP β CD dont la constante d'association a augmenté de 3.6 fois ($6247 M^{-1}$ vs $22\ 567 M^{-1}$). Des résultats similaires ont été précédemment observés pour le poly γ CD utilisé pour solubiliser l'éthoxzolamide : la réticulation de la γ CD avec de l'acide citrique avait provoqué une augmentation d'un facteur 40 de la constante d'association (345), tandis qu'un facteur de 5 fois avait également été constaté dans le cas de la β CD et du poly β CD mélangés avec du risperidone ou vérapamil (346). La capacité de complexation du polyHP β CD est la plus élevée (CE=2.60). Ceci peut être attribué à l'effet synergique entre les interactions hydrophobes (inclusion dans la CDs) et les interactions hydrophiles et électrostatiques du polymère (acide citrique) (346).

En conclusion, le polyHP β CD présente un effet de solubilisation nettement plus élevé du TCL que le poly β CD. C'est pourquoi le polyHP β CD a été choisi pour l'ensemble de l'étude. En conséquence, CD et PCD désigneront respectivement la HP β CD et le polyHP β CD dans la suite de l'étude.

I.2 Résonance magnétique nucléaire du proton :

Une étude ^1H RMN a été réalisée afin de mettre en évidence la complexation du TCL avec le polyHP β CD (PCD). Un mélange équimolaire (25 mM) entre le TCL et le PCD a été utilisé. Les spectres sont présentés dans la **Figure 89**. La complexation avec le monomère a également été étudiée et le spectre correspondant est visible en **Annexe 7**.

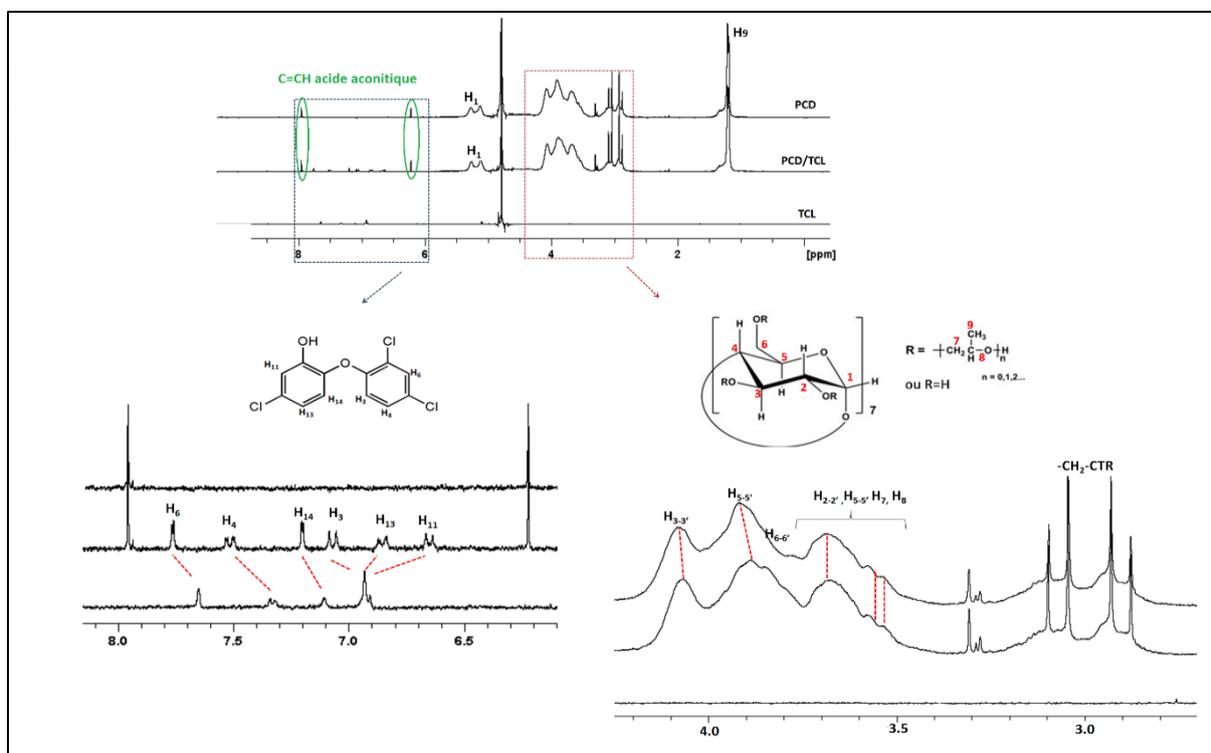


Figure 89 : Etude RMN du complexe TCL/PCD équimolaire dans le D_2O

Les déplacements chimiques des signaux des protons de la CD et du PCD lors de la formation du complexe d'inclusion avec le TCL sont regroupés dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 : Déplacements chimiques des protons de la CD et du PCD et leur variation dans les complexes avec le TCL

	$\text{H}_{1-1'}$	$\text{H}_{3-3'}$	$\text{H}_{5-5'}$	$\text{H}_{2-2'}$	$\text{H}_{4-4'}$	$\text{CH}_2\text{-CTR}$	$-\text{CH}_3$
δ_{CD} (ppm)	5.12	3.86	3.77	3.55	3.41	-	1.05
$\Delta\delta$ (ppm) CD/TCL complexe	0.01	0.025	0.01	0.01	0	-	0
$\Delta\delta$ PCD (ppm)	5.13	4.08	3.92	3.68	3.57	2.88-3.04	1.19
$\Delta\delta$ (ppm) PCD/TCL complexe	0	-0.012	-0.029	0	0	0	0

Il est possible d'identifier sur le spectre du PCD (**Figure 89**) les massifs correspondant à la CD (1.19 ppm, 3.5-4.2 ppm et 5.13 ppm) et l'agent réticulant (2.5-3.2 ppm). Les deux signaux observés à 6.22 ppm et 7.95 ppm correspondent aux groupes aconitates formés par déshydratation des citrates qui relient les macrocycles de cyclodextrine dans PCD. La concentration massique du PCD en CD est

déterminée à partir du rapport des intégrations du signal des protons H_1 (5.13ppm) de la CD et celui des protons des groupes méthylènes des citrates (2.5-3.2ppm), sachant que la CD porte 7 protons H_1 et les citrates 4 protons (2 groupes CH_2). Ainsi le PCD utilisé comporte 51% en poids de cyclodextrine.

Le spectre du complexe PCD/TCL montre un léger déplacement des protons $H_{3-3'}$ et $H_{5-5'}$ internes de la CD (cf. **Tableau 21** et **Figure 89**) respectivement de (-0.012) et (-0.029) ppm. Par contre, le déplacement des signaux des protons aromatiques du TCL observés entre 6 et 8 ppm est nettement visible sur la **Figure 89**. Ceci révèle la formation d'un complexe d'inclusion entre le TCL et le PCD.

I.3 Analyse thermogravimétrique

Une analyse thermogravimétrique des complexes de PCD/TCL, CD/TCL et des différents composés constituant les complexes a été réalisée. Les thermogrammes (5°C/min) sont présentés sur la **Figure 90**.

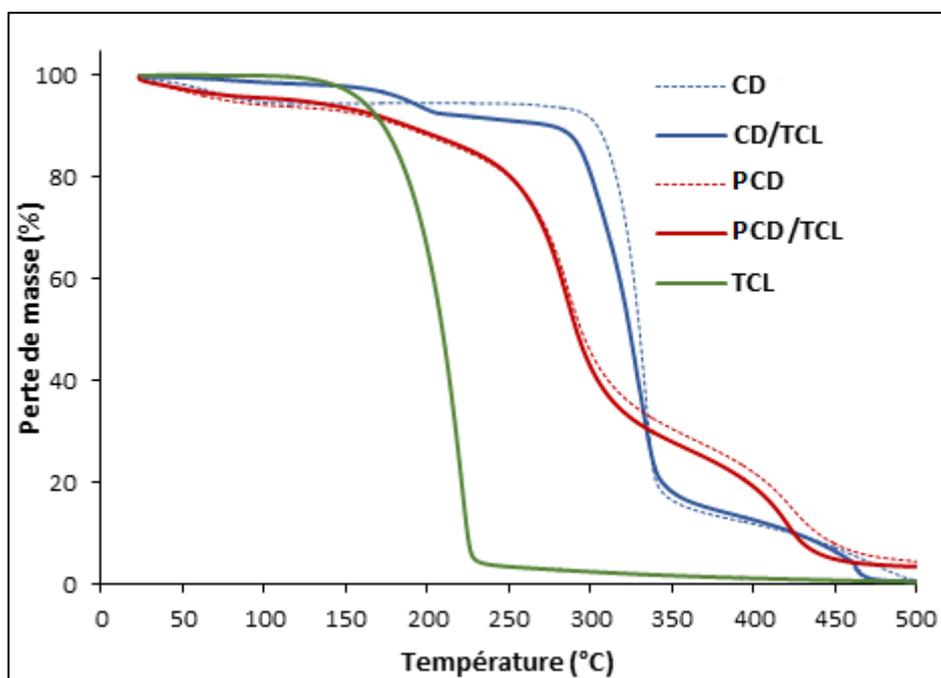


Figure 90 : ATG des complexes d'inclusion PCD/TCL et CD/TCL obtenus à partir d'un mélange équimolaire 1 : 1 ainsi que les composés seuls

Le triclosan pur est stable sur toute la gamme de température allant de 25°C à 110°C, puis commence à se dégrader à 110°C.

La CD présente une 1^{ère} perte de masse entre 25°C et 90°C et qui correspond à l'évaporation de l'eau se trouvant à l'intérieur de la cavité des CD. La seconde perte de masse est observée à 275°C et qui représente la perte de masse correspondant à la décomposition de la CD (347).

Dans le cas du PCD, trois étapes de dégradation ont été observées. La 1^{ère} perte de masse observée entre 25°C et 90°C est similaire à celle observée avec le monomère. La 2^{ème} étape observée entre 140°C et 285°C est attribuée à la décomposition thermique des liaisons de réticulation citrates (348). Enfin, la 3^{ème} étape observée entre 290°C et 420°C correspond à la décomposition thermique de la CD.

Dans le cas du complexe CD/TCL, on remarque tout d'abord que la perte de masse liée à l'évaporation de l'eau contenue dans les cavités des CD est atténuée, ce qui peut être dû à la présence de TCL dans les cavités. Ensuite, une perte de masse est observée à 150°C qui pourrait correspondre à la dégradation du TCL. On rappelle que le TCL commence à se dégrader à 110°C. Ceci signifierait que des interactions ont eu lieu entre le TCL et la CD et ont permis d'augmenter la température de dégradation du TCL. La perte de masse majeure correspondant à la décomposition de la HP β CD a été observée à 265°C, 10°C de moins que dans le cas de la CD seule. Ces résultats montrent l'existence d'interactions entre la CD et le TCL mais ne représentent pas une preuve absolue de la présence de complexes d'inclusion entre la CD et le TCL (démontrée précédemment par RMN).

Sur le thermogramme du complexe PCD/TCL, il est difficile d'observer la dégradation du TCL car le début de dégradation du polymère a lieu dans la même gamme de température de dégradation de la molécule active. En revanche, on remarque que la dégradation de la CD, observée à partir de 290°C dans le cas du polymère seul, se produit à une température moins élevée en présence du TCL. Ceci confirme la présence d'interactions entre les cyclodextrines présentes dans le polymère et le TCL, mais toutefois ne constitue pas la preuve absolue de l'existence de complexes d'inclusion entre la CD et le TCL.

1.4 Analyse par calorimétrie différentielle à balayage

La DSC est souvent utilisée pour la caractérisation des complexes d'inclusion de CDs. Les thermogrammes des complexes obtenus après lyophilisation ainsi que ceux des composés de référence (TCL commercial non lyophilisé, CD commerciale non lyophilisée, PCD obtenu après lyophilisation) sur la **Figure 91**.

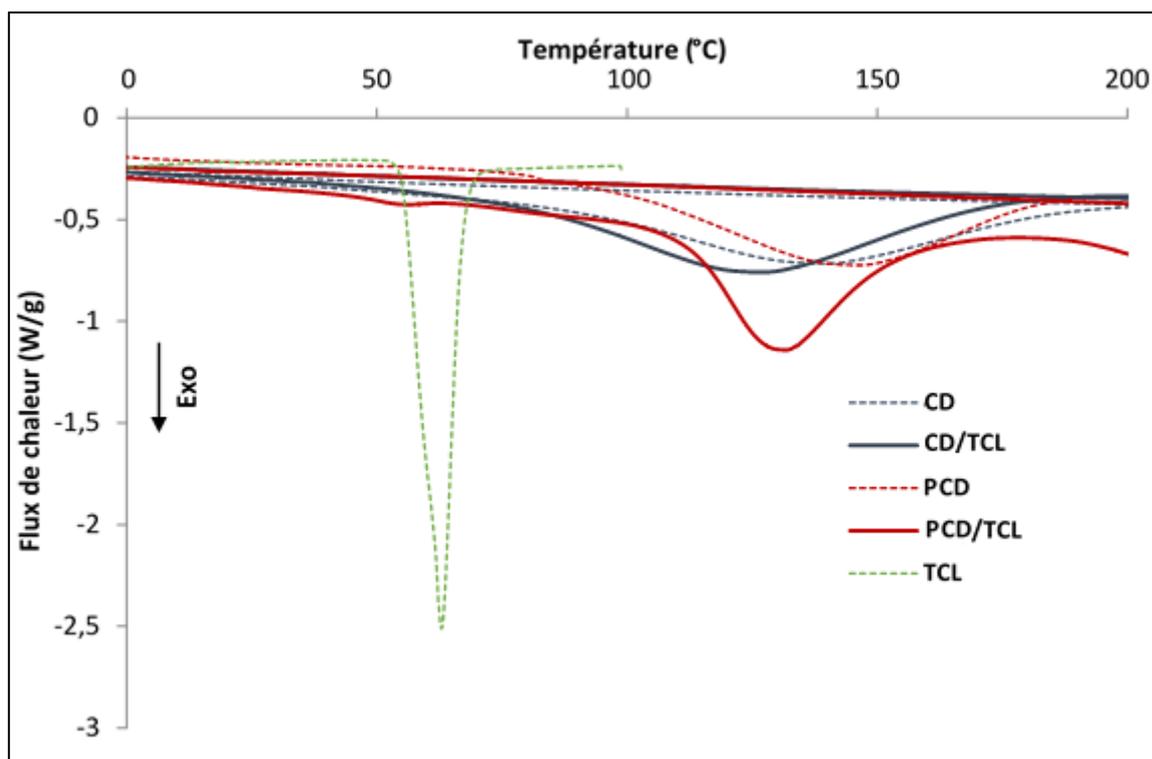


Figure 91 : Thermogrammes DSC des complexes d'inclusion PCD/TCL et CD/TCL ainsi que des composés seuls

Le TCL présente un endotherme à 63°C correspondant à un pic de fusion ($CP=93.19$ J/g). Ce pic de fusion n'apparaît pas sur le thermogramme du complexe CD/TCL et est très faiblement observé (à 51°C) sur le thermogramme du complexe PCD/TCL ($CP=2.548$ J/g). Ceci pourrait être une preuve de la formation de complexe d'inclusion. La DSC ne permet pas toutefois de statuer avec certitude sur la complexation du PCD/TCL ou CD/TCL dans la mesure où les composés ne sont pas dans le même état physique. En effet, le complexe solide a été obtenu par lyophilisation, ce qui pourrait provoquer l'amorphisation du TCL. Cette étude devra être couplée à une étude de DRX afin de prouver avec certitude la formation de complexe. Une autre démarche possible serait de préparer des complexes avec un excès de TCL de type 2:1 ou 3:1 et de calculer leurs enthalpies.

Par ailleurs, lors du premier passage, de larges endothermes ont été observés sur les thermogrammes des complexes et des produits purs entre 100 et 170°C. Ces pics, absents au second passage, correspondent à une perte d'eau. Ceci a été confirmé par DSC modulée qui n'est pas sensible aux pertes d'eau et aux dégradations chimiques(348).

II. Elaboration de nanofibres antibactériennes à base de chitosan et polymère de cyclodextrine

II.1 Nanofibres à base du mélange CHT/PCD pour la libération prolongée du TCL

Des nanofibres à base d'un mélange de CHT et de PCD ont été élaborées. Ces deux polymères sont de charges opposées, et leur mélange peut donc conduire à la formation de complexes de polyélectrolytes (CPE) (197,313). La formation de CPE dépend essentiellement du pH, de la force ionique ou encore du taux de charge du polyélectrolyte. Le mélange en solution diluée de CHT (dissous dans 1% d'AA) et de PCD conduit à l'apparition d'une turbidité, ce qui confirme l'auto-assemblage des deux polymères. Cependant, la condition pour qu'une solution soit électrofilable est que celle-ci soit homogène.

Dans notre cas, le solvant utilisé pour le filage du chitosan est l'acide acétique à 90% (v/v). Dans ces conditions, les fonctions du PCD ne sont pas ionisées et donc aucune interaction électrostatique ne pourra avoir lieu entre les deux polymères et par conséquent le CPE ne peut se former dans ces conditions.

Le **Tableau 22** présente les concentrations utilisées pour la préparation de NFs ainsi que les propriétés des solutions préparées. Des NFs de chitosan sans PCD ainsi que des NFs contenant le monomère de cyclodextrine (à la place du polymère) ont été préparées comme témoin.

Trois formulations à partir du mélange CHT-PCD ont été élaborées avec des concentrations de PCD croissantes (1.75, 3.5 et 8 w/v %) afin d'évaluer l'effet de la quantité du PCD sur la formation du complexe de polyélectrolytes et sur la libération de principe actif.

La composition théorique des nanofibres en polymère (CHT, PEO, PCD ou CD) est également présentée dans le **Tableau 22**. La quantité de TCL présente dans chaque échantillon a également été déterminée après extraction du TCL en immergeant les nanofibres dans de l'éthanol absolu suivi d'un dosage spectrophotométrique.

Tableau 22 : Concentration et propriétés des solutions à électrospinner (à gauche) et composition des nanofibres obtenues (à droite)

	Concentrations et propriétés des solutions						Composition des nanofibres					
	CHT w/v	PEO w/v	PCD or CD w/v	TCL* wt%	Conductivité mS.cm ⁻¹	Viscosité Pa.s	CHT wt%	PEO wt%	PCD ou CD wt%	TCL** wt%	Efficacité d'incorporation %	Diamètre moyen (nm)
CHT/ TCL	3.15	0.35	-	5	0.46	1.28	85.5	9.5	-	4.8 ± 0.3	90 ± 6	138 ± 35
CHT-CD4/TCL	3.15	0.35	4	5	0.37	1.40	40	4.4	50.6	4.9 ± 0.1	98 ± 3	344 ± 93
CHT - PCD1.75/TCL	3.15	0.35	1.75	5	0.44	1.27	57	6.3	31.7	4.2 ± 0.5	80 ± 10	313 ± 46
CHT-PCD3.5/TCL	3.15	0.35	3.5	5	0.38	1.86	42.7	4.7	47.6	4.5 ± 0.1	90.5 ± 3	378 ± 91
CHT-PCD8/TCL	3.15	0.35	8	5	0.26	2.21	26	2.9	66.1	5.1 ± 0.1	100 ± 3	340 ± 85

Les paramètres liés à la machine sont similaires à ceux optimisés pour la préparation de NFs de CHT-PEO du chapitre I. Le voltage a été fixé à 15 kV, le débit à 0.3mL/h et 200 mm pour la distance aiguille-collecteur. Les NFs ont été collectées sur un rouleau rotatif tournant à 100 tr/min. 4 mL de solution ont été utilisés pour chaque membrane électrofilée.

II.1.1 Morphologie des nanofibres

Nous avons étudié dans le chapitre I la possibilité d'électrofiler le CHT mélangé à du PEO. Nous avons conservé la même formulation CHT-PEO 90/10 à laquelle le complexe d'inclusion de PCD/TCL a été ajouté. Les mélanges préparés comme indiqué dans le **Tableau 22** ont été électrofilés. Afin de ne pas encombrer les graphiques et les schémas, la présence de PEO n'apparaît pas dans la nomenclature.

La **Figure 92** montre les images MEB de nanofibres électrofilées des différentes formulations.

Des NFs régulières sans agrégats ont été obtenues. Il n'y a pas non plus d'apparition de billes, ce qui signifie que les paramètres de solution et les paramètres d'électrofilage appliqués sont adéquats.

Le diamètre moyen des NFs de CHT/TCL est de 138 nm et de 300 nm pour celles obtenues par mélange de CHT-PCD ou CHT-CD (cf **Tableau 22**). L'ajout de PCD ou de CD induit donc une augmentation des diamètres des fibres. Ceci est dû à la différence de concentration des solutions électrofilées.

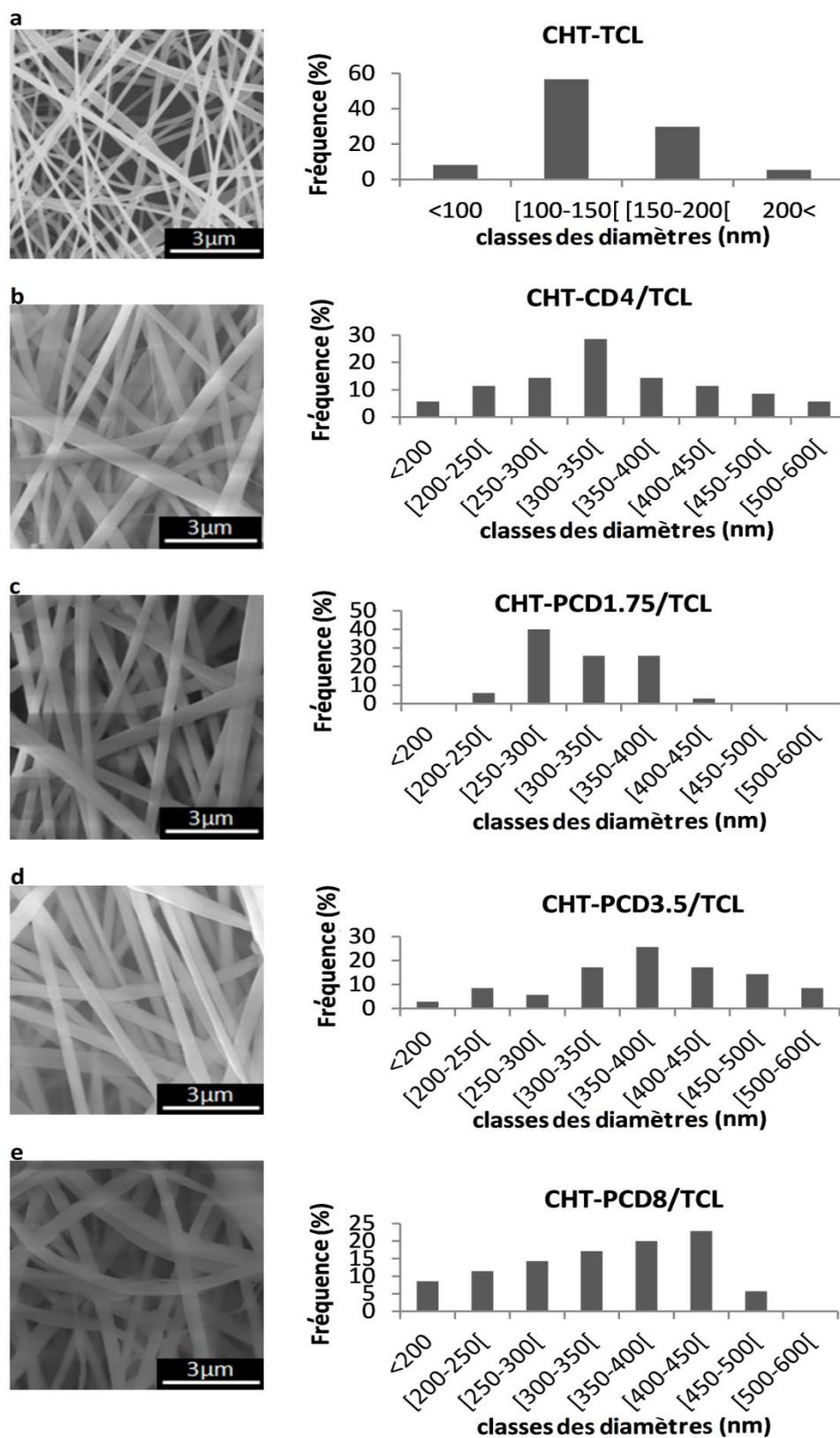


Figure 92: Images MEB (x15k) et répartition des tailles de diamètres de nanofibres de a) CHT-TCL, b) CHT-CD4/TCL, c) CHT-PCD1.75/TCL, d) CHT-PCD3.5/TCL, e) CHT-PCD8/TCL

II.1.2 Spectroscopie Infrarouge

La structure chimique des nanofibres de CHT-TCL, CHT-CD/TCL et CHT-PCD/TCL a été étudiée par IRTF ainsi que les polymères sous leur forme pulvérulente. Les spectres respectifs sont présentés dans la **Figure 93**.

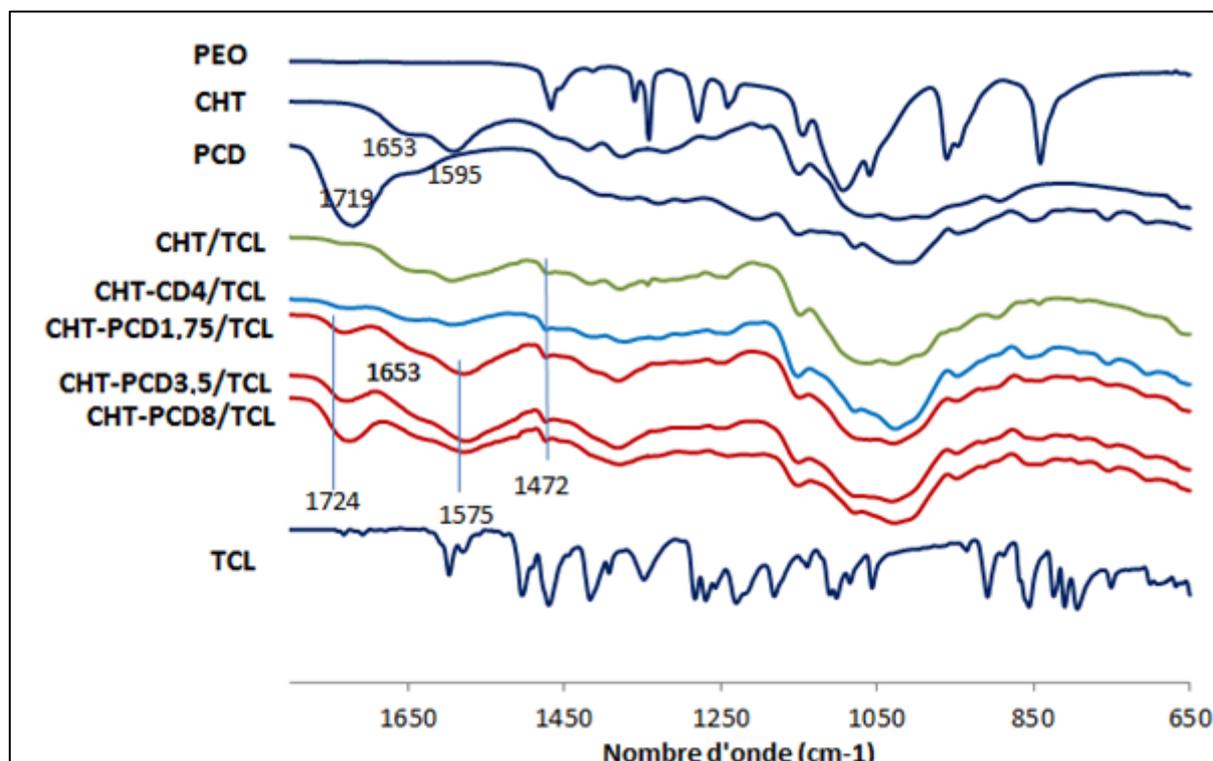


Figure 93: Spectres IR des NFs de CHT/TCL, CHT-CD4/TCL, CHT-PCD1.75,3.5,8/TCL et des composés purs CHT, PCD et TCL

Les spectres des deux polymères CHT et PCD présentent les caractéristiques des polysaccharides qu'on retrouve à 3300 cm^{-1} , bandes représentatives de l'élongation des hydroxyles et des groupements amines pour le CHT et les groupements carboxyliques pour le PCD (non représenté sur la figure 6). La bande à 1719 cm^{-1} qui apparaît sur le spectre du PCD est caractéristique de l'élongation des COOH et des esters (COOR). Les bandes d'absorption apparentes sur le spectre du CHT aux alentours de 1653 cm^{-1} et de 1595 cm^{-1} , sont attribuées respectivement aux groupements amide carbonyle -C=O et amine -NH_2 . Les bandes à 1100 cm^{-1} retrouvées dans les deux spectres sont attribuées à l'élongation des groupements C-O-C.

Les mêmes bandes observées sur les spectres du CHT et du PCD sont retrouvées dans ceux des nanofibres de CHT-PCD/TCL. De plus, on constate que le pic à 1593 cm^{-1} , représentatif des groupements -NH_2 du CHT, se déplace à 1575 cm^{-1} et son intensité diminue en augmentant la concentration du PCD. Ceci suggérerait une interaction entre le CHT et le PCD qui pourrait être la conséquence de la formation du CPE. Cette variation d'intensité du pic des -NH_2 n'apparaît pas dans

le spectre des nanofibres de CHT-CD4/TCL utilisées comme contrôle où il n'y a pas de PCD donc pas de charges anioniques, de plus le pic à 1595 cm^{-1} ne se décale pas. Le spectre du TCL présente des pics caractéristiques dans la région $1610\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$ et $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, correspondant à des vibrations impliquant l'étirement des C-C dans le noyau aromatique. En dépit du spectre bien défini du TCL, sa présence a été difficile à observer dans les nanofibres, en raison de son faible taux de 5% (w/w).

II.1.3 Analyse thermogravimétrique

La **Figure 94** montre les thermogrammes ATG des nanofibres à base de CHT et PCD chargées en TCL, ainsi que les thermogrammes des poudres de CHT, PCD et du TCL. Seules les nanofibres de CHT/TCL, CHT-CD4/TCL et CHT-PCD8/TCL ont été représentées dans le but de ne pas encombrer le graphique.

Une première perte de masse est observée pour tous les échantillons jusque 120°C . Cette perte de masse est relative à la déshydratation des composés.

La seconde dégradation débute à partir de 120°C pour CHT-TCL, 150°C pour CHT-PCD8/TCL. Plus la concentration du PCD croît dans les nanofibres, plus leur température de dégradation augmente. La perte de poids correspond à la dégradation du chitosan, du PCD, du PEO et du triclosan.

La dernière étape de la dégradation observée au-delà de 300°C correspond à la dégradation complète du résidu intermédiaire formé par déshydratation des polysaccharides.

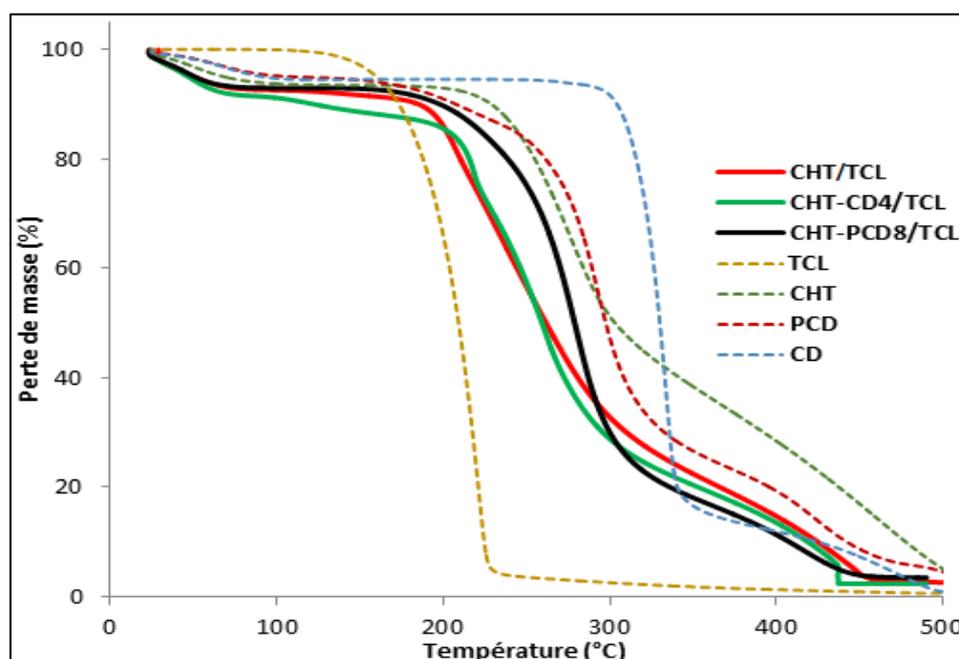


Figure 94 : Thermogrammes de CHT, PEO, PCD des nanofibres de CHT/TCL, CHT-CD4/TCL, CHT-PCD8/TCL et du TCL

II.1.4 Diffraction par Rayons-X

Une analyse par diffraction par rayons X a été effectuée afin d'obtenir des informations sur la cristallinité des NFs. La **Figure 95** regroupe les diffractogrammes des différentes nanofibres électrofilées à base de CHT et PCD ou CD chargées de triclosan TCL et des composés purs CD, CHT, PCD, PEO et TCL.

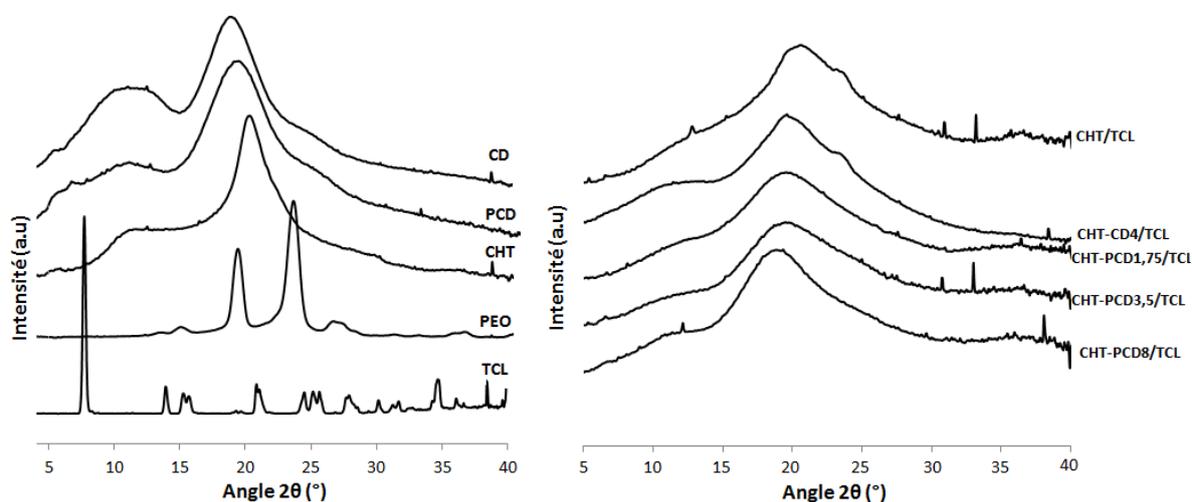


Figure 95: Diffractogrammes des produits en poudre (à gauche) CD, PCD, CHT, PEO et TCL et des nanofibres (à droite) de CHT-TCL, CHT-CD4/TCL, CHT-PCD1.75/TCL, d) CHT-PCD3.5/TCL CHT-PCD8/TCL

Le TCL présente une structure cristalline caractérisée par un pic de diffraction intense à $2\theta = 7,7^\circ$ et d'autres pics bien résolus mais d'intensité plus faible observés entre $2\theta = 14^\circ$ et $2\theta = 35^\circ$. L'absence de ces pics dans le spectre de nanofibres électrofilées révèle que le TCL n'est pas présent sous forme cristalline à l'intérieur des nanofibres. Cela peut suggérer que le TCL est présent dans les NFs sous forme de complexes d'inclusion ou dispersé de manière homogène dans les matrices polymères. On remarque que le pic central devient moins large à forte concentration de PCD, ceci témoigne de la formation de NFs plus riches en PCD.

II.1.5 Etude du comportement des nanofibres en milieu aqueux

II.1.5.1 Etude du gonflement

Le CHT et le PCD sont des polyélectrolytes faibles ce qui implique que leur comportement en milieu aqueux est fortement dépendant du pH. Le comportement de gonflement des nanofibres contenant du CHT et du PCD a alors été étudié à pH 7.4 et à pH 5.5 en laissant les membranes nanofibreuses immergées dans le milieu pendant 24 heures. Les nanofibres ne contenant que du CHT et celles préparées à partir du CHT et du monomère de CD ont été testées comme témoin.

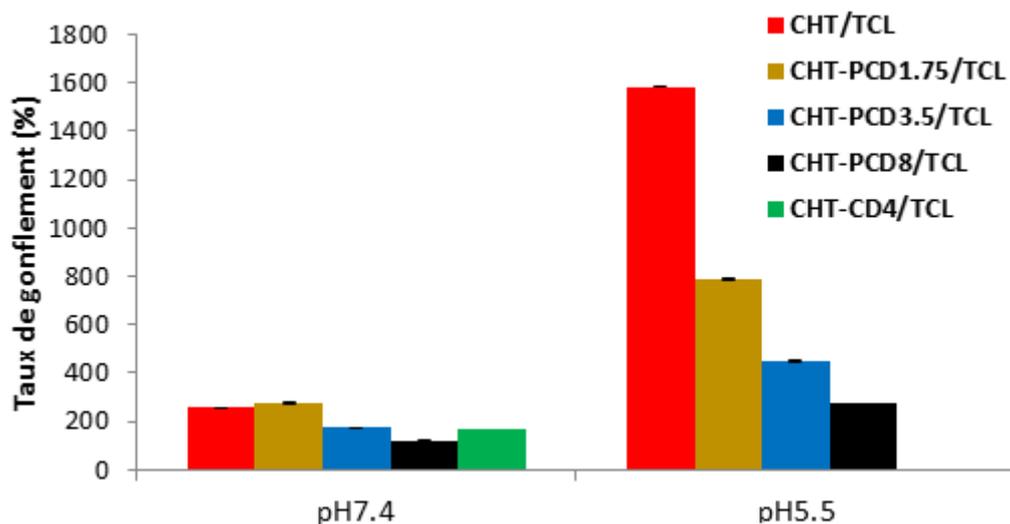


Figure 96: Taux de gonflement des nanofibres chargées en TCL dans le PBS à pH 7.4 et pH 5.5 après 24h d'immersion à 37°C

La **Figure 96** montre que le taux de gonflement est plus important à pH 5.5 qu'à pH 7.4 pour tous les échantillons testés.

Dans le cas des nanofibres de CHT/TCL, le taux de gonflement passe de 1600% (pH 5.5) à 250% (pH 7.4) et il faut préciser qu'à pH 5.5 les nanofibres présentaient l'aspect d'un hydrogel. En effet, comme il a été observé dans le chapitre I, le CHT est soluble à pH 5.5 et les nanofibres gonflent puis se dissolvent, tandis qu'à pH 7.4 elles sont insolubles et gonflent peu.

Dans le cas des nanofibres de CHT-PCD/TCL, on remarque qu'en augmentant le pourcentage de PCD le taux de gonflement décroît notamment à pH 5.5. En effet, à ce pH le PCD est sous la forme carboxylate, et le CHT est sous la forme ammonium. Le taux de gonflement le plus faible a été observé dans le cas des nanofibres de CHT-PCD8/TCL où le pourcentage de PCD est le plus élevé, ce qui signifierait que les interactions ioniques intermoléculaires sont dans ce cas les plus fortes. Le CPE formé présente donc une densité croissante en liaisons ioniques lorsque la proportion de PCD augmente dans les NFs. Dans une précédente étude menée dans notre groupe, il a été démontré que l'interaction entre le CHT et le PCD conduit à la formation de CPE, ce qui a permis dans le cadre d'autres travaux menés dans le laboratoire d'élaborer des systèmes multicouches sur des textiles ou des surfaces métalliques (197,313,349), et des hydrogels (350).

Dans le cas des nanofibres de CHT-CD4/TCL, le taux de gonflement à pH 7.4 a été mesuré et a montré une valeur similaire à celle des NFs CHT/TCL. En revanche, à pH 5.5 celles-ci se sont complètement désintégréées. Ce résultat confirme encore une fois la formation de CPE entre le CHT et le PCD et le rôle joué par cette interaction vis à vis de la stabilité des nanofibres.

II.1.5.2 Etude de la dégradation

II.1.5.2.1 pH 7.4 :

A pH 7.4, les nanofibres de CHT/TCL ont perdu environ 10% de leur poids initial en 24 heures (**Figure 97.a**). Par la suite, la masse des membranes reste relativement stable (perte de 3% de leur poids après 60 jours). La perte de masse initiale pourrait être attribuée à la dissolution du PEO. Ceci a été confirmé par l'étude ^1H RMN du résidu de dégradation où seul un pic attribué au PEO apparaît (les spectres sont en **Annexe 8**). En outre, la perte de masse observée sur les NF de CHT-CD4/ TCL atteint 60%, ce qui correspond à la dissolution totale de la CD (d'après le **Tableau 23**, 50 % de CD sont présentes dans les NFs) en plus du PEO. En revanche, les échantillons CHT-PCD/TCL affichent des taux de dégradation après 24h de 23%, 20% et 29 % pour respectivement les NF de CHT-PCD1.75/TCL, CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL, ce qui indique que le PCD n'a été que partiellement dissous dans le milieu, contrairement à la CD non polymérisée. Les NFs restent stables jusqu'à 60 jours et perdent une faible quantité de masse.

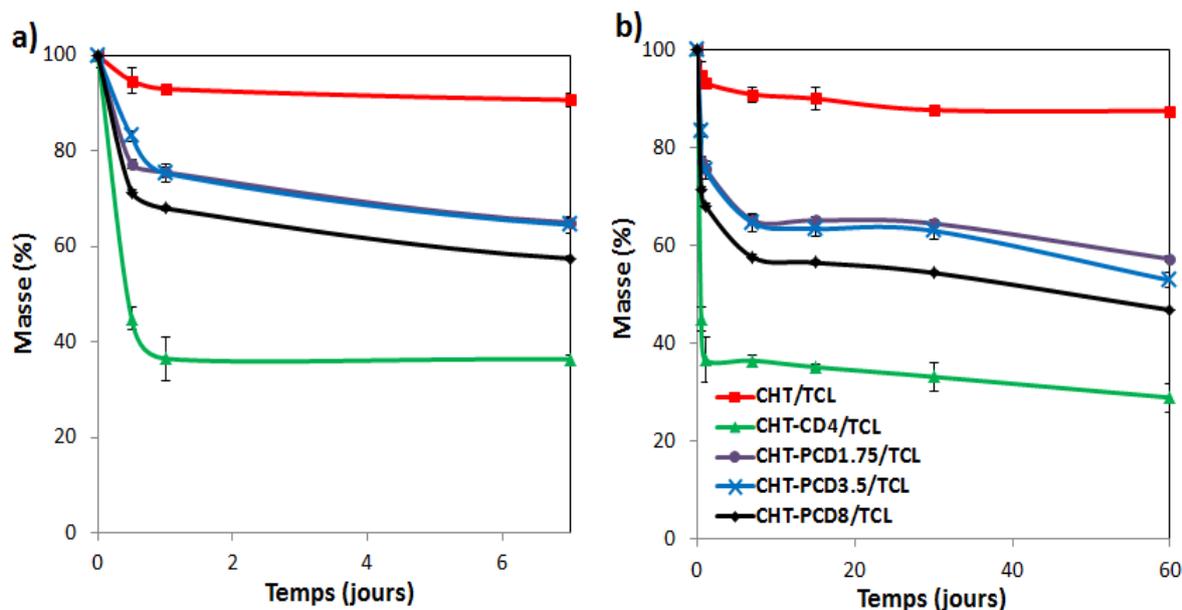


Figure 97: Suivi de dégradation en batch à pH 7.4 a) sur 7 jours b) sur 60 jours des nanofibres électrospinnées

II.1.5.2.2 pH 5.5 :

A pH 5.5, les nanofibres de CHT-CD4/TCL se dissolvent complètement après 24 heures. Les nanofibres de CHT/TCL et de CHT-PCD1.75/TCL gonflent et forment un gel qui se dissout dès 24 heures. Ceci est probablement dû à la solubilité du chitosan en milieu acide mais également à la faible densité d'interactions électrostatiques lorsqu'une faible quantité de PCD est présente dans le mélange. Par ailleurs, ce résultat confirme à nouveau que le traitement thermique seul à 90°C n'est

pas suffisant pour assurer la stabilité en milieu acide des nanofibres (voir chapitre précédent). En effet, seules les NFs de CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL ne se sont pas dégradées spontanément. La **Figure 98** présente le suivi de dégradation de ces nanofibres. On observe que les nanofibres de CHT-PCD3.5/TCL perdent plus de la moitié de leur masse après 7 jours et se dégradent complètement après 15 jours. Celles qui contiennent 8% de PCD n'ont perdu que 30% de leur poids initial après 60 jours. Ce résultat confirme que les NFs sont stabilisées grâce à la formation de CPE dans le mélange.

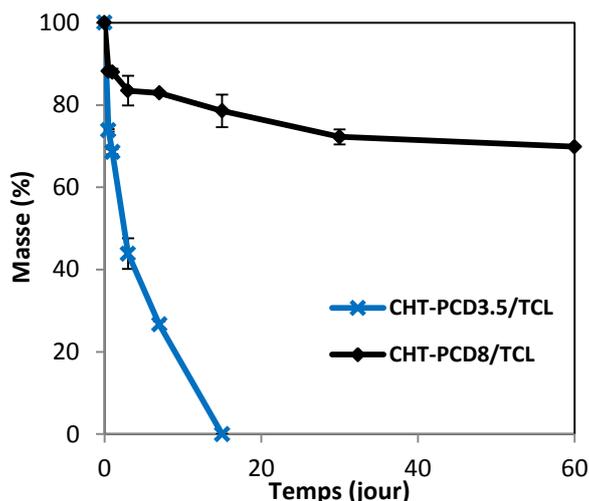


Figure 98: Suivi de dégradation des nanofibres de CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL à pH 5.5 à 37°C pendant 60 jours. CHT-CD4/TCL, CHT-PCD1.75/TCL et CHT/TCL étaient spontanément dissoutes

Cette étude de dégradation montre que, d'une part, les NFs sont stabilisées par formation de CPE entre le CHT et le PCD, et d'autre part, que la CD sous forme PCD reste liée dans les NFs contrairement à la CD monomère.

II.1.6 Etude de la cinétique de libération du Triclosan :

L'étude de la cinétique de la libération du TCL à partir de nanofibres préparées à partir de mélange de polyelectrolytes CHT et PCD/TCL avec différentes concentrations de PCD (1.75, 3.5 et 8%), ainsi que des nanofibres de CHT/TCL et CHT-CD4/TCL utilisées comme témoin, a donc été réalisée dans un milieu à pH 7.4 et à pH 5.5 à 37°C.

Les profils de libération obtenus en utilisant le mode dynamique (circuit fermé, 35 mL/min) sont présentés dans la **Figure 99**.

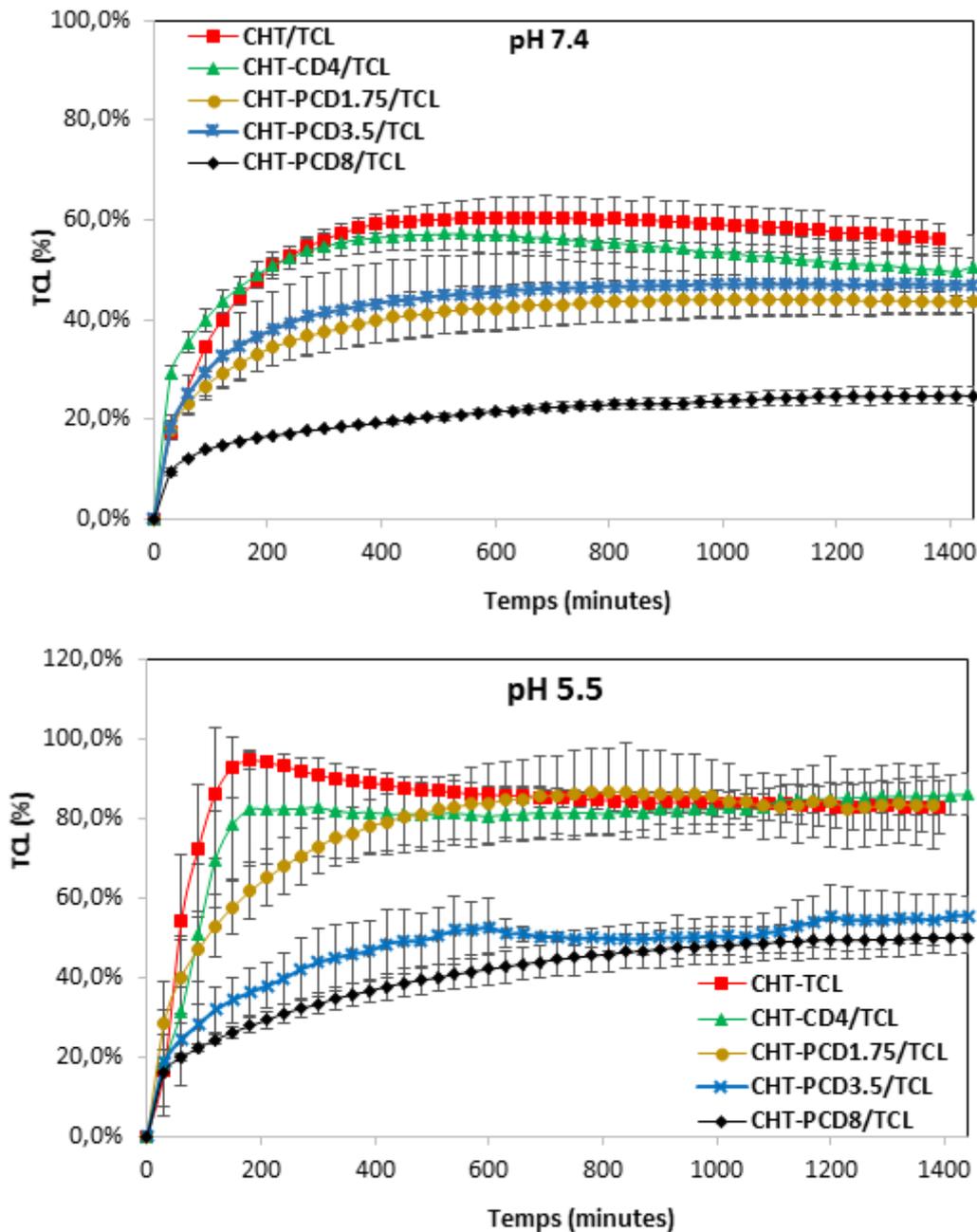


Figure 99: Profils de libération du TCL dans le PBS à pH 7.4 et pH 5.5 à 37°C en mode continu, 35mL/min pour les NFs de CHT-TCL, CHT-CD4/TCL et CHT-PCD 1.75-8/TCL (n=3)

En ce qui concerne les NFs à base de CD, celle-ci étant très soluble et de petite taille par rapport au PCD, la CD va diffuser rapidement vers l'extérieur des NFs. De plus, contrairement au PCD, la CD n'interagit pas avec le chitosan via des liaisons ioniques. Par conséquent, le PA sera libéré rapidement. Ceci explique l'effet *burst* important obtenu avec ces NFs.

Pour les NFs à base de PCD, la cinétique de libération du TCL à pH 7.4 est ralentie. Après 24 heures, 47%, 43.7% et 24.7% de TCL sont libérés à partir des NFs de CHT-PCD1.75/TCL, CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL, respectivement. Par conséquent, plus les NFs sont riches en PCD plus la libération est ralentie.

A pH 5.5, les profils sont différents notamment pour les NFs de CHT/TCL et de CHT-CD4/TCL où 95% et 82% de TCL sont libérés après seulement 200 minutes. Cet effet *burst* est causé par le gonflement élevé des NFs dans ce milieu (cf. **Figure 99**). Un palier est ensuite très rapidement atteint à 80 % et 100 % de TCL respectivement pour les deux échantillons.

En présence de PCD, un meilleur contrôle de la libération du TCL est observé. En effet, plus la quantité de PCD augmente, plus l'effet *burst* est réduit. On remarque que les NFs de CHT-PCD1.75/TCL montrent la libération la plus rapide où un palier à 80% de TCL est atteint après environ 700 minutes. Ceci est dû aux faibles interactions entre le PCD et le CHT qui causent une désintégration rapide de ces NFs. En revanche, les NFs de CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL, qui sont plus stables à ce pH (cf étude de dégradation **Figure 98**), présentent une libération prolongée en particulier pour l'échantillon qui contient 8% de PCD pour lequel seulement 50% de TCL sont libérés après 24h. En effet, à pH 5.5 les deux polyélectrolytes sont ionisés ce qui favorise la formation d'un complexe de polyélectrolyte, permettant de ralentir la libération du TCL grâce à un faible taux de gonflement de la matrice et donc une diminution de la diffusion du TCL.

Cette étude a montré que la libération est ralentie par ajout de PCD et que plus les NFs sont riches en PCD, plus la libération est ralentie et l'effet *burst* réduit. Cet effet est encore plus marqué à pH 5.5.

II.1.7 Etude cinétique : Modèle Korsmeyer-Peppas

Le **Tableau 23** rassemble les paramètres de la cinétique de libération du TCL à pH 7.4 selon le modèle Korsmeyer-Peppas. Nous constatons tout d'abord que les R^2 obtenus pour les échantillons testés sont proches de 1, ce qui pourrait suggérer que ce modèle s'applique à nos échantillons, sauf pour le CHT-TCL où $R^2 = 0.80$ ce qui pourrait signifier que sans CD le mécanisme serait différent. De plus, les valeurs de n sont toutes inférieures à 0.45, ce qui indique que le mécanisme de libération suit la loi de diffusion de Fick. En effet, à pH 7.4 les taux de gonflement étaient très faibles et les nanofibres ne se dégradaient pas instantanément ce qui signifie que le mécanisme de libération dominant est la diffusion.

Tableau 23 : Paramètres de la cinétique de libération du TCL à pH 7.4 et pH 5.5 selon le modèle Korsmeyer-Peppas

pH 7.4	R ²	K	n	Mécanisme
CHT-TCL	0.80	8.5	0.28	Fickian
CHT-CD/TCL	0.99	11.66	0.27	Fickian
CHT-PCD1.75/TCL	0.98	4.9	0.42	Fickian
CHT-PCD3.5/TCL	0.87	12.3	0.2	Fickian
CHT-PCD8/TCL	0.90	5.99	0.19	Fickian
pH 5.5	R ²	K	n	Mécanisme
CHT-TCL	0.95	0.32	1.19	non Fickian
CHT-CD4/TCL	0.99	1.52	0.96	non Fickian
CHT-PCD1.75/TCL	0.99	7.24	0.41	Fickian
CHT-PCD3.5/TCL	0.90	11.25	0.22	Fickian
CHT-PCD8/TCL	0.93	7.77	0.25	Fickian

Les paramètres obtenus suite à l'application du modèle de Korsmeyer-Peppas sur les résultats de libération du TCL à pH 5.5 sont reportés dans le **Tableau 23**. Pour les deux premiers échantillons étudiés (CHT-TCL, CHT-CD4/TCL), l'exposant n est supérieur à 0.89, c'est-à-dire que le mécanisme est super Case II. Ce résultat indique que le mécanisme dominant lors du transport du principe actif est la diffusion couplée à une relaxation du polymère ou une érosion. Ce résultat est en accord avec l'étude de dégradation qui montre que ces deux membranes se dégradent complètement à pH 5.5 au bout de 24h.

En revanche, les membranes contenant le PCD ont un exposant $n < 0.45$, ce qui indique que le mécanisme dominant est la diffusion. En effet, les membranes CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL sont beaucoup plus stables à pH 5.5 que les autres membranes étudiées grâce aux interactions ioniques entre le CHT et le PCD. Par contre, l'échantillon CHT-PCD1.75/TCL, qui répond à la loi de Fick puisque $n < 0.45$, se dégrade à pH 5.5 après 24h d'immersion dans le milieu. Ce résultat est contradictoire avec les études précédentes, on peut supposer que même si les nanofibres sont dégradées, le TCL est toujours sous forme complexée dans le PCD et qu'il diffuse à travers le polymère.

II.1.8 Conclusion :

Des nanofibres ont été formées à partir de CHT et de polymère de cyclodextrine anionique complexant le TCL. Après un simple traitement thermique à 90°C, les nanofibres restent stables à pH 7.4 pendant plus de 60 jours. La formation d'un complexe de polyélectrolyte entre CHT et PCD assure une meilleure stabilité des NFs, même à pH 5.5 notamment les nanofibres obtenues à partir de solution à 8% en PCD. La quantité de PCD dans les NFs permet également de contrôler la cinétique de

libération du TCL. Plus la quantité de PCD est importante plus la libération est prolongée. Lorsque le TCL a été dispersé dans la matrice polymère ou complexé avec le monomère de CD, un *burst* important a été observé et un plateau a été rapidement atteint. Le complexe de polyélectrolyte permet donc de limiter la diffusion rapide du triclosan inclus dans le PCD en dehors des fibres.

II.2 Elaboration de nanofibres PCD-CHT en cœur-peau

Les nanofibres coaxiales ont été préparées à partir des deux polymères utilisés précédemment. Le chitosan joue le rôle de la peau de la fibre tandis que le polymère anionique de cyclodextrine (PCD) complexant le TCL est en cœur de la fibre.

Les compositions des différentes solutions ainsi que les débits utilisés pour la fabrication des nanofibres sont décrits dans le **Tableau 24** :

Tableau 24 : Composition des solutions de cœur et de peau, les débits respectifs et le diamètre moyen des nanofibres coaxiales obtenues

Nom	Solution		Solvant		Débit (mL/h)		Voltage (kV)	Distance (mm)	Diamètre moyen (nm)
	cœur	peau	cœur	peau	cœur	peau			
CP-TCL 1	PCD (8 % (w/v) PEO (2% (w/v) TCL (5 wt%)	3.5% (CHT/PEO) (80/20 w/w)	acide acétique à 50% (v/v)	acide acétique à 90% (v/v)	0.3	0.4	15	200	274 ± 57
CP-TCL 2					0.3	0.7	15	200	284 ± 48
CP-TCL 3					0.3	0.9	15	200	397 ± 31
CP-TCL 4					0.5	0.7	20	200	325 ± 91

Le choix du solvant de la solution de cœur (acide acétique à 50%) a été établi de façon à ce que le CPE ne se forme pas à la sortie de l'aiguille, ce qui provoquerait la formation d'agrégat et entraverait l'étirement du jet.

Un traitement thermique à 90°C pendant 4h a été appliqué aux nanofibres obtenues dans le but d'améliorer leur stabilité.

La composition théorique des différentes NFs coaxiales obtenues a été calculée et donnée dans le **Tableau 25**. On remarque qu'en augmentant le débit de peau, la quantité de TCL diminue. Celle-ci est donc modulée par les débits de la solution de cœur et de peau.

Tableau 25 : Composition théorique des nanofibres coaxiales obtenues en fonction du débit de peau et de cœur choisis

	Débit (mL/h)		Composition calculée des NFs (%)			
	cœur	peau	PCD	CHT	PEO	TCL
CP-TCL 1	0.3	0.4	32.12	51.43	13.74	2.71
CP-TCL 2	0.3	0.7	22.48	63	12.62	1.9
CP-TCL 3	0.3	0.9	18.74	67.5	12.18	1.58
CP-TCL 4	0.5	0.7	31.23	52.5	13.63	2.5

II.2.1 Caractérisation des nanofibres coaxiales

II.2.1.1 MEB

Les images MEB de la **Figure 100** montrent la morphologie des NFs coaxiales obtenues. Des NFs ont été formées sans présence d'agrégats ni de billes. Deux populations de fibres ont été observées ayant des diamètres très différents.

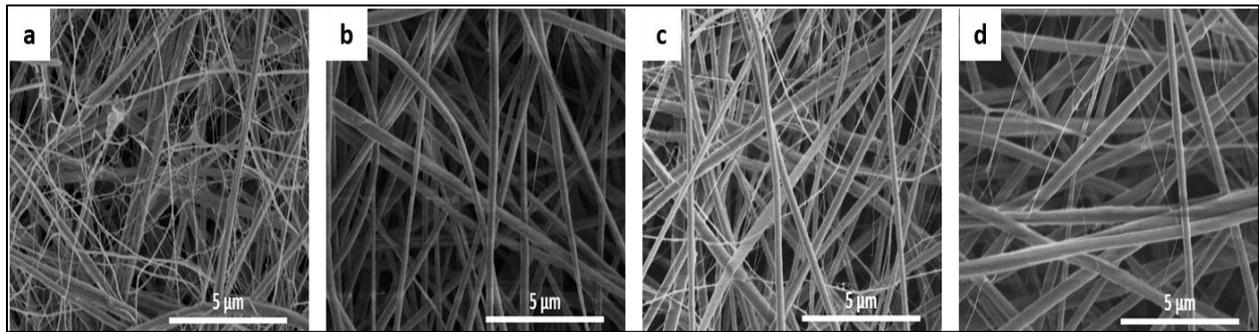


Figure 100 : Images MEB(x10k) de nanofibres coaxiales obtenues selon la formulation a-d à CP-TCL1-4

Les diamètres moyens des nanofibres obtenues sont indiqués dans le **Tableau 24**. Le diamètre des nanofibres est modulé essentiellement par le débit de cœur et/ou de peau. La valeur du diamètre moyen des nanofibres croît avec l'augmentation du débit de peau ou celui de cœur. Cette constatation révèle que l'effet du débit en électrospinning coaxial est identique à celui produit par électrospinning simple, soit une augmentation du débit conduit généralement à un plus grand diamètre de la fibre (351).

D'autre part, on remarque que dans le cas des nanofibres de CP-TCL 1 et CP-TCL4, les fibres peuvent être divisées grossièrement en deux groupes : des fibres principales avec un diamètre moyen $274 \text{ nm} \pm 57 \text{ nm}$ et des fibres secondaires très fines ($<10 \text{ nm}$). Ce résultat est probablement dû à la division du jet en plusieurs jets lors de l'électrospinning. En effet, ces nanofibres ont été élaborées à partir d'un débit de cœur et un débit de peau relativement proches et par conséquent, le volume de la solution de peau peut ne pas être suffisant pour envelopper la solution de cœur. Ainsi, une instabilité est créée à cause du fait que la solution de cœur ne soit pas électrofilable seule provoquant alors des instabilités lors de l'étirement du jet (352). Des nanofibres plus homogènes sont obtenues en augmentant l'écart entre le débit de cœur et de peau. En revanche, en augmentant le débit de cœur à 0.5 mL/h avec un débit de peau à 0.7 mL/h , le diamètre moyen des fibres diminue et la dispersion de diamètre des nanofibres augmente ($325 \pm 91 \text{ nm}$). Ce résultat trouve son explication par l'augmentation du voltage jusqu'à 20 kV . En effet, le jet s'étire plus en augmentant le voltage à cause de l'augmentation des charges à la surface des nanofibres créant ainsi des fibres plus fines.

II.2.1.2 MET

La microscopie électronique en transmission (MET) permet de différencier deux éléments se trouvant dans un même échantillon grâce à une différence de contraste. La **Figure 101** présente des clichés MET de nanofibres coaxiales.

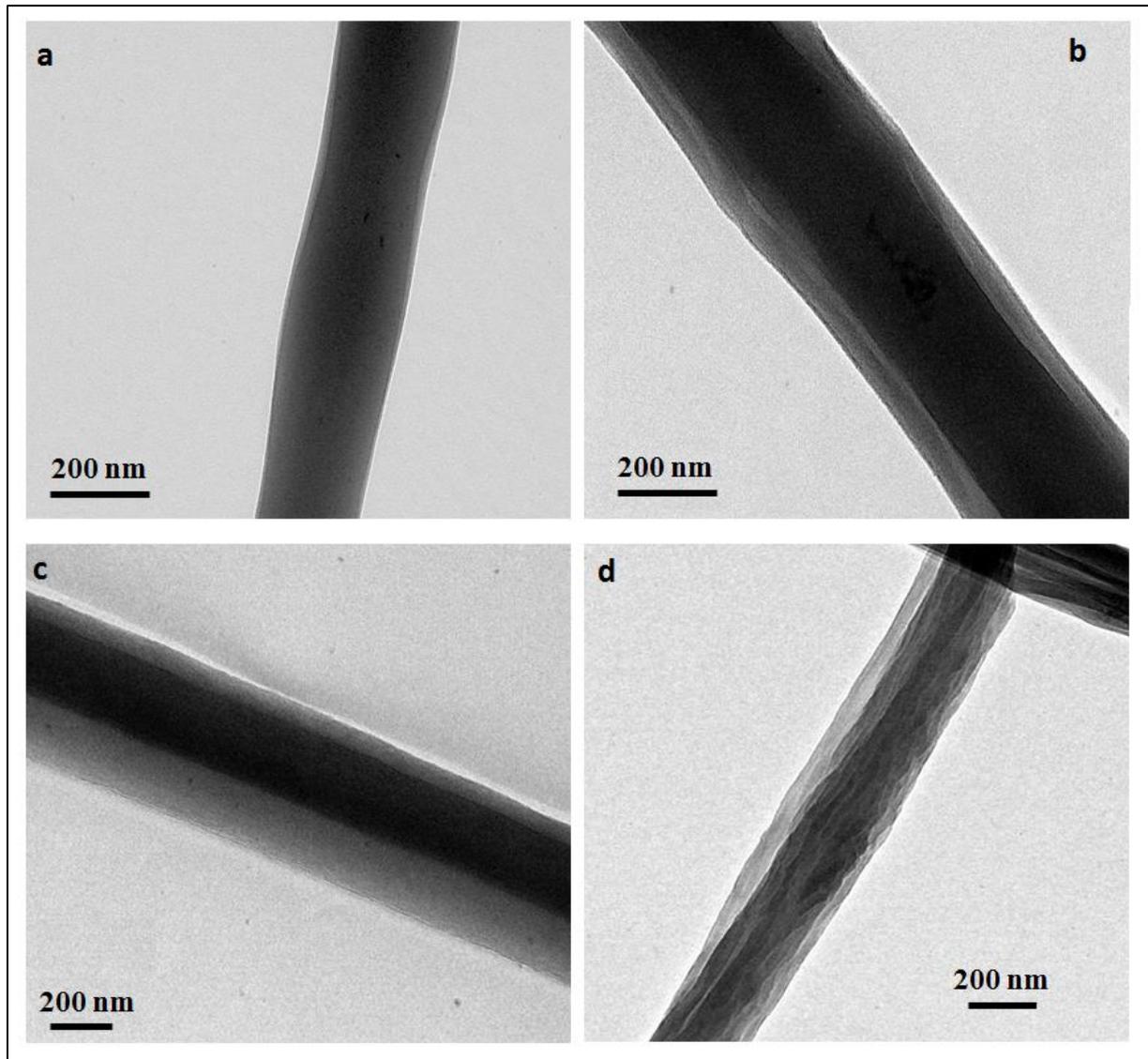


Figure 101 : Images MET de nanofibres coaxiales électrospinnées a) CP-TCL 1 b) CP-TCL 2 c) CP-TCL 3 et d) CP-TCL 4

Les zones foncées et claires représentent respectivement le cœur et la peau de la fibre. Sur certaines fibres on peut observer une concentricité plus ou moins régulière en fonction des paramètres d'électrofilage, voire par endroits l'absence de structure cœur-peau. On remarque que l'épaisseur de la peau évolue lorsque le débit de la solution de peau augmente (celui de la solution cœur étant fixe pour CP-TCL 1 à 3). Il est possible d'expliquer ces résultats par les rapports des débits peau/cœur. En effet, pour les NFs de CP-TCL1 le rapport des débits est faible (0.4/0.3), ce qui a conduit à une faible épaisseur. En augmentant le débit de peau, le rapport augmente et par conséquent une épaisseur de peau plus importante est observée. Ces résultats s'expliquent par le fait qu'en augmentant le débit

de la solution de peau, une plus grande quantité de polymère vient envelopper le polymère de cœur et par conséquent une épaisseur de peau plus grande est obtenue. Pour les NFs de CP-TCL 4, des imperfections sont observées sur les fibres qui peuvent être dûes à des instabilités créées par le voltage, qui a été augmenté à 20 kV pour permettre le départ du jet, le débit étant trop élevé. Il est important de noter que pour un échantillon donné, l'effet cœur-peau n'a pas été observé sur l'ensemble des fibres.

Le **Tableau 26** présente les valeurs des mesures du diamètre de cœur et l'épaisseur de peau relatives à chaque photo MET.

Tableau 26 : Mesures des diamètres de cœur et épaisseurs de peau associés à chaque image MET

Echantillons	Débit de la solution de cœur (ml/h)	Débit de la solution de peau (ml/h)	Diamètre cœur (nm)	Épaisseur de peau (nm)
CP-TCL 1	0.3	0.4	198	14
CP-TCL 2	0.3	0.7	194	47
CP-TCL 3	0.3	0.9	157	87
CP-TCL 4	0.5	0.7	242	48

La mesure des diamètres confirme les constatations présentées ci-dessus. Le diamètre de l'épaisseur croît avec l'augmentation du débit de la solution de peau : de 14 nm pour 0.4 mL/h à 87 nm pour 0.9mL/h. Le diamètre du cœur (qui lui est resté fixe) évolue sensiblement.

En comparant les NFs CP-TCL2 et CP-TCL-4, où le débit de cœur a été varié en fixant celui de la solution de peau, on constate que le diamètre de cœur augmente de 194 nm à 242 nm. L'épaisseur de peau reste constante car le débit de peau est resté fixe.

Il est possible que la zone d'instabilité du jet lors de l'électrofilage soit responsable de la non-régularité des nanofibres (352). Les images MET montrent que le constituant majeur de la surface des nanofibres est le CHT alors que le cœur est constitué de PCD. Les diamètres du cœur et de la peau varient d'une formulation à une autre. Lorsque le débit de cœur est fixé à 0.3mL/h et le débit de peau augmente, une légère diminution du diamètre de cœur est observée surtout lorsque le débit de cœur est augmenté jusqu'à 0.9mL/h. En revanche, l'épaisseur augmente de manière significative. En outre lorsque le débit de cœur est augmenté à 0.5 mL/h et le débit de peau est fixé à 0.9 mL/h, le diamètre de cœur augmente jusqu'à 242 nm et l'épaisseur augmente également légèrement pour atteindre 99 nm.

II.2.1.3 Spectroscopie infrarouge (IRTF)

Le spectre IR des NFs coaxiales CP-TCL 4 a été comparé à celui des NFs monolithiques CHT-PCD8/TCL (Figure 102). Les spectres des composés purs constituant les NFs ont également été présentés.

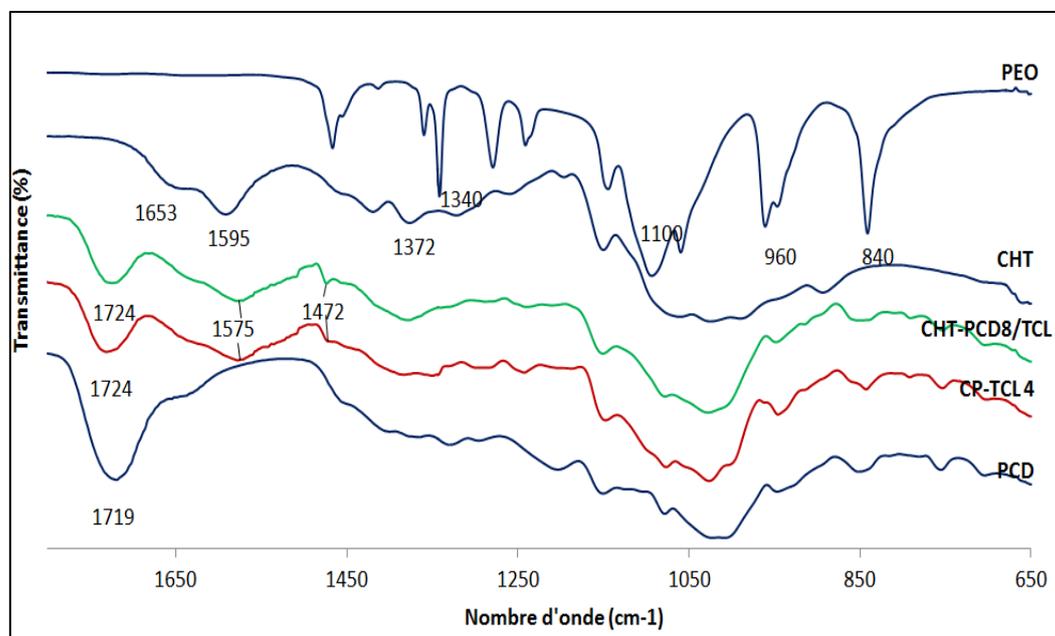


Figure 102 : Spectre IR de nanofibres coaxiales CP-TCL 4 comparé à celui des NFs monolithiques CHT-PCD/TCL, ainsi que les spectres du CHT et du PCD

Sur les spectres des NFs coaxiales, nous retrouvons les pics caractéristiques du CHT et du PCD. La bande caractéristique à 1724 cm⁻¹ qui correspond à l'élongation des COOH et des esters (COOR) est décalée par rapport à celle observée sur le spectre du PCD. De même, la bande d'absorption apparente sur le spectre du CHT à 1595 cm⁻¹ et qui correspondent à la déformation N-H des groupements amine -NH₂ est devenue plus large et s'est décalée à un plus faible nombre d'onde (1575 cm⁻¹). La bande observée à 1653 cm⁻¹ sur le spectre du CHT et qui correspond aux groupements C=O du CHT se décale vers 1640 cm⁻¹ et devient moins intense. Les modifications observées sur le spectre des NFs coaxiales sont similaires à celles observées sur celui des NFs monolithiques de CHT-PCD8/TCL, celles qui ont montré une forte interaction ionique entre le CHT et le PCD. Ceci pourrait suggérer qu'un CPE s'est aussi formé dans le cas des NFs coaxiales. En effet, bien que les deux polymères ne soient pas mélangés durant le procédé d'électrospinning coaxial entre deux polyélectrolytes de charges opposées, un complexe pourrait se former à l'interface du cœur et de la peau.

II.2.2 Eude du comportement en milieu aqueux

Comme pour les NFs monolithiques (CHT-PCD/CTL), pour stabiliser les nanofibres coaxiales un traitement thermique à 90°C pendant 4h a été effectué. Leur dégradation dans le PBS à pH 7.4 au cours du temps a été étudiée. Le suivi de dégradation est présenté dans la **Figure 103**.

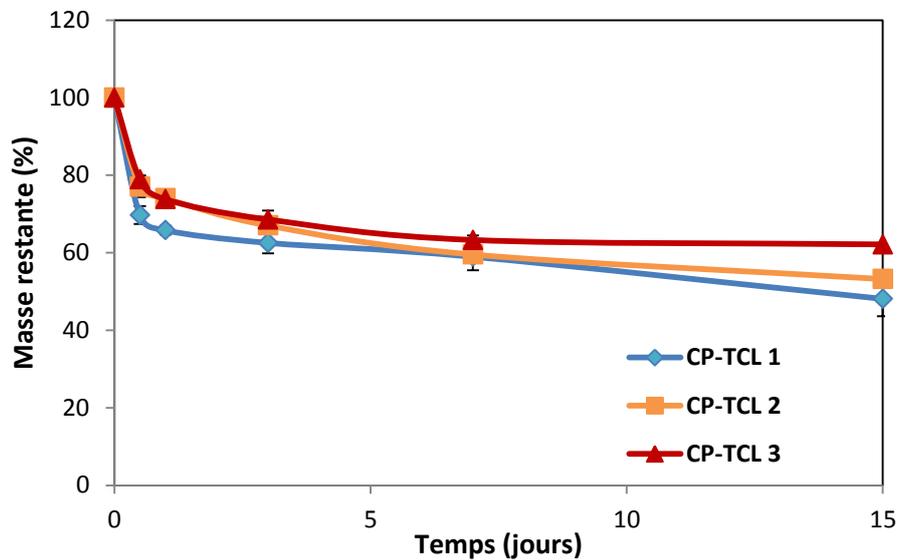


Figure 103 : Suivi de dégradation dans du PBS à pH 7.4 de nanofibres coaxiales contenant du TCL sur une durée de 15 jours

La perte de masse après 1 jour est d'environ 34%, 26% et 27% respectivement pour les membranes CP-TCL 1, CP-TCL 2 et CP-TCL 3. Cette perte de masse peut être associée à la dissolution du PEO qui représente environ 12% de la masse totale des nanofibres. On peut faire l'hypothèse qu'une partie non négligeable du PCD a pu également diffuser à travers la peau de CHT, voire même par les défauts de nanofibres où il n'y aurait pas de peau.

II.2.3 Etude de Libération du TCL en mode batch

Au cours de cette étude, la libération du TCL à partir de nanofibres coaxiales a été étudiée à pH 7.4 en mode statique pendant 12 jours. Les profils de libération obtenus ont été comparés à ceux des nanofibres monolithiques CHT-PCD8/TCL et CHT/TCL. Les profils de libération sont donnés dans la **Figure 104**.

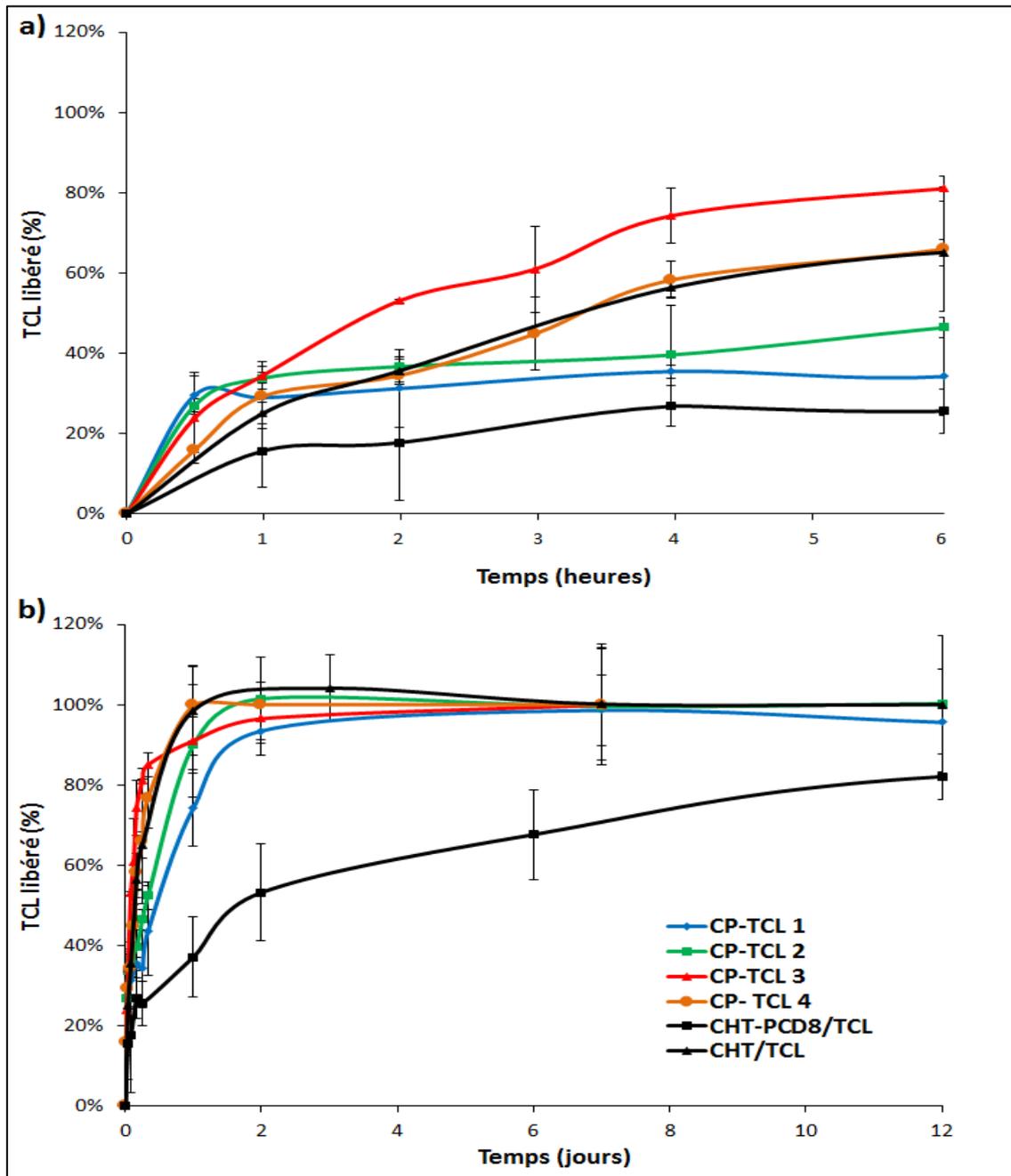


Figure 104 : Profils de libération du TCL dans le PBS à pH 7.4 à 37°C à partir des nanofibres coaxiales et de nanofibres monolithiques CHT-PCD8/TCL sur une durée de a) 12 jour et b) agrandissement sur une durée de 9 heures.

Au cours des premières heures de libération (**Figure 104.a**), un effet *burst* important est observé pour les échantillons CP-TCL 3 et CP-TCL 4 avec des valeurs respectives de 74% et 58 % (4 heures). Ces NFs coaxiales ont un profil similaire à celui des NFs monolithiques de CHT/TCL qui ont montré une libération rapide. Un effet *burst* réduit a été observé avec les nanofibres de CP-TCL 1 et 2 où 35 et 40 % sont libérés au bout de 4 heures. La cinétique de libération du TCL à partir des nanofibres coaxiales montre que plus on augmente le débit total (peau + cœur), plus l'effet *burst* est important. Ce résultat peut être expliqué par le fait que plus le débit de peau est élevé, plus la peau présente une épaisseur irrégulière (comme ceci a été observé au MET) et plus la libération est rapide.

Par ailleurs, en comparant la libération du TCL à partir des nanofibres coaxiales et des nanofibres monolithiques de CHT-PCD8/TCL, on observe que l'effet *burst* est réduit et la libération est prolongée jusqu'à plus de 12 jours (25 jours plus exactement, points non représentés). Ceci est probablement dû au fait que lorsque les deux polymères sont mélangés, les interactions entre le CHT et le PCD sont plus denses. En revanche, dans le cas des nanofibres coaxiales le complexe se forme seulement à l'interface entre les deux polymères, ce qui semble ne pas être suffisant pour maintenir la stabilité des nanofibres pendant une durée prolongée. Par conséquent, la structure des nanofibres se fragilise et le principe actif est libéré de manière plus rapide en diffusant en même temps que le PCD.

Après l'effet *burst*, le principe actif est libéré progressivement jusqu'à atteindre un plateau à 93%, 100%, 96.5 % et 100% respectivement pour les nanofibres de CP-TCL 1 à 4. Durant cette phase, le principe actif est libéré par diffusion du complexe PCD/TCL et par le phénomène d'érosion des NFs.

II.2.4 Modèle cinétique

L'étude du mécanisme de la cinétique de libération en appliquant la loi de Korsmeyer-Peppas est présentée dans le **Tableau 27**. L'étude montre que le TCL libéré à partir des nanofibres coaxiales par diffusion suit la loi de Fick sauf pour l'échantillon CP-TCL 4 où un phénomène de gonflement et/ou de dégradation a lieu en même temps que la diffusion. Cette diffusion à travers la matrice polymère a lieu par simple diffusion du TCL à travers le polymère de peau, par diffusion à travers le cœur suite à la dégradation du polymère de peau ou par l'absence de peau dans les défauts des nanofibres coaxiales.

Tableau 27 : Paramètres de la cinétique de libération du TCL à pH 7.4 selon le modèle Korsmeyer-Peppas

	R ²	n	k	mécanisme
CP-TCL 1	0.77	0.089	0.4	Fickian
CP-TCL 2	0.95	0.21	0.63	Fickian
CP-TCL 3	0.92	0.35	1.41	Fickian
CP-TCL 4	0.97	0.54	1.15	Non Fickian

II.2.5 Conclusion

L'élaboration de nanofibres coaxiales constituées d'un cœur en polymère de cyclodextrines complexant le TCL et d'une peau en chitosan a été réalisée. Les observations au MEB ont démontré que les nanofibres obtenues étaient homogènes et continues. La structure cœur-peau a pu être observée mais malheureusement celle-ci n'est pas régulière y compris et surtout lorsque le débit de peau était important. Ceci est provoqué par les instabilités subies par le jet. Un simple traitement thermique a permis de stabiliser les NFs dans un milieu à pH7.4. La libération du TCL à partir de ces nanofibres est prolongée, avec un effet *burst* réduit lorsque le débit de peau est le moins élevé. En augmentant l'épaisseur de la peau, le TCL devrait diffuser de façon plus prolongée à travers la peau, mais dans notre cas c'est l'inverse qui se passe. Ceci est probablement dû au fait que l'effet cœur-peau n'est pas régulier lorsque le débit de la solution de peau est élevé et que des NFs non concentriques se forment. Les NFs monolithiques permettent une libération plus prolongée que les NFs coaxiales, car un CPE plus dense est formé dans le cas d'un mélange entre le CHT et le PCD.

III. Etude microbiologique

L'activité antibactérienne des membranes nanofibreuses (CHT-TCL, CHT-CD4/TCL, CHT-PCD1.75/TCL, CHT-PCD3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL, CP-TCL 1 et CP-TCL 2) ainsi que des nanofibres sans TCL de CHT-PEO, CHT-CD4 et CHT-PCD8 employées comme témoin a été évaluée par le test de Kirby-Bauer sur *S. aureus* et *E. coli* par analyse du milieu de libération.

Pour cela, nous avons suivi la libération du TCL dans le PBS à pH 7.4 à différents temps sur une période de 15 jours. Après chaque temps, le milieu est extrait puis 50 µl sont déposés dans un puits creusé sur une gélose Agarensemencée de la suspension bactérienne. La présence d'une zone d'inhibition autour du puits renseigne sur la présence d'une activité antibactérienne.

La **Figure 105** présente l'évolution de l'activité antibactérienne contre les deux bactéries en fonction du temps. Les échantillons de nanofibres ne contenant pas de TCL n'ont montré aucune activité contre les deux souches et ne sont pas représentés.

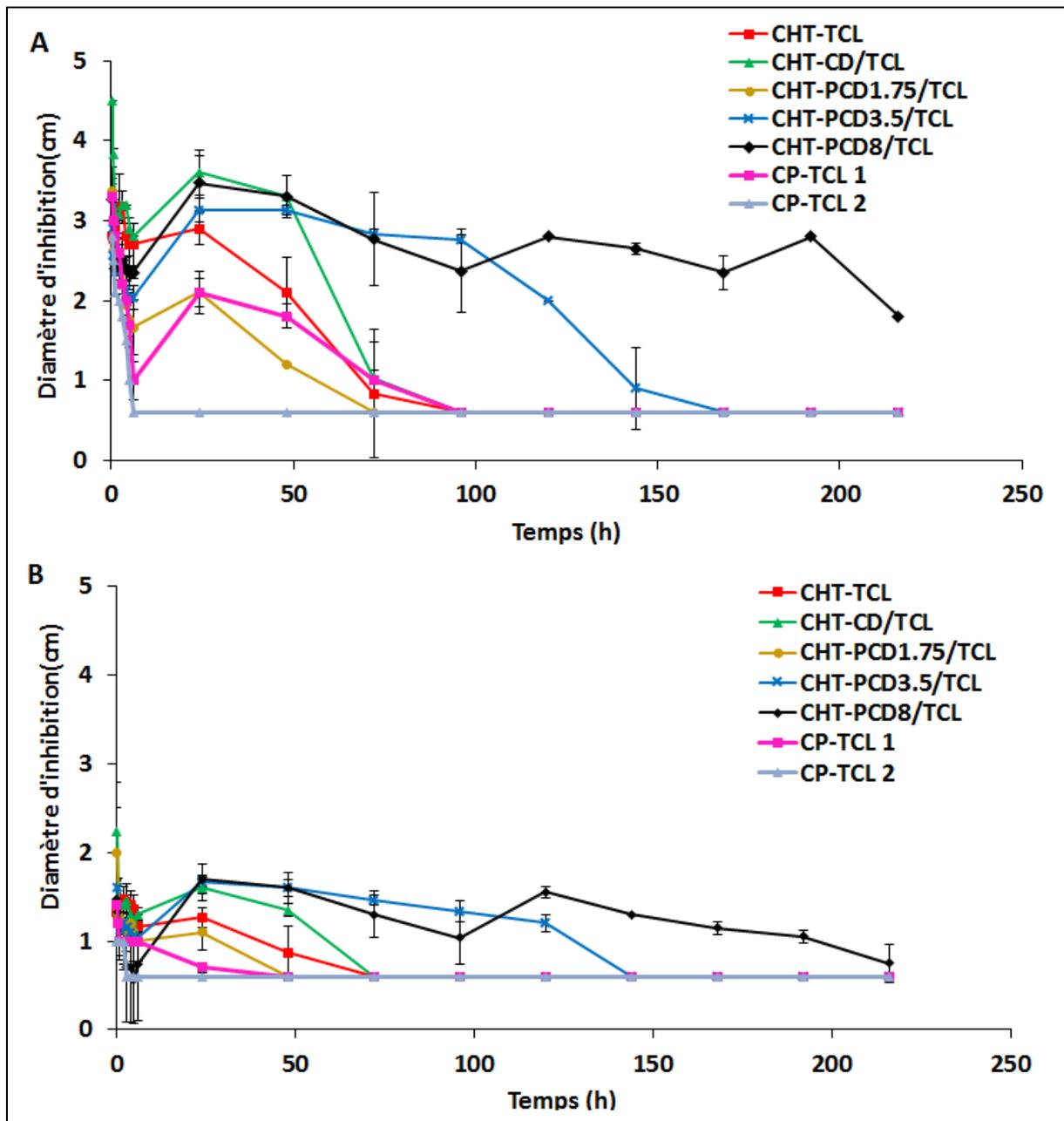


Figure 105 : Activité antibactérienne vis-à-vis de a) *S.aureus* et b) *E.coli* sur du milieu de libération des NFs nanofibres chargées en TCL et contenant ou non du PCD

Les nanofibres chargées en TCL montrent une inhibition de croissance des deux souches. Compte tenu des valeurs de la zone d'inhibition mesurées, nous constatons que la souche *S. aureus* (Gram positif) est plus sensible que la souche *E.coli* (Gram négatif) en présence de TCL (comme montré dans le chapitre précédent).

L'activité antibactérienne est importante durant les premières 24 heures avec une efficacité inégale entre les échantillons étudiés. En effet, la zone d'inhibition la plus élevée a été observée dans le cas de nanofibres CHT-CD4/TCL, qui pourrait être due à la libération rapide du complexe d'inclusion

TCL/CD à partir de l'échantillon testé. Ceci est en accord avec les résultats de libération qui ont démontré un effet *burst* important pendant les premières 24h.

Les nanofibres contenant du PCD ont démontré une activité antibactérienne plus prolongée dans le temps, surtout pour les échantillons qui contiennent 3.5% et 8% de PCD. En effet cette activité a été prolongée jusqu'à 144 heures (6 jours) et 216 h (9 jours) pour les échantillons CHT-PCD 3.5/TCL et CHT-PCD8/TCL respectivement, alors que les échantillons contenant une faible quantité de PCD (CHT-PCD1.75/TCL) ont une activité moins prolongée (48 heures pour le *S.aureus* et 24h pour le *E.coli*), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de la cinétique de libération. Les nanofibres obtenues par électrospinning coaxial ont montré une activité réduite par rapport aux nanofibres monolithiques obtenues par mélange de CHT et de PCD ou de CD. Néanmoins, il faut noter que la quantité de TCL dans les deux systèmes n'est pas équivalente. En effet, 5% de TCL sont présents dans les nanofibres avec le mélange alors que 2.7 % et 1.9% sont présents respectivement dans les nanofibres coaxiales CP-TCL 1 et CP-TCL 2. De plus, les nanofibres coaxiales ont montré une libération plus rapide que les nanofibres monolithiques, ce qui expliquerait aussi l'activité limitée dans le temps de ces nanofibres en cœur-peau. Avec des séjours prolongés dans le PBS, l'absence d'une activité antibactérienne (absence de rayon d'inhibition) est liée à une concentration en triclosan trop faible dans le milieu et donc inférieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

IV. Evaluation de la cytocompatibilité des membranes électrospinnées

La cytocompatibilité des NFs monolithiques a été étudiée sur ostéoblastes MCTC313 via deux tests complémentaires : i) par le test d'extraction, afin d'évaluer la présence dans le milieu d'extraction de produits cytotoxiques et ii) par contact direct en ensemençant les cellules directement sur les NFs, afin d'évaluer leur capacité pour la prolifération cellulaire (ISO 10993-5). Pour ce faire, chaque échantillon stérile a été placé dans du MEM pendant 24h, puis le milieu a été extrait et déposé sur une culture cellulaireensemencée 24 heures auparavant (Test d'extraction). Les échantillons ont été utilisés pour le test par contact direct sur lesquels la suspension cellulaire a directement étéensemencée (test contact direct).

IV.1 Cytotoxicité des NFs par la méthode d'extraction

La cytotoxicité des différentes nanofibres élaborées (CHT/PEO, CHT-CD4, CHT-PCD 1.75, 3.5 et 8) a été étudiée dans un premier temps par la méthode du Bleu Alamar. La **Figure 106** présente la viabilité des ostéoblastes obtenus. Les nanofibres de CHT-PEO et de CHT-PCD1.75 présentent une viabilité cellulaire excellente avec respectivement 100% et 104% de survie, en les comparant au témoin (TCPS). L'ajout de CD ou de PCD à faible concentration (1.75%) n'impacte pas de manière

significative la viabilité des cellules avec des taux de survie de 95% et 96% respectivement. De plus, l'analyse statistique n'a pas révélé de différence significative entre ces groupes et le témoin ($p > 0.01$).

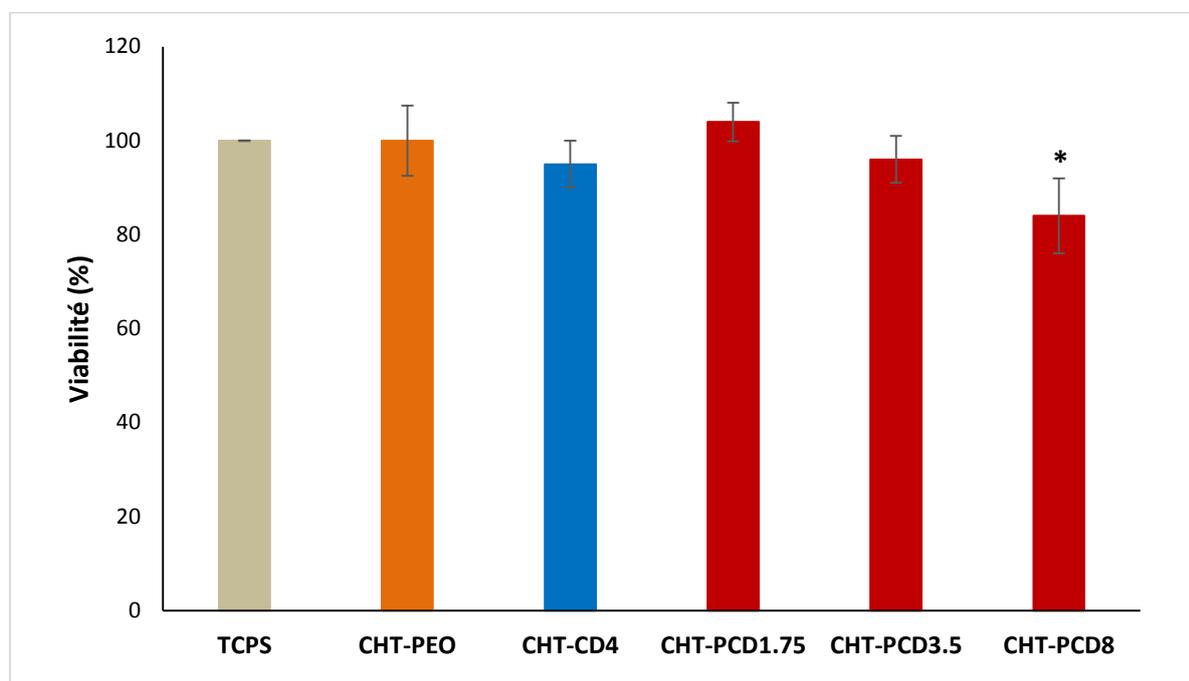


Figure 106 : Viabilité cellulaire sur des nanofibres monolithiques ne contenant pas de principe actif après 24h d'incubation déterminée par méthode d'extraction ($n=6$). Le témoin est le fond de la boîte de culture : TCPS (Tissu Culture Polystyrene). Significace statistique : ns : non significatif, * $p < 0.01$

En revanche, une diminution progressive de la viabilité cellulaire est observée lorsque les nanofibres CHT-PCD contiennent de plus en plus de PCD. En effet la viabilité cellulaire décroît de 104% (CHT-PCD1.75) à 84% (CHT-PCD8) avec une différence significative par rapport au témoin ($p < 0.01$). Cette diminution de la viabilité cellulaire peut provenir de la quantité de PCD libérée qui est peut-être élevée dans le milieu d'extraction.

Cependant, nous avons prouvé dans une précédente étude que le PCD non neutralisé (comme c'est le cas pour la fabrication des NFs) induit un effet cytotoxique lorsque sa concentration est supérieure à 0.4 mg.mL^{-1} (353). En se référant aux résultats de dégradation (cf **Figure 97**) et au **Tableau 22**, et connaissant la masse initiale des échantillons découpés sous forme de disques utilisés pour cette étude, nous avons évalué la concentration du PCD dans le milieu après 24h d'incubation qui était d'environ 0.6 mg.mL^{-1} et 1.92 mg.mL^{-1} respectivement pour les échantillons CHT-PCD3.5 et CHT-PCD8. Ces concentrations sont en effet supérieures à 0.4 mg.mL^{-1} , c'est ce qui expliquerait alors la baisse de viabilité cellulaire avec ces deux échantillons qui reste cependant acceptable au regard de la norme. Blanchemain *et al.* ont démontré qu'il était possible d'améliorer la cytotoxicité en neutralisant le PCD; la limite toxique du PCD était alors augmentée à 2.6 mg.mL^{-1} (353).

En résumé, le test d'extraction montre que les NFs testées ne sont pas cytotoxiques, seul un excès de PCD libéré réduit la viabilité cellulaire par un abaissement de pH comme cela a été montré par Blanchemain *et al.* (353).

IV.2 Cytocompatibilité par contact direct

Le cytocompatibilité des NFs a été évaluée par un test contact direct par la méthode du bleu d'Alamar après 3 et 6 jours de prolifération.

Les résultats présentés dans la **Figure 107** ont été obtenus selon la norme ISO 10993-5. On considère que des échantillons sont cytocompatibles lorsque la viabilité est supérieure à 70%.

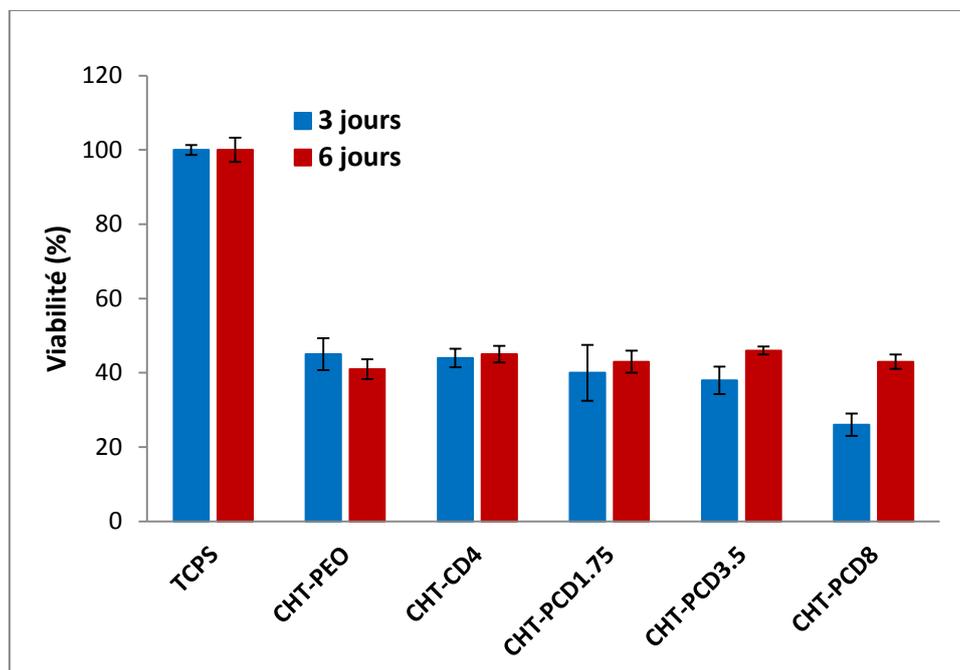


Figure 107 : Viabilité des ostéoblastes en contact direct avec des échantillons de NFs monolithiques ne contenant pas de TCL

Les résultats montrent que quelque soit les NFs testées, la cytocompatibilité reste faible et ce dès le 3ème jour de l'expérience (<40%). La viabilité cellulaire reste identique au 6ème jour sans toutefois dépasser les 40%. Il faut toutefois noter que l'augmentation de la concentration de PCD semble avoir un impact sur la viabilité cellulaire notamment après 3 jours où une diminution est observée avec les NFs CHTPCD8 comparé aux NFs CHT-PCD1.75. Cette tendance n'est plus observée au 6ème jour. Néanmoins, la cytocompatibilité relativement faible ne semble pas être liée à la présence de CDs ou PCD car la viabilité reste la même sur tous les échantillons y compris le témoin (CHT-PEO).

Cette faible cytocompatibilité des NFs peut être expliquée par la présence de traces d'acide acétique malgré le pré-conditionnement des NFs sous vide à 25°C puis dans le milieu MEM (24 heures). Une neutralisation et un rinçage avec le milieu MEM sont donc envisageables.

Chapitre 3 : Sulfonation du Chitosan pour l'électrofilage de nanofibres à propriétés antithrombotiques

Après avoir développé des NFs à base de CHT à activité antibactérienne, nous nous sommes consacrés à l'élaboration de NFs à activité antithrombotique, autre propriété d'intérêt dans le domaine des biomatériaux implantables.

Dans cette étude, nous allons modifier le CHT par des groupements sulfonates. Grâce à cette modification celui-ci aura une structure chimique semblable à celle des glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) qui sont des polymères naturellement présents dans la matrice extracellulaire (MEC).

Tout d'abord, les paramètres de synthèse seront étudiés et les polymères obtenus seront caractérisés à l'aide de différentes techniques de caractérisations.

Ensuite, nous procéderons à l'électrofilage du chitosan sulfonique. Et enfin, l'activité antithrombotique ainsi que la cytocompatibilité de notre polymère sous forme de poudre et nanofibres seront évaluées.

I. Synthèse et caractérisations de chitosans sulfoniques :

La modification chimique du chitosan consiste à greffer des groupements benzyliques sulfonés sur ses unités glucosamines. Pour cela, le chitosan a réagi avec le sel de sodium de l'acide 2-formylbenzène sulfonique (BZ1S) ou le sel de disodium de l'acide 4-formyl-1,3-benzène disulfonique (BZ2S) en présence de NaCNBH_3 dans le but d'obtenir un N-benzyl chitosan mono et disulfoné (CHT1S et CHT2S) (cf. **Figure 108**). Différents chitosans mono et di-sulfoné ont été synthétisés en faisant varier le rapport molaire initial (R) entre les deux composés aldéhydiques sulfonés (BZ1S et BZ2S) et les unités de répétition glucosamines présentes dans le CHT (R= 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25) ceci de manière à obtenir deux séries de chitosan avec des degrés de substitutions variables.

Les masses utilisées et les rendements obtenus sont indiqués dans le **Tableau 28**.

Tableau 28 : Valeurs des masses utilisées dans le mélange réactionnel et les masses des polymères finaux

Rapport molaire R	masse CHT (g)	masse BZ1S (g)	masse BZ2S (g)	NaBH3CN (g)	Masse CHT1S (g)	Masse CHT2S (g)
2	5	8,34	11,66	3	7,3207	7,099
1,5	5	7,40	11,03	3	7,906	7,133
1	5	4,17	5,83	3	6,7495	7
0,75	5	3,70	5,51	3	6,29	6,06
0,5	5	2,09	2,92	3	5,9178	6,4108
0,25	5	1,04	1,46	3	5,8546	5,6
0,15	5	0,63	0,87	3		5,124

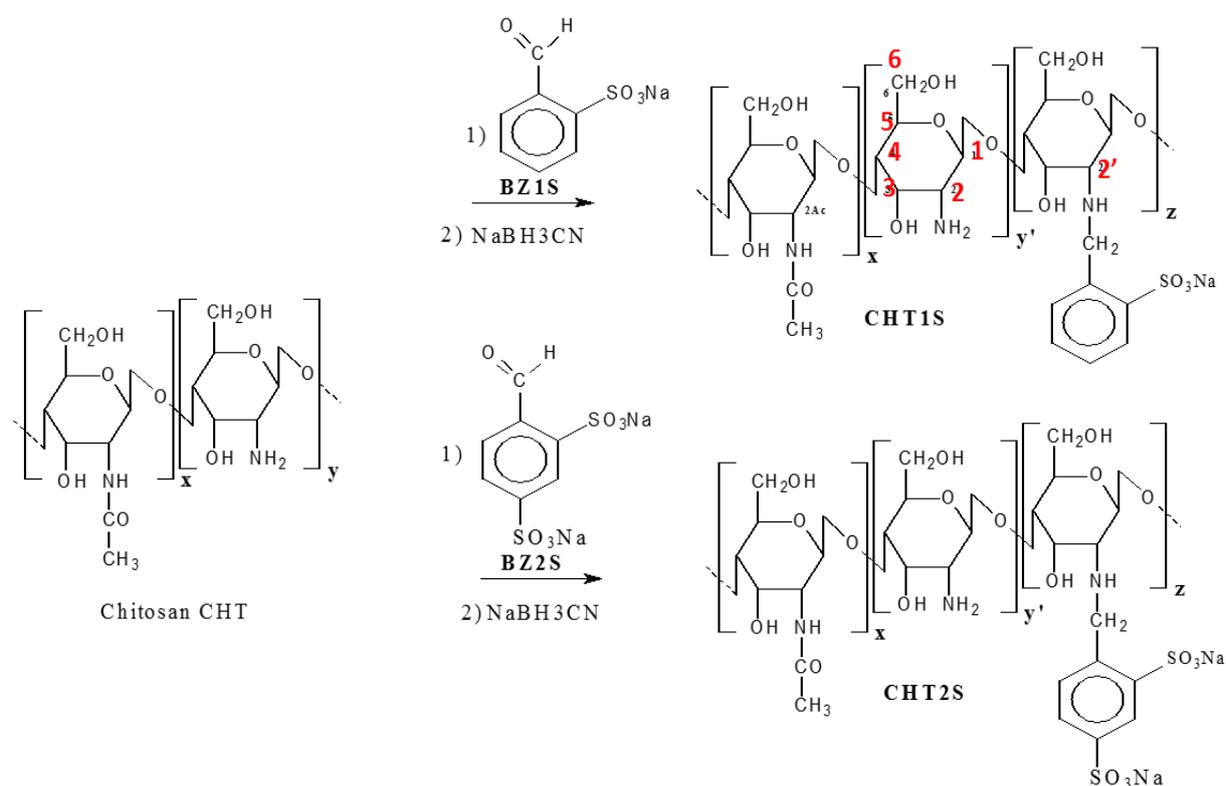


Figure 108 : Schéma réactionnel de l'amination réductive

1.1 Résonance magnétique nucléaire

Les analyses avancées de RMN du proton et du carbone des composés CHT1S et CHT2S obtenus à partir d'un rapport R = 4, rapporté dans une précédente étude, ont permis d'identifier chaque signal observé sur les spectres et de les attribuer aux protons présents dans la structure du CHT modifié (242,317). Il a été démontré également que le degré de substitution (DS) du chitosane pour la série

CHT1S et CHT2S pouvait être déterminé à partir du rapport des intégrations des signaux des protons aromatiques situés entre 7 et 8.5 ppm, d'une part, par rapport à ceux des protons situés sur la position 2 des unités anhydroglucosamine à savoir H2 et H'2 à 2.5 ppm environs (242). Les spectres RMN des deux dérivés sulfonés CHT2S2 et CHT1S2 et du CHT non modifié sont présentés sur **Figure 109**. Les spectres des autres rapports R sont donnés en **Annexe 9**.

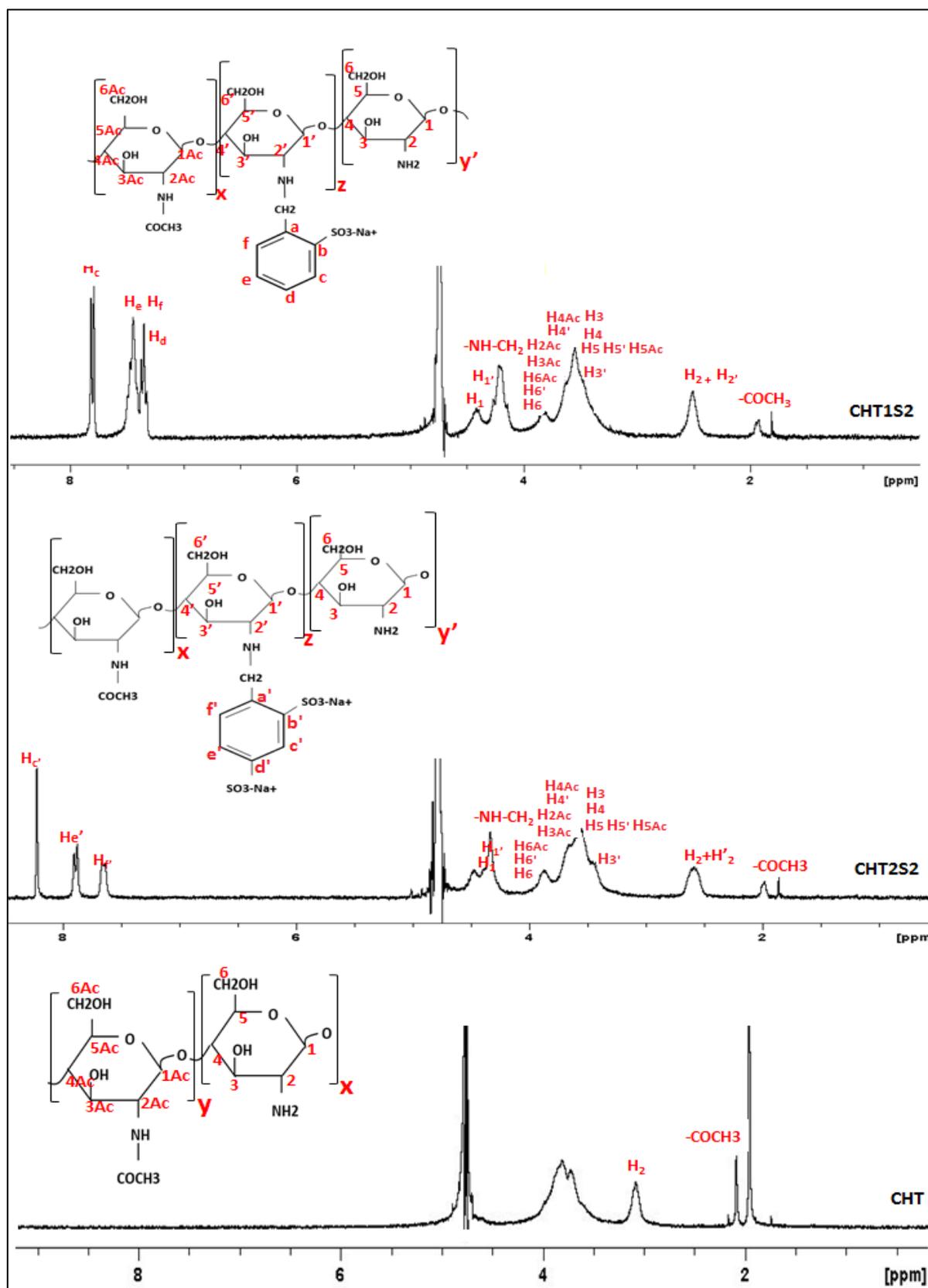


Figure 109 : Spectres RMN du CHT1S2, CHT2S2 et CHT

La présence de signaux aromatiques situés entre 7 et 8.5 ppm confirme le greffage des groupements sulfonates sur les chaînes du CHT. Les DS des différents CHT sulfonés obtenus à partir de différents

rapports molaires ont ensuite été calculés. Les valeurs d'intégrations ainsi que les DS sont donnés dans le **Tableau 29**. A partir de ce tableau, les valeurs obtenues ont été tracées en fonction de R et les courbes de tendances sont données sur la **Figure 110**. On constate que pour $0.15 \leq R < 1$, le DS augmente et atteint un plateau pour $R > 1$. Les valeurs du plateau sont de 0.69 et 0.41 pour les séries CHT1S et CHT2S. Ceci signifie qu'un maximum de substitution est atteint à $R=1$ pour le CHT1S et le CHT2S.

Tableau 29 : Valeurs des intégrales des signaux aromatiques et des protons situés sur la position 2 des unités anhydroglucosamine H₂ et H'₂ et les valeurs de DS calculés à partir de ces intégrales

R	CHT1S			CHT2S		
	Aire H _{aromatiques}	Aire H ₂ et H' ₂	DS	Aire H _{aromatiques}	Aire H ₂ et H' ₂	DS
0.25	1	1.880	0.11	1	2.476	0.14
0.5		0.588	0.34		1.025	0.26
0.75		0.322	0.57		0.692	0.39
1		0.350	0.62		0.693	0.39
1.5		0.309	0.65		0.689	0.39
2		0.293	0.69		0.648	0.41

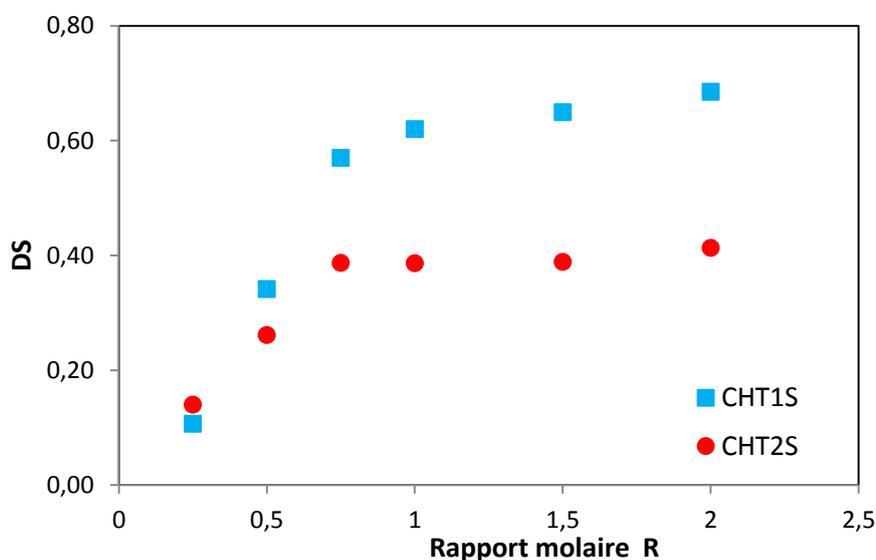


Figure 110 : DS du CHT1S et CHT2S en fonction du rapport molaire R entre BZ1S et BZ2S et les groupements amines du CHT dans le mélange réactionnel mesuré par RMN dans NaOD 0.01M.

1.2 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire a permis de déterminer les proportions massiques atomiques de chaque polymère en éléments C, H, N, et S rapportées dans le **Tableau 30**. Les résultats montrent que la teneur en soufre des dérivés sulfonés du CHT augmente avec l'augmentation des rapports molaires R appliqués dans la synthèse des séries CHT1S et CHT2S.

Tableau 30: Proportions atomiques (C, H, N et S) du CHT et des deux séries de CHT1S et CHT2S déterminées par analyse élémentaire, degré de substitution et teneur en SO_3^- exprimé en mmol/g calculé par analyse élémentaire

	R	C %	H %	N %	S %	DS*	SO_3^- (mmol/g) % S
CHT	0	39.93	7.18	7.44	-	0	0
CHT1S0.25	0.25	39.13	6.50	6.59	2.69	0.16	0.84
CHT1S0.5	0.5	40.61	6.73	5.57	4.88	0.35	1.52
CHT1S0.75	0.75	41.82	6.14	4.61	6.33	0.51	1.98
CHT1S1	1	42.18	6.18	4.16	6.94	0.58	2.17
CHT1S1.5	1.5	41.74	6.07	3.95	7.13	0.60	2.23
CHT1S2	2	42.61	6.18	4.07	7.32	0.63	2.29
CHT2S0.15	0.15	37.84	7.14	6.79	2.69	0.08	0.77
CHT2S0.25	0.25	36.62	6.81	5.2	4.61	0.15	1.44
CHT2S0.5	0.5	36.12	6.10	4.73	7.35	0.29	2.3
CHT2S0.75	0.75	36.28	5.99	4.15	8.50	0.37	2.66
CHT2S1	1	34.89	5.80	3.93	8.64	0.38	2.70
CHT2S1.5	1.5	34.41	5.67	4.08	8.94	0.40	2.79
CHT2S2	2	34.55	5.67	3.73	9.14	0.41	2.85

*Calculés à partir des équations 1 et 2 définies dans la partie 2 matériels et méthodes

** Calculé par intégration des $^1\text{HRMN}$

La **Figure 111** montre que le DS calculé à partir de la composition des polymères en soufre et des équations (1) et (2) (voir partie Matériels et Méthodes) augmente progressivement jusqu'à R=1 puis un plateau est observé lorsque R > 1 d'une valeur de 0.63 et 0.41 pour respectivement le CHT1S et le CHT2S. Ceci est donc en corrélation avec l'étude RMN précédente.

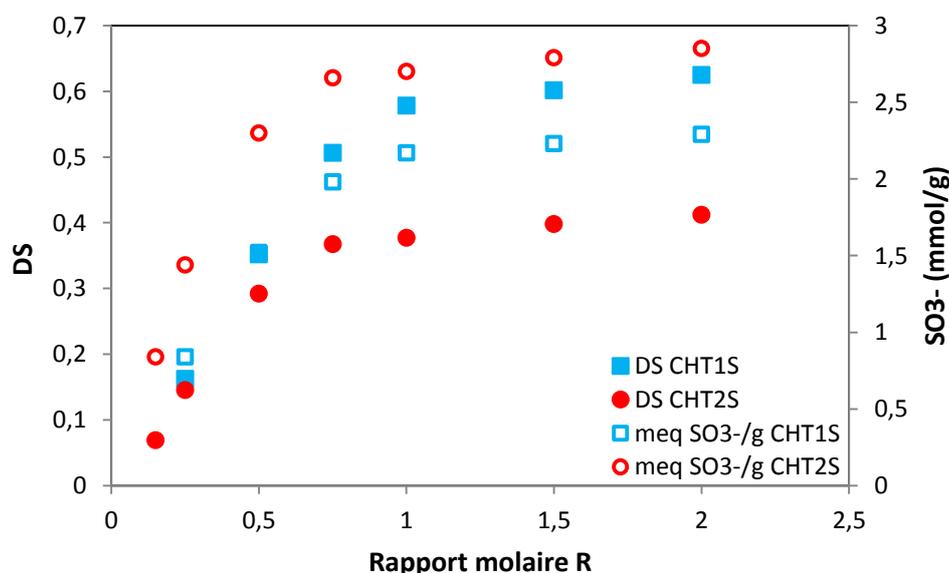


Figure 111 : Degrés de substitution des polymères sulfonés et leur teneur en SO_3^- en fonction du rapport molaire R

En parallèle, la valeur maximale des groupements sulfonates calculés à partir de la teneur en soufre atteint 2.3 et 2.85 mmol/g respectivement pour le CHT1S et le CHT2S. Ainsi, bien qu'une réaction

moins complète a eu lieu lors de l'utilisation du BZ2S, le CHT2S contient plus de groupements sulfonates que le CHT1S et ce en raison de la présence de deux groupements sulfonates dans le BZ2S.

Ces résultats mettent en évidence i) que la composition de deux séries de dérivés du CHT peut être contrôlée par le rapport R ii) Toutefois, un maximum de substitution est atteint à $R=1$ pour le CHT1S et le CHT2S iii) Compte tenu du DD initial du CHT (80.3%), lorsque $R>1$, le nombre d'unités glucosamines diminue jusqu'à environ 20% et 40% dans le cas des séries CHT1S et CHT2S, respectivement. La RMN et l'analyse élémentaire ont donc permis l'analyse quantitative des polymères modifiés. Les méthodes d'analyses suivantes seront semi-quantitatives, voir uniquement qualitatives.

I.3 Spectroscopie infra-rouge

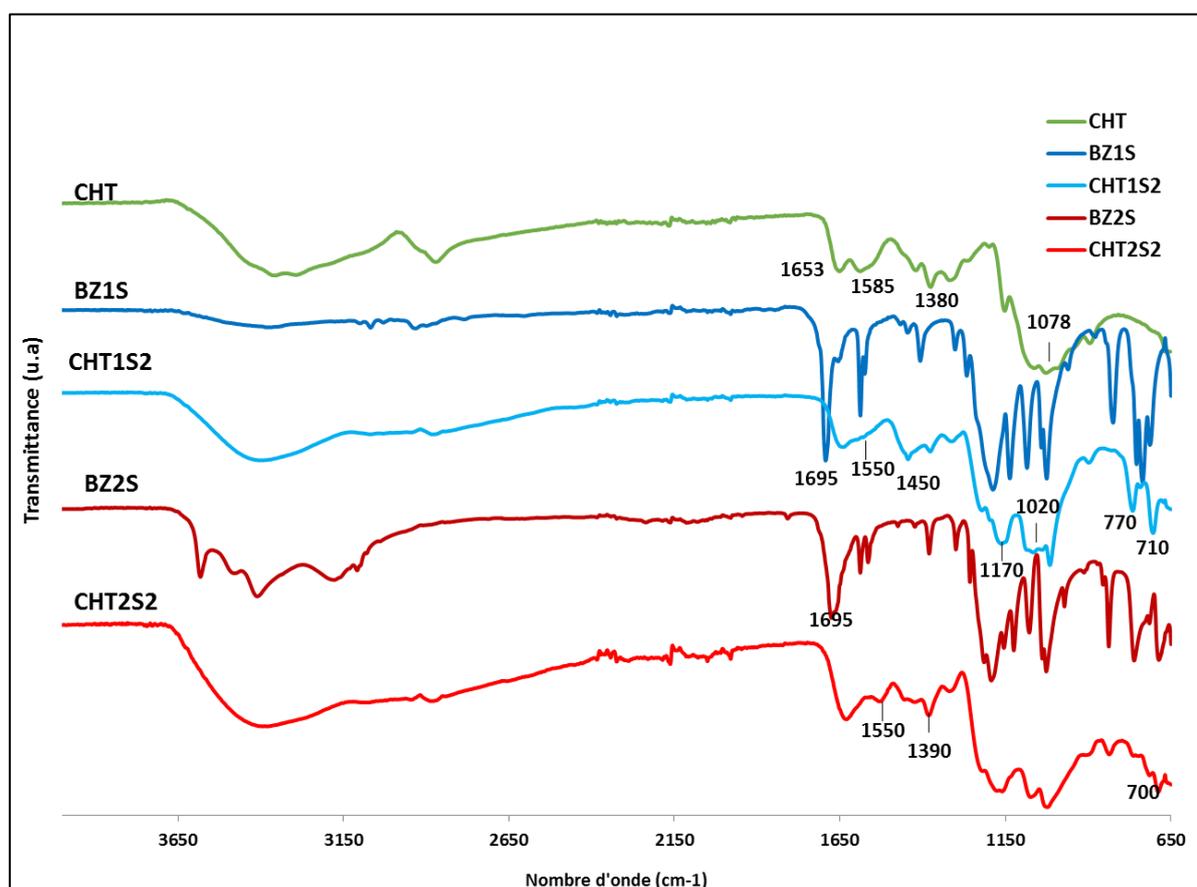


Figure 112 : Spectres IR des chitosan mono et di-sulfoné à un rapport molaire $R=2$, BZ1S, BZ2S et le chitosan

Les spectres dans la **Figure 112** correspondent aux chitosans, CHT2S2, CHT1S2 ainsi que les deux aldéhydes substituées par les groupes phényl-sulfoniques BZ1S et BZ2S.

Les bandes caractéristiques du chitosan, notamment à 1653 cm^{-1} et à 1585 cm^{-1} correspondent respectivement à l'élongation de la fonction amide $C=O$ et à déformation $N-H$ des amines primaires.

La bande à 1380 cm^{-1} est associée à la liaison C-H dans le méthyle du groupement acétamide, et la bande à 1078 cm^{-1} correspond à l'élongation des polysaccharides C-O-C.

En comparant les spectres du chitosan sulfonés par rapport au spectre du chitosan non modifié, on constate que le pic à 1585 cm^{-1} s'est décalé vers des nombres d'onde inférieurs à 1550 cm^{-1} . Ceci confirme la réaction d'amination réductrice entre les groupements amines du chitosan et l'aldéhyde (BZ1S ou BZ2S) formant ainsi une amine secondaire après la réduction de la base de Schiff avec l'ajout du NaBH_3CN . De plus, les pics à 1695 cm^{-1} observés sur les spectres du BZ1S et BZ2S correspondant aux groupements aldéhydes, disparaissent sur les spectres des CHT1S ET CHT2S ce qui signifie que la réaction entre les aldéhydes sulfoniques et les groupements amines a bien eu lieu.

En outre, la présence de fonctions sulfonates est confirmée par l'apparition de nouveaux pics dans les spectres du CHT1S2 et du CHT2S2, en particulier à 1170 cm^{-1} , entre 1107 cm^{-1} et 1092 cm^{-1} et à 1020 cm^{-1} et qui correspondent respectivement à l'élongation des groupements sulfonates, à la vibration des noyaux aromatiques et à l'élongation symétrique des O=S=O présents dans les groupements sulfonates. Les bandes caractéristiques des groupements benzyles apparaissent à 770 cm^{-1} et 709 cm^{-1} pour le CHT1S2 et à 700 cm^{-1} pour le CHT2S2 et qui correspondent aux vibrations de déformation des C-H présents dans les groupements aromatiques.

1.4 Spectroscopie UV-visible

La modification chimique du chitosan par greffage de groupements benzyles sulfonates sur les chaînes du chitosan a été caractérisée par spectroscopie UV-vis. Les spectres obtenus sont donnés dans la **Figure 113**.

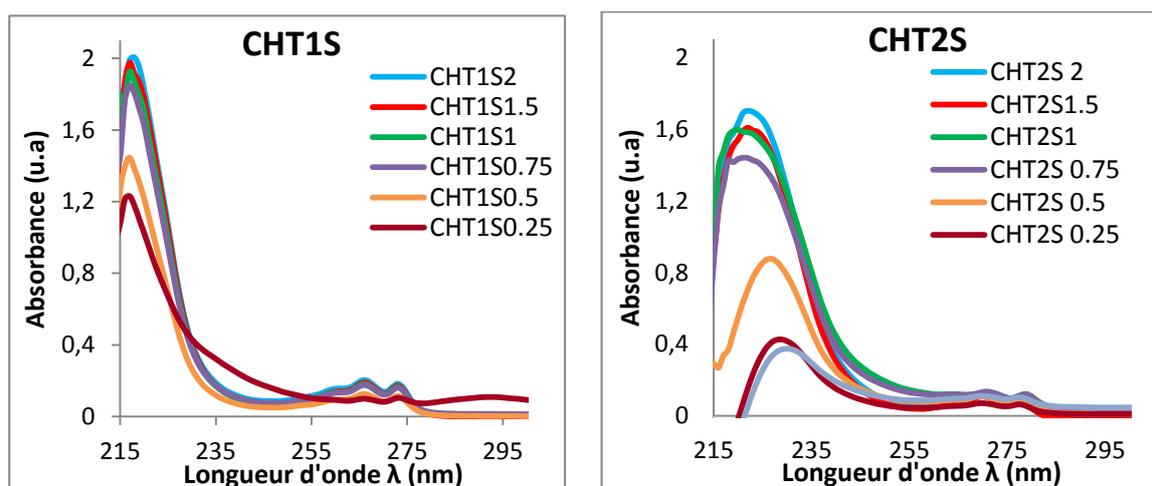


Figure 113 : Absorbance des bandes d'absorption spécifiques au CHT1S et CHT2S en fonction du rapport molaire R

Les groupements benzyles sulfonates greffés sur les chaînes de chitosan présentent des chromophores qui ont engendré l'apparition de bandes d'absorption spécifiques entre 215 nm et 300

nm. On remarque que les spectres relatifs à la série CHT1S présentent un maximum à une longueur d'onde fixe à $\lambda_{\max}=218$ nm, tandis que ceux de la série CHT2S, se décalent en fonction de R. Pour $0.75 \leq R \leq 2$, λ_{\max} est fixe à 218 nm et pour $R < 0.75$, λ_{\max} est à 225nm, 227nm et 229nm pour respectivement CHT2S0.5, CHT2S0.25 ET CHT2S0.15.

A partir de ces spectres, l'absorbance correspondant à chaque λ_{\max} a été tracée en fonction du rapport R (**Figure 114**).

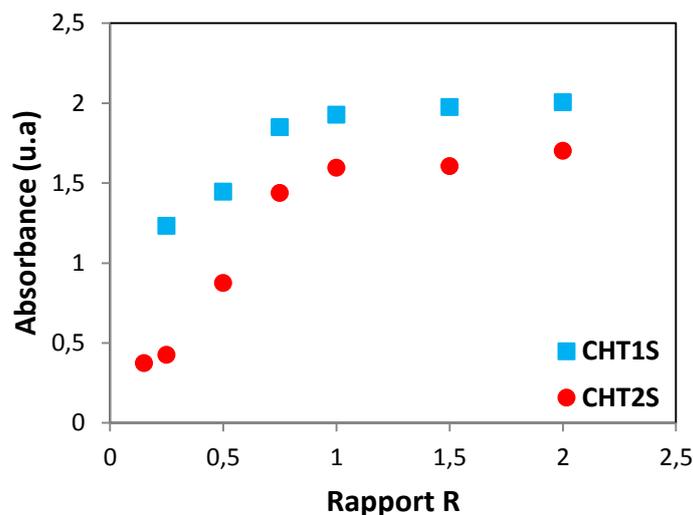


Figure 114 : Absorbance en fonction du rapport R à $\lambda=218$ nm pour la série CHT1S et de $218 \text{ nm} < \lambda < 228 \text{ nm}$ pour la série CHT2S

Le graphe montre une augmentation de l'absorbance (donc du DS) lorsque R augmente jusqu'à 1, puis un plateau est observé à $R > 1$ qui montre un phénomène de saturation, ce qui est en cohérence avec les résultats RMN et d'analyse élémentaire.

1.5 Potentiométrie couplée à la conductimétrie

Contrairement au CHT, les CHT sulfonés (mono et disulfonés) sont solubles dans la soude (0.01M). Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que les échantillons CHT2S avec un $R = 0.25$ et $R = 0.15$ mettent plus de temps à se solubiliser dans la soude (0.01M) (24h environ) et ne sont pas solubles dans la soude (0.1M) mais reste également soluble à pH acide. Un tel comportement est lié au faible DS de ces échantillons (seulement 0.15 et 0.09) dont la faible teneur en groupements sulfonates n'a pas été suffisante pour contrebalancer le caractère insoluble caractéristique du chitosan en milieu basique.

Les solutions de CHT1S et CHT2S, dissouts dans la soude (0.01M), ont pu être titrées par HCl (0.1M) en suivant en simultanément l'évolution du pH et de la conductance (G). Seules les courbes de titration du

CHT2S R=2 et R=0.15 et CHT1S R=2 R=0.25 ont été présentées (voir **Figure 115**). Les autres courbes sont données en **Annexe 10**.

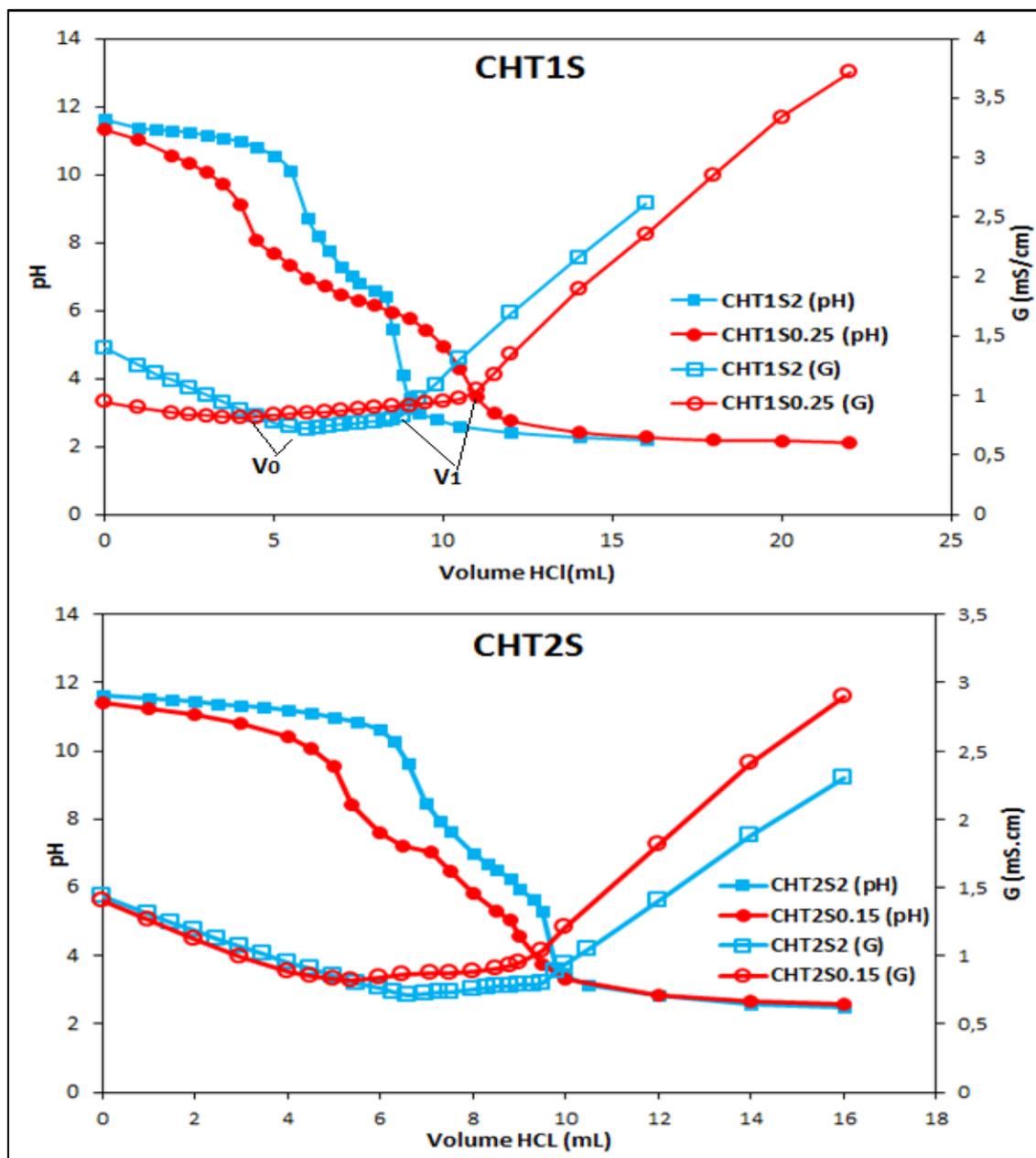


Figure 115 : Titration par pHmétrie et conductimétrie en simultané du CHT2S préparé à un rapport molaire R= 2 et 0.25

Les courbes obtenues par titration pHmétrique présentent deux sauts de pH. Ils sont attribués, d'une part, à la neutralisation de l'excès de NaOH nécessaire pour solubiliser les polymères (1^{er} saut) et d'autre part à la protonation des groupements amines résiduels non substitués (2^{ème} saut). En raison de leur faible pKa (pKa 2.55), les sels de sodium de l'acide sulfonique ne pouvaient pas être convertis en leur forme acide sulfonique.

Lors de cette expérimentation, nous avons constaté que la série CHT1S ($0.25 < R \leq 0.75$) présentait une solubilité aux pH extrêmes $pH < 5$ et $pH > 7$ et une insolubilité à pH intermédiaire ($5 \leq pH \leq 7$). Pour les CHT1S ($R > 0.75$), les polymères étaient solubles jusqu'à pH 7 puis un trouble apparaissait en deçà de pH 7. Ce même comportement a été observé pour la série CHT2S ($0.15 < R < 1$) où les polymères étaient solubles jusqu'à pH 7, pH 6 et pH 4 pour respectivement $0.15 < R < 0.5$, $R = 0.75$ et $R = 1$. En revanche, les deux polymères CHT2S2 et CHT2S1.5 étaient solubles sur toute la gamme du pH testée. Cette propriété est très originale qui n'a pas été rapportée à notre connaissance, qui montre qu'un polyampholyte a été obtenu, qui est soluble à la fois à pH basique grâce aux fonctions sulfonates et à pH acide grâce aux fonctions ammonium.

En parallèle, les courbes obtenues par conductimétrie présentent trois sections avec des transitions qui se produisent simultanément aux sauts de pH observés par potentiométrie. Ces transitions correspondent aux volumes équivalents V_0 et V_1 ajoutés du titrant. Ces variations de pente des courbes de conductimétrie sont donc attribuables aux mêmes phénomènes.

La **Figure 116** présente la différence de volumes $\Delta V = V_1 - V_0$ en fonction du rapport R. On remarque que les ΔV diminuent en augmentant les valeurs de R jusqu'à $R = 1$ puis atteignent un plateau. En effet, les valeurs de ΔV sont proportionnelles aux groupements amines libres contenus dans les deux polymères (plus ΔV est petit moins il y a de groupements amines libres), par conséquent la **Figure 116** met en évidence l'augmentation du DS pour R compris entre 0 et 1, puis une saturation pour $R > 1$. Ceci confirme les constatations observées avec l'étude RMN, UV-vis et analyse élémentaire. Cette méthode peut donc être considérée comme relative ou semi-quantitative.

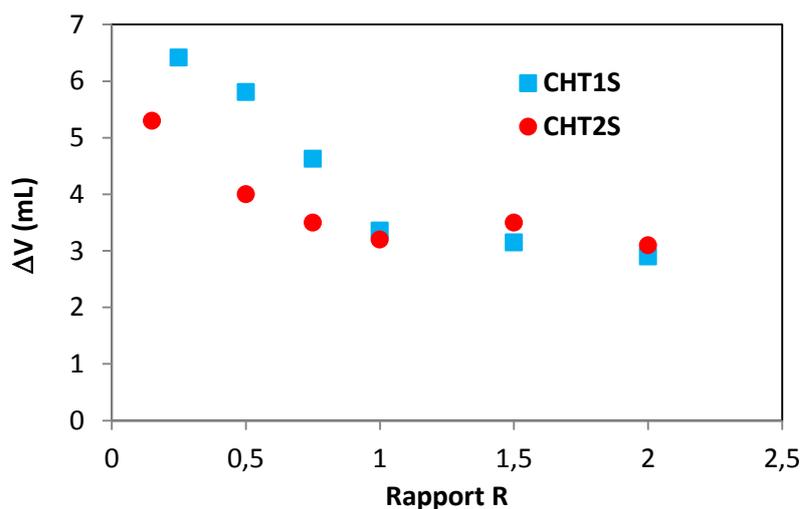


Figure 116 : Différence entre les volumes équivalents déterminés par dosage conductimétrique ($\Delta V = V_T - V_0$) du CHT1S et CHT2S à des rapports molaires R. Une baisse du ΔV montre une substitution des groupements amines.

En théorie la titration par HCl devrait conduire non seulement à la protonation des fonctions NH_2 résiduelles, mais aussi à celle des fonctions amines secondaires substituées par les groupes benzyles porteurs de une ou deux fonctions sulfonates. Cependant, la titration par potentiométrie et conductimétrie montre que seules les fonctions amines primaires résiduelles sont dosées (car ΔV diminue lorsque R augmente). Ceci s'explique par l'effet inductif attracteur (-I) à longue distance exercé par les groupes SO_3Na sur la fonction amine secondaire, ce qui provoque une diminution importante de sa basicité (Figure 117). Ainsi, ces fonctions amines substituées ne sont pas protonées (ou faiblement) lors du dosage.

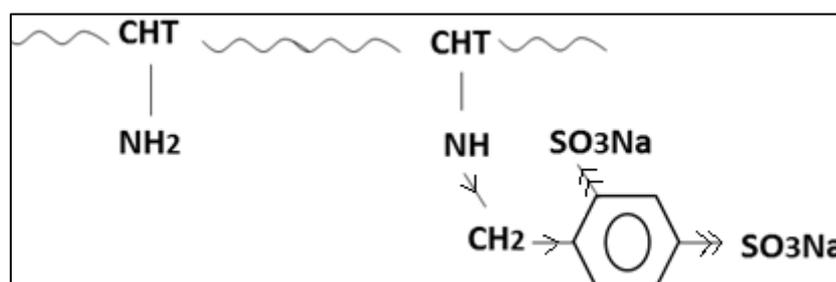


Figure 117 : Interactions intramoléculaires entre une amine secondaire et un groupement sulfonate

1.6 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta des deux séries de chitosans sulfonés ainsi que du chitosan de départ ont été mesurée en faisant varier progressivement le pH par addition de NaOH ou HCl, respectivement. Les résultats sont présentés dans la Figure 118.

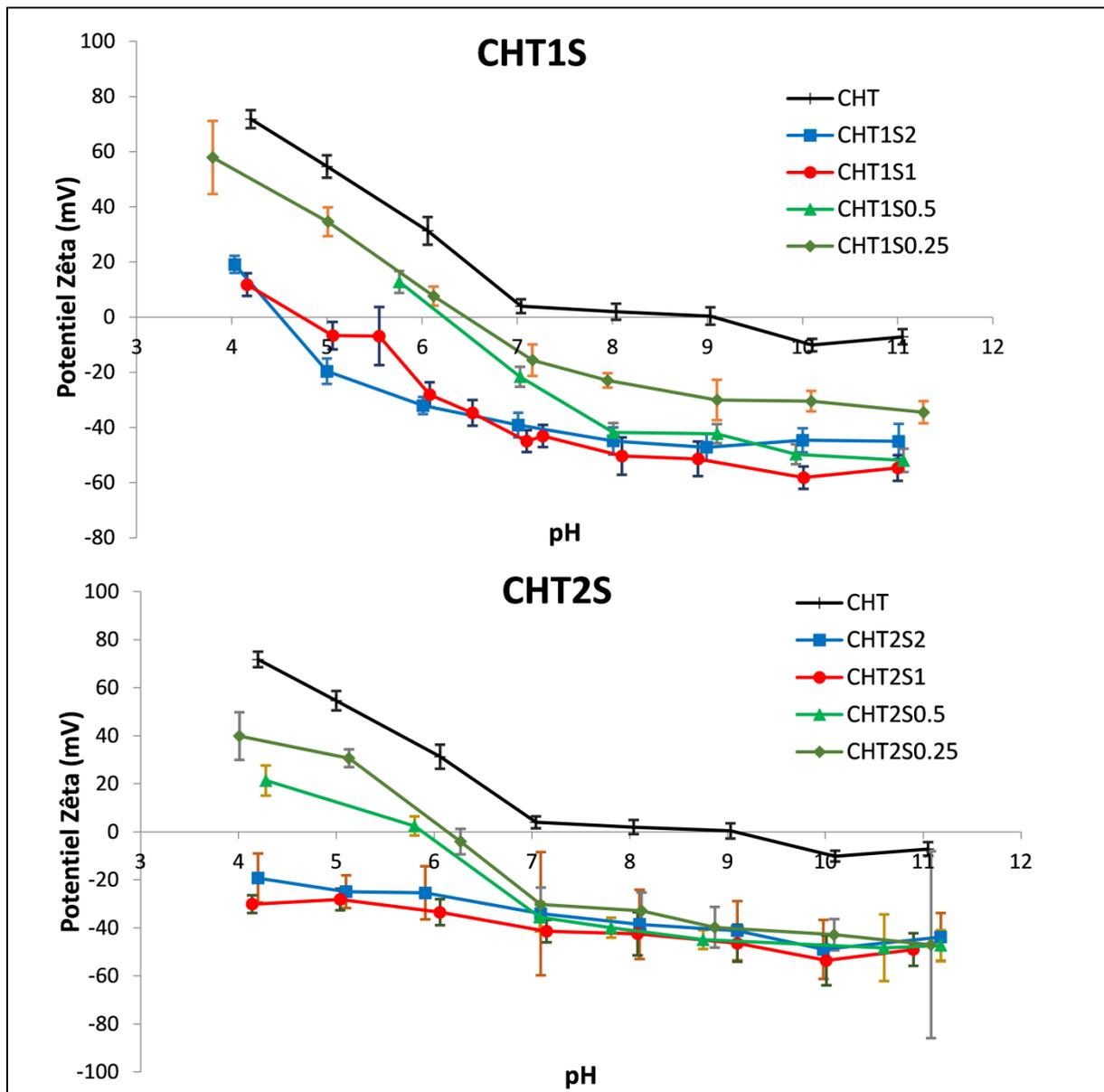


Figure 118 : Mesure des potentiels zêta des CHT1S, CHT2S pour des rapports molaires $R= 2, 0.5$ et 0.25 et le CHT en fonction du pH

Le potentiel zêta du chitosan non modifié (initialement solubilisé dans de l'acide acétique dilué) est de +70 mV. Les valeurs du potentiel zêta décroissent progressivement en augmentant le pH suite à la déprotonation des groupements amines lors de l'ajout de la soude. Le point isoélectrique du CHT a été observé entre pH 7 et pH 9. Lorsque le pH augmente au-delà de pH 9, le potentiel zêta devient légèrement négatif (-10 mV).

Par ailleurs, le potentiel zêta des deux séries CHT1S et CHT2S solubilisées dans la soude (0.01M) présentent des valeurs négatives autour de -50 mV. Globalement, lorsque le pH augmente avec l'ajout progressif de HCl, le potentiel zêta demeure stable jusqu'à la protonation des groupements

amines non substituées à environ pH 8 pour le CHT1S et pH 7 pour le CHT2S. Par la suite, le potentiel zêta augmente considérablement lorsque le pH descend jusqu'à 4.

Plus précisément, différents comportements ont été observés entre les polymères sulfonés : ceux qui ont un faible rapport R (0.25 et 0.5), puis ceux avec un DS intermédiaire comparés à ceux qui ont été préparés avec un rapport équimolaire ou un excès d'aldéhyde sulfonique (R=1 et 2) et qui présentent un DS maximum. En effet, les polymères ayant un faible DS présentent un caractère polyanionique à pH basique et polycationique à pH acide. Par conséquent, leurs valeurs de potentiel zêta présentent les amplitudes les plus élevées, à l'inverse des polymères avec un haut DS dont la densité des groupements amines à pH acide ne pouvait pas contrebalancer les charges négatives apportées par les substituants benzènesulfonate. En particulier, l'influence des groupes sulfonates est visible de la manière la plus évidente dans le cas de CHT2S R=1 et 2 dont le potentiel zêta reste négatif dans toute la gamme du pH testée, ceci grâce à leur richesse en groupes sulfonates qui atteint 2.79 meq/g et 2.85 meq/g, respectivement.

Enfin, la modification du CHT par greffage de groupements sulfonates provoque la diminution de son point isoélectrique nettement en dessous de pH 7. Ainsi, les résultats de potentiel zêta confirment le caractère polyampholyte des deux séries de CHT sulfonés étudiés ici.

Ce résultat est important car les interactions de ces polymères avec des cellules composant le milieu physiologiques (tels que les plaquettes le plasma sanguin) vont dépendre du potentiel zêta.

1.7 Chromatographie d'exclusion stérique

Les valeurs de dn/dc , déterminées dans 30 mM de tampon borate à pH=8.5 pour chaque série, sont indépendantes du rapport R et donc du DS, et dépendent seulement de la nature du polymère (CHT1S ou CHT2S). Les valeurs moyennes sont de 0.1507 pour CHT1S et 0.1356 pour CHT2S. Elles sont plus faibles que la valeur de dn/dc du CHT qui est donnée autour de 0.165 dans la littérature (354–356).

La **Figure 119** présente les chromatogrammes du CHT1S et CHT2S (R=2, 1, 0.75, 0.5, 0.25). On remarque que tous les polymères sulfonés ont un comportement similaire. La diffusion de la lumière (LS) (tracés en rouge) montre l'apparition d'un dédoublement sur les pics LS de la série CHT1S, et une dissymétrie sur les pics LS de la série CHT2S. Ce dédoublement pourrait traduire la présence d'agrégats ou de nanoobjets à faible volume d'éluion (i.e. à faible temps de rétention). Ces agrégats pourraient être dus à une modification non homogène des chaînes. Par ailleurs, cette présence d'agrégats fausse les valeurs de masse molaire des polymères. En effet, la détection LS est très sensible aux agrégats ou nanoobjets qui diffusent fortement la lumière même à faibles

concentrations. Au contraire, la détection RI (tracés en bleu) est directement reliée à la concentration massique des composés. On observe sur les chromatogrammes que plus le rapport R est faible, plus il y a d'agrégats en solution.

Le décalage des pics d'élution détectés par RI et LS montre donc que s'il y a bien présence d'agrégats (visibles par (LS)), ceux-ci sont présents en relative faible concentration.

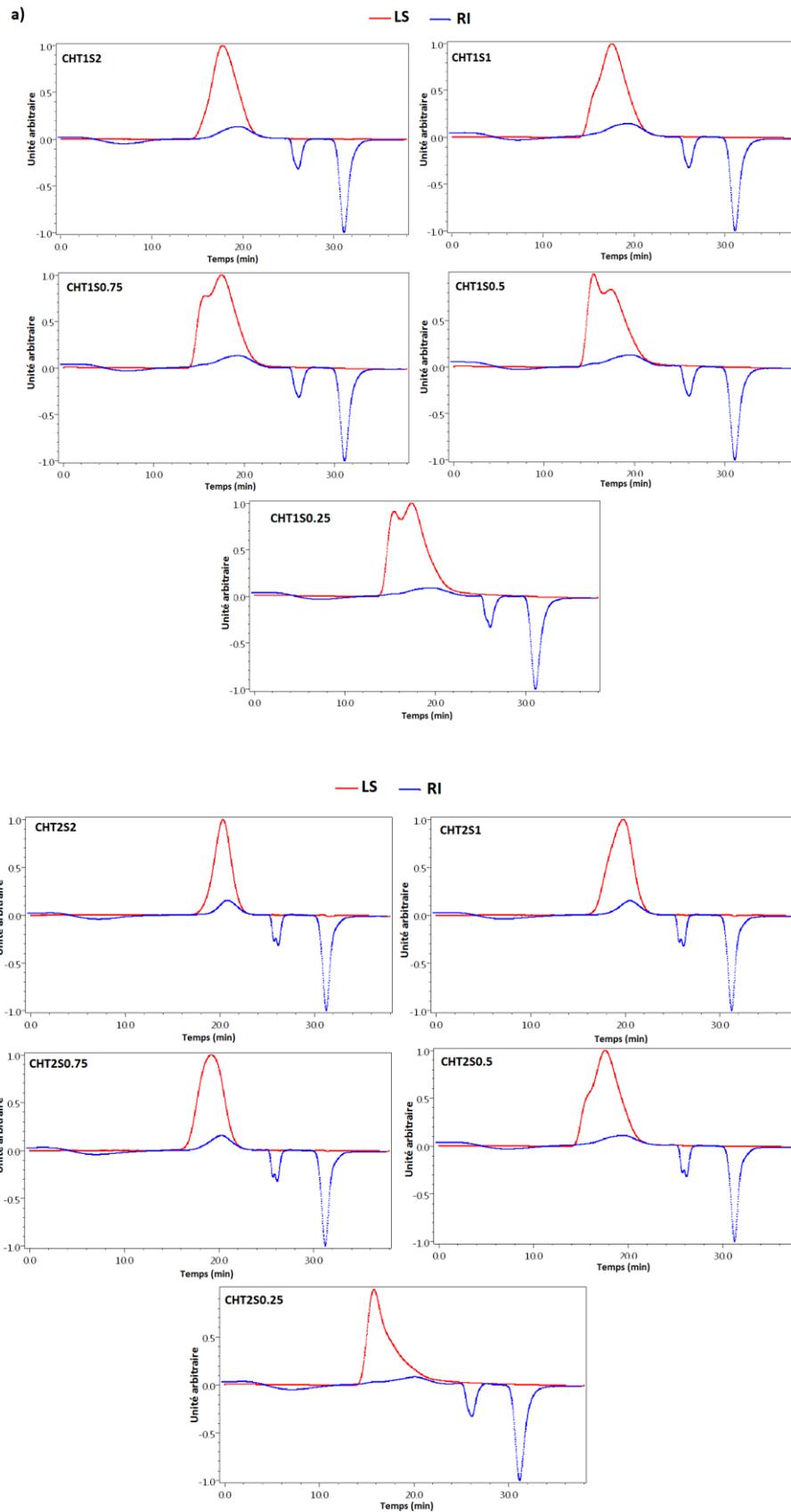


Figure 119 : Chromatogrammes de la série a) CHT1S et b) CHT2S dissout dans 30 mM de tampon borate à $pH=8.5$, tracé rouge : détection LS ; tracé bleu détection RI

Les masses molaires ont tout de même été mesurées dans le tampon borate et sont données dans le **Tableau 31**. On constate que les valeurs de M_w et M_n de la série CHT1S sont nettement supérieures à celles de la série CHT2S. La différence entre les masses molaires de CHT1S et CHT2S calculées par le logiciel ASTRA peut être expliquée par la présence d'agrégats de plus grande taille dans CHT1S que dans CHT2S. En revanche, on remarque une faible différence de masse molaire entre les rapports au sein d'une même série. Par ailleurs, Les valeurs des M_w pour les deux séries ne sont pas cohérentes par rapport à celle du CHT de départ qui a une masse molaire de 130000 g/mol (mesurée par viscosimétrie capillaire dans de l'acide acétique et l'acétate de sodium (0.3M et 0.2M respectivement)). La masse molaire donnée par Sigma-Aldrich est de 50000-190000 g/mol.

Il est à noter également que l'indice de polymolécularité est compris entre 1.2 et 2, ce qui semble faible pour un polymère d'origine naturelle.

Tableau 31 : Valeurs des masses molaires moyennes en poids M_w et en nombre M_n et de l'indice de polymolécularité PDI déterminées par SEC-MALS dans 30 mM de tampon borate à pH=8.5 ainsi que des valeurs de rayon hydrodynamique R_h déterminées par l'analyse de la dispersion de Taylor dans un milieu 0.01 M NaOH.

Echantillons	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	PDI	R_h (nm)
CHT1S 2	235000	121000	1,94	52
CHT1S 1,5	285000	151000	1,89	54
CHT1S 1	297000	149000	1,99	54
CHT1S 0,75	299000	170000	1,76	53
CHT1S 0,5	282000	164000	1,72	54
CHT1S 0,25	-	-	-	-
CHT2S 2	56000	46000	1,22	62
CHT2S 1,5	80000	61000	1,31	64
CHT2S 1	78000	62000	1,26	63
CHT2S 0,75	86000	65000	1,32	65
CHT2S 0,5	89000	66000	1,35	62
CHT2S 0,25	-	-	-	-
CHT2S 0,15	-	-	-	-

1.8 Analyse par dispersion de Taylor

La **Figure 120** montre uniquement les Taylorgrammes du CHT1S et CHT2S (R=2), car les Taylorgrammes des autres rapports ont des profils similaires. Les valeurs des rayons hydrodynamiques (R_h) mesurés dans 0.01 M NaOH sont données dans le **Tableau 31** (cf. paragraphe précédent).

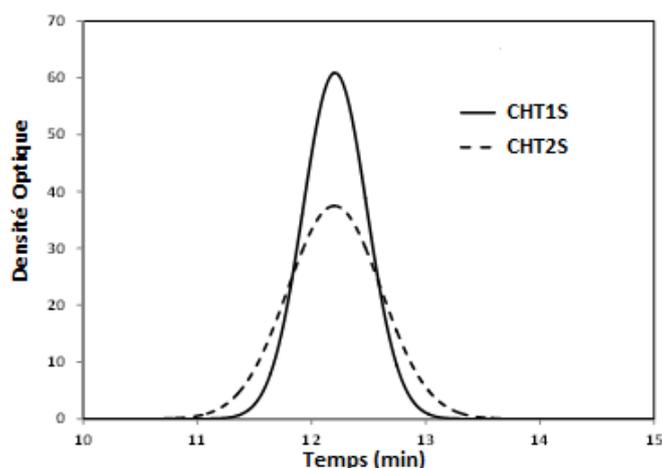


Figure 120 : Taylorgrammes de CHT1S et CHT2S, $R=2$ dans 0.01 M NaOH

Les Taylorgrammes présentent un profil Gaussien, ce qui signifie que la proportion d'agrégats observée par SEC-MALS est relativement faible. Dans le cas contraire, les Taylorgrammes auraient montré un profil de type « chapeau Mexicain » (superposition de deux Gaussiennes). Sur la **Figure 120**, on observe une plus grande dispersion du pic pour CHT2S, ce qui est caractéristique d'une plus grande taille.

Contrairement à la méthode de la diffusion de la lumière (SEC-MALS) qui fournit des valeurs moyennes de R_h en intensité (moyennes harmoniques en z), les valeurs moyennes pondérales de R_h sont déterminées par TDA à l'aide d'un détecteur UV qui est sensible à la concentration. Un des avantages de la méthode TDA est que, dans le cas d'échantillons polydisperses, la TDA conduit à des valeurs de R_h qui ne sont pas biaisées par la présence d'agrégats ou de nanoobjets, contrairement aux valeurs obtenues par SEC-MALS.

D'après le **Tableau 31**, on conclut qu'au sein d'une même série le R_h n'évolue pas en fonction de R , il est en moyenne de 53 nm pour CHT1S et 63 nm pour CHT2S. En revanche, ces résultats semblent en contradiction avec les valeurs de masses molaires mesurées par SEC-MALS qui donnent des masses molaires de la série CHT1S supérieures à celles de la série CHT2S. Ceci est probablement dû à la présence de deux groupements sulfonates dans le cas des CHT2S au lieu d'un seul groupement dans le cas des CHT1S. Ces groupements sulfonates provoqueraient des répulsions intramoléculaires plus importantes avec les CHT2S que les CHT1S et, par conséquent, les chaînes gonfleraient davantage dans le solvant dans le cas des CHT2S, d'où un R_h plus élevé.

I.9 Mesure des viscosités dynamiques par rhéologie

Les viscosités des solutions de chitosans mono et di-sulfoné dans NaOH 0.1M a été mesurées en fonction du rapport molaire R. Les résultats sont présentés dans la **Figure 121**.

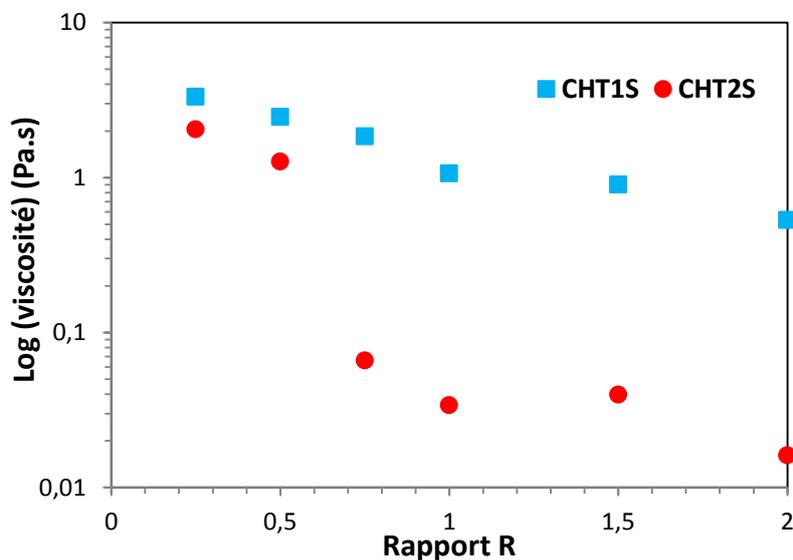


Figure 121 : Viscosité du CHT1S et CHT2S à une concentration de 3.5% solubilisé dans la soude (0.1M) en fonction des rapports molaires R

Tout d'abord, on remarque que les solutions de chitosans di-sulfonés sont moins visqueuses que celles de chitosans mono sulfonés, ceci quel que soit le rapport R. Dans les deux séries, la viscosité diminue avec les rapports molaires R croissants. Cette baisse est sensible pour $0.25 < R < 1$ puis, moins prononcée pour $R > 1$. On peut donc supposer que les chaînes polymères en conformation de pelote dans la solution forment davantage d'enchevêtrements lorsque R est faible (donc DS faible). En revanche, pour $R > 1$, les pelotes seraient davantage repliées et formeraient moins d'enchevêtrements. Ainsi la variation des viscosités des polymères en solutions suit avec l'évolution du degré de modification du chitosan mise en évidence précédemment par, RMN, UV-vis, analyse élémentaire, potentiométrie.

I.10 Conclusion

Deux séries de chitosans sulfonés ont pu être synthétisées : mono et disulfonés, présentant des degrés de substitutions dépendant du rapport molaire R des réactifs sulfoniques et les fonctions amines primaires du chitosan. Les polymères obtenus ont été caractérisés par plusieurs techniques : Deux techniques quantitatives RMN et analyse élémentaire qui ont permis de mesurer le DS en fonction de R et l'IR, l'UV-vis ont également permis de confirmer le greffage des groupes benzyliques mono ou di-sulfonés sur les chaînes du chitosan de façon qualitative. De plus, ces méthodes, complétées par des méthodes indirectes (conductimétrie, rhéologie) ont montré que le DS dépendait

du rapport molaire R en particulier pour $0 < R < 1$ puis reste quasiment stable pour $R > 1$. Pour des valeurs de R équivalentes, si le DS atteint est toujours supérieur dans la série CHT1S, en revanche, la série CHT2S est plus riche en fonctions sulfonates.

La zétamétrie a montré que les polymères sulfonés présentaient un caractère polyampholyte, étant donné que les polymères comportaient à la fois des fonctions ammonium et des fonctions sulfonates. De plus, selon le rapport R , ou selon le DS, les polymères avaient une charge globale négative à pH basique, et positive à bas pH sauf dans le cas de CHT2S2 et CHT2S1, les plus riches en fonctions sulfonates.

Les mesures de viscosités dynamiques ont montré que les solutions du CHT1S étaient plus visqueuses que celles du CHT2S, ce qui est en corrélation avec l'analyse par diffusion de la lumière qui détecte des masses molaires supérieures pour la série CHT1S. Toutefois Les valeurs absolues des masses molaires mesurées étaient probablement faussées par la présence d'agrégats. En revanche, ceci n'est pas en corrélation avec les mesures de la diffusion de Taylor qui ont révélée un R_h pour le CHT1S inférieur à celui du CHT2S.

II Electrospinning du chitosan sulfonique

II.1 Tests préliminaires

Deux CHT sulfonés de chaque série ont été choisis pour l'électrofilage : CHT1S2 et CHT2S2. Les paramètres de solution tels que la concentration et les paramètres d'électrospinning tels que le débit et la distance ont été étudiés. Cette étude préliminaire a été réalisée avec le CHT2S2 et les paramètres optimaux ont été par la suite appliqués et ajustés pour l'électrofilage de CHT1S2.

Le CHT2S2 a été tout d'abord solubilisé dans la soude (0.05M) puis électrofilés mais ce dernier ne formait pas de NFs. Il s'est supposé ses chaînes moléculaires sont rigides et ne s'enchevêtrent pas à cause des répulsions entre des charges. Dans une seconde tentative, du NaCl a été ajouté à la solution de CHT2S2 afin d'écranter ces charges mais sans succès. Enfin, du PEO a été ajouté à la solution de CHT2S2, en nous basant sur sa capacité à rendre possible l'électrofilage du chitosan, tel qu'observé dans le chapitre I. Différents rapports massiques de PEO ont été testés variant de 50/50 à 90/10 (w/w). Pour notre étude nous avons choisi le rapport 80/20 qui conduit à des NFs uniformes et sans défauts avec une quantité maximale de CHT sulfoné.

II.2 Optimisation des paramètres

II.2.1 Influence de la concentration

Dans cette étude, une solution de CHT2S2/PEO (80/20) à des concentrations allant de 2 wt% à 4.5 wt% ont été électrospinnées. Les viscosités dynamiques ont été mesurées à l'aide d'un rhéomètre.

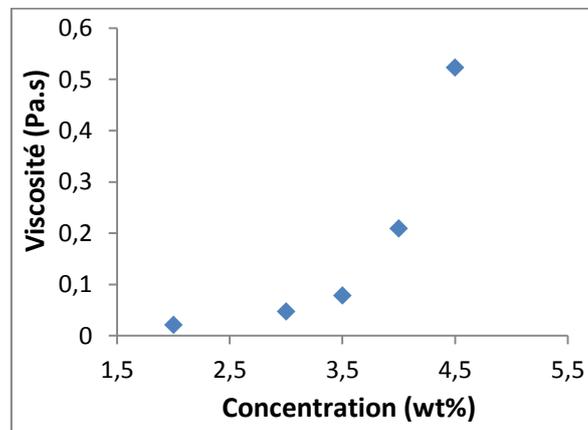


Figure 122: Mesure des viscosités des solutions de CHT2S2/PEO (80/20) (w/w) électrospinnées en fonction de leur concentration dans NaOH (0.05M)

Dans cette étude, une solution de CHT2S2/PEO (80/20) à des concentrations allant de 2 wt% à 4.5 wt% ont été électrospinnées. Les viscosités dynamiques de solutions de CHT2S2 de concentrations variables ont été mesurées à l'aide d'un rhéomètre et présentées dans le graphe de la **Figure 122**. On remarque que la viscosité dynamique augmente avec la concentration notamment au-delà de 3.5 wt%, où l'enchevêtrement des chaînes apparaît ($C \gg C^*$).

Les images MEB des nanofibres de CHT2S2 obtenues à partir de solutions de différentes concentrations sont présentées sur la **Figure 123**. À une concentration inférieure à 3.5 wt%, l'électrospinning de cette solution a généré des fibres avec beaucoup de billes (**Figure 123.a-b**). La forme des billes évolue en fonction de la concentration. À une concentration de 2 wt%, les billes sont de forme ovale puis s'étirent lorsque la concentration augmente. Ceci signifie que l'enchevêtrement des chaînes évolue et favorise l'étirement des macromolécules pour former des nanofibres. Des nanofibres régulières et sans billes ont été formées pour une concentration de 4 wt% (**Figure 123.d**). Lorsque la concentration atteint les 4.3 wt% des billes réapparaissent probablement à cause de l'augmentation de la viscosité (**Figure 123.e**). En augmentant la concentration à 4.5 wt%, la solution devient très visqueuse (0.5 Pa.s) (et impossible à électrospinner).

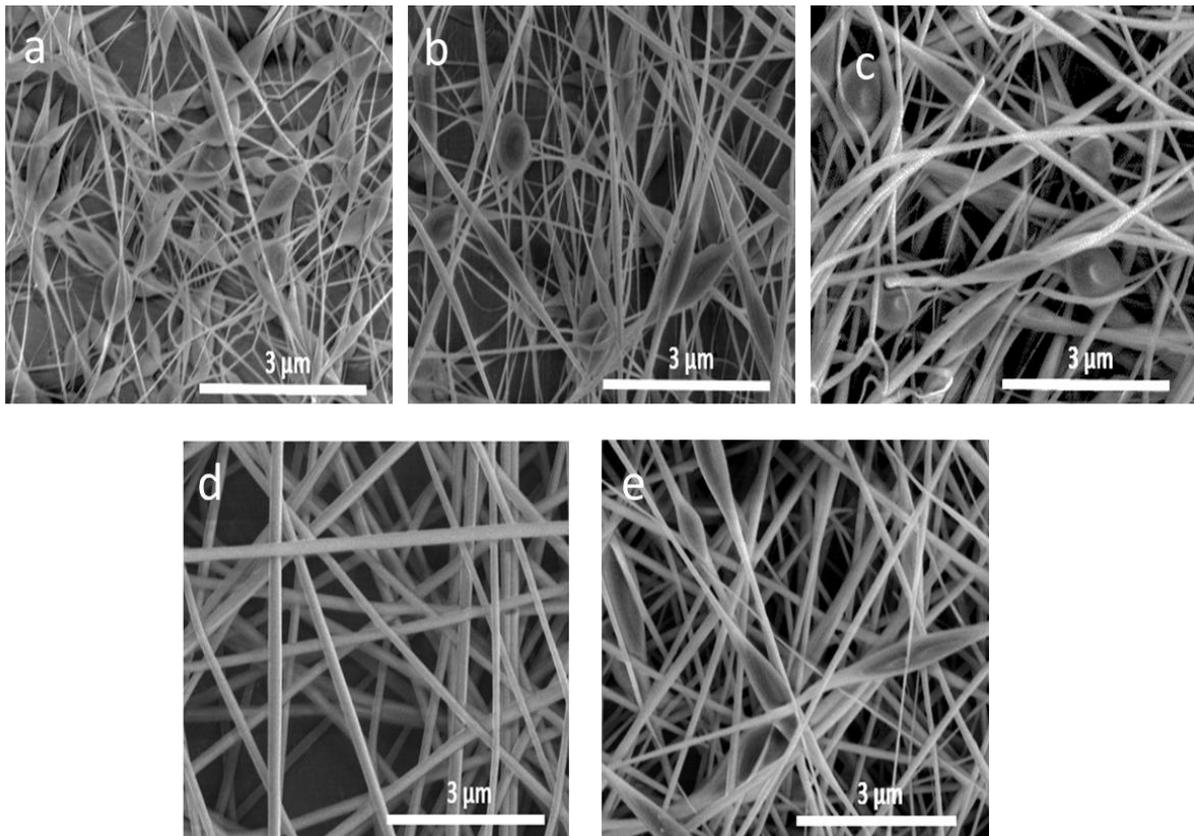


Figure 123 : Images MEB de nanofibres de CHT2S2/PEO (80/20) électrospinnées à différentes concentrations : a) 2 wt%, b) 3 wt%, c) 3.5 wt% d) 4 wt% e) 4.3 wt% dans du NaOH (0.05M)- 0.5mL/h, 250 mm, 15 kV

En définitive, la concentration qui permet d'obtenir des nanofibres de CHT2S2 uniformes et sans défauts est de 4%.

II.2.2 Influence de la distance

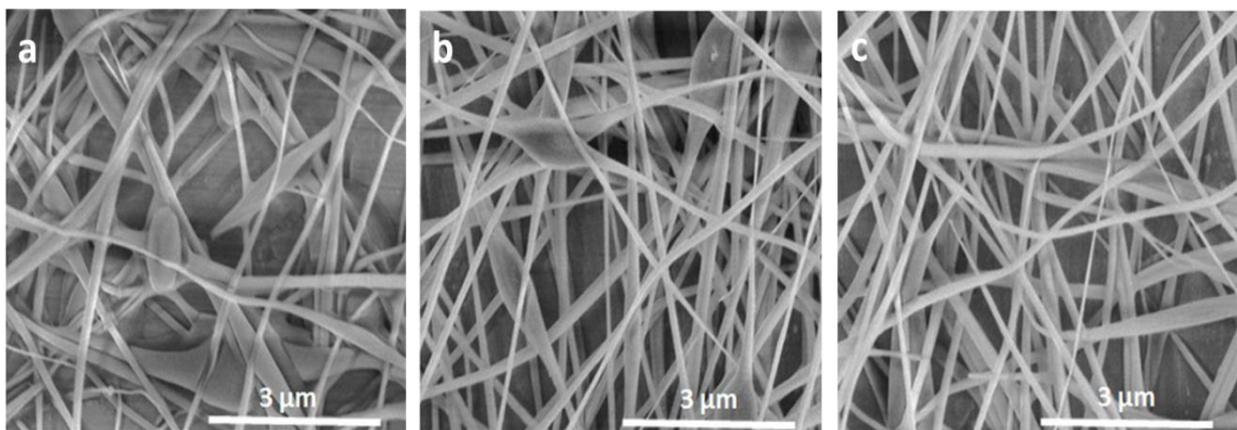


Figure 124 : Images MEB de nanofibres de CHT2S2 préparées à une concentration de 4% w/v, dans du NaOH (0.05 M) et avec un rapport CHT2S2/PEO à 80/20 (w/w), et électrospinnées à une distance de a) 150 mm, b) 200 mm et c) 250 mm à un débit 0.5 ml/h et un voltage de 13 kV.

La distance entre l'aiguille et le collecteur a été réglée successivement à 150 mm, 200 mm et 250 mm en fixant le débit à 0.5 mL/h et le voltage à 13 kV. La **Figure 124** présente les images MEB

correspondantes. Lorsque la distance est de 150 mm, les nanofibres ont fusionné à cause d'une évaporation non complète du solvant. De plus, des billes apparaissent ce qui signifie que le jet ne s'est pas suffisamment étiré. En augmentant la distance à 200 mm, le nombre de billes diminue et les points de jonctions entre les fibres deviennent moins apparents. A 250 mm, les fibres sont plus uniformes et présentent moins de défauts.

II.2.3 *Influence du débit*

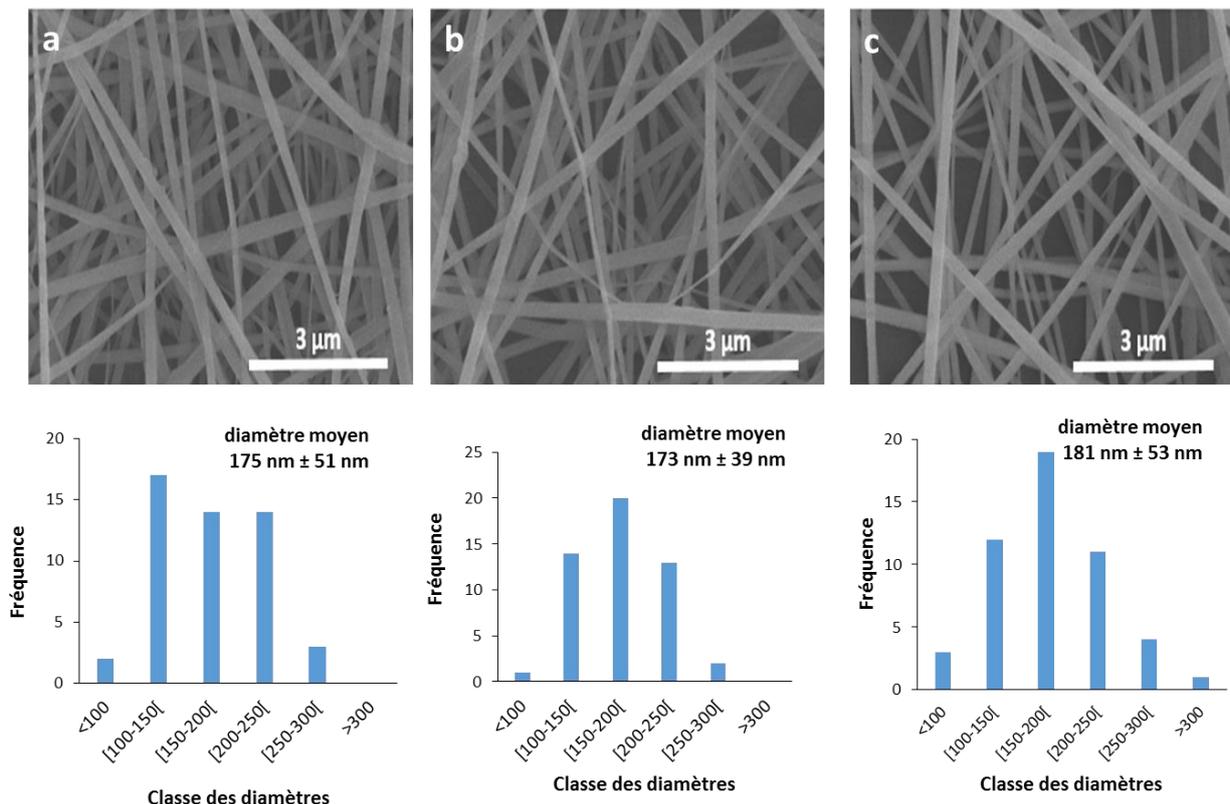


Figure 125: Images MEB de nanofibres de CHT2S2 préparées à une concentration de 4% w/v, solubilisée dans NaOH (0.05 M) et avec un rapport CHT2S2/PEO à 8/2 (w/w), et électrospinnées à un débit de a) 0.2 ml/h, b) 0.5 ml/h et c) 1 ml/h à une distance de 250 mm et un voltage de 13 kV. Les images sont accompagnées des distributions des diamètres et les diamètres moyens

Le débit a été fixé à 0.2 ml/h, 0.5 ml/h et 1 ml/h. Les images MEB respectives sont présentées dans la **Figure 125** avec les distributions des diamètres correspondants. La gamme des débits étudiés n'a pas une grande influence sur la morphologie des nanofibres, elles sont uniformes et sans défauts. Le diamètre moyen des NFs varie également peu en fonction du débit. En augmentant le débit à 0.2 ml/h à 1 ml/h, le diamètre augmente de manière peu significative de 175nm \pm 51 nm à 181nm \pm 53 nm. Les nanofibres les moins dispersées ont été obtenues avec un débit de 0.5 ml/h avec un écart moyen de 39 nm.

II.2.4 Electrofilage du CHT1S2

Comme indiqué précédemment, les paramètres optimisés pour l'électrofilage du CHT2S2 ont été appliqué pour le CHT1S2 puis ajustés pour l'obtention de nanofibres sans défauts.

Les paramètres optimaux pour le CHT2S2 sont : une solution à 4wt% CHT2S2/PEO à 80/20 (w/w) dissouts dans une solution aqueuse de soude (0.05M) puis électrofilée en fixant le voltage, le débit et la distance aiguille-collecteur respectivement à 13 kV, 0.5mL/h et 250 mm. A 4 wt% CHT2S2/PEO 80/20. Le CHT2S1 ne pouvait pas être électrospinné en appliquant ces paramètres à cause de la forte concentration et de la forte viscosité de la solution. Celle-ci a alors été diluée à 3.5 et 3.8 wt%. Les images MEB des NFs obtenues à partir de ces concentrations ainsi que leur distribution des diamètres sont présentées sur la **Figure 126**. On remarque que des NFs avec billes ont été obtenues avec une concentration de 3.5wt% ce qui signifie que cette concentration n'est pas suffisante pour provoquer un enchevêtrement des chaînes suffisant à la formation de NFs régulières. Ces NFs étaient très dispersées avec un diamètre moyen de $121 \text{ nm} \pm 110 \text{ nm}$. En augmentant la concentration à 3.8wt% des NFs uniformes et avec une distribution de diamètre peu dispersée avec un diamètre moyen de $214 \text{ nm} \pm 52 \text{ nm}$.

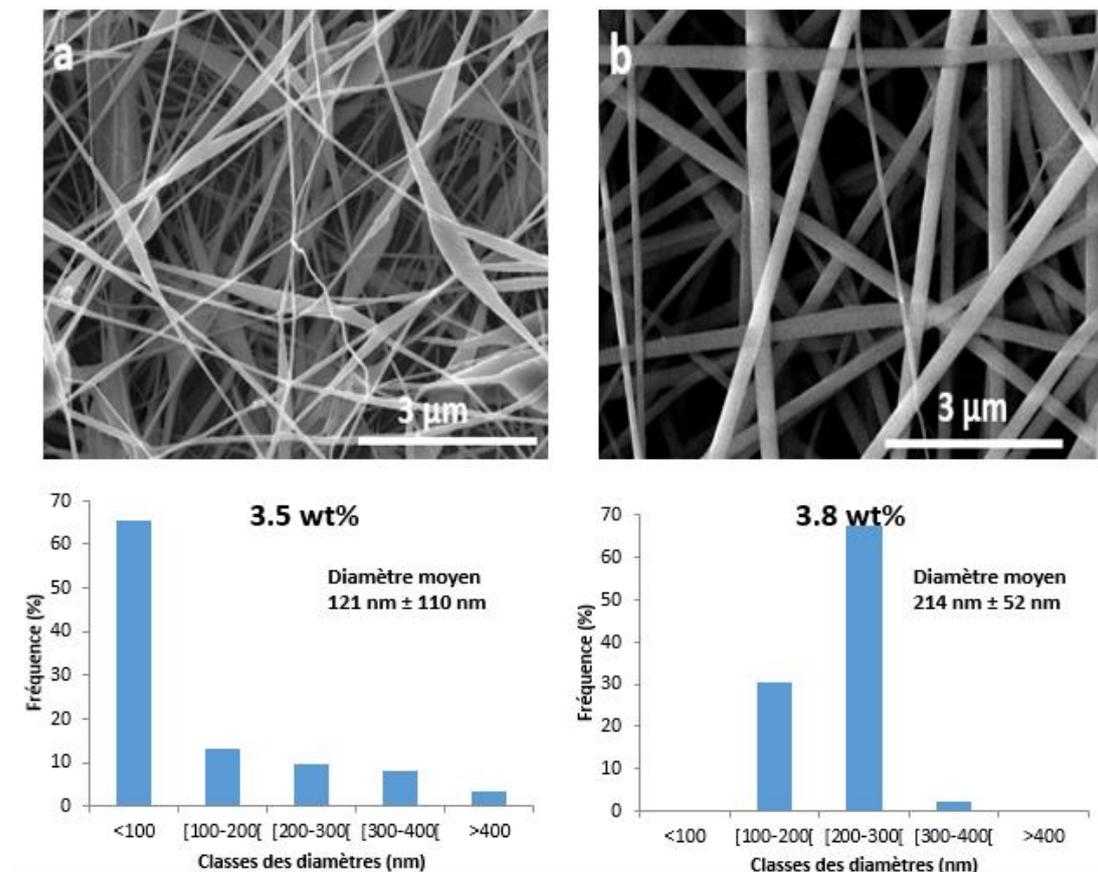


Figure 126 : Images MEB de NFs de CHT1S2/PEO (80/20) électrofilées à a) 3.5wt% et b) 3.8wt% dans la soude (0.05M) avec leur distribution des diamètres respectifs, voltage 13 kV, débit 0.5 mL/h, distance aiguille collecteur 250 mm

II.2.5 Conclusion

Les paramètres optimaux pour l'obtention de NFs uniformes et sans billes à base CHT2S2 ou CHT1S2 sont regroupés dans le **Tableau 32**. Les caractéristiques des membranes obtenues sont également données dans le tableau à savoir l'épaisseur pour un volume de solution électrofilé de 4mL et le grammage (g/m^2).

Tableau 32 : Paramètres optimisés de l'électrospinning des nanofibres de CHT2S2 et de CHT1S2 comparé à celles du CHT non modifié

		CHT2S2	CHT1S2
Paramètres solutions	Concentration (wt%)	4	3.8
	CHTS/PEO (w/w)	80/20	80/20
	Solvant	NaOH (0.05M)	NaOH (0.05M)
Paramètres d'électrofilage	Débit (mL/h)	0.5	0.5
	Distance (mm)	250	250
	Voltage (kV)	13-15	13-15
	Diamètre de dépôt (cm)	15	15
	Volume de solution (mL)	4	4
Caractérisations nanofibres	Diamètre (nm)	173±39	214 ±52
	Epaisseur (μm) ^a	74±7	64±5
	Grammage (g/m^2) ^b	8.1±1.1	9.2±6.0

^a Mesuré à l'aide d'un micromètre digital, échantillons obtenues après 4 mL de solution injectée

^b Calculé après pesée d'un échantillon découpé en disque ayant un diamètre de 1.5 cm.

II.3 Réticulation des nanofibres par la génipine

Les NFs de CHT1S2 et CHT2S2 se solubilisent spontanément quand elles sont plongées dans un tampon PBS pH7.4, il est donc nécessaire de les réticuler afin de les stabiliser.

Le CHT1S2 et le CHT2S2 ont des degrés de substitution maximum de 0.69 et 0.41 (mesuré par RMN) respectivement ce qui veut dire que les deux polymères contiennent encore des groupements amines primaires disponibles. Ces groupements amines peuvent former alors des liaisons covalentes avec la génipine permettant la réticulation des nanofibres.

La génipine a été introduite dans les solutions de polymères à électrofiler en suivant le protocole décrit dans le premier chapitre. La concentration de génipine employée est de 0.1 (w/v)%. Les nanofibres obtenues ont été exposées aux vapeurs d'eau à 50 °C pendant 4h.

II.3.1 Observation au MEB

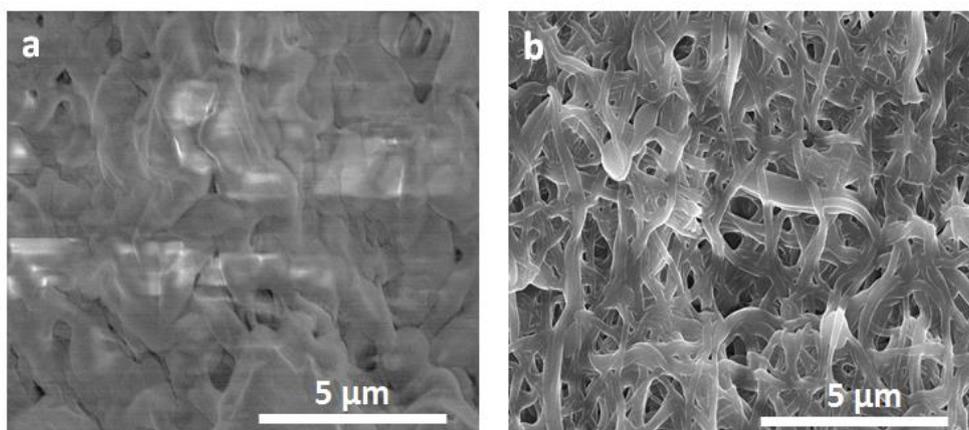


Figure 127 : Images MEB de nanofibres de a) CHT1S2 et b) CHT2S2 réticulées avec 0.1% de génipine après exposition aux vapeurs d'eau à 50°C pendant 4 heures et lavage au PBS pendant 24h.

La **Figure 127** présente des images MEB de nanofibres de CHTS2 et CHT2S2 réticulées à la génipine après leur exposition aux vapeurs d'eau à 50°C pendant 4h et lavage au PBS pendant 24h.

Les nanofibres de CHT1S2 ont perdu leur structure fibreuse avec un gonflement des fibres jusqu'à complète disparition de la porosité. Tandis que les nanofibres de CHT2S2 ont gardé leur structure fibreuse avec une augmentation de diamètre.

II.3.2 Taux de gonflement

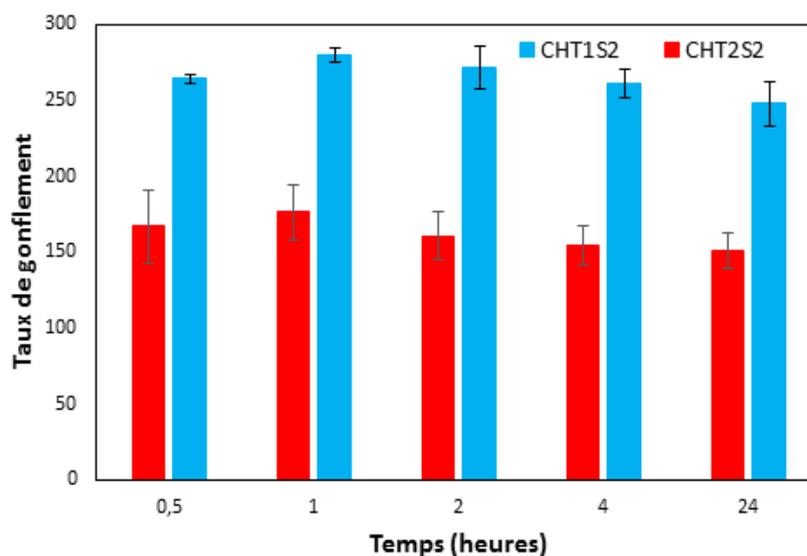


Figure 128 : Taux de gonflement dans le PBS à pH 7.4 des NFs de CHT2S2 et CHT1S2 réticulées avec 0.1% de génipine

Le taux de gonflement des nanofibres dans le PBS a été mesuré par méthode gravimétrique. Les résultats sont affichés dans la **Figure 128**. L'échantillon CHT1S2 montre un taux de gonflement

moyen de 264.6% beaucoup plus élevé que celui du CHT2S2 (161.8%), 1.64 fois plus élevé. Ce résultat est en accord avec l'observation au MEB.

Le degré de réticulation est probablement plus élevé dans le cas de CHT2S2 que dans celui de CHT1S2 car CHT2S2 possède davantage de fonctions amines primaires libres et disponibles pour réagir avec le génipine (11.3% contre 39.3%).

III Etude des propriétés anti-thrombotiques du chitosan sulfonique

III.1 Test d'hémolyse

L'hémolyse résulte de l'augmentation de la pression osmotique des globules rouges (hématies) qui conduit à la libération de l'hémoglobine. Il s'agit d'un phénomène physiologique naturel, en effet, Les hématies sont détruites après environs 100 jours de vie. Lorsque l'hémolyse est provoquée par un élément externe ou exagérée, elle provoque une hémorragie ou une anémie.

L'index hémolytique (IH%) représente la quantité de globules rouges brisées lorsque l'échantillon étudié est en contact avec du sang total. Plus le nombre de GR détruites est élevé plus la valeur IH est importante.

Le test d'hémolyse a été réalisé sur des poudres de CHT2S2 et de CHT non modifié pour vérifier leur compatibilité aux globules rouges. Les valeurs trouvées restent toutes inférieures à 2%. Ainsi, d'après la norme ASTM F756-00(2000), le CHT et le CHT2S2 sont non-hémolytiques. Autrement dit, les deux polymères ne provoquent pas une destruction prématurée des globules rouges. Ce résultat est en accord avec des résultats déjà rapportés dans la littérature sur l'étude de l'hémocompatibilité du chitosan [5].

En résumé, le chitosan et le CHT2S2 ne présentent aucun caractère hémolytique au regard de la norme.

III.2 Test de coagulation

La cascade de coagulation présente trois voies : la voie intrinsèque, extrinsèque et une voie commune. La voie intrinsèque et la voie extrinsèque conduisent à la formation de caillots de fibrine. La coagulation résulte d'une série de réactions protéolytiques impliquant l'activation par étapes des facteurs de coagulation présents dans le plasma [5]. Afin de mesurer l'impact d'un dispositif médical sur la cascade de la coagulation et notamment sur le temps, une série de tests est réalisée. Parmi les tests les plus couramment effectués on retrouve le TCA (Temps de Céphaline Activée), le TP (temps de prothrombine) et l'anti facteur-Xa (anti-Xa).

Le test TCA est un indicateur de l'activation de la voie intrinsèque et de la voie commune, qui comprennent les facteurs II, V, VIII, IX, X, XI, XII, et le fibrinogène. Un temps de coagulation prolongé indique que le dispositif médical présente une activité anticoagulante, tandis qu'un temps de coagulation plus court démontre une transformation plus rapide du fibrinogène en fibrine insoluble et la formation de thrombus et par conséquent une activité thrombogène. Le TCA prolongé dépasse la valeur normale comprise entre 28 et 30 secondes au cours desquelles un caillot de sang se forme. Plus le temps mesuré est long plus le déclenchement de la voie intrinsèque est difficile. Ainsi, lorsque le TCA est prolongé ceci indique une activité anticoagulante du biomatériau. Ainsi la mesure du TCA est couramment utilisée pour évaluer in vitro l'activité anticoagulante d'un biomatériau.

Le Temps de prothrombine (TP) est un indicateur de l'activation ou non de la voie extrinsèque et la voie commune qui comprennent les facteurs I, II, V, VII, X. Il représente la durée pendant laquelle la voie extrinsèque débute et un TP prolongé est synonyme de l'activité anticoagulante d'un biomatériau.

Le facteur Xa (a pour activé) accélère la transformation de la prothrombine (facteur II) en thrombine (elle-même transformant le fibrinogène en fibrine) qui est responsable de la formation de caillot de sang. La mesure de l'activité anti-Xa est surtout utilisée dans la surveillance biologique de traitements par héparine ou d'autres agents antithrombotiques. Il s'agit d'un dosage qui permet de savoir si oui ou non la quantité administrée d'agent antithrombotique est suffisante pour inhiber le facteur Xa.

Au cours de cette étude, nous avons étudié l'effet des chitosans mono et di-sulfonique sur les voies intrinsèque, extrinsèque et la voie commune de la cascade de coagulation en mesurant le TCA et le TP ainsi que l'activité anti-Xa lors du traitement avec des plaquettes pauvres en plasma.

Dans une première partie, l'activité anti-thrombotique des poudres de CHT1S et CHT2S a été évaluée avec l'étude des différents paramètres influençant cette activité comme la concentration en chitosan sulfoné et l'effet du rapport molaire R. Dans une seconde partie, l'activité des nanofibres issues des deux polymères a été évaluée et comparée à celle des poudres.

III.2.1 Activité anticoagulante des poudres

III.2.1.1 Influence de la concentration

Nous avons étudié l'activité anticoagulante du CHT2S2 et du CHT à différentes concentrations (de 0.05 mg/mL à 0.4 mg/mL) en utilisant les tests de coagulation suivant : TCA, TP et anti-Xa. L'héparine a été utilisée comme témoin positif, le sang total et le sang total dilué dans NaCl à 0.9% comme témoins négatifs. Les résultats des mesures sont donnés dans le **Tableau 33**.

Le CHT non modifié ne montre aucune activité anticoagulante car le TCA, TP et anti-Xa sont proches des valeurs obtenues pour le témoin négatif. A l'inverse, le CHT2S2 permet de prolonger le TCA jusqu'à ~ 80 s lorsque la concentration est élevée jusqu'à 0.4 mg/mL. Ce résultat montre le rôle des groupements sulfonates dans l'activité anticoagulante. Bien que le TCA du CHT2S2 soit élevé, il reste inférieur à celui de l'héparine à 10UI/mL.

Tableau 33 : Résultats des tests d'TCA, de TQ et d'anti-Xa du CHT et du CHT2S2 en poudre en comparaison avec l'héparine

	Concentration (mg/mL)	TCA* (sec) ^a	TP (INR) ^b	Anti-Xa (UI/ml)
CHT	0,05	30	1	0,09
	0,1	30	1	0,09
	0,2	30	1	0,09
	0,4	31	1	0,09
CHT2S2	0,05	39	1	0,09
	0,1	49	1	0,09
	0,2	57	1	0,09
	0,4	80	1	0,09
Héparine (10UI/mL)	0.1	>145	1	> 3.5
sang complet		30	1	0,09
sang+0,9%NaCl		31	1	0,09

^aTemps de céphaline activé, valeur normale 28-30s

^bTemps de prothrombine, exprimé en INR (International Normalized Ratio), valeur normale INR (0.8 et 1.2)

En outre, le CHT2S2 n'a pas montré d'effet sur le TP, ce qui signifie que le CHT sulfoné n'a pas d'effet sur la voie extrinsèque. Ce résultat est en accord avec des études déjà rapportées dans la littérature [6]. De plus, le CHT2S2 n'inhibe pas l'activité du facteur Xa (0.09 U/mL) contrairement à l'héparine (>3.5 U/mL). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le CHT2S2 a une masse molaire beaucoup plus élevée que celle de l'héparine. En effet, dans la littérature ce paramètre semble avoir un rôle important sur l'inhibition du facteur Xa. G. Vikhoreva *et al.* ont rapporté que le chitosan sulfoné peut avoir une activité anti-Xa comme l'héparine à condition que la masse molaire soit faible (M_v 8 000-10 000 $g \cdot mol^{-1}$) avec un fort pourcentage de soufre (15.7%) (310). Dans notre cas, le CHT2S2 a une masse molaire (mesurée par Chromatographie) de 56 000 $g \cdot mol^{-1}$ et un pourcentage de soufre de 9.14% (déterminé par analyse élémentaire).

III.2.1.2 Influence du rapport molaire R

La **Figure 129** montre l'évolution du TCA en fonction du rapport molaire R relatif à chaque chitosan sulfoné (CHT1S et CHT2S).

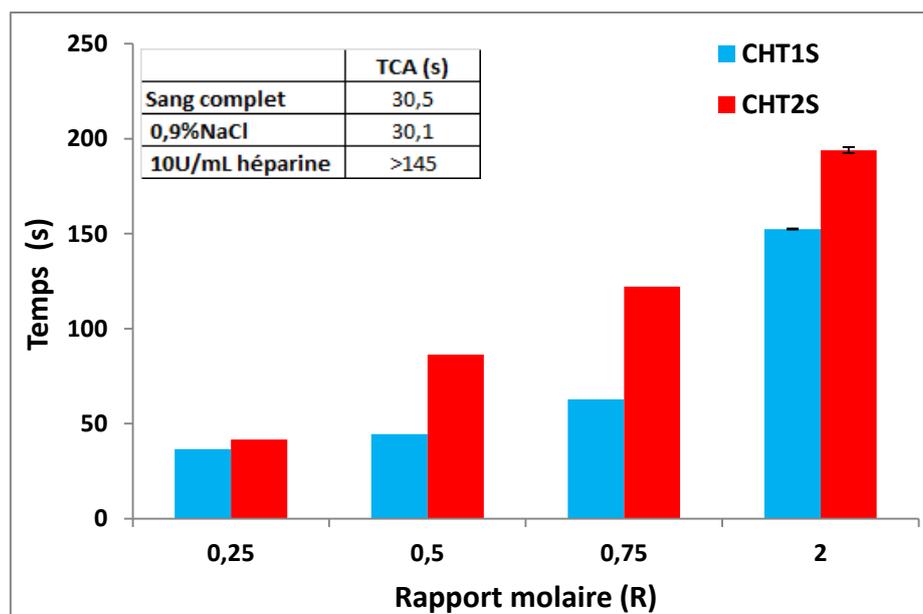


Figure 129 : TCA du CHT2S et CHT1S à différents rapport molaire R, concentration utilisée 1 mg/mL

On remarque que le temps de TCA est prolongé avec l'augmentation du rapport R (donc avec le DS). En effet, plus le polymère est substitué plus il y a de groupements sulfonates qui sont responsables de l'activité anticoagulante. De plus, à un rapport R équivalent, CHT2S montre un TCA supérieur à celui de CHT1S. Ceci est dû à la présence, à R équivalent, d'un plus grand nombre de groupements sulfonates dans CHT2S que dans CHT1S. A titre d'exemple, le CHT2S2 qui contient 2.85 mmol/g de SO_3^- a un TCA de 194 s, alors que CHT1S2 qui contient 2.29 mmol/g présente un TCA de 152.5 s. Il en résulte que l'activité anticoagulante du chitosan sulfonique est modulée par la densité de charges négatives produites par les groupements sulfonates. Ce résultat est en accord avec des études publiées dans la littérature démontrant que le TCA augmente avec la quantité de groupements sulfonates (6).

On remarque dans cette étude que la concentration choisie est de 1mg/mL. Celle-ci nous a permis de prolonger davantage le TCA jusqu'à 194 s (comparable au TCA de l'héparine (>145)) par rapport à l'étude précédente où un TCA de 80s a été mesuré par une 0.4mg/mL (cf. paragraphe III.2.1.1).

Dans cette étude également, ni CHT1S ni CHT2S n'ont démontré d'effet sur la voie extrinsèque (PT) et sur l'activité anti-Xa.

III.2.2 Activité anticoagulante nanofibres

Le **Tableau 34** représente le TCA en fonction de la masse de nanofibres de CHT2S2 par millilitre de sang en comparaison avec celui mesuré sur les poudres. Pour des raisons de solubilité et de viscosité la concentration maximale testée pour les poudres est de 4 mg/mL, et la concentration minimale des

NFs est de 1.6 mg/mL (qui correspond à 2 mg de NFs pour 1 mL) car en dessous la masse est très faible pour pouvoir peser les échantillons.

Tableau 34 : TCA à différentes concentrations de CHT2S2 à l'état poudreux et sous forme de NFs de CHT2S2/PEO (80/20)(w/w)

Echantillon	Masse de CHT2S2 par mL de sang (mg/mL)	TCA (s)
NFs (CHT2S2/PEO) (80/20) (w/w)	1,6	53 ± 3
	3,2	122 ± 11
	6,4	160 ± 22
	12,8	238 ± 10
Poudres	0,4	58 ± 3
	1	100 ± 24
	4	259 ± 12
Sang complet		30
0,9%NaCl		30
10U/mL héparine		>145

On remarque tout d'abord, que le TCA augmente considérablement avec l'augmentation de la masse de CHT2S2 sous la forme de poudres ou de nanofibres. Le temps est prolongé jusqu'à 238 s et 259 s pour respectivement une masse de 4 mg/mL de CHT2S2 en poudre et 12.8 mg/mL de CHT2S2 sous forme de NFs.

Par ailleurs, on constate que 1.6mg/ml de CHT2S2 en fibres ont montré un effet presque équivalent (53 s) à 0.4 mg/ml de CHT2S2 en poudre (58 s) et 4 mg/mL de CHT2S2 en poudre ont montré plus d'effet (259s) que 12.8mg/mL de CHT2S2 en NFs (238 s). Ceci est probablement dû à un changement de forme. Le CHT2S2 sous forme de nanofibres conserve malgré tout son activité anticoagulante.

Comme pour les poudres, les nanofibres de CHT2S2 n'ont pas démontré d'effet sur la voie extrinsèque (TP) ni sur l'inhibition du facteur Xa.

IV Etude de la cytotoxicité du chitosan sulfoné

La viabilité cellulaire a été évaluée sur les polymères de chitosan mono et di-sulfoné sous forme de poudres dans une première partie et sur des nanofibres de CHT2S2 et CHT1S2 dans une seconde partie par la méthode d'extraction (ISO 10993-5) avec la technique du Bleu Alamar. D'après la norme, une viabilité est acceptable si elle est supérieure à 70% par rapport au témoin TCPS.

IV.1 Etude de la viabilité des poudres

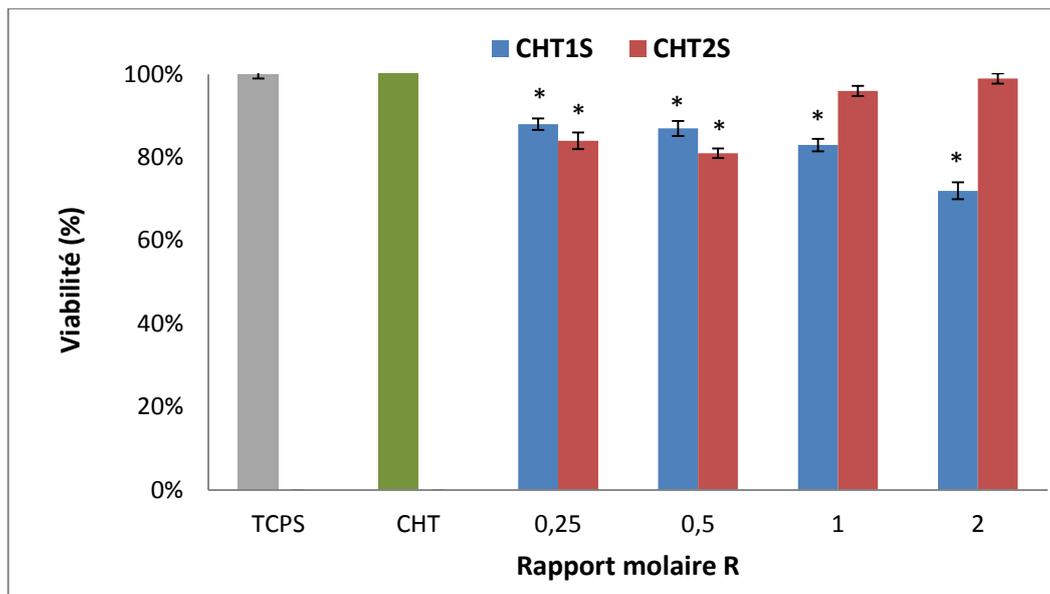


Figure 130 : Viabilité cellulaire en fonction du rapport molaire R des échantillons de CHT1S et CHT2S déterminée après 24h d'incubation par méthode d'extraction (n=6). Les données sont exprimées en % (moyenne \pm écart type) comparées au témoin TCPS (fond de la boîte de culture) (* $p < 0.001$)

La viabilité cellulaire après 24h d'incubation a été déterminée par méthode d'extraction sur les poudres de chitosan mono et di-sulfoné synthétisées avec différents rapports molaires R. Le CHT non-modifié a été utilisé comme témoin (R=0).

D'après la **Figure 130**, on remarque que pour $R < 1$, la viabilité des cellules est quasi équivalente vis-à-vis des ostéoblastes entre le CHT1S et le CHT2S et est en dessous de 80% mais reste très acceptable au regard de la norme. Étonnement, celle-ci décroît lorsque R augmente ($R \geq 1$) pour le CHT1S jusqu'à moins de 80% et une évolution contraire est observée pour le CHT2S (99% et 96% respectivement pour le CHT2S2 et CHT2S1). Cette expérience réalisée sur 6 réplicas, avec un écart type faible, et a été reproduite 3 fois et a montré la même tendance à chaque fois, ce qui confirme le phénomène observé.

Il est possible d'expliquer cette tendance opposée entre le CHT1S et le CHT2S par la proximité des groupements sulfonates en position ortho dans le cycle benzénique des amines secondaires qui pourraient créer des interactions hydrogènes (**Figure 117**) et par conséquent rendre ces groupements sulfonates non disponibles pour interagir avec les cellules. Dans le cas du CHT1S (qui contient un seul groupement sulfonate en position ortho), il aura donc très peu de fonctions sulfonates disponibles à interagir avec les cellules et ainsi plus ce polymère sera substitué et plus il devient cytotoxique. En revanche, le CHT2S contient deux groupements sulfonates un en position ortho et l'autre en position para. Celui en position para reste donc disponible pour interagir avec les cellules et assurer leur viabilité.

IV.2 Etude de la viabilité des nanofibres

La viabilité cellulaire a été également déterminée sur des nanofibres de chitosan mono et di-sulfoné après incubation pendant 24h par la méthode d'extraction.

La **Figure 131** présente les résultats de viabilité des cellules d'ostéoblastes sur les nanofibres de CHT2S2 et CHT1S2.

Dans le cas des nanofibres à base de CHT2S2, la viabilité est d'environ 91 % qui reste acceptable d'autant plus que l'étude statistique n'a pas montré de différence significative entre les nanofibres de CHT2S2 et le témoin ($p > 0.05$). Dans le cas des nanofibres de CHT1S2 la viabilité atteint 92% alors qu'à l'état de poudre ce polymère avait montré un effet cytotoxique sur les cellules (72%) (Cf. **Figure 130**). Ainsi, les polymères sous forme de nanofibres présentent une meilleure cytocompatibilité que sous forme de poudres. De plus, la présence du PEO dans les nanofibres (20% en masse) pourrait aussi jouer un rôle dans l'amélioration de la cytocompatibilité des polymères notamment du CHT1S2.

Ainsi, les résultats de viabilité cellulaire montrent que nos nanofibres ne libèrent pas de produits toxiques pour les cellules.

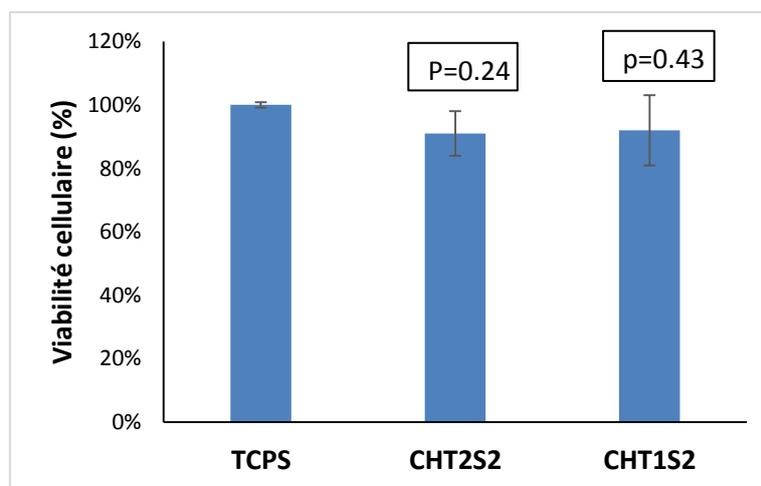


Figure 131 : Viabilité cellulaire sur des échantillons de nanofibres de CHT1S2/PEO (80/20) et CHT2S2/PEO (80/20) réticulées à la génipine à 0.1wt%, déterminée après 24h d'incubation par méthode d'extraction (n=6)

V Conclusion

Nous avons atteint notre objectif qui était de produire des nanofibres à activité anticoagulante à partir d'un chitosan modifié par des fonctions sulfoniques.

Nous avons dans un premier temps synthétisé deux gammes de CHT monosulfonés et di-sulfonés en greffant sur l'unité glucosamine du chitosan des groupements N-benzyl sulfoné ou di-sulfoné par réaction d'amination réductrice. Différents rapports molaires R entre les unités de répétition glucosamines présentes dans le CHT et les deux composés aldéhydiques sulfonés (BZ1S et BZ2S) ont été étudiés.

Pour les deux séries, le rapport molaire R s'est avéré avoir une influence directe sur le DS et la teneur en groupements sulfonates pour $0.15 < R < 1$. En revanche, les degrés de substitution ont atteint des valeurs stables pour $R > 1$. Pour R équivalent, la série des CHT1S a montré un DS supérieur à celle du CHT2S. En revanche, la teneur en groupements sulfoniques est plus grande pour la série CHT2S (toujours pour un R équivalent) grâce à la présence de deux groupements sulfonates sur son noyau benzénique. Les analyses physico-chimiques ont montré que les CHT sulfonés présentaient un caractère de polyampholytes grâce à la présence de groupements sulfonates et de groupements amines sur les chaînes polymères.

L'électrofilage des NFs de CHT2S2 et CHT1S2 a été possible par ajout du PEO à 20%. Des paramètres inhérents à l'électrofilage tels que la concentration, la distance aiguille collecteur et le débit ont été optimisés. La stabilité des NFs dans les milieux aqueux a été assurée par réticulation à la gènipine. Suite à un lavage dans du PBS (pH 7.4), les NFs ont gonflé de manière plus importante dans le cas du CHT1S2.

Pour l'évaluation de l'activité antithrombotique des polymères en poudre et des nanofibres, trois tests de coagulation ont été réalisés : le TCA, le TP et l'anti-Xa.

Tout d'abord, le rapport R relatif à chaque série a montré une influence sur le temps de coagulation TCA. Plus le rapport R était élevé plus le TCA était prolongé. De plus, pour un R équivalent, CHT2S a un effet anticoagulant plus important que CHT1S. On a conclu alors que le TCA dépendait du nombre de groupements sulfonates. L'activité antithrombotique a été conservée même après électrofilage, mais une plus grande masse de CHT2S2 électrofilé par ml de sang est nécessaire pour atteindre la même activité que celle produite par CHT2S2 en poudre. Il est à noter également que dans tous les cas, le CHT sulfoné n'a pas démontré d'activité sur la voie extrinsèque. Ceci est en accord avec la littérature. De plus, celui-ci n'a pas non plus d'activité anti-Xa contrairement à l'héparine. Ceci

signifie que le CHT sulfoné n'a pas le même mécanisme d'action sur les facteurs de coagulation que l'héparine.

Les CHT2S1 et CHT2S2 présentaient la meilleure cytocompatibilité, contrairement au CHT1S ayant des rapports R équivalents, grâce à la présence de deux groupements sulfonates. La cytocompatibilité pour des rapports R plus faibles reste acceptable au regard de la norme. Dans le cas des NFs, les deux polymères étudiés CHT2S2 et CHT1S2 conservent une cytocompatibilité acceptable.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans la thèse ont été effectués pour réaliser des membranes nanofibreuses par la technique d'électrospinning pour une activité antibactérienne ou antithrombotique. Notre choix s'est porté sur le Chitosan comme polymère de base pour l'élaboration de nanofibres, pour plusieurs raisons: i) il a des propriétés intrinsèques intéressantes (hémostatique, antibactérienne, etc..) ii) c'est un polymère cationique dont la charge dépend du pH ce qui offre la possibilité de contrôler la libération de principes actifs ou de l'associer avec un polymère anionique par formation de complexe de polyélectrolytes, iii) Il présente des fonctions hydroxyles et amines qu'il est possible de le modifier avec des groupes fonctionnels pour lui apporter des propriétés supplémentaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à la réalisation de supports nanofibreux à base de Chitosan capables de libérer de manière prolongée un agent antibactérien, le Triclosan.

Une étude de faisabilité de l'électrofilage du CHT a été réalisée et les paramètres qui ont permis d'obtenir des NFs uniformes et sans défauts ont été optimisés.

Des nanofibres de chitosan chargées de TCL stabilisées par un traitement thermique ou par réticulation chimique par la génipine ont pu être élaborées pour limiter leur dégradation en milieu tamponnés (pH 5.5 et pH 7.4). La libération du TCL à partir de ces NFs a été prolongée jusqu'à 7 jours avec 80% de principe actif libéré au bout de 24 heures avec un effet burst assez important (70% après 4 heures)

Afin de réduire cet effet *burst*, notre stratégie s'est portée sur l'utilisation du savoir-faire du laboratoire en associant le Chitosan à un polymère anionique de cyclodextrines (PCD). La présence de charges négatives permet de former un complexe de polyélectrolytes et la présence de cyclodextrines de former des complexes d'inclusion avec des molécules d'intérêt. Cette association a été utilisée pour former des assemblages multicouches déposés sur supports textiles ou encore dans la préparation d'hydrogels. Dans le cas présent, nous avons proposé de former directement un textile nanofibreux à partir de ces deux polymères.

Nous avons pour cela exploité deux stratégies : une première où les deux polyélectrolytes ont été mélangés formant ainsi des nanofibres monolithiques et une seconde où des NFs cœur-peau ont été obtenues par électrospinning coaxial, dont la peau; la peau était formée de chitosan et le cœur de polymère de cyclodextrine.

La 1^{ère} stratégie a permis d'obtenir des NFs riches en PCD avec 66% de PCD. La présence de PCD a amélioré la stabilité des NFs notamment à pH 5.5 dans la mesure où les NFs sans PCD se sont solubilisées spontanément, ce qui témoigne de l'intérêt du complexe ionique formé entre le CHT et

le PCD. Ce complexe a également montré son intérêt sur la cinétique de libération du TCL particulièrement à pH 5.5. Un effet *burst* limité et une libération prolongée ont été obtenus lorsque le TCL formait un complexe d'inclusion avec le PCD notamment lorsque les fibres étaient riches en PCD. Par contre, lorsque le TCL était dispersé dans la matrice de CHT ou formait un complexe d'inclusion avec le monomère de CD, le principe actif était libéré rapidement. Le PCD permet de ralentir la diffusion du complexe CD/TCL en le maintenant dans la matrice polymère grâce à la formation d'un complexe de polyélectrolytes dense.

La 2^{ème} stratégie a permis d'obtenir des NFs en cœur-peau à partir de deux polyélectrolytes pour la libération d'un principe actif. L'étude a montré que lorsque le débit de peau était faible conduisant à une faible épaisseur de peau, une morphologie cœur-peau plus homogène et plus concentrique était obtenue. Ceci se répercutait sur la libération du TCL qui était davantage ralentie dans le cas des NFs présentant l'épaisseur de peau la plus faible ont présenté une libération plus prolongée.

La comparaison des cinétiques de libération obtenues à partir de NFs monolithiques et coaxiales de CHT-PCD, et celles sans PCD (CHT/TCL) a montré une libération plus prolongée (25 jours) avec les NFs monolithiques CHT-PCD (notamment les plus riches en PCD).

L'évaluation microbiologique a permis de montrer que le TCL gardait son activité antibactérienne après l'électrofilage et après le traitement thermique. L'activité antibactérienne du TCL est en accord avec les études de cinétique de libération puisque les NFs monolithiques les plus riches en PCD ont montré une activité prolongée jusqu'à 9 jours.

Les résultats de cytocompatibilité par la méthode d'extraction ont montré que les nanofibres ne libéraient pas de substances toxiques. En revanche, les résultats en contact direct ne sont pas encore acceptables probablement du à la présence de traces d'acide acétique. Un traitement pour éliminer ces traces d'acide acétique est à envisager.

L'élaboration de NFs à base de polymère de cyclodextrine formant un complexe de polyélectrolyte permettant la libération prolongée d'un agent antibactérien est une approche originale. A notre connaissance, il n'y pas encore d'étude similaire dans la littérature. Ces NFs à activité antibactérienne prolongée pourraient être appliquées pour le traitement des infections aiguës ou des ulcères notamment chez des patients diabétiques. Cependant, certains critères sont à prendre en compte tels que la cytocompatibilité à améliorer et la cicatrisation à 8 semaines d'une plaie.

Dans un second temps, nous avons effectué une modification du CHT en greffant sur sa position N des groupements sulfonates par amination réductrice afin de lui apporter une activité antithrombotique. Le contrôle du rapport molaire entre les aldéhydes mono ou disulfoniques et les

groupements amines du CHT a été effectué dans le but d'obtenir un polymère riche en groupements sulfonates et dont les groupements amines libres sur l'unité de répétition glucosamine ne soient pas totalement substitués car ces groupements amines présentent un rôle majeur dans l'activité biologique du CHT. Différentes méthodes de caractérisations ont été employées, quantitatives, semi-quantitative et qualitatives.

L'originalité des polymères obtenus est leur caractère polyampholyte. Certains sont solubles à pH fortement basique ou fortement acide en fonction de leur degré de modification et de la présence d'un ou deux groupes sulfonates sur le réactif utilisé.

Dans la littérature, on trouve de nombreuses publications sur la synthèse de chitosans sulfonés à activité anticoagulante, testés en dispersion ou sous forme de films. Mais l'innovation dans nos travaux est la préparation d'une surface intrinsèquement anticoagulante grâce à l'électrofilage du chitosan sulfoné. Notre choix s'est porté vers le CHT mono et disulfoné qui présentaient le plus haut DS de leurs séries. Nous avons par la suite réussi à obtenir des nanofibres régulières grâce à l'optimisation des paramètres de solution et d'instrumentation. Les tests d'hémocompatibilité ont montré une absence d'hémolyse et une activité antithrombotique conservée même après électrofilage du chitosan sulfoné.

L'étude de la prolifération des cellules ainsi que l'adhésion plaquettaire sur les nanofibres de CHT sulfoné sont à prévoir. Une fois ces aspects maîtrisés, les applications de ces surfaces nanofibreuses antithrombotiques apparaissent nombreuses, notamment pour les biomatériaux qui sont amenés à être en contact avec le sang.

Perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire ont amené à réfléchir aux applications possibles des NFs à base du mélange CHT-PCD/TCL, ainsi que celle à base du CHTsulfoné. Voici les perspectives qui découlent de ces réflexions.

1. Dépôt de NFs sur un support textile pour élaborer un pansement pour le traitement des plaies chroniques

Les plaies chroniques (escarres, ulcères des jambes, plaies du pied diabétique, etc.) sont des plaies qui nécessitent un temps de cicatrisation à plus de 8 semaines. Pour cela un dispositif antibactérien à libération prolongée pourrait être une solution thérapeutique à ce genre problème.

Afin de pouvoir utiliser les NFs en tant que pansements il faut leur apporter un support pour les maintenir sur le site de la plaie comme c'est le cas de nombreux pansements. Les NFs à base de CHT-PCD/TCL ont démontré une activité antibactérienne prolongée sur 9 jours, elles auront donc le rôle d'empêcher le développement des bactéries. Une telle libération permettrait de limiter les fréquences de changements de pansements si l'environnement de la plaie reste humide. Les NFs sont connues pour leur porosité ce qui permettra le maintien d'un taux d'humidité et de température propices à la guérison de la plaie grâce aux échanges gazeux avec l'extérieur. Quant au support textile supplémentaire, il aura comme rôle de support mécanique aux NFs, de les maintenir le pansement sur le site de la plaie.

Les NFs dans le cas présent devront bien adhérer sur le textile. Il existe de nombreuses solutions comme par exemple l'application d'une pression mécanique ou encore le traitement du textile par plasma.

2. L'utilisation des NFs de CHT-PCD pour la libération d'antibiotiques pour le traitement des infections osseuses

Le système de CHT-PCD ne se limite pas seulement à la libération du TCL, il est possible d'envisager l'incorporation d'un antibiotique tel que la ciprofloxacine pour le traitement des infections osseuses. Lors du remplacement d'un défaut osseux suite à une ostéite, le chirurgien procède au remplacement par un biomatériau, généralement minéral (hydroxyapatite). Certaines technologies et particulièrement l'électrospinning permette d'obtenir une structure des matériaux mimant la matrice extracellulaire, ce qui en fait des candidats de choix pour la reconstruction osseuse. Néanmoins, ce matériau seul ne peut avoir des propriétés antibactériennes suffisantes. L'idée est donc d'incorporer la CFX, largement utilisée en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale pour obtenir des propriétés antibactériennes prolongées. Nous avons démontré la faisabilité de ce système en

électrofilant des NFs de CHT/CFX contenant 5% de CFX et CHT-PCD8/CFX5 en suivant la même méthodologie. La cinétique de libération en mode dynamique a été ensuite réalisée (cf. **Figure 132**). Les résultats montrent un effet *burst* important pour les NFs de CHT/CFX5 avec 56.4 % de CFX de libéré après seulement 10 minutes alors que pour les NFs de CHT-PCD8/CFX, seulement 37.5% est libéré en 10 min. La CFX se libère encore progressivement à partir de ces deux NFs avec une quantité plus importante dans le cas des NFs CHT-PCD8/CFX. Ceci permet de conclure que la PCD améliore la solubilité de la CFX, paramètre important pour sa biodisponibilité. Cette perspective fait l'objet d'un projet de thèse en cours dans notre laboratoire.

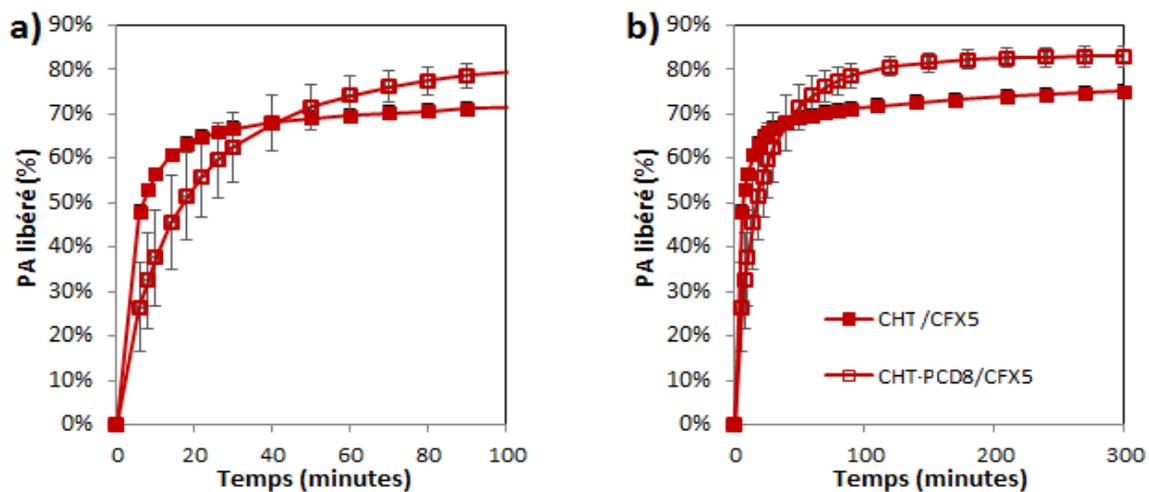


Figure 132 : Cinétique de libération en mode dynamique à pH 7.4, 37°C, 35 ml/min de la CFX à partir de NFs de CHT/CFX5 et CHT-PCD8/CFX5

3. Electrofilage sur un stent enrobé de nanofibres à activité anticoagulante

Les stents sont utilisés pour le traitement des maladies coronariennes. Suite à l'implantation de ces stents, un phénomène de resténose (30%) et thrombose (5%) peut survenir. Une stratégie pour limiter la resténose est de couvrir le stent avec un textile (actuellement tissé). Néanmoins le risque de thrombose subsiste. La solution d'activer les stents nus par des agents antithrombotiques a déjà été étudiée dans la littérature mais le risque de resténose dans ce cas persiste. L'originalité de cette perspective est d'enrober la surface d'un stent par un polymère intrinsèquement antithrombotique. L'idée est donc d'électrofiler le CHT2S2 dans notre cas est d'enrober la surface externe du stents par des NFs de CHT sulfoné (CHT2S2). Cette idée fait l'objet d'un projet de thèse qui vient de débiter dans notre laboratoire.

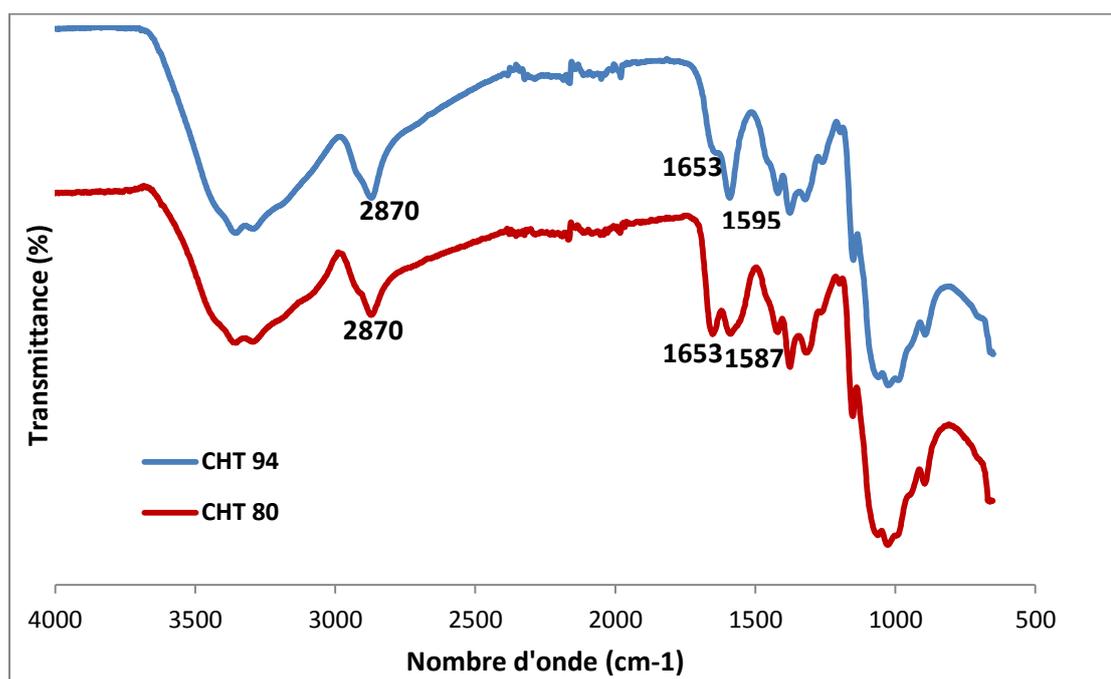
Annexes

Annexe 1

Détermination du degré de désacétylation (DD) des CHTs par IR et par RMN

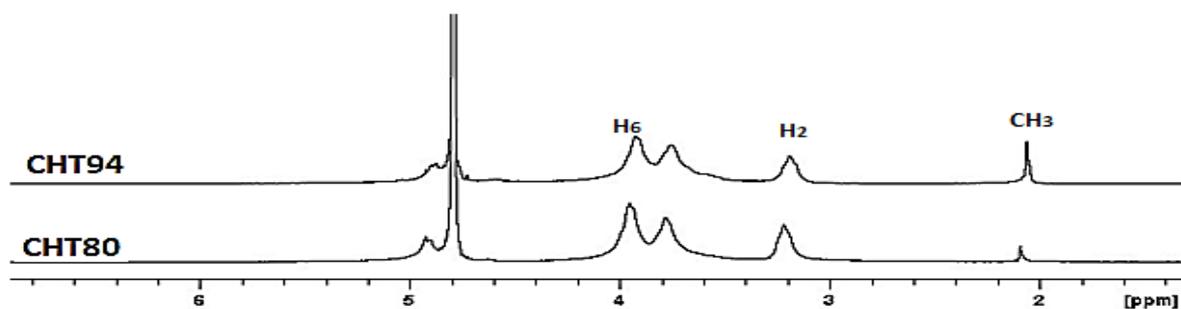
1. Par IR

$$DA(\%) = (A_{1653}/A_{2870}) * (100/1,33)$$



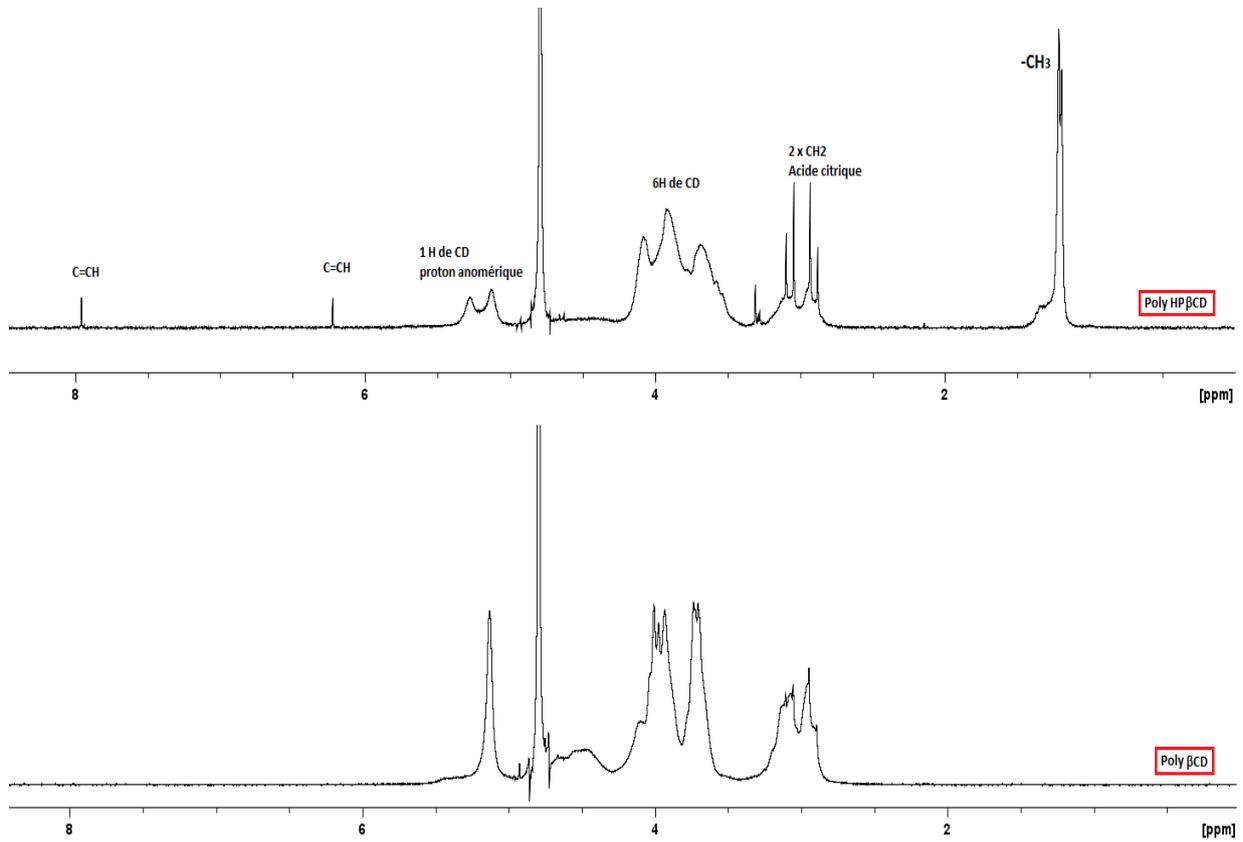
2. Par RMN

$$DD(\%) = \frac{1 - \left(\frac{1}{3}\right) * \text{aireCH}_3}{\left(\frac{1}{6}\right) * \text{aireH}_2 - \text{aireH}_6}$$



Annexe 2

Spectres RMN du proton du poly β CD et du polyHP β CD



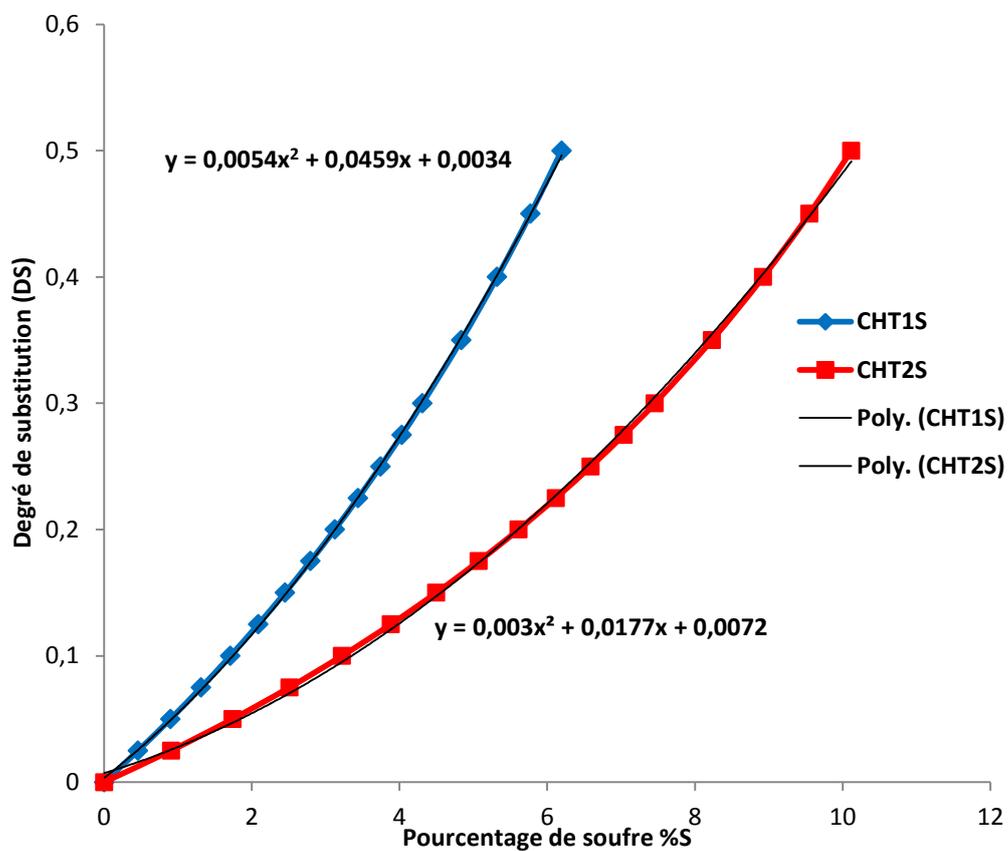
Annexe 3

Concentration minimale inhibitrice du TCL

- La souche bactérienne est préalablement repiquée sur une gélose inclinée Mueller Hinton Agar (MHA) dans un tube incubé à 24h à 37°C. Les colonies sont ensuite décrochées et remises en suspension dans un milieu Ringer Cystéiné 5RC) et la solution est diluée afin d'avoir une concentration plus faible, de l'ordre de 10^4 .
- Une solution du TCL à 500 ppm dissout dans du DMSO dilué à 10% a été préparée.
- Dans chaque puits d'une ligne d'une plaque de 96 puits (1 plaque par souche bactérienne), on introduit 100 μ L de milieu RC puis est ajouté 100 μ L d'une solution TCL uniquement dans le premier puit. On prélève 100 μ L de la solution TCL+RC de ce premier puits, que l'on dépose dans le second puits, puis 100 μ L de la solution du second puits que l'on dépose dans le troisième puits, etc... Par ces dilutions successives, on obtient une gamme de concentrations variables en TCL avec 100 μ L de solution dans chaque puits, en veillant à enlever les 100 μ L de surplus dans le dernier puits. On ajoute ensuite 100 μ L de la suspension bactérienne dans chaque puits. Les témoins positifs correspondent à 100 μ L de la suspension bactérienne dans chaque puits. Les témoins négatifs correspondent à 100 μ L du milieu RC et 100 μ L de DMSO à 10%.
- Les plaques sont finalement incubées à 37°C, pendant 24h et 48h. La CMI est définie comme la plus basse concentration à laquelle il n'y a pas de croissance visible, ce qui se traduit par la concentration du premier puits ne présentant pas le trouble en solution, caractéristique de la croissance bactérienne.

Annexe 4

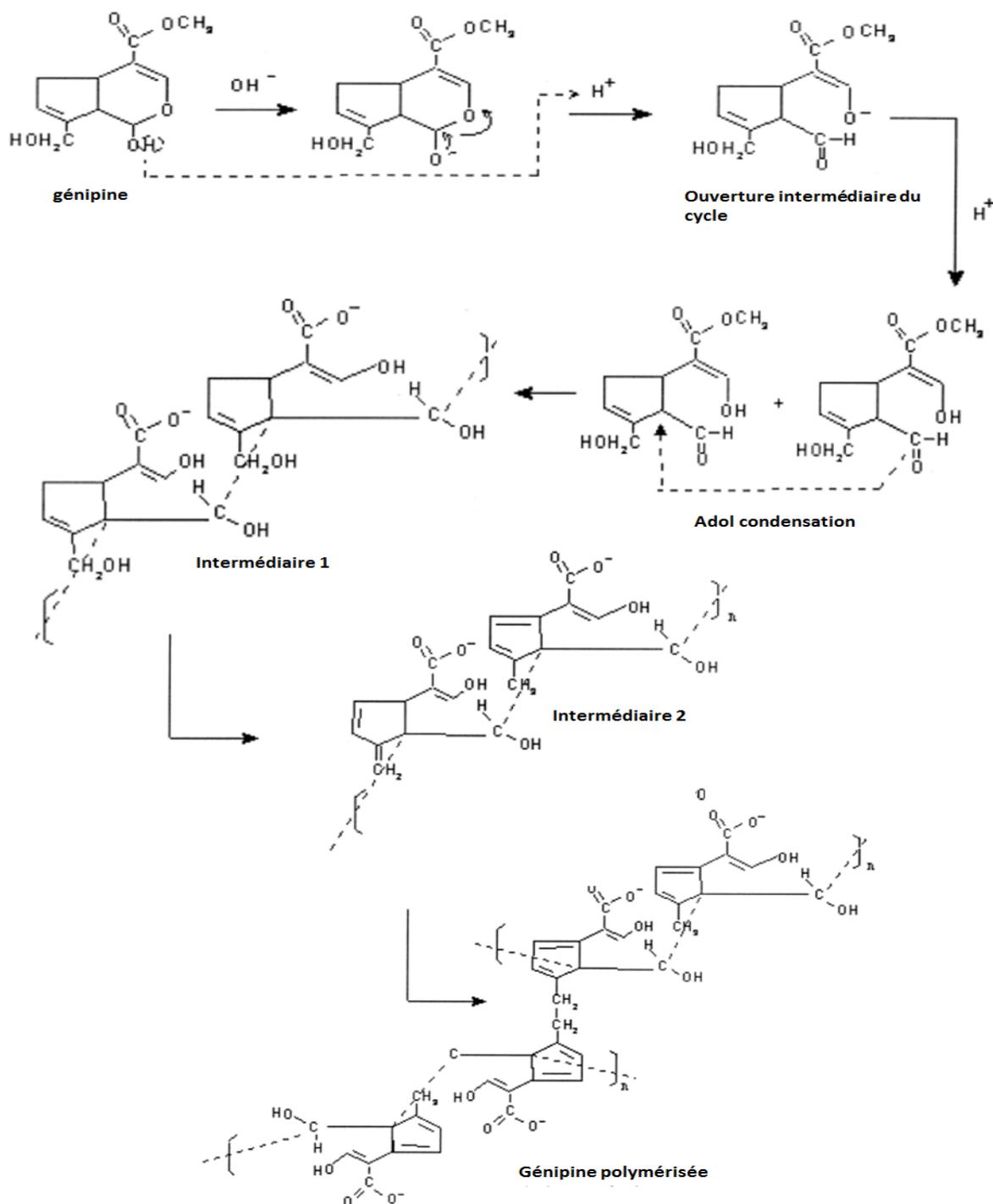
Courbes théoriques de l'analyse élémentaire



Courbes des DS en fonction du pourcentage de soufre

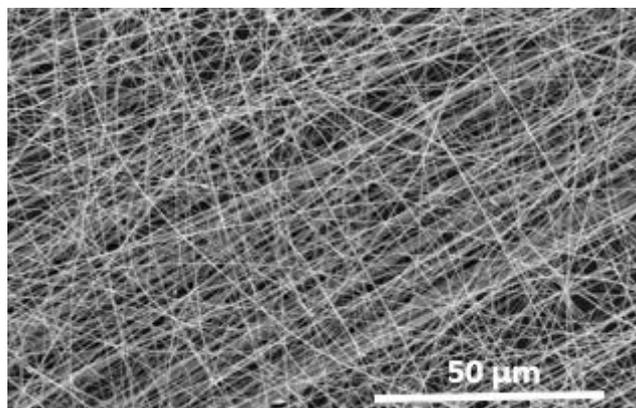
Annexe 5

Mécanisme de l'étape 1 de la réaction de réticulation du CHT et la génipine à pH basique



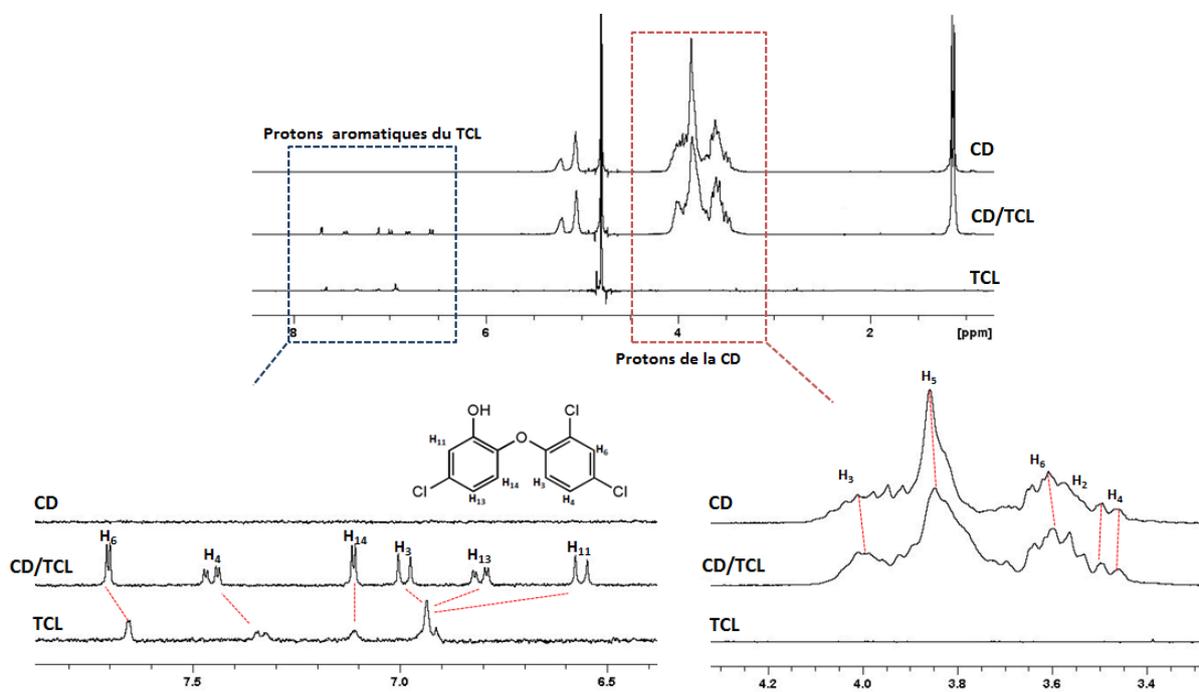
Annexe 6

Photo MEB de NFs CHT/TCL alignées obtenues par deux électrodes parallèles (x900)



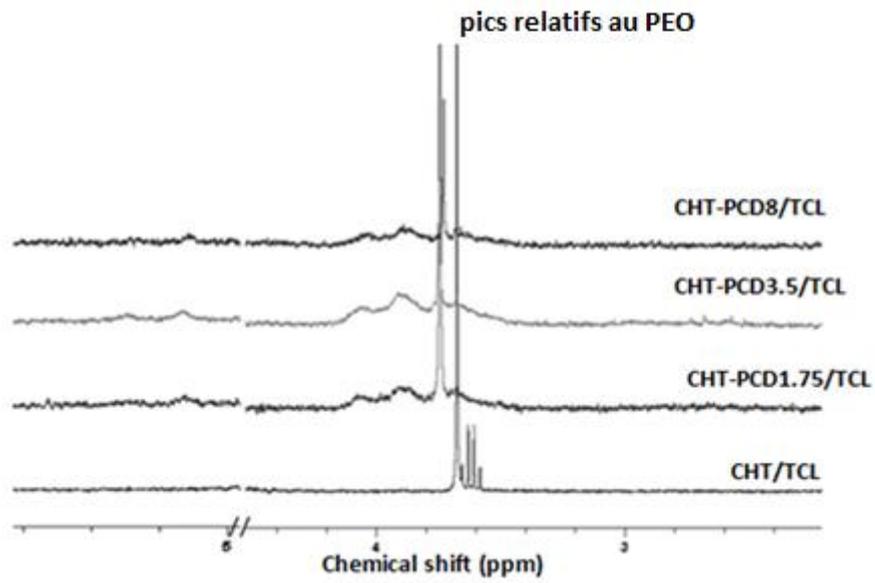
Annexe 7

Etude RMN du complexe TCL/CD équiolaire dans le D₂O



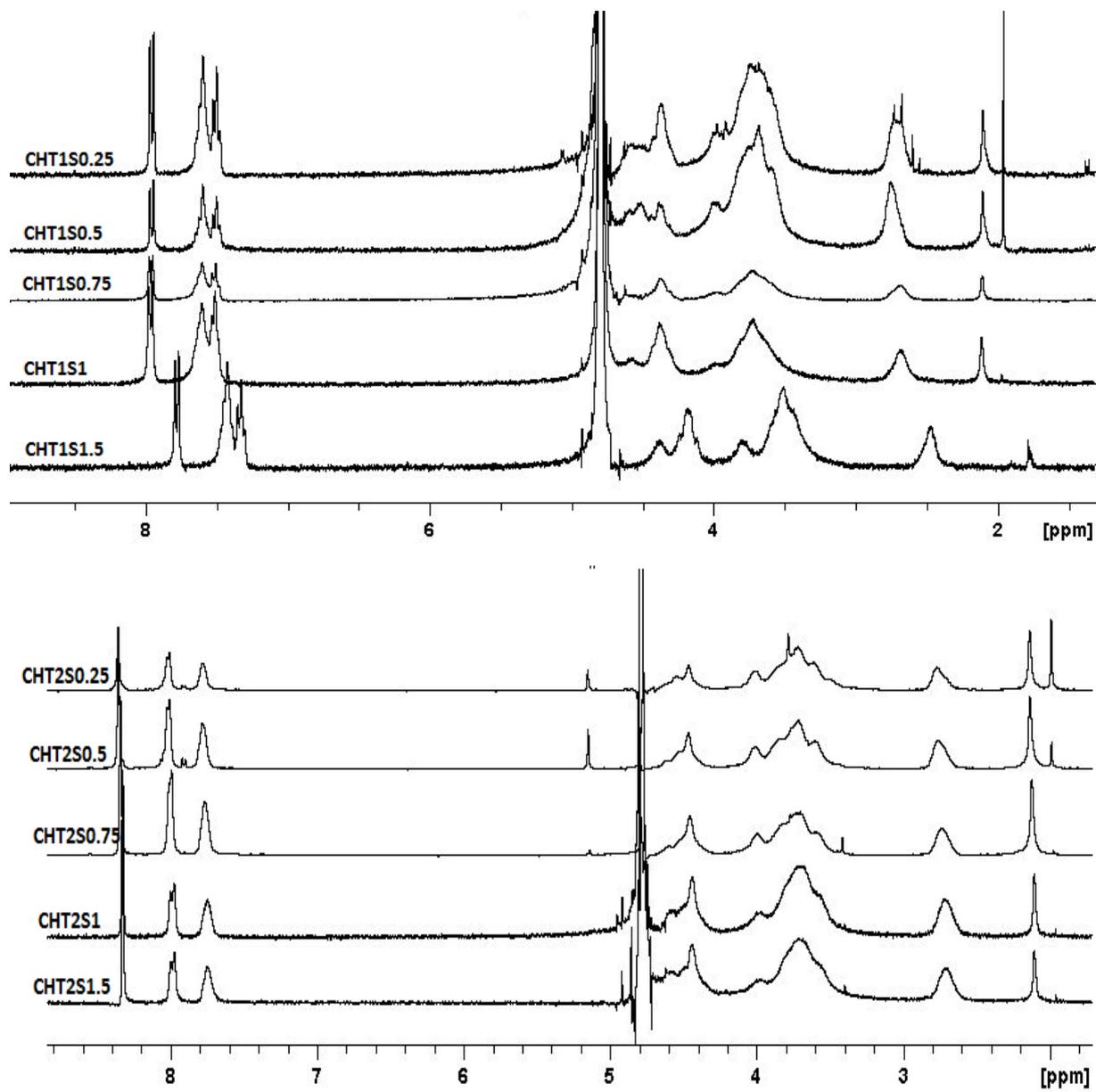
Annexe 8

RMN de proton du milieu de dégradation des NFs récupéré puis lyophilisé



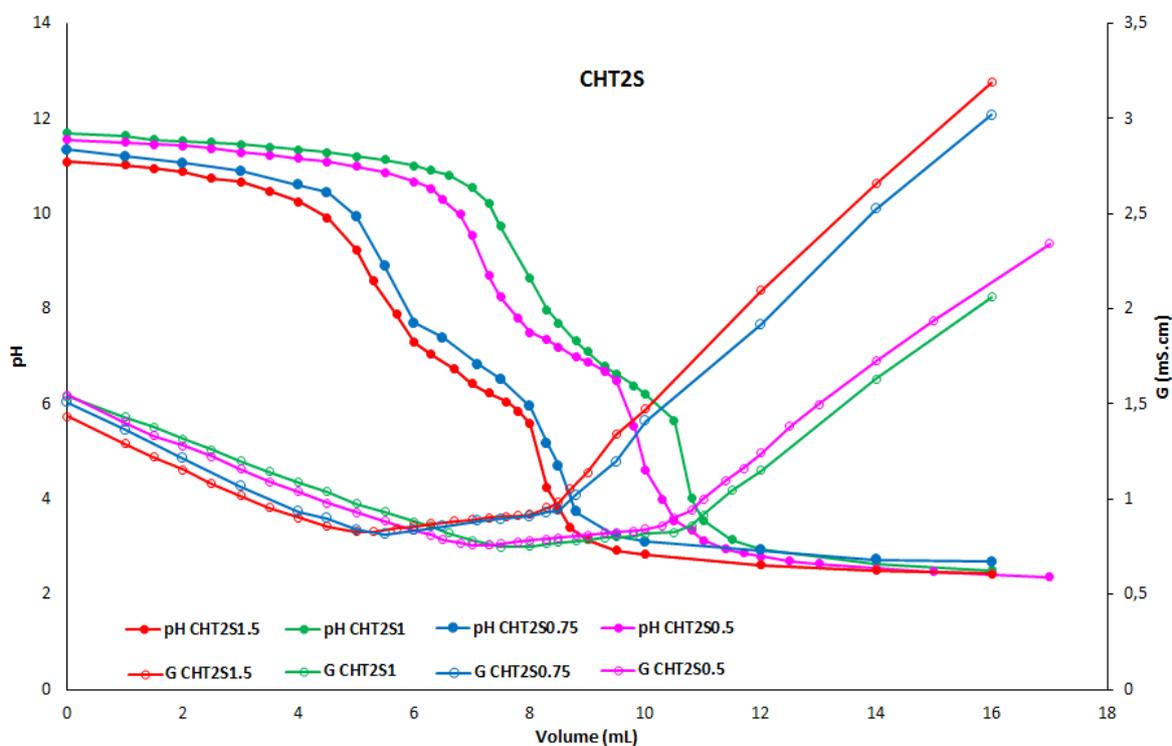
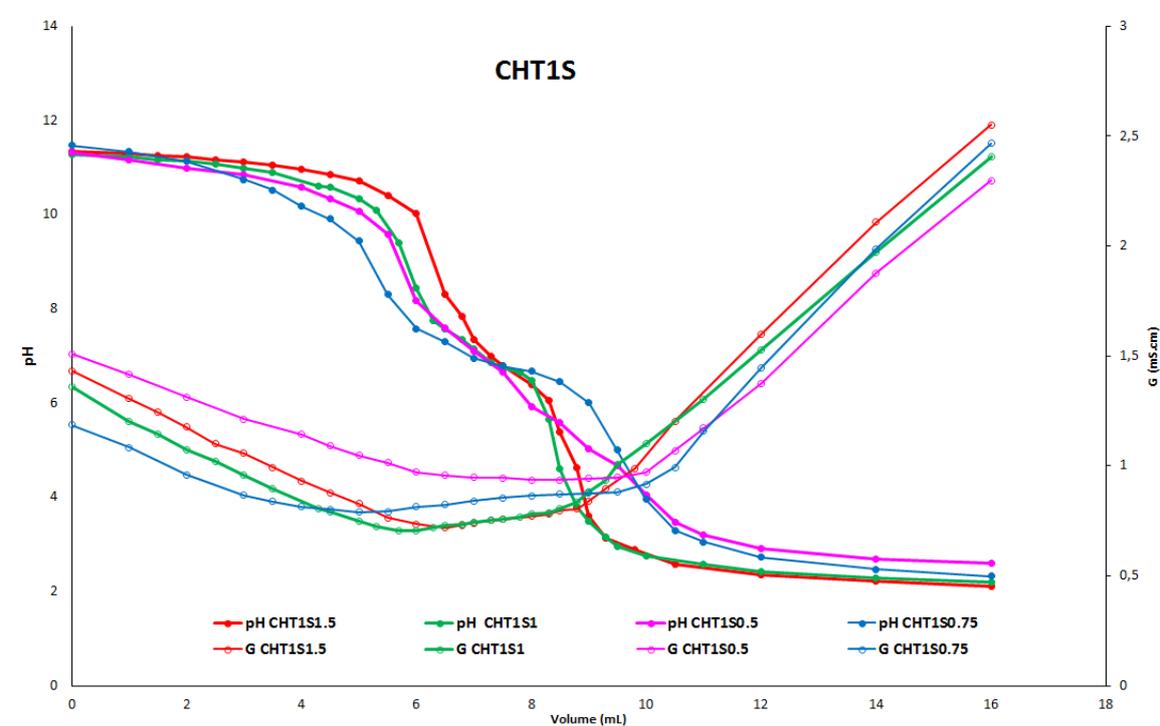
Annexe 9

Spectres RMN du proton des Chitosans mono et disulfoné (R= 1.5,1, 0.75,0.5,0.25)



Annexe 10

Courbe de titrations par pHmétrie et conductimétrie de la série CHT1S et CHT2S



Liste des travaux et des communications

Publications :

Safa Ouerghemmi, Stéphanie Degoutin, Nicolas Tabary, Frédéric Cazaux, Mickaël Maton, Valérie Gaucher, Ludovic Janus, Christel Neut, Feng Chai, Nicolas Blanchemain and Bernard Martel, *Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex*, International Journal of Pharmaceutics, Volume 513, Issues 1–2, 2016, Pages 483-495

«Polyampholyte chitosan modified with formylbenzene sulfonate derivatives: an investigation of the synthesis parameters artificial GAG» EN PREPARATION

Communications:

Safa Ouerghemmi, Syrine Dimassi, Stéphanie Degoutin, Nicolas Tabary, Frédéric Cazaux, Ludovic Janus, Feng Chai, Nicolas Blanchemain and Bernard Martel, *Synthesis and Electrospinning of a sulfonated chitosan as an artificial GAG for tissue engineering*, 10th World Biomaterial Congress, Montréal, Canada, Mai 2016 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, Stéphanie Degoutin, Nicolas Tabary, Frédéric Cazaux, Ludovic Janus, Feng Chai, Nicolas Blanchemain and Bernard Martel, *Chitosan based electrospun nanofibres for Ciprofloxacin controlled release*, 10th World Biomaterial Congress, Montréal, Canada, Mai 2016 (**Poster**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, F. Cazaux, L. Janus, N. Blanchemain, B. Martel, *Biomatériaux à base de nanofibres pour la libération de Triclosan*, *Biomat2015*, Ile de Ré, France, Octobre 2015 (**Poster**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, F. Cazaux, L. Janus, N. Blanchemain, B. Martel, *Electrospun cyclodextrin functionalized chitosan nanofibres for Triclosan release*, *EuroCD2015*, Lille, France, Octobre 2015 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, F. Cazaux, L. Janus, N. Blanchemain, B. Martel, *Electrospun Triclosan-Loaded Chitosan Nanofibres for Potential Drug Delivery Application*, European Symposium of Biomaterials ESB2015, Krakow, Pologne, Septembre 2015 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, F. Cazaux, L. Janus, N. Blanchemain, F. Chai, B. Martel, *Electrospinning of a Chitosan Based Artificial GAG for Tissue Engineering Application*, European Symposium of Biomaterials ESB2015, Krakow, Pologne, Septembre 2015 (**Poster**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, L. Janus, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel, *Electrospinning de biomatériaux nanofibreux pour la libération prolongée de principes actifs*, Journée des jeunes polyméristes du Nord, Villeneuve d'Ascq, juin 2015 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, L. Janus, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel, *Electrospinning and crosslinking of chitosan based nanofibres for potential drug delivery applications*, 6th international Conference of Applied Research on Textile, Hammamet, Tunisie, Novembre 2014 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, L. Janus, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel, *Biomatériaux à base de nanofibres pour la libération prolongée de médicaments*, 16^{ème} Journées Cyclodextrines, Amiens, France, Octobre 2014 (**Communication orale**)

Safa Ouerghemmi, S. Degoutin, N. Tabary, L. Janus, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel, *Biomatériaux à base de nanofibres pour la libération prolongée de médicaments*, Journée Nord-Ouest Européennes des jeunes chercheurs, Villeneuve d'Ascq, France, Juin 2014 (**Communication orale**)

Références Bibliographiques

1. Blanchemain N, Karrout Y, Tabary N, Bria M, Neut C, Hildebrand HF, et al. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr Polym.* 6 nov 2012;90(4):1695-703.
2. Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET Prostheses Surface Modification with Cyclodextrin Coating: Development of a New Drug Delivery System. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* juin 2005;29(6):628-32.
3. Vermet G, Degoutin S, Chai F, Maton M, Bria M, Danel C, et al. Visceral mesh modified with cyclodextrin for the local sustained delivery of ropivacaine. *Int J Pharm.* 10 déc 2014;476(1-2):149-59.
4. Tabary N, Chai F, Blanchemain N, Neut C, Pauchet L, Bertini S, et al. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta Biomater.* janv 2014;10(1):318-29.
5. Degoutin S, Jimenez M, Chai F, Pinalie T, Bellayer S, Vandenbossche M, et al. Simultaneous immobilization of heparin and gentamicin on polypropylene textiles: A dual therapeutic activity. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(11):3846-3854.
6. Tamada Y. Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity. *Biomaterials.* févr 2004;25(3):377-83.
7. Yang J, Du Y, Huang R, Wan Y, Wen Y. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: Effect of carboxyl group and position of sulfation. *Int J Biol Macromol.* juill 2005;36(1-2):9-15.
8. Ronghua H, Yumin D, Jianhong Y. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives. *Carbohydr Polym.* 1 avr 2003;52(1):19-24.
9. Vongchan P, Sajomsang W, Subyen D, Kongtawelert P. Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. *Carbohydr Res.* 16 juill 2002;337(13):1239-42.
10. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol.* nov 2003;63(15):2223-53.
11. Feng L, Xie N, Zhong J. Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications. *Materials.* 15 mai 2014;7(5):3919-45.
12. Dai Y, Liu W, Formo E, Sun Y, Xia Y. Ceramic nanofibers fabricated by electrospinning and their applications in catalysis, environmental science, and energy technology. *Polym Adv Technol.* 1 mars 2011;22(3):326-38.
13. Owida A, Xiu MM, Wong CS, Morsi YS. Electrospinning of nanofibres for construction of vital organ replacements. In 2006. p. 585-7.

14. Townsend-Nicholson A, Jayasinghe SN. Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds. *Biomacromolecules*. déc 2006;7(12):3364-9.
15. Ma K, Yong T, Chan KC, Ramakrishna S. Collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: Potential substrates for wound healing in skin tissue engineering. In 2007. p. 262-6.
16. Rayleigh, Lord. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos Mag Ser 5*. 1 sept 1882;14(87):184-6.
17. Formhals A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US1975504, 1934.
18. Formhals A. Method and apparatus for spinning. US2349950, 1944.
19. Anton F, Gastell RS. Artificial thread and method of producing same. US2145076A, 1939.
20. Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. 1996;7(3):216.
21. Reneker DH, Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 13 mai 2008;49(10):2387-425.
22. Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys*. 1 mai 2000;87(9):4531-47.
23. Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, et al. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog Polym Sci*. mai 2014;39(5):862-90.
24. Yang Q, Li Z, Hong Y, Zhao Y, Qiu S, Wang C, et al. Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 15 oct 2004;42(20):3721-6.
25. Colby RH, Fetters LJ, Funk WG, Graessley WW. Effects of concentration and thermodynamic interaction on the viscoelastic properties of polymer solutions. *Macromolecules*. 1 juin 1991;24(13):3873-82.
26. McKee MG, Wilkes GL, Colby RH, Long TE. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules*. 1 mars 2004;37(5):1760-7.
27. Cheng F, Gao J, Wang L, Hu X. Composite chitosan/poly(ethylene oxide) electrospun nanofibrous mats as novel wound dressing matrixes for the controlled release of drugs. *J Appl Polym Sci*. 2015;132(24).
28. Rieger KA, Birch NP, Schiffman JD. Electrospinning chitosan/poly(ethylene oxide) solutions with essential oils: Correlating solution rheology to nanofiber formation. *Carbohydr Polym*. 30 mars 2016;139:131-8.
29. Zhou Y, Yang H, Liu X, Mao J, Gu S, Xu W. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *Int J Biol Macromol*. févr 2013;53:88-92.

30. Jacobs V, Anandjiwala RD, Maaza M. The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers. *J Appl Polym Sci*. 5 mars 2010;115(5):3130-6.
31. Tan S-H, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*. 25 juill 2005;46(16):6128-34.
32. Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. juill 2002;43(16):4403-12.
33. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. mai 2008;29(13):1989-2006.
34. Theron SA, Zussman E, Yarin AL. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*. mars 2004;45(6):2017-30.
35. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*. 1 oct 2002;35(22):8456-66.
36. Haider A, Haider S, Kang I-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem*.
37. Doshi J, Reneker DH. Selected papers from the special technical session « Electrostatics in Polymer Processing and Charge Monitoring », 1993 IEEE Industry Applications Society Meeting Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat*. 1 août 1995;35(2):151-60.
38. Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*. 27 juin 2005;46(14):5094-102.
39. Heikkilä P, Harlin A. Parameter study of electrospinning of polyamide-6. *Eur Polym J*. oct 2008;44(10):3067-79.
40. Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. févr 2004;25(5):877-86.
41. Su B, Wu Y, Jiang L. The art of aligning one-dimensional (1D) nanostructures. *Chem Soc Rev*. 2012;41(23):7832-56.
42. Nedjari S, Schlatter G, Hébraud A. Thick electrospun honeycomb scaffolds with controlled pore size. *Mater Lett*. 1 mars 2015;142:180-3.
43. Faccini M, Vaquero C, Amantia D. Development of Protective Clothing against Nanoparticle Based on Electrospun Nanofibers. *J Nanomater*. 2012;2012.
44. Oh B, Lee CH. Advanced cardiovascular stent coated with nanofiber. *Mol Pharm*. 2 déc 2013;10(12):4432-42.
45. Fee T, Surianarayanan S, Downs C, Zhou Y, Berry J. Nanofiber Alignment Regulates NIH3T3 Cell Orientation and Cytoskeletal Gene Expression on Electrospun PCL+Gelatin Nanofibers. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0154806.

46. Kolambkar YM, Bajin M, Wojtowicz A, Hutmacher DW, García AJ, Guldborg RE. Nanofiber orientation and surface functionalization modulate human mesenchymal stem cell behavior in vitro. *Tissue Eng Part A*. janv 2014;20(1-2):398-409.
47. Huang C, Geng X, Qinfei K, Xiumei M, Al-Deyab SS, El-Newehy M. Preparation of composite tubular grafts for vascular repair via electrospinning. *Prog Nat Sci Mater Int*. avr 2012;22(2):108-14.
48. He W, Ma Z, Teo WE, Dong YX, Robless PA, Lim TC, et al. Tubular nanofiber scaffolds for tissue engineered small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*. juill 2009;90(1):205-16.
49. Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. mai 2004;25(10):1883-90.
50. Pelipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm*. 30 avr 2015;484(1-2):57-74.
51. 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(5):1357-62.
52. Putti M, Simonet M, Solberg R, Peters GWM. Electrospinning poly(ϵ -caprolactone) under controlled environmental conditions: Influence on fiber morphology and orientation. *Polymer*. 20 avr 2015;63:189-95.
53. Loscertales IG, Barrero A, Guerrero I, Cortijo R, Marquez M, Gañán-Calvo AM. Micro/Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets. *Science*. 1 mars 2002;295(5560):1695-8.
54. Sun Z, Zussman E, Yarin A I., Wendorff J h., Greiner A. Compound Core-Shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning. *Adv Mater*. 17 nov 2003;15(22):1929-32.
55. Nguyen TTT, Chung OH, Park JS. Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. *Carbohydr Polym*. 15 oct 2011;86(4):1799-806.
56. Ma G, Fang D, Liu Y, Zhu X, Nie J. Electrospun sodium alginate/poly(ethylene oxide) core-shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym*. 4 janv 2012;87(1):737-43.
57. Saraf A, Baggett LS, Raphael RM, Kasper FK, Mikos AG. Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2 avr 2010;143(1):95-103.
58. Qu H, Wei S, Guo Z. Coaxial electrospun nanostructures and their applications. *J Mater Chem A*. 10 sept 2013;1(38):11513-28.
59. Yu JH, Fridrikh SV, Rutledge GC. Production of Submicrometer Diameter Fibers by Two-Fluid Electrospinning. *Adv Mater*. 3 sept 2004;16(17):1562-6.
60. Ding B, Kimura E, Sato T, Fujita S, Shiratori S. Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning. *Polymer*. mars 2004;45(6):1895-902.

61. Varesano A, Rombaldoni F, Mazzuchetti G, Tonin C, Comotto R. Multi-jet nozzle electrospinning on textile substrates: observations on process and nanofibre mat deposition. *Polym Int.* 2010;59(12):1606–1615.
62. Theron SA, Yarin AL, Zussman E, Kroll E. Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer.* 15 avr 2005;46(9):2889–99.
63. Kim G, Cho Y-S, Kim WD. Stability analysis for multi-jets electrospinning process modified with a cylindrical electrode. *Eur Polym J.* sept 2006;42(9):2031–8.
64. Lyons J, Li C, Ko F. Melt-electrospinning. part I: processing parameters and geometric properties. *Polymer.* 2004;45(22):7597–603.
65. Brown TD, Edin F, Detta N, Skelton AD, Hutmacher DW, Dalton PD. Melt electrospinning of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds: phenomenological observations associated with collection and direct writing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* déc 2014;45:698–708.
66. Liu W, Yao Y, Lin Y, Wang B, Luo Y, Li N, et al. Electrospinning assisted by Gas Jet for Preparing ultrafine Poly(vinyl alcohol) Fibres. *Iranian polymer Journal.* 2009;18(1):89–96.
67. Lin Y, Yao Y, Yang X, Shen L, Li R, Wu D. Effect of gas flow rate on crystal structures of electrospun and gas-jet/electrospun poly(vinylidene fluoride) fibers. *Chin J Polym Sci.* 1 juill 2009;27(04):511–6.
68. Hernández-Navarro N, González-González V, Moreno-Cortez IE, Garza-Navarro MA. Electrospun polyvinylidene fluoride nanofibers by bubble electrospinning technique. *Mater Lett.* 15 mars 2016;167:34–7.
69. Hernández-Navarro N, González-González V, Moreno-Cortez IE, Garza-Navarro MA. Electrospun polyvinylidene fluoride nanofibers by bubble electrospinning technique. *Mater Lett.* 15 mars 2016;167:34–7.
70. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol.* oct 2003;21(10):1171–8.
71. Suvannasara P, Praphairaksit N, Muangsin N. Self-assembly of mucoadhesive nanofibers. *RSC Adv.* 5 nov 2014;4(102):58664–73.
72. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science.* 23 nov 2001;294(5547):1684–8.
73. Niece KL, Hartgerink JD, Donners JJM, Stupp SI. Self-Assembly Combining Two Bioactive Peptide-Amphiphile Molecules into Nanofibers by Electrostatic Attraction. *J Am Chem Soc.* 1 juin 2003;125(24):7146–7.
74. Berndt P, Fields GB, Tirrell M. Synthetic lipidation of peptides and amino acids: monolayer structure and properties. *J Am Chem Soc.* 1 sept 1995;117(37):9515–22.
75. Hong Y, Legge RL, Zhang S, Chen P. Effect of amino acid sequence and pH on nanofiber formation of self-assembling peptides EAK16-II and EAK16-IV. *Biomacromolecules.* oct 2003;4(5):1433–42.

76. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 avr 2002;99(8):5133-8.
77. Luo J, Tong YW. Self-assembly of collagen-mimetic peptide amphiphiles into biofunctional nanofiber. *ACS Nano*. 25 oct 2011;5(10):7739-47.
78. Rolandi M, Rolandi R. Self-assembled chitin nanofibers and applications. *Adv Colloid Interface Sci*. mai 2014;207:216-22.
79. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. nov 2003;63(15):2223-53.
80. He C, Nie W, Feng W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering. *J Mater Chem B*. 29 oct 2014;2(45):7828-48.
81. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng*. févr 2005;11(1-2):101-9.
82. Ma PX, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. juill 1999;46(1):60-72.
83. Jonsson JL. For centrifugal machines. US581423 A, 1897.
84. GLADISH JL, SMITH M-E, Corp TNFA. Forcespinning of fibers and filaments. WO2015003170 A3, 2015.
85. Ren L, Pandit V, Elkin J, Denman T, Cooper JA, Kotha SP. Large-scale and highly efficient synthesis of micro- and nano-fibers with controlled fiber morphology by centrifugal jet spinning for tissue regeneration. *Nanoscale*. 2013;5(6):2337-45.
86. Ren L, Kotha SP. Centrifugal jet spinning for highly efficient and large-scale fabrication of barium titanate nanofibers. *Mater Lett*. 15 févr 2014;117:153-7.
87. Ren L, Ozisik R, Kotha SP, Underhill PT. Highly Efficient Fabrication of Polymer Nanofiber Assembly by Centrifugal Jet Spinning: Process and Characterization. *Macromolecules*. 28 avr 2015;48(8):2593-602.
88. Tokarev A, Trotsenko O, Asheghali D, Griffiths IM, Stone HA, Minko S. Reactive Magnetospinning of Nano- and Microfibers. *Angew Chem Int Ed*. 9 nov 2015;54(46):13613-6.
89. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*. 2012;2(1):2-11.
90. Potrč T, Baumgartner S, Roškar R, Planinšek O, Lavrič Z, Kristl J, et al. Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci*. 30 juill 2015;75:101-13.
91. Prabakaran M. Characterization of tissue scaffolds drug release profiles. In: *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds* [Internet]. Elsevier; 2016 [cité 6 avr 2016]. p. 149-68. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782420873000079>

92. Zupančič Š, Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Kristl J, Yarin AL. Long-Term Sustained Ciprofloxacin Release from PMMA and Hydrophilic Polymer Blended Nanofibers. *Mol Pharm.* 4 janv 2016;13(1):295-305.
93. Shastri VP. Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. *Curr Pharm Biotechnol.* oct 2003;4(5):331-7.
94. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface.* 6 oct 2008;5(27):1137-58.
95. Lemons JE, Misch-Dietsh F, McCracken MS. Chapter 4 - Biomaterials for Dental Implants. In: *Dental Implant Prosthetics (Second Edition)*. St. Louis: Mosby; 2015. p. 66-94.
96. Khan W, Muntimadugu E, Jaffe M, Domb AJ. Implantable Medical Devices. In: Domb AJ, Khan W, éditeurs. *Focal Controlled Drug Delivery*. Boston, MA: Springer US; 2014. p. 33-59.
97. Sheikh FA, Barakat NAM, Kanjwal MA, Chaudhari AA, Jung I-H, Lee JH, et al. Electrospun antimicrobial polyurethane nanofibers containing silver nanoparticles for biotechnological applications. *Macromol Res.* sept 2009;17(9):688-96.
98. Saha K, Butola BS, Joshi M. Drug-loaded polyurethane/clay nanocomposite nanofibers for topical drug-delivery application. *J Appl Polym Sci.* 15 mai 2014;131(10):n/a-n/a.
99. Kenawy E-R, Abdel-Hay FI, El-Newehy MH, Wnek GE. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. *Mater Chem Phys.* 15 janv 2009;113(1):296-302.
100. Aguilar LE, Unnithan AR, Amarjargal A, Tiwari AP, Hong ST, Park CH, et al. Electrospun polyurethane/Eudragit® L100-55 composite mats for the pH dependent release of paclitaxel on duodenal stent cover application. *Int J Pharm.* 15 janv 2015;478(1):1-8.
101. Ardeshirzadeh B, Anaraki NA, Irani M, Rad LR, Shamshiri S. Controlled release of doxorubicin from electrospun PEO/chitosan/graphene oxide nanocomposite nanofibrous scaffolds. *Mater Sci Eng C.* 1 mars 2015;48:384-90.
102. Laha A, Yadav S, Majumdar S, Sharma CS. In-vitro release study of hydrophobic drug using electrospun cross-linked gelatin nanofibers. *Biochem Eng J.* 15 janv 2016;105, Part B:481-8.
103. Lankalapalli S, Kolapalli VRM. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(5):481-7.
104. Li X, Du P, Liu P. Layer-by-layer polyelectrolyte complex coated poly(methacrylic acid) nanogels as a drug delivery system for controlled release: structural effects. *RSC Adv.* 2014;4(99):56323-31.
105. Jiang C, Wang Z, Zhang X, Zhu X, Ma JN and G. Crosslinked polyelectrolyte complex fiber membrane based on chitosan–sodium alginate by freeze-drying. *RSC Adv.* 6 août 2014;4(78):41551-60.
106. Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol.* mars 2014;64:353-67.

107. Ignatova MG, Manolova NE, Rashkov IB, Markova ND, Toshkova RA, Georgieva AK, et al. Poly(3-hydroxybutyrate)/caffeic acid electrospun fibrous materials coated with polyelectrolyte complex and their antibacterial activity and in vitro antitumor effect against HeLa cells. *Mater Sci Eng C*. 1 août 2016;65:379-92.
108. Shawe S, Buchanan F, Harkin-Jones E, Farrar D. A study on the rate of degradation of the bioabsorbable polymer polyglycolic acid (PGA). *J Mater Sci*. 2 mai 2006;41(15):4832-8.
109. Immich APS, Arias ML, Carreras N, Boemo RL, Tornero JA. Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen. *Mater Sci Eng C*. oct 2013;33(7):4002-8.
110. Park J-Y, Lee I-H. Controlled release of ketoprofen from electrospun porous polylactic acid (PLA) nanofibers. *J Polym Res*. 24 nov 2010;18(6):1287-91.
111. Doustgani A. Doxorubicin release from optimized electrospun polylactic acid nanofibers. *J Ind Text*. 16 févr 2016;1528083716634033.
112. You Y, Min B-M, Lee SJ, Lee TS, Park WH. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). *J Appl Polym Sci*. 15 janv 2005;95(2):193-200.
113. Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan CK, Ramakrishna S. Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers. *Tissue Eng Part B Rev*. 21 mai 2009;15(3):333-51.
114. Tseng Y-Y, Kao Y-C, Liao J-Y, Chen W-A, Liu S-J. Biodegradable Drug-Eluting Poly[lactic-co-glycolic acid] Nanofibers for the Sustainable Delivery of Vancomycin to Brain Tissue: In Vitro and in Vivo Studies. *ACS Chem Neurosci*. 18 sept 2013;4(9):1314-21.
115. Haider A, Gupta KC, Kang I-K. PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. *Nanoscale Res Lett*. 25 juin 2014;9(1):314.
116. Xavier Acasigua GA, Bernardi L, Braghirolli DI, Filho MS, Pranke P, Medeiros Fossati AC. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(4):330-7.
117. Stachewicz U, Qiao T, Rawlinson SCF, Almeida FV, Li W-Q, Cattell M, et al. 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration. *Acta Biomater*. nov 2015;27:88-100.
118. Kolluru PV, Lipner J, Liu W, Xia Y, Thomopoulos S, Genin GM, et al. Strong and tough mineralized PLGA nanofibers for tendon-to-bone scaffolds. *Acta Biomater*. déc 2013;9(12):9442-50.
119. Shin HJ, Lee CH, Cho IH, Kim Y-J, Lee Y-J, Kim IA, et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(1-2):103-19.
120. Tseng Y-Y, Wang Y-C, Su C-H, Liu S-J. Biodegradable Vancomycin-eluting Poly[(d,l)-lactide-co-glycolide] Nanofibres for the Treatment of Postoperative Central Nervous System Infection. *Sci Rep*. 19 janv 2015;5:7849.

121. Panseri S, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, et al. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnol.* 2008;8:39.
122. Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials.* sept 2009;30(26):4325-35.
123. Tseng Y-Y, Liao J-Y, Chen W-A, Kao Y-C, Liu S-J. Sustainable release of carmustine from biodegradable poly[(d,l)-lactide-co-glycolide] nanofibrous membranes in the cerebral cavity: in vitro and in vivo studies. *Expert Opin Drug Deliv.* 1 juill 2013;10(7):879-88.
124. Soscia DA, Raof NA, Xie Y, Cady NC, Gadre AP. Antibiotic-Loaded PLGA Nanofibers for Wound Healing Applications. *Adv Eng Mater.* 1 avr 2010;12(4):B83-8.
125. Norouzi M, Shabani I, Ahvaz HH, Soleimani M. PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration. *J Biomed Mater Res A.* juill 2015;103(7):2225-35.
126. Liu K-S, Lee C-H, Wang Y-C, Liu S-J. Sustained release of vancomycin from novel biodegradable nanofiber-loaded vascular prosthetic grafts: in vitro and in vivo study. *Int J Nanomedicine.* 29 janv 2015;10:885-91.
127. Kim MJ, Kim J-H, Yi G, Lim S-H, Hong YS, Chung DJ. In vitro and in vivo application of PLGA nanofiber for artificial blood vessel. *Macromol Res.* juin 2008;16(4):345-52.
128. Dinarvand P, Hashemi SM, Seyedjafari E, Shabani I, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Farhadian S, et al. Function of Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanofiber in Reduction of Adhesion Bands. *J Surg Res.* janv 2012;172(1):e1-9.
129. Zong X, Li S, Chen E, Garlick B, Kim K, Fang D, et al. Prevention of Postsurgery-Induced Abdominal Adhesions by Electrospun Bioabsorbable Nanofibrous Poly(lactide-co-glycolide)-Based Membranes. *Ann Surg.* nov 2004;240(5):910-5.
130. Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, Laurencin CT, Chen AF, Nair LS. Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibers: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* déc 2009;36(12):1149-56.
131. Han J, Chen T-X, Branford-White CJ, Zhu L-M. Electrospun shikonin-loaded PCL/PTMC composite fiber mats with potential biomedical applications. *Int J Pharm.* 1 déc 2009;382(1-2):215-21.
132. Karuppuswamy P, Reddy Venugopal J, Navaneethan B, Luwang Laiva A, Ramakrishna S. Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride. *Mater Lett.* 15 févr 2015;141:180-6.
133. Haroosh H, Dong Y. Electrospun nanofibrous composites to control drug release and interaction between hydrophilic drug and hydrophobic blended polymer matrix. 2013;
134. Roozbahani F, Sultana N, Fauzi Ismail A, Noupavar H. Effects of Chitosan Alkali Pretreatment on the Preparation of Electrospun PCL/Chitosan Blend Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Application. *J Nanomater.* 29 août 2013;2013.

135. Natu MV, de Sousa HC, Gil MH. Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers. *Int J Pharm.* 15 sept 2010;397(1–2):50-8.
136. Seif S, Franzen L, Windbergs M. Overcoming drug crystallization in electrospun fibers – Elucidating key parameters and developing strategies for drug delivery. *Int J Pharm.* 15 janv 2015;478(1):390-7.
137. He T, Wang J, Huang P, Zeng B, Li H, Cao Q, et al. Electrospinning polyvinylidene fluoride fibrous membranes containing anti-bacterial drugs used as wound dressing. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 juin 2015;130:278-86.
138. Son YJ, Kim WJ, Yoo HS. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Arch Pharm Res.* janv 2014;37(1):69-78.
139. Schnüriger B, Barmparas G, Branco BC, Lustenberger T, Inaba K, Demetriades D. Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *Am J Surg.* janv 2011;201(1):111-21.
140. Ma Z, He W, Yong T, Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell Orientation. *Tissue Eng.* août 2005;11(7-8):1149-58.
141. Li W, Guo Y, Wang H, Shi D, Liang C, Ye Z, et al. Electrospun nanofibers immobilized with collagen for neural stem cells culture. *J Mater Sci Mater Med.* févr 2008;19(2):847-54.
142. Chua K-N, Chai C, Lee P-C, Ramakrishna S, Leong KW, Mao H-Q. Functional nanofiber scaffolds with different spacers modulate adhesion and expansion of cryopreserved umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol.* mai 2007;35(5):771-81.
143. Chua K-N, Chai C, Lee P-C, Tang Y-N, Ramakrishna S, Leong KW, et al. Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biomaterials.* déc 2006;27(36):6043-51.
144. Chen J-P, Su C-H. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* janv 2011;7(1):234-43.
145. Kim HS, Yoo HS. MMPs-responsive release of DNA from electrospun nanofibrous matrix for local gene therapy: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 3 août 2010;145(3):264-71.
146. Son YJ, Yoo HS. Dexamethasone-incorporated nanofibrous meshes for antiproliferation of smooth muscle cells: thermally induced drug-loading strategy. *J Biomed Mater Res A.* oct 2012;100(10):2678-85.
147. Shao S, Li L, Yang G, Li J, Luo C, Gong T, et al. Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. *Int J Pharm.* 15 déc 2011;421(2):310-20.
148. Ji L, Saquing C, Khan SA, Zhang X. Preparation and characterization of silica nanoparticulate-polyacrylonitrile composite and porous nanofibers. *Nanotechnology.* 27 févr 2008;19(8):085605.

149. Ionescu LC, Lee GC, Sennett BJ, Burdick JA, Mauck RL. An anisotropic nanofiber/microsphere composite with controlled release of biomolecules for fibrous tissue engineering. *Biomaterials*. mai 2010;31(14):4113-20.
150. Yuan Z, Pan Y, Cheng R, Sheng L, Wu W, Pan G, et al. Doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticle composite nanofibers for long-term adjustments of tumor apoptosis. *Nanotechnology*. 2016;27(24):245101.
151. Wang Y, Wang B, Qiao W, Yin T. A novel controlled release drug delivery system for multiple drugs based on electrospun nanofibers containing nanoparticles. *J Pharm Sci*. déc 2010;99(12):4805-11.
152. Wang Y, Wang B, Qiao W, Yin T. A Novel Controlled Release Drug Delivery System for Multiple Drugs Based on Electrospun Nanofibers Containing Nanoparticles. *J Pharm Sci*. déc 2010;99(12):4805-11.
153. Jo E, Lee S, Kim KT, Won YS, Kim H-S, Cho EC, et al. Core-Sheath Nanofibers Containing Colloidal Arrays in the Core for Programmable Multi-Agent Delivery. *Adv Mater*. 6 mars 2009;21(9):968-72.
154. Del Valle LJ. Biodegradable polyesters reinforced with triclosan loaded polylactide micro/nanofibers: Properties, release and biocompatibility. 2012.
155. Huang L-Y, Branford-White C, Shen X-X, Yu D-G, Zhu L-M. Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes. *Int J Pharm*. 15 oct 2012;436(1-2):88-96.
156. Okuda T, Tominaga K, Kidoaki S. Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes. *J Controlled Release*. 19 avr 2010;143(2):258-64.
157. Alhusein N, Blagbrough IS, De Bank PA. Electrospun matrices for localised controlled drug delivery: release of tetracycline hydrochloride from layers of polycaprolactone and poly(ethylene-co-vinyl acetate). *Drug Deliv Transl Res*. déc 2012;2(6):477-88.
158. Javanmard SH, Anari J, Kharazi AZ, Vatankhah E. In vitro hemocompatibility and cytocompatibility of a three-layered vascular scaffold fabricated by sequential electrospinning of PCL, collagen, and PLLA nanofibers. *J Biomater Appl*. 31 mai 2016;0885328216652068.
159. Jiang H, Hu Y, Li Y, Zhao P, Zhu K, Chen W. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J Controlled Release*. 28 nov 2005;108(2-3):237-43.
160. Jiang H, Hu Y, Zhao P, Li Y, Zhu K. Modulation of protein release from biodegradable core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 1 oct 2006;79B(1):50-7.
161. Zhang YZ, Wang X, Feng Y, Li J, Lim CT, Ramakrishna S. Coaxial Electrospinning of (Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Bovine Serum Albumin)-Encapsulated Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers for Sustained Release. *Biomacromolecules*. 1 avr 2006;7(4):1049-57.
162. Jin G, Prabhakaran MP, Kai D, Ramakrishna S. Controlled release of multiple epidermal induction factors through core-shell nanofibers for skin regeneration. *Eur J Pharm Biopharm*. nov 2013;85(3, Part A):689-98.

163. Choi JS, Choi SH, Yoo HS. Coaxial electrospun nanofibers for treatment of diabetic ulcers with binary release of multiple growth factors. *J Mater Chem*. 22 mars 2011;21(14):5258-67.
164. Jayasinghe SN, Irvine S, McEwan JR. Cell electrospinning highly concentrated cellular suspensions containing primary living organisms into cell-bearing threads and scaffolds. *Nanomed*. 1 août 2007;2(4):555-67.
165. López-Rubio A, Sanchez E, Sanz Y, Lagaron JM. Encapsulation of Living Bifidobacteria in Ultrathin PVOH Electrospun Fibers. *Biomacromolecules*. 12 oct 2009;10(10):2823-9.
166. Liao I-C, Chen S, Liu JB, Leong KW. Sustained viral gene delivery through core-shell fibers. *J Controlled Release*. 1 oct 2009;139(1):48-55.
167. Yu D-G, Chian W, Wang X, Li X-Y, Li Y, Liao Y-Z. Linear drug release membrane prepared by a modified coaxial electrospinning process. *J Membr Sci*. 1 févr 2013;428:150-6.
168. Maleki M, Latifi M, Amani-Tehran M, Mathur S. Electrospun core-shell nanofibers for drug encapsulation and sustained release. *Polym Eng Sci*. 1 août 2013;53(8):1770-9.
169. Nista SVG, Bettini J, Mei LHI. Coaxial nanofibers of chitosan-alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. *Carbohydr Polym*. 20 août 2015;127:222-8.
170. Castillo-Ortega MM, Montaña-Figueroa AG, Rodríguez-Félix DE, Prado-Villegas G, Pino-Ocaño KP, Valencia-Córdova MJ, et al. Preparation by coaxial electrospinning and characterization of membranes releasing (-) epicatechin as scaffold for tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 1 janv 2015;46:184-9.
171. Yang J-M, Zha L, Yu D-G, Liu J. Coaxial electrospinning with acetic acid for preparing ferulic acid/zein composite fibers with improved drug release profiles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 févr 2013;102:737-43.
172. Zupančič Š, Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Kristl J, Yarin AL. Controlled Release of Ciprofloxacin from Core-Shell Nanofibers with Monolithic or Blended Core. *Mol Pharm*. 4 avr 2016;13(4):1393-404.
173. Ji X, Wang P, Su Z, Ma G, Zhang S. Enabling multi-enzyme biocatalysis using coaxial-electrospun hollow nanofibers: redesign of artificial cells. *J Mater Chem B*. 4 déc 2013;2(2):181-90.
174. Yu D-G, Yu J-H, Chen L, Williams GR, Wang X. Modified coaxial electrospinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers. *Carbohydr Polym*. 1 oct 2012;90(2):1016-23.
175. Luo X, Xie C, Wang H, Liu C, Yan S, Li X. Antitumor activities of emulsion electrospun fibers with core loading of hydroxycamptothecin via intratumoral implantation. *Int J Pharm*. 4 avr 2012;425(1-2):19-28.
176. Wang Y, Li Z, Shao P, Hao S, Wang W, Yang Q, et al. A novel multiple drug release system in vitro based on adjusting swelling core of emulsion electrospun nanofibers with core-sheath structure. *Mater Sci Eng C*. 1 nov 2014;44:109-16.

177. Liu W, Wei J, Wei Y, Chen Y. Controlled Dual Drug Release and In Vitro Cytotoxicity of Electrospun Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibers Encapsulated with Micelles. *J Biomed Nanotechnol.* mars 2015;11(3):428-35.
178. Hu J, Prabhakaran MP, Tian L, Ding X, Ramakrishna S. Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility. *RSC Adv.* 20 nov 2015;5(121):100256-67.
179. Qi H, Hu P, Xu J, Wang A. Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules.* août 2006;7(8):2327-30.
180. Fenyvesi É. Cyclodextrin polymers in the pharmaceutical industry. *J Incl Phenom.* oct 1988;6(5):537-45.
181. Mocanu G, Vizitiu D, Carpov A. Cyclodextrin Polymers. *J Bioact Compat Polym.* 7 janv 2001;16(4):315-42.
182. Oster M, Hébraud A, Gallet S, Lapp A, Pollet E, Avérous L, et al. Star-pseudopolyrotaxane organized in nanoplatelets for poly(ϵ -caprolactone)-based nanofibrous scaffolds with enhanced surface reactivity. *Macromol Rapid Commun.* févr 2015;36(3):292-7.
183. Qian L, Guan Y, Xiao H. Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic beta-cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan. *Int J Pharm.* 5 juin 2008;357(1-2):244-51.
184. Xin J, Guo Z, Chen X, Jiang W, Li J, Li M. Study of branched cationic β -cyclodextrin polymer/indomethacin complex and its release profile from alginate hydrogel. *Int J Pharm.* 15 févr 2010;386(1-2):221-8.
185. Junthip J, Tabary N, Leclercq L, Martel B. Cationic β -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system. *Carbohydr Polym.* 1 août 2015;126:156-67.
186. El Fagui A, Wintgens V, Gaillet C, Dubot P, Amiel C. Layer-by-Layer Coated PLA Nanoparticles with Oppositely Charged β -Cyclodextrin Polymer for Controlled Delivery of Lipophilic Molecules. *Macromol Chem Phys.* 1 mars 2014;215(6):555-65.
187. Yang SY, Hoonor R, Jin H-S, Kim J. Synthesis and Characterization of Cationic and Anionic Cyclodextrin Oligomers and Their Use in Layer-by-Layer Film Formation. *Bull Korean Chem Soc.* 2013;34(7):2016-22.
188. Liu S, Chen X, Zhang Q, Wu W, Xin J, Li J. Multifunctional hydrogels based on β -cyclodextrin with both biomineralization and anti-inflammatory properties. *Carbohydr Polym.* 15 févr 2014;102:869-76.
189. Weltrowski M, Morcellet M, Martel B. Polymères de cyclodextrine(s) et/ou dérivés de cyclodextrine(s) présentant des propriétés complexantes et échangeuses d'ions et leur procédé de fabrication. FR2789685A1, 2000.
190. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci.* 15 juill 2005;97(2):433-42.

191. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Neut C, Chai F, Maton M, Martel B, et al. Evaluation of the anti-infectious properties of polyester vascular prostheses functionalised with cyclodextrin. *J Infect.* févr 2014;68(2):116-24.
192. Laurent T, Kacem I, Blanchemain N, Cazaux F, Neut C, Hildebrand HF, et al. Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomater.* août 2011;7(8):3141-9.
193. Tabary N, Lepretre S, Boschini F, Blanchemain N, Neut C, Delcourt-Debruyne E, et al. Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidine. *Biomol Eng.* nov 2007;24(5):472-6.
194. Taha M, Chai F, Blanchemain N, Goube M, Martel B, Hildebrand HF. Validating the poly-cyclodextrins based local drug delivery system on plasma-sprayed hydroxyapatite coated orthopedic implant with toluidine blue O. *Mater Sci Eng C.* 1 juill 2013;33(5):2639-47.
195. Blanchemain N, CHAI F, HILDEBRAND HF, TAHA M, Martel B. Dispositif implantable de réparation et de reconstruction osseuse apte à adsorber des agents bioactifs et procédés de fabrication d'un tel dispositif. WO2013144486 A1, 2013.
196. Lavoine N, Tabary N, Desloges I, Martel B, Bras J. Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 sept 2014;121:196-205.
197. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, François Aubert-Viard, et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue–poly(cyclodextrin) complex. *Biomed Mater.* 2013;8(6):065006.
198. Lavoine N, Givord C, Tabary N, Desloges I, Martel B, Bras J. Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by synergistic action of cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Innov Food Sci Emerg Technol.* déc 2014;26:330-40.
199. Celebioglu A, Uyar T. Electrospinning of Polymer-free Nanofibers from Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Langmuir.* 2011;27:6218–6226.
200. Celebioglu A, Uyar T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives. *Nanoscale.* 2012;4:621-31.
201. Celebioglu, A, Uyar T. Green and one-step synthesis of gold nanoparticles incorporated into electrospun cyclodextrin nanofibers. *RSC Adv.* 2013;3:10197-201.
202. Celebioglu A, Aytac Z, Ozgun U, Aykutlu D, Turgay T, Uyar T. One-step synthesis of size-tunable Ag nanoparticles incorporated in electrospun PVA/cyclodextrin nanofibers. *Carbohydr Polym.* 2014;99:808-16.
203. Celebioglu A, Uyar T. Electrospun gamma-cyclodextrin (γ -CD) nanofibers for the entrapment of volatile organic compounds. 2013;
204. Manasco JL, Saquing CD, Tang C, Khan SA. Cyclodextrin fibers via polymer-free electrospinning. *RSC Adv.* 10 avr 2012;2(9):3778-84.

205. Celebioglu A, Uyar T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. *J Colloid Interface Sci.* 2013;404:1-7.
206. Celebioglu A, Kayaci-Senirmak F, İpek S, Durgun E, Uyar T. Polymer-free nanofibers from vanillin/cyclodextrin inclusion complexes: high thermal stability, enhanced solubility and antioxidant property. *Food Funct.* 2016;7(7):3141–3153.
207. Celebioglu A, Sen HS, Durgun E, Uyar T. Molecular entrapment of volatile organic compounds (VOCs) by electrospun cyclodextrin nanofibers. *Chemosphere.* févr 2016;144:736-44.
208. Canbolat MF, Celebioglu A, Uyar T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 mars 2014;115:15-21.
209. Narayanan G, Gupta BS, Tonelli AE. Poly(ϵ -caprolactone) Nanowebs Functionalized with α - and γ -Cyclodextrins. *Biomacromolecules.* 10 nov 2014;15(11):4122-33.
210. Aytac Z, Dogan SY, Tekinay T, Uyar T. Release and antibacterial activity of allyl isothiocyanate/ β -cyclodextrin complex encapsulated in electrospun nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;120:125-31.
211. Kayaci F, Uyar T. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinylalcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem.* 2012;133:641–649.
212. Kayaci F, Umu COO, Tekinay, Uyar T. Antibacterial Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Nanofibrous Webs Incorporating Triclosan/Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J Agric Food Chem.* 2013;61:3901–3908.
213. Uyar T, Havelund R. Molecular filters based on cyclodextrin functionalized electrospun fibers. *J Membr Sci* 333:129. *J Membr Sci.* 2009;332(1-2):129-37.
214. Uyar T, Hacaloglu J, Besenbacher F. Electrospun polystyrene fibers containing high temperature stable volatile fragrance/ flavor facilitated by cyclodextrin inclusion complexes. *React Funct Polym.* mars 2009;69(3):145-50.
215. Fatma Kayaci YE. Enhanced Thermal Stability of Eugenol by Cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated in Electrospun Polymeric Nanofibers. *J Agric Food Chem.* 2013;61:8156–8165.
216. Aytac Z, Uyar T. Antioxidant activity and photostability of α -tocopherol/ β -cyclodextrin inclusion complex encapsulated electrospun polycaprolactone nanofibers. *Eur Polym J.* juin 2016;79:140-9.
217. Aytac Z, Kusku SI, Durgun E, Uyar T. Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: release behavior and antioxidant activity of gallic acid. *Mater Sci Eng C.* 1 juin 2016;
218. Aytac Z, Sen HS, Durgun E, Uyar T. Sulfisoxazole/cyclodextrin inclusion complex incorporated in electrospun hydroxypropyl cellulose nanofibers as drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 avr 2015;128:331-8.

219. Huang Y, Li C, Bai J, Sun W, Wang J. Fabrication of Ni Nanoparticles Loaded on β -Cyclodextrin/Polymethyl Methacrylate Composite Nanofibers via Electrospinning, Immersion, and Chemical Reduction. *J Macromol Sci Part B*. 4 mars 2015;54(3):231-8.
220. Zhang W, Chen M, Diao G. Electrospinning β -cyclodextrin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane for molecular capture. *Carbohydr Polym*. 30 août 2011;86(3):1410-6.
221. Narayanan G, Ormond BR, Gupta BS, Tonelli AE. Efficient wound odor removal by β -cyclodextrin functionalized poly (ϵ -caprolactone) nanofibers. *J Appl Polym Sci*. 5 déc 2015;132(45).
222. Narayanan G, Aguda R, Hartman M, Chung C-C, Boy R, Gupta BS, et al. Fabrication and Characterization of Poly(ϵ -caprolactone)/ α -Cyclodextrin Pseudorotaxane Nanofibers. *Biomacromolecules*. 11 janv 2016;17(1):271-9.
223. Uyar T, Kingshott P, Besenbacher F. Electrospinning of Cyclodextrin–Pseudopolyrotaxane Nanofibers. *Angew Chem Int Ed*. 10 nov 2008;47(47):9108-11.
224. Zhao R, Wang Y, Li X, Sun B, Wang C. Synthesis of β -Cyclodextrin-Based Electrospun Nanofiber Membranes for Highly Efficient Adsorption and Separation of Methylene Blue. *ACS Appl Mater Interfaces*. 9 déc 2015;7(48):26649-57.
225. Aytac Z, Kusku SI, Durgun E, Uyar T. Quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex embedded nanofibres: Slow release and high solubility. *Food Chem*. 15 avr 2016;197(Pt A):864-71.
226. Zahra Norouzi MA. Electrospinning of B-Cyclodextrin grafted chitosan nanofibrous membrane for dye removal. 5TH TEXTEH INTERNATIONAL CONFERENCE; 2012 oct 18; Bucharest, Romania.
227. Oliveira MF, Suarez D, Rocha JCB, de Carvalho Teixeira AVN, Cortés ME, De Sousa FB, et al. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. *Mater Sci Eng C*. 1 sept 2015;54:252-61.
228. Costoya A, Ballarin FM, Llovo J, Concheiro A, Abraham GA, Alvarez-Lorenzo C. HMDSO-plasma coated electrospun fibers of poly(cyclodextrin)s for antifungal dressings. *Int J Pharm*. 20 nov 2016;513(1-2):518-27.
229. Choi C, Nam J-P, Nah J-W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *J Ind Eng Chem*.
230. Bhattarai N, Edmondson D, Veisoh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. nov 2005;26(31):6176-84.
231. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. déc 2003;4(6):1457-65.
232. Antonov SF, Kryzhanovskaya EV, Filippov YI, Shinkarev SM, Frolova MA. Study of wound-healing properties of chitosan. *Russ Agric Sci*. 25 févr 2009;34(6):426-7.
233. Pusateri AE, McCarthy SJ, Gregory KW, Harris RA, Cardenas L, McManus AT, et al. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine. *J Trauma*. janv 2003;54(1):177-82.

234. Ong S-Y, Wu J, Moochhala SM, Tan M-H, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. nov 2008;29(32):4323-32.
235. Kurita Y, Isogai A. Reductive N-alkylation of chitosan with acetone and levulinic acid in aqueous media. *Int J Biol Macromol*. 1 août 2010;47(2):184-9.
236. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. *Carbohydr Polym*. 2 janv 2013;91(1):452-66.
237. Ignatova M, Manolova N, Rashkov I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *Eur Polym J*. 2007;43(4):1112-22.
238. Ignatova M, Kalinov K, Manolova N, Toshkova R, Rashkov I, Alexandrov M. Quaternized chitosan-coated nanofibrous implants loaded with gossypol prepared by electrospinning and their efficacy against Graffi myeloid tumor. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014;25(3):287-306.
239. Tan H, Ma R, Lin C, Liu Z, Tang T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1854-69.
240. Campelo CS, Lima LD, Rebêlo LM, Mantovani D, Beppu MM, Vieira RS. In vitro evaluation of anti-calcification and anti-coagulation on sulfonated chitosan and carrageenan surfaces. *Mater Sci Eng C*. 1 févr 2016;59:241-8.
241. Chang S-H, Huang J-J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. *Surf Coat Technol*. 15 juill 2012;206(23):4959-63.
242. Crini G, Torri G, Guerrini M, Morcellet M, Weltrowski M, Martel B. NMR characterization of N-benzyl sulfonated derivatives of chitosan. *Carbohydr Polym*. juin 1997;33(2-3):145-51.
243. Nishimura SI, Kai H, Shinada K, Yoshida T, Tokura S, Kurita K, et al. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydr Res*. janv 1998;306(3):427-33.
244. Ishihara C, Shimakawa S, Tsuji M, Arikawa J, Tokura S. A sulfated chitin, SCM-chitin III, inhibits the clearance of human erythrocytes from the blood circulation in erythrocyte-transfused SCID mice. *Immunopharmacology*. févr 1995;29(1):65-71.
245. R X, S L, H Y, Y Q, X C, K L, et al. Protective effect of sulfated chitosan of C3 sulfation on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Int J Biol Macromol*. 2014 2014;65:383-8.
246. Jung B-O, Kim C-H, Choi K-S, Lee YM, Kim J-J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J Appl Polym Sci*. 24 juin 1999;72(13):1713-9.
247. Holme KR, Perlin AS. Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte. *Carbohydr Res*. 11 juill 1997;302(1-2):7-12.
248. Baumann H, Faust V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydr Res*. 9 mars 2001;331(1):43-57.

249. Hall LD, Yalpani M. Formation of branched-chain, soluble polysaccharides from chitosan. *J Chem Soc Chem Commun.* 1 janv 1980;(23):1153-4.
250. Muzzarelli RAA. Modified chitosans carrying sulfonic acid groups. *Carbohydr Polym.* 1 janv 1992;19(4):231-6.
251. Desai UR. New antithrombin-based anticoagulants. *Med Res Rev.* mars 2004;24(2):151-81.
252. Drozd NN, Sher AI, Makarov VA, Galbraikh LS, Vikhoreva GA, Gorbachiova IN. Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives in in vivo and in vitro system. *Thromb Res.* 1 juin 2001;102(5):445-55.
253. Hirano S, Tanaka Y, Hasegawa M, Tobetto K, Nishioka A. Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. *Carbohydr Res.* 29 mars 1985;137:205-15.
254. Xing R, Liu S, Yu H, Guo Z, Li Z, Li P. Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr Polym.* 4 août 2005;61(2):148-54.
255. Lu X, Guo H, Zhang Y. Protective effects of sulfated chitooligosaccharides against hydrogen peroxide-induced damage in MIN6 cells. *Int J Biol Macromol.* 1 janv 2012;50(1):50-8.
256. Subhapradha N, Suman S, Ramasamy P, Saravanan R, Shanmugan V, Srinivasan A, et al. Anticoagulant and antioxidant activity of sulfated chitosan from the shell of donacid clam *Donax scortum* (Linnaeus, 1758). *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* 2013;3(1):39.
257. Jayakumar R, Nwe N, Tokura S, Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol.* 28 févr 2007;40(3):175-81.
258. Geng X, Kwon O-H, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials.* sept 2005;26(27):5427-32.
259. Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydr Polym.* 11 juill 2009;77(3):656-61.
260. Pakravan M, Heuzey M-C, Ajji A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer.* 29 sept 2011;52(21):4813-24.
261. Bizarria MTM, d'Ávila MA, Mei LHI. Non-woven nanofiber chitosan/peo membranes obtained by electrospinning. *Braz J Chem Eng.* mars 2014;31(1):57-68.
262. Rieger KA, Birch NP, Schiffman JD. Electrospinning chitosan/poly(ethylene oxide) solutions with essential oils: Correlating solution rheology to nanofiber formation. *Carbohydr Polym.* 2016;139:131-8.
263. Kohsari I, Shariatnia Z, Pourmortazavi SM. Antibacterial electrospun chitosan-polyethylene oxide nanocomposite mats containing bioactive silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 20 avr 2016;140:287-98.
264. Spasova M, Manolova N, Paneva D, Rashkov I. Preparation of chitosan-containing nanofibres by electrospinning of chitosan/poly(ethylene oxide) blend solutions. *E-Polym.* 2013;4(1):624-635.

265. Erdem R, Akalin M. Characterization and evaluation of antimicrobial properties of electrospun chitosan/polyethylene oxide based nanofibrous scaffolds (with/without nanosilver). *J Ind Text.* 1 janv 2015;44(4):553-71.
266. Duan B, Dong C, Yuan X, Yao K. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004;15(6):797-811.
267. Kazemi P, Dilamian M, Mirian M, Sadeghi-Aliabadi H, Maleknia L, Nousiainen P, et al. Nanofibrous chitosan-polyethylene oxide engineered scaffolds: A comparative study between simulated structural characteristics and cells viability. *BioMed Res Int.* 2014;2014.
268. Wang X, Cheng F, Gao J, Wang L. Antibacterial wound dressing from chitosan/polyethylene oxide nanofibers mats embedded with silver nanoparticles. *J Biomater Appl.* 1 mars 2015;29(8):1086-95.
269. Pangon A, Saesoo S, Saengkrit N, Ruktanonchai U, Intasanta V. Multicarboxylic acids as environment-friendly solvents and in situ crosslinkers for chitosan/PVA nanofibers with tunable physicochemical properties and biocompatibility. *Carbohydr Polym.* 2016;138:156-65.
270. Çay A, Miraftab M, Perrin Akçakoca Kumbasar E. Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly(vinyl alcohol)/chitosan nanofibres. *Eur Polym J.* déc 2014;61:253-62.
271. Alipour SM, Nouri M, Mokhtari J, Bahrami SH. Electrospinning of poly(vinyl alcohol)-water-soluble quaternized chitosan derivative blend. *Carbohydr Res.* 14 déc 2009;344(18):2496-501.
272. Charernsriwilaiwat N, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Sukma M, Opanasopit P. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. *Int J Pharm.* 16 août 2013;452(1-2):333-43.
273. Jia Y-T, Gong J, Gu X-H, Kim H-Y, Dong J, Shen X-Y. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydr Polym.* 1 févr 2007;67(3):403-9.
274. Abbaspour M, Sharif Makhmalzadeh B, Rezaee B, Shoja S, Ahangari Z. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Chitosan/Polyvinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Containing Mafenide Acetate. *Jundishapur J Microbiol.* 28 oct 2015;8(10).
275. Van der Schueren L, Steyaert I, De Schoenmaker B, De Clerck K. Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydr Polym.* 16 mai 2012;88(4):1221-6.
276. Ignatova M, Manolova N, Markova N, Rashkov I. Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromol Biosci.* 2009;9(1):102-11.
277. Wu L, Li H, Li S, Li X, Yuan X, Li X, et al. Composite fibrous membranes of PLGA and chitosan prepared by coelectrospinning and coaxial electrospinning. *J Biomed Mater Res A.* févr 2010;92(2):563-74.

278. Cai Z, Mo X, Zhang K, Fan L, Yin A, He C, et al. Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite Nanofibers for Wound-dressing Applications. *Int J Mol Sci.* 21 sept 2010;11(9):3529-39.
279. Kim G, Cho Y-S, Kim WD. Stability analysis for multi-jets electrospinning process modified with a cylindrical electrode. *Eur Polym J.* sept 2006;42(9):2031-8.
280. Wan Y-Q, He J-H, Yu J-Y, Wu Y. Electrospinning of high-molecule PEO solution. *J Appl Polym Sci.* 15 mars 2007;103(6):3840-3.
281. Kazemi Pilehrood M, Dilamian M, Mirian M, Sadeghi-Aliabadi H, Maleknia L, Nousiainen P, et al. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A Comparative Study between Simulated Structural Characteristics and Cells Viability. *BioMed Res Int.* 2014;2014.
282. Frohbergh ME, Katsman A, Botta GP, Lazarovici P, Schauer CL, Wegst UGK, et al. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials.* déc 2012;33(36):9167-78.
283. Zhao R, Li X, Sun B, Zhang Y, Zhang D, Tang Z, et al. Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings. *Int J Biol Macromol.* juill 2014;68:92-7.
284. Victor T. Tchemtchoua GA. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules.* 2011;12:3194-204.
285. Fathollahipour S, Abouei Mehrizi A, Ghaee A, Koosha M. Electrospinning of PVA/chitosan nanocomposite nanofibers containing gelatin nanoparticles as a dual drug delivery system. *J Biomed Mater Res A.* 1 déc 2015;103(12):3852-62.
286. Cai N, Li C, Han C, Luo X, Shen L, Xue Y, et al. Tailoring mechanical and antibacterial properties of chitosan/gelatin nanofiber membranes with Fe₃O₄ nanoparticles for potential wound dressing application. *Appl Surf Sci.* 2016;369:492-500.
287. Chen J-P, Chang G-Y, Chen J-K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 1 févr 2008;313-314:183-8.
288. Martinova L, Lubasova D. Electrospun chitosan based nanofibers. *RJTA.* 2008;12(2):72-9.
289. Xu F, Weng B, Gilkerson R, Materon LA, Lozano K. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. *Carbohydr Polym.* 22 janv 2015;115:16-24.
290. Austero MS, Donius AE, Wegst UGK, Schauer CL. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis. *J R Soc Interface R Soc.* 7 oct 2012;9(75):2551-62.
291. Zhang K, Qian Y, Wang H, Fan L, Huang C, Yin A, et al. Genipin-crosslinked silk fibroin/hydroxybutyl chitosan nanofibrous scaffolds for tissue-engineering application. *J Biomed Mater Res A.* 1 déc 2010;95A(3):870-81.
292. Jin Y, Yang D, Zhou Y, Ma G, Nie J. Photocrosslinked electrospun chitosan-based biocompatible nanofibers. *J Appl Polym Sci.* 5 sept 2008;109(5):3337-43.

293. Kiechel MA, Schauer CL. Non-covalent crosslinkers for electrospun chitosan fibers. *Carbohydr Polym.* 5 juin 2013;95(1):123-33.
294. Frohbergh ME, Katsman A, Botta GP, Lazarovici P, Schauer CL, Wegst UGK, et al. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials.* déc 2012;33(36):9167-78.
295. Mirzaei E, Faridi-Majidi R, Shokrgozar MA, Asghari Paskiabi F. Genipin cross-linked electrospun chitosan-based nanofibrous mat as tissue engineering scaffold. *Nanomedicine J.* 1 avr 2014;1(3):137-46.
296. Donius AE, Kiechel MA, Schauer CL, Wegst UGK. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. Part II: mechanical properties. *J R Soc Interface R Soc.* 6 avr 2013;10(81):20120946.
297. Austero MS, Donius AE, Wegst UGK, Schauer CL. New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis. *J R Soc Interface.* 7 oct 2012;9(75):2551-62.
298. Monteiro N, Martins M, Martins A, Fonseca NA, Moreira JN, Reis RL, et al. Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin. *Acta Biomater.* mai 2015;18:196-205.
299. Jiang S, Lv J, Ding M, Li Y, Wang H, Jiang S. Release behavior of tetracycline hydrochloride loaded chitosan/poly(lactic acid) antimicrobial nanofibrous membranes. *Mater Sci Eng C.* 1 févr 2016;59:86-91.
300. Valarezo E, Tammara L, González S, Malagón O, Vittoria V. Fabrication and sustained release properties of poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers loaded with layered double hydroxide nanoparticles intercalated with amoxicillin. *Appl Clay Sci.* févr 2013;72:104-9.
301. Park H, Yoo H, Hwang T, Park T-J, Paik D-H, Choi S-W, et al. Fabrication of levofloxacin-loaded nanofibrous scaffolds using coaxial electrospinning. *J Pharm Investig.* 15 avr 2012;42(2):89-93.
302. Dilamian M, Montazer M, Masoumi J. Antimicrobial electrospun membranes of chitosan/poly(ethylene oxide) incorporating poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride. *Carbohydr Polym.* 15 avr 2013;94(1):364-71.
303. Dhurai B, Saraswathy N, Maheswaran R, Sethupathi P, Vanitha P, Vigneshwaran S, et al. Electrospinning of curcumin loaded chitosan/poly (lactic acid) nanofilm and evaluation of its medicinal characteristics. *Front Mater Sci.* 13 nov 2013;7(4):350-61.
304. Fouda MMG, El-Aassar MR, Al-Deyab SS. Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 15 févr 2013;92(2):1012-7.
305. Akmaz S, Adiguzel D, Guler Z, Zel E, Yasar M, Erguven O, et al. The Effect of Ag Content of the Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Material on the Structure and Antibacterial Activity, The Effect of Ag Content of the Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Material on the Structure and Antibacterial Activity. *Adv Mater Sci Eng Adv Mater Sci Eng.* 17 déc 2013;2013, 2013:e690918.

306. Abdelgawad AM, Hudson SM, Rojas OJ. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr Polym.* 16 janv 2014;100:166-78.
307. Huang R, Du Y, Yang J, Fan L. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. *Carbohydr Res.* 14 mars 2003;338(6):483-9.
308. Xue J, Zhao W, Nie S, Sun S, Zhao C. Blood compatibility of polyethersulfone membrane by blending a sulfated derivative of chitosan. *Carbohydr Polym.* 5 juin 2013;95(1):64-71.
309. Suwan J, Zhang Z, Li B, Vongchan P, Meepowpan P, Zhang F, et al. Sulfonation of papain-treated chitosan and its mechanism for anticoagulant activity. *Carbohydr Res.* 6 juill 2009;344(10):1190-6.
310. Vikhoreva G, Bannikova G, Stolbushkina P, Panov A, Drozd N, Makarov V, et al. Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan. *Carbohydr Polym.* 14 déc 2005;62(4):327-32.
311. Guo J, Zhou H, Akram MY, Mu X, Nie J, Ma G. Characterization and application of chondroitin sulfate/polyvinyl alcohol nanofibres prepared by electrospinning. *Carbohydr Polym.*
312. Zhong SP, Teo WE, Zhu X, Beuerman R, Ramakrishna S, Yung LYL. Development of a novel collagen-GAG nanofibrous scaffold via electrospinning. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(2):262-6.
313. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, et al. Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydr Polym.* 2 avr 2013;93(2):718-30.
314. Junthip J, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Maton M, Cazaux F, et al. Layer by layer coating of textile with two oppositely charged cyclodextrin polyelectrolytes for extended drug delivery. *J Biomed Mater Res A.* 1 févr 2016;n/a-n/a.
315. Aubert-Viard F, Martin A, Chai F, Neut C, Tabary N, Martel B, et al. Chitosan finishing nonwoven textiles loaded with silver and iodide for antibacterial wound dressing applications. *Biomed Mater.* 2015;10(1):015023.
316. Martel B, Weltrowski M, Morcellet M, Scheubel G. Chitosan N-benzyl Sulfonate filters for sorption of heavy metals in acidic solution. In: *Advances in Chitin Science.* France: A.Domard, JJeuniaux, R.A.A.Muzzarelli, GROberts,J.André; 1996. p. 291.
317. Crini G, Torri G, Martel B, Weltrowski M, Morcellet M, Cosentino C. Synthesis, NMR Study and Preliminary Sorption Properties of two N-Benzyl Sulfonated Chitosan Derivatives. *J Carbohydr Chem.* 1 mai 1997;16(4-5):681-9.
318. Weltrowski M, Martel B, Morcellet M. Chitosan N-benzyl sulfonate derivatives as sorbents for removal of metal ions in an acidic medium. *J Appl Polym Sci.* 24 janv 1996;59(4):647-54.
319. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J Pharm Pharmacol.* 1 août 2001;53(8):1047-67.
320. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31(7):603-632.

321. Higuchi TA, Connors KA. Phase-Solubility Techniques. *Adv Anal Chem Instrum.* 1 janv 1965;4(2):117.
322. Mi F-L, Sung H-W, Shyu S-S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *J Polym Sci Part Polym Chem.* 1 août 2000;38(15):2804-14.
323. Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J Polym Sci Part Polym Chem.* 15 déc 2003;41(24):3941-53.
324. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem FEBS.* sept 2000;267(17):5421-6.
325. Taylor G. Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube. *Proc R Soc Lond Math Phys Eng Sci.* 25 août 1953;219(1137):186-203.
326. Cottet H, Biron J-P, Martin M. On the optimization of operating conditions for Taylor dispersion analysis of mixtures. *Analyst.* 16 juin 2014;139(14):3552-62.
327. d'Orlyé F, Varenne A, Gareil P. Determination of nanoparticle diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis using a capillary electrophoresis instrument. *J Chromatogr A.* 19 sept 2008;1204(2):226-32.
328. Taylor G. Conditions under Which Dispersion of a Solute in a Stream of Solvent can be Used to Measure Molecular Diffusion. *Proc R Soc Lond Math Phys Eng Sci.* 22 sept 1954;225(1163):473-7.
329. Cottet H, Biron J-P, Martin M. Taylor dispersion analysis of mixtures. *Anal Chem.* 1 déc 2007;79(23):9066-73.
330. Hawe A, Hulse WL, Jiskoot W, Forbes RT. Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharm Res.* sept 2011;28(9):2302-10.
331. Angamma CJ, Jayaram SH. Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. *IEEE Trans Ind Appl.* mai 2011;47(3):1109-17.
332. Vondran JL, Sun W, Schauer CL. Crosslinked, electrospun chitosan-poly(ethylene oxide) nanofiber mats. *J Appl Polym Sci.* 15 juill 2008;109(2):968-75.
333. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res.* nov 1980;14(6):753-64.
334. Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res.* juill 1995;29(7):829-34.
335. Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar Drugs.* 2010;8(5):1567-636.

336. Kumar S, Koh J, Kim H, Gupta MK, Dutta PK. A new chitosan-thymine conjugate: synthesis, characterization and biological activity. *Int J Biol Macromol.* 1 avr 2012;50(3):493-502.
337. Wang Y, Ramos I, J. J. Diversity of Nanofibers from Electrospinning: from Graphitic Carbons to Ternary Oxides. In: Kumar A, éditeur. *Nanofibers.* InTech; 2010.
338. Ichi SE, Zebda A, Alcaraz J-P, Laaroussi A, Boucher F, Boutonnat J, et al. Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body. *Energy Environ Sci.* 5 mars 2015;8(3):1017-26.
339. Qian W, Yu D-G, Li Y, Liao Y-Z, Wang X, Wang L. Dual Drug Release Electrospun Core-Shell Nanofibers with Tunable Dose in the Second Phase. *Int J Mol Sci.* 8 janv 2014;15(1):774-86.
340. Meng ZX, Zheng W, Li L, Zheng YF. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Mater Chem Phys.* 15 févr 2011;125(3):606-11.
341. Andres Y, Giraud L, Gerente C, Le Cloirec P. Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environ Technol.* déc 2007;28(12):1357-63.
342. Assadian O, Wehse K, Hübner N-O, Koburger T, Bagel S, Jethon F, et al. Minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of polihexanide and triclosan against antibiotic sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. *GMS Krankenhaushygiene Interdiszip.* 15 déc 2011;6(1).
343. Jug M, Kosalec I, Maestrelli F, Mura P. Analysis of triclosan inclusion complexes with β -cyclodextrin and its water-soluble polymeric derivative. *J Pharm Biomed Anal.* 5 avr 2011;54(5):1030-9.
344. Loftsson T, Össurardóttir ÍB, Thorsteinsson T, Duan M, Másson M. Cyclodextrin Solubilization of the Antibacterial Agents Triclosan and Triclocarban: Effect of Ionization and Polymers. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2005;52(1-2):109-17.
345. García-Fernández MJ, Tabary N, Martel B, Cazaux F, Oliva A, Taboada P, et al. Poly-(cyclo)dextrins as ethoxzolamide carriers in ophthalmic solutions and in contact lenses. *Carbohydr Polym.* 6 nov 2013;98(2):1343-52.
346. Danel C, Azaroual N, Chavaria C, Odou P, Martel B, Vaccher C. Comparative study of the complex forming ability and enantioselectivity of cyclodextrin polymers by CE and ¹H NMR. *Carbohydr Polym.* 15 févr 2013;92(2):2282-92.
347. Tabary N, Mahieu A, Willart J-F, Dudognon E, Danède F, Descamps M, et al. Characterization of the hidden glass transition of amorphous cyclomaltoheptaose. *Carbohydr Res.* 18 oct 2011;346(14):2193-9.
348. Tabary N, Garcia-Fernandez MJ, Danède F, Descamps M, Martel B, Willart J-F. Determination of the glass transition temperature of cyclodextrin polymers. *Carbohydr Polym.* 5 sept 2016;148:172-80.
349. Pérez-Anes A, Gargouri M, Laure W, Van Den Berghe H, Courcot E, Sobocinski J, et al. Bioinspired Titanium Drug Eluting Platforms Based on a Poly- β -cyclodextrin-Chitosan Layer-

- by-Layer Self-Assembly Targeting Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 17 juin 2015;7(23):12882-93.
350. Flores C, Lopez M, Hornez J, Chai F, Raoul G, Tabary N, et al. Chitosan-hydroxyapatite composite hydrogels for bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;10th World Biomaterials Congress.
351. Pillay V, Dott C, Choonara YE, Tyagi C, Tomar L, Kumar P, et al. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications. *J Nanomater*. 13 févr 2013;2013.
352. Kao T-H, Cheng C-C, Huang C-F, Chen J-K. Using coaxial electrospinning to fabricate core/shell-structured polyacrylonitrile–polybenzoxazine fibers as nonfouling membranes. *RSC Adv*. 3 juill 2015;5(72):58760-71.
353. Blanchemain N, Haulon S, Boschin F, Traisnel M, Morcellet M, Martel B, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomol Eng*. févr 2007;24(1):143-8.
354. Theisen A, Johann C, Deacon M., Harding S. *Refractive Increment Data-book for Polymer and Biomolecular Scientists*. Nottingham University Press UK; 2000. 70 p.
355. Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*. juin 2003;4(3):641-8.
356. Morris G, Castile J, Smith A, Adams GG, Harding SE. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach. *Carbohydr Polym*. mai 2009;76(4):616-21.

Résumé

Les biomatériaux sont très largement utilisés dans le soin de maladies, de brûlures ou de blessures. Ils sont utilisés sous la forme de dispositifs médicaux destinés à des applications extra ou intra corporelles : pansement, prothèses vasculaire, filet de réparation de hernie, ligament artificiel etc.. Ils se doivent donc notamment d'être biocompatibles et hémocompatibles, mais la recherche vise actuellement à leur apporter des propriétés *bioactives* supplémentaires (antibactérienne, anti inflammatoire, anti-thrombotique, régénérative etc.). Le chitosan (CHT) est un polymère cationique biosourcé couramment utilisé en tant que biomatériau pour ses propriétés biologiques intrinsèques (biocompatible, bio résorbable, antibactérien, hémostatique, pro-cicatrisant). Dans ce contexte, nous avons élaboré deux types de membranes bioactives (antibactérienne et anti thrombotique) constituées d'enchevêtrements de nanofibres (NFs) à base de chitosan grâce à la technologie innovante de l'électrospinning. Premièrement, des NF antibactériennes ont été élaborées par association du CHT avec un polymère anionique de cyclodextrine (PCD), molécule cage connue pour piéger puis libérer de façon ralentie des molécules bioactives. Deux types de NFs chargées en triclosan (TCL) choisi comme principe actif antibactérien ont été préparées : 1) par mélange homogène CHT+PCD/TCL, ou en structure *cœur-peau* avec [PCD/TCL] en cœur, et [CHT] en peau. Deuxièmement, des NFs à activité anti-thrombotiques ont été obtenues en modifiant chimiquement le CHT par des fonctions sulfonates qui ont apporté des propriétés anticoagulantes similaires à celles de l'héparine (*heparin-like*), suivi de l'étape d'électrofilage.

Mots clés : Nanofibres, Electrospinning, Chitosan, polymère anionique de cyclodextrine, libération prolongée, Activité antibactérienne, Chitosan sulfoné, Activité anti-thrombotique

Abstract

Biomaterials are designed to cure people suffering from chronic diseases or suffer injuries or burns. They are developed for intra or extra bodily applications (wound dressings, vascular prostheses, inguinal meshes artificial ligaments etc.). Thus, they must be biocompatible and hemocompatible at first, but research presently aims to give them additional properties (antibacterial, anti-thrombotic, regenerative). Chitosan (CHT) is a cationic biosourced polymer commonly used for these applications thanks to its intrinsic biological properties (biocompatible, bioresorbable, antibacterial, hemostatic, healing)

In this context, we developed two kinds of bioactive membranes based on chitosan nanofibers by using the innovative electrospinning technology. Firstly antibacterial NFs have been obtained by associating CHT with an anionic cyclodextrin polymer (PCD), known to trap and slowly release some bioactive compounds. Two kinds of NFs loaded with triclosan (TCL) have been prepared: mixed CHT+PCD/TCL and *core-sheath* with PCD/TCL in core, and CHT as sheath. Secondly, antithrombotic NFs have been elaborated by chemically modifying CHT with sulfonate groups giving heparin-like properties to the NFs after electrospinning.

Keywords: Nanofibers, Electrospinning, Chitosan, anionic cyclodextrin polymer, sustained drug release, antibacterial activity, sulfonated chitosan, antithrombotic activity