



Université
de Lille

Université Lille - Sciences et Technologies

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

Thèse

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Chimie des matériaux

Membranes bioactives à propriétés antithrombotiques ou ostéoinductrices élaborées par electrospinning

Présentée et soutenue par

Syrine DIMASSI

Le 20 Novembre 2018

Membres du jury

Pr. Xavier GARRIC	Université de Montpellier	Rapporteur
Pr. Thierry DELAIR	Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Pr. Peter DUBRUEL	Université de Ghent	Examineur
Pr. Bernard MARTEL	Université de Lille	Directeur de thèse
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN	Université de Lille	Co-directeur
Dr. Nicolas TABARY	Université de Lille	Membre invité
Dr. Feng CHAI	Université de Lille	Membre invité

A la mémoire de ma grand-mère,

“S’il n’y avait pas d’hiver, le printemps ne serait pas si agréable : si nous ne goûtions pas à l’adversité, la réussite ne serait pas tant appréciée”

Anne Bradstreet

“No es pot dir blat fins que no estigui al sac i ben lligat”

Saura

Remerciements

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Unité de Recherche CNRS UMR 8207 « Unité Matériaux Et Transformations » (UMET) sur le site de l'Université de Lille - Sciences et Technologies. Je tiens donc naturellement à remercier **Monsieur le Président de l'Université** pour son accueil et son soutien. C'est pour moi l'occasion de remercier la **Métropole Européenne de Lille** qui a cru en ce projet et qui a accepté de participer au financement.

Je remercie également le **Pr. Patrice WOISEL**, directeur de l'UMET de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse :

Pr. Thierry DELAIR, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et vos précieux conseils. Permettez-moi de vous témoigner toute ma gratitude.

Pr. Xavier GARRIC, Professeur à l'Université de Montpellier, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je ne pouvais concevoir cette journée sans votre présence. Vous avez toujours été présent pour moi depuis mon inscription en Master 2 « Biomatériaux et dispositifs médicaux » dont vous êtes le responsable. Je vous remercie pour votre soutien, votre gentillesse et vos conseils tout au long de mon parcours universitaire mais également en Recherche. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma plus profonde estime.

Pr. Peter DUBRUEL, Professeur à l'Université de Ghent, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier très sincèrement le **Pr. Bernard MARTEL**, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie et permis de réaliser ces travaux au sein de son équipe de recherche. Je vous témoigne toute ma reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordé, pour l'ensemble des conseils pertinents et pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès nationaux et internationaux. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Je vous remercie également pour votre bonne humeur, votre humour, votre bienveillance et vos qualités humaines. Je suis consciente que beaucoup de doctorants ne bénéficient pas de cette chance.

Mes sincères remerciements au **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN**, mon co-directeur de thèse, de m'avoir accueillie et donné l'accès à son laboratoire GRB afin d'effectuer toutes les caractérisations biologiques. Un grand merci pour votre implication dans les projets, pour vos corrections, vos conseils scientifiques, professionnels et réglementaires et pour votre sympathie.

Je souhaite remercier tout particulièrement le **Dr. Nicolas TABARY**, mon co-encadrant, pour m'avoir accompagné tout au long de ces trois années et pour m'avoir transmis de nombreuses connaissances que ce soit scientifiques ou pratiques. Je tiens à mettre en avant ta disponibilité, ta patience, ta simplicité et ta gentillesse. Je retiendrai plus particulièrement ta bonne humeur, ton humour et nos longues discussions et ton écoute lors des moments difficiles. Tu as été (es) un vrai ami et je suis sûre que notre amitié durera après mon départ.

REMERCIEMENTS

Un grand merci au **Dr. Feng CHAI** pour sa disponibilité, pour ses conseils scientifiques, pour son aide concernant les caractérisations biologiques, pour m'avoir permis d'en réaliser certaines par moi-même et pour sa contribution quant aux corrections du manuscrit.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers le **Dr. Joël LYSKAWA** pour son expertise et l'ensemble de ses conseils, ainsi que pour sa disponibilité.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble des personnes de l'équipe « Ingénierie des Systèmes Polymères » (ISP) que j'ai côtoyées durant ma thèse :

A **Stéphanie DEGOUTIN**, Maître de Conférences à Polytech'Lille, et **Maryse BACQUET**, Professeur à l'Université de Lille – Sciences et Technologies, merci pour votre sympathie, votre aide et vos encouragements

A **Frédéric CAZAUX**, Maître de Conférences à l'Ecole de Chimie de Lille, merci pour ton intervention scientifique, pour ton humour et pour m'avoir donné la chance et fait confiance pendant les deux années consécutives de mon monitorat

A **Jean-Noël STAELENS**, Technicien du laboratoire, merci pour ta bonne humeur quotidienne, d'avoir contribué à ce travail et d'avoir été présent pour moi, notamment pendant les moments difficiles. Nos longues discussions et « papotage » vont me manquer

A **Ludovic JANUS**, Maître de Conférences à l'Université de Lille – Sciences et Technologie, merci de m'avoir formée au microscope électronique à balayage

Je ne peux oublier de remercier **Mr. Benoit HUE**, Assistant Ingénieur, pour sa sympathie, sa disponibilité pendant ces trois années et pour m'avoir aidé à assurer la maintenance de l'electrospinning.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe du GRB pour leur accueil, en particulier **Dr. Maria José GARCIA FERNANDEZ** pour sa gentillesse, sa simplicité et ses conseils tant au niveau personnel que professionnel, ainsi que **Mr. Mickaël MATON** pour sa disponibilité, sa patience et sa bonne humeur.

Je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu de rencontrer l'ensemble des doctorants et post-doctorants. Je pense particulièrement à **Alice**, mon acolyte de chambre lors des congrès, à **Carla** et **Alejandra**, mes deux péruviennes aussi gentilles l'une que l'autre avec qui l'entente et l'amitié ont été une évidence. Sans oublier, **Malo** qui sous ses airs angéliques, se cache un vrai farceur. Même si tu m'en as fait voir de toutes les couleurs, tes blagues et tes farces ont fait ressortir mon âme d'enfant et m'ont aidé à déstresser et à penser à autre chose lors des moments difficiles. Que notre amitié continue de plus belle. Je remercie également **Safa, Malika, Dyhia, Sami, Florine, Marie**, sans oublier l'ensemble du personnel de l'UMET, notamment **Aurélie** et **Jonathan** pour la bonne humeur et leur amitié et les stagiaires (**Léa, Grégory, Hugo, Conrad** et **Victor**) pour leur contribution à ce travail.

Un grand merci à tous mes ami(e)s, en particulier **Laetitia** pour nos soirées et les moments passés ensemble, mon acolyte **Jude** pour la plus belle des amitiés, tu as su être à l'écoute et présente pour moi, et les **copains** pour les soirées retrouvailles.

REMERCIEMENTS

Je tiens finalement à remercier toute ma famille :

Un grand merci à **ma belle-famille** pour m'avoir si bien accueillie au sein de leur famille et pour leur bienveillance à mon égard

A **tonton** et **tata**, je vous suis très reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour nous et pour votre présence en ce grand jour. Au moindre problème, vous n'hésitez pas à traverser des kilomètres pour être présents pour nous. Tonton, tu as toujours le mot pour rire, je n'ai aucune crainte quant à l'ambiance que tu vas mettre le jour de ma soutenance.

A **mamie**, je te dédie cette thèse pour te remercier de tout ce que tu as fait pour nous pendant toutes ces années. Je t'admire énormément et je suis vraiment fière que tu sois présente en ce jour tant attendu.

A **maman, papa, Myriam et Sofian**, il m'est difficile de trouver des mots suffisamment forts pour vous exprimer toute ma gratitude et mon amour. Je vous remercie pour votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible. Il n'y a rien de plus précieux que de faire partie d'une famille solide et formidable. Un petit clin d'œil pour mes parents qui ont pris le temps de corriger ce travail.

A **loulou**, tu as été d'un soutien inconditionnel pendant ces trois années de thèse malgré la distance. Tu as le don de m'apaiser quand je suis en colère et de croire en moi. Tu as cette capacité à trouver les mots et à être à l'écoute des gens faisant de toi un confident pour tes proches et un pharmacien très apprécié par les patients. Je suis fière de toi et je te remercie pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien depuis ces neuf années.

Table des matières

Principales abréviations.....	1
Introduction générale.....	5

PREMIERE PARTIE. NANOFIBRES DE CHITOSANE POUR APPLICATIONS BIOMEDICALES	11
--	-----------

I. Electrospinning pour applications biomédicales.....	15
I.1. Historique.....	15
I.2. Description du procédé.....	17
I.3. Influence des différents paramètres.....	18
I.3.1. Paramètres de solution	18
I.3.2. Paramètres du procédé	20
I.3.3. Paramètres environnementaux	21
I.4. Propriétés des nanofibres et leurs applications biomédicales	22
I.4.1. Systèmes de libération de principes actifs.....	23
I.4.2. Traitement des plaies (pansements)	24
I.4.3. Prothèses.....	24
I.4.4. Ingénierie tissulaire	25
I.5. Polymères utilisés en electrospinning	26
I.5.1. Polymères synthétiques	26
I.5.2. Polymères naturels	28
I.6. Conclusion.....	29
II. Electrospinning du chitosane	30
II.1. Généralités sur le chitosane.....	30
II.1.1. Définition, structure du chitosane	30
II.1.2. Sources du chitosane	30
II.2. Propriétés du chitosane.....	31
II.2.1. Solubilité du chitosane	31
II.2.2. Propriétés biologiques du chitosane.....	32
II.2.3. Applications biomédicales du chitosane	34
II.3. Nanofibres de chitosane	34
II.3.1. Elaboration des nanofibres de chitosane	34
II.3.2. Applications biomédicales	35
III. Objectifs de la thèse.....	36

DEUXIEME PARTIE. NANOFIBRES DE CHITOSANE À PROPRIETES OSTEOINDUCTRICES	39
---	-----------

Chapitre I. Etude bibliographique	41
I. Le tissu osseux.....	43
I.1. La physiologie de l'os	43
I.2. Le remodelage osseux	45
I.3. Les besoins cliniques.....	46
II. L'ingénierie tissulaire osseuse	47
III. Les nanofibres pour l'ingénierie tissulaire osseuse : état de l'art.....	50

III.1.	Nanofibres à base de polymères synthétiques	51
III.2.	Nanofibres à base de polymères naturels	51
IV.	Les nanofibres de chitosane pour l'ingénierie tissulaire osseuse	52
IV.1.	Propriétés mécaniques	52
IV.2.	Biodégradabilité	53
IV.3.	Biocompatibilité	53
IV.4.	Adhésion et prolifération cellulaire	54
V.	Fonctionnalisation des biomatériaux.....	54
V.1.	Incorporation de charges	56
V.2.	Traitement par plasma	56
V.3.	Fonctionnalisation chimique	57
VI.	Fonctionnalisation de surfaces avec la polydopamine	58
VII.	Conclusion.....	67
Chapitre II. Produits, matériels et techniques de caractérisation		69
I.	Elaboration de nanofibres par electrospinning à partir du chitosane	70
I.1.	Les polymères utilisés	71
I.1.1.	Le chitosane.....	71
I.1.2.	Le poly (oxyde d'éthylène)	72
I.2.	Electrospinning.....	72
I.2.1.	Préparation de la solution	72
I.2.2.	Dispositif d'electrospinning du laboratoire	72
I.2.3.	Conditions d'electrospinning	73
I.3.	Réticulation thermique	73
II.	Fonctionnalisation des nanofibres par la polydopamine	74
III.	Caractérisations du support.....	75
III.1.	Caractérisations physicochimiques	75
III.1.1.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	75
III.1.2.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	75
III.1.3.	Analyse thermogravimétrique (ATG)	75
III.1.4.	Quantification colorimétrique des groupements amine.....	76
III.1.5.	Dosage colorimétrique des groupements catécholamine.....	77
III.1.6.	Mesure dynamique de sorption d'eau.....	79
III.1.7.	Etude de dégradation des membranes	79
III.2.	Evaluation biologique	79
III.3.	Biominéralisation <i>in vitro</i>	81
II.3.1.	Diffraction de rayons X.....	82
Chapitre III. Résultats et discussion.....		85
I.	Elaboration et caractérisation de nanofibres à base de chitosane	87
II.	Fonctionnalisation des nanofibres de chitosane avec la polydopamine	89
III.	Caractérisations physicochimiques des supports	91
III.1.	Spectroscopie à infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	91
III.2.	Analyse thermogravimétrique	93
III.3.	Quantification des groupements amine	94
III.4.	Quantification des groupements catécholamine.....	95

III.5.	Absorption dynamique de vapeur d'eau.....	96
III.6.	Test de dégradation	96
III.7.	Conclusion.....	97
IV.	Cytocompatibilité des supports.....	98
V.	Etude des propriétés ostéoinductrices des nanofibres	100
V.1.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	100
V.2.	Analyse thermogravimétrique (ATG)	102
V.3.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	103
V.4.	Diffraction des rayons X (DRX)	104
VI.	Conclusion.....	106

TROISIEME PARTIE. ELABORATION DE NANOFIBRES DE CHITOSANE SULFONIQUE À PROPRIETES ANTITHROMBOTIQUES.....	107
--	------------

Chapitre I. Etude bibliographique	109	
I. Traitements de surface antithrombotiques.....	112	
I.1.	Traitement à l'oxyde nitrique	112
I.2.	Immobilisation d'agents thérapeutiques.....	113
I.2.1.	Les agents antiplaquettaires	114
I.2.2.	Les agents thrombolytiques.....	114
I.2.3.	Les agents anticoagulants.....	115
II. Sulfonation du chitosane.....	117	
III. Conclusion.....	120	
Chapitre II. Produits, matériels et techniques de caractérisation	122	
I. Synthèse des dérivés sulfonés du CHT	124	
II. Techniques de caractérisation des dérivés CHT1S et CHT2S	126	
II.1.	Caractérisations physicochimiques	126
II.1.1.	Analyse élémentaire	126
II.1.2.	¹ H-RMN	126
II.1.3.	Spectroscopie infrarouge	127
II.1.4.	Spectroscopie UV-visible.....	127
II.1.5.	Potentiel zêta	127
II.1.6.	Domaine de solubilité en fonction du pH.....	127
II.1.7.	Mesure de viscosité dynamique	128
II.2.	Caractérisations biologiques	128
II.2.1.	Cytotoxicité par méthode d'extraction	128
II.2.2.	Etude d'hémocompatibilité	128
III. Elaboration de nanofibres par electrospinning.....	131	
Chapitre III. Résultats et discussion.....	134	
I. Synthèse et caractérisations des chitosanes sulfoniques	136	
I.1.	Résonance magnétique nucléaire du proton (¹ H-RMN).....	136
I.2.	Analyse élémentaire	138
I.3.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-IRTF).....	140
I.4.	Spectroscopie UV.....	142
I.5.	Potentiel zêta	143

I.6.	Etude de solubilité	145
I.7.	Etude de la viscosité dynamique	146
I.8.	Conclusion.....	147
II.	Propriétés biologiques.....	148
II.1.	Test de cytocompatibilité	148
II.2.	Etudes de l'hémocompatibilité.....	149
II.2.1.	Test d'hémolyse	149
II.2.2.	Test de coagulation.....	149
III.	Electrospinning du CHT2S-2 et CHT1S-2.....	153
III.1.	Optimisation de l'électrofilage du CHT2S-2	154
III.2.	Electrofilage du CHT1S-2.....	159
III.3.	Conclusion.....	160
IV.	Stratégie alternative : sulfonation des nanofibres du chitosane	160
IV.1.	MEB	161
IV.2.	IRTF-ATR.....	161
IV.3.	¹ H-RMN	162
V.	Conclusion.....	163
QUATRIEME PARTIE. POSITION DE LA MEMBRANE ELECTROFILEE AU REGARD DE LA REGLEMENTATION EUROPEENNE.....		
164		
1.	Développement du biomatériau	169
2.	Stratégie règlementaire	170
3.	Organisation	177
Conclusion générale		164
Perspectives.....		164
Références bibliographiques		164
Liste des publications et des communications		164
Annexes		164

Principales abréviations

Produits, réactifs et polymères

AA	Acide acétique
AO	Acide orange II
BCA	Acide bicinchoninique
BMP-2	Protéine morphogénétique osseuse 2
BZ1S	Sels de sodium de l'acide 2-formylbenzènesulofnique
BZ2S	Sels de sodium de l'acide 4-formyl-1,3-benzènedisulfonique
CaP	Phosphate de calcium
CHT	Chitosane
CHTS	Chitosane sulfonique
CHT1S	Chitosane monosulfonique
CHT2S	Chitosane disulfonique
DA	Dopamine
GAG	Glycosaminoglycane
HA	Hydroxyapatite
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Poly (ϵ -caprolactone)
pDA	Polydopamine
PEO	Poly (oxyde d'éthylène)
PLA	Poly (acide lactique)
PLGA	Poly (acide lactique-co-glycolique)
SBF	Fluide corporel simulé
THF	Tétrahydrofyrane
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane

Appareils et techniques

ATG	Analyse thermogravimétrique
DVS	Mesure dynamique de soprtion d'eau
EDS	Spectroscopie à rayon X à dispersion d'énergie
^1H -RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
MEB	Microscopie électronique à balayage

Abréviations diverses

Anti-Xa	Anti facteur X activé
DD	Degré de désacétylation
DM	Dispositif médical
DMI	Dispositif médical implantable
DS	Degré de substitution
FDA	« Food and Drug Administration »
HR	Humidité relative
IH	Indice hémolytique
IT	Ingénierie tissulaire
ITO	Ingénierie tissulaire osseuse
MEC	Matrice extracellulaire
NF	Nanofibre
ON	Organisme notifié
PZ	Potentiel zêta
TCA	Temps de céphaline activé
TP	Temps de prothrombine

Introduction générale

Le vieillissement de la population, les maladies héréditaires et les traumatismes peuvent générer une altération des organes ou des tissus comme les os, les vaisseaux et la peau, ce qui pose un sérieux problème de santé publique. Pour cette raison, elle a été définie comme étant un axe de Recherche prioritaire dans le cadre du Groupement De Recherche (GDR) « réparer l'humain ». Afin de pallier à ce problème, des dispositifs médicaux et des biomatériaux, notamment des prothèses (vasculaires, de hanche, pour hernie), des substituts osseux ou des scaffolds pour la régénération des tissus, ont été développés. Ils ont pour but de renforcer, de régénérer et de remplacer un tissu, un organe ou une fonction devenue défectueuse. Ces biomatériaux peuvent être composés de divers matériaux, allant des polymères biostables (PP, PET) ou biodégradables (PLA, collagène, polysaccharides), d'origine synthétique ou naturelle, des céramiques (hydroxyapatite, phosphate tricalcique, verres bioactifs) jusqu'aux métaux (alliages CoCr, NiTiNOL).

Actuellement, la recherche tend à développer des biomatériaux de troisième génération, dits « *bioactifs* », qui sont capables d'interagir avec les tissus vivants, avec lesquels ils seront mis en contact en vue d'accélérer le processus de guérison et d'améliorer l'intégration de l'implant via, par exemple, la libération de principes actifs, le contrôle de l'adhésion cellulaire ou la présence de signaux pour la croissance cellulaire. Pour cela, le développement des biomatériaux fonctionnalisés a conduit à l'adoption d'un cahier des charges bien strict, notamment en termes de sécurité et d'efficacité pour répondre aux exigences essentielles spécifiques de la directive 93/42/CEE. En outre, le dispositif qui est mis en place doit favoriser l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire et inhiber en même temps le développement des cellules à caractère pathologique, en particulier les cellules cancéreuses.

Afin de répondre au mieux à ce cahier des charges, plusieurs stratégies sont développées. Parmi les solutions des plus efficaces, le développement de supports nanostructurés et biomimétiques, notamment des hydrogels et des nanofibres, est favorisé en raison de leur structure qui mime celle de la matrice extracellulaire, permettant ainsi d'améliorer la biointégration du biomatériau au sein de son environnement hôte.

Une technique attrayante, à laquelle la recherche académique et industrielle attache un grand intérêt, consiste en l'électrofilage de différents types de matériaux, principalement les polymères, sous forme de textiles. En effet, l'électrospinning permet d'élaborer des nanofibres à partir d'une solution de polymères par simple application d'un haut champ électrique entre l'aiguille et le collecteur. Une large gamme de polymères biocompatibles, biostables et/ ou

biorésorbables peut être électrofilable. De plus, les supports nanofibreux obtenus se caractérisent par une surface spécifique élevée, par une forte porosité avec des pores interconnectés de taille modulable et par une structure qui est très similaire à celle de la matrice extracellulaire. Les nanofibres présentent ainsi un grand potentiel pour des multiples applications biomédicales en tant que systèmes de libération de principes actifs ou en tant que « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire ou pour la médecine régénérative.

Dans le cadre de cette thèse, un intérêt particulier sera porté aux nanofibres de chitosane. Le chitosane est un polysaccharide d'origine naturelle très connu en raison de ses propriétés biologiques (la biocompatibilité, l'hémocompatibilité, l'activité antibactérienne, pro-cicatrisation). En outre, depuis l'émergence de l'électrospinning dans les années 2000, de nombreuses applications des nanofibres de chitosane ont vu le jour, à savoir les traitements de plaies (pansements) ou les « scaffolds » pour la médecine régénérative. Toutefois, la présence des groupements fonctionnels dans la structure chimique du chitosane permet d'explorer différentes modifications chimiques afin d'améliorer ses propriétés biologiques ou de lui en conférer des nouvelles.

Depuis 2013, l'électrospinning est une thématique émergente au sein de notre laboratoire UMET, et en particulier l'équipe « Ingénierie des Systèmes Polymères ». Effectuée en collaboration avec l'INSERM – unité U1008, cette thèse a pour objectif d'élaborer des membranes de nanofibres de chitosane à propriétés originales et innovantes, plus spécifiquement ostéoinductrices ou anticoagulantes dans le but de répondre aux deux problématiques qui sont respectivement liées au remodelage osseux et vasculaire.

Les problématiques osseuses sont très fréquentes en chirurgie dentaire, maxillofaciale et orthopédique, suite à des traumatismes osseux ou à des maladies tels que l'ostéoporose ou le cancer. Les solutions cliniques actuelles consistent, le plus souvent, en l'utilisation de substituts osseux à base d'hydroxyapatite sous forme de granules ou de blocs ou d'éponges à base de collagène, par exemple lorsque la greffe autologue n'est pas possible. Toutefois, ces solutions ne sont pas entièrement satisfaisantes à cause de leurs propriétés physicochimiques, mécaniques et/ ou biologiques.

Les membranes nanofibreuses présentent ainsi un grand potentiel pour une utilisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse, dont le principal challenge est de fabriquer des substituts osseux qui soient capables d'induire la régénération de l'os. Les propriétés de surface

jouent un rôle primordial dans la régulation du comportement cellulaire, la différenciation ostéogénique et dans la biominéralisation.

Le premier objectif de cette thèse est d'élaborer des supports nanofibreux qui possèdent des propriétés ostéoinductrices. Pour ce faire, les nanofibres seront, dans un premier temps, formées par électrospinning à partir du chitosane. Un traitement de surface sera ensuite appliqué afin d'obtenir les propriétés désirées, à savoir la capacité du biomatériau à induire la biominéralisation. Pour ce faire, une stratégie simple sera choisie pour ces travaux de recherche. Elle consiste en le dépôt d'un revêtement de polydopamine à la surface des nanofibres par immersion des supports dans une solution de dopamine.

Par ailleurs, certains dispositifs implantables, notamment les endoprothèses et les stents, seront destinés à être en contact avec le sang, pouvant provoquer un phénomène de thrombose. La thrombose est une des principales causes des troubles thromboemboliques dont des millions de personnes souffrent à travers le monde. Pour cette raison, les solutions cliniques actuelles s'orientent vers l'utilisation d'agents anticoagulants, le plus souvent l'héparine qui fait partie des glycosaminoglycanes. Même si leur efficacité est incontestée, ces médicaments présentent malgré tout plusieurs effets indésirables et leur activité anticoagulante est limitée dans le temps en raison de leur solubilité.

Pour pallier à ces problèmes, la recherche s'oriente vers, d'une part, la fonctionnalisation des biomatériaux avec des agents anticoagulants, afin de bénéficier d'une activité thérapeutique locale via une libération contrôlée des principes actifs et, d'autre part, la fabrication des dispositifs à partir de polymères « heparin-like ». Ces polymères sont le plus souvent, préalablement modifiés par greffage des fonctions sulfates et/ ou carboxyliques qui sont responsables de l'activité antithrombotique.

Dans notre étude, le chitosane, un polysaccharide qui possède une structure similaire à celle des glycosaminoglycanes, sera modifié chimiquement, en greffant des groupements sulfonates dans le but de lui conférer la propriété antithrombotique désirée. Pour ce faire, une méthode publiée par notre équipe qui consiste en une réaction d'amination réductive sera utilisée. Ces dérivés de chitosane seront par la suite électrofilés.

En conséquence, cette thèse sera répartie en quatre parties :

La première sera consacrée à l'étude bibliographique qui nous placera dans le contexte. Nous allons pour cela nous intéresser en premier lieu au procédé de l'électrospinning et aux

propriétés et applications des nanofibres dans le domaine biomédical. Puis, le chitosane, ses propriétés et les applications des nanofibres à base de chitosane seront détaillés. Enfin, et sur la base des données précédentes, les deux problématiques qui seront développées dans cette thèse seront présentées. Dans le dernier chapitre, il sera question de la sulfonation du chitosane et des différents biomatériaux antithrombotiques.

La deuxième partie comportera trois chapitres. Le premier consistera en un état de l'art sur la place des nanofibres de chitosane et leur fonctionnalisation au sein de l'ingénierie tissulaire osseuse. Le deuxième chapitre traitera de l'élaboration des nanofibres de chitosane à propriétés ostéoinductrices, en listant les réactifs et les produits utilisés, de même que les techniques et les méthodes employées dans ce travail. Le dernier chapitre sera consacré à l'étude de fonctionnalisation des supports avec la polydopamine et à l'évaluation de leur capacité à induire la régénération osseuse.

La troisième partie sera également composée de trois chapitres. Une étude bibliographique sur les différents biomatériaux antithrombotiques et la sulfonation du chitosane sera développée dans un premier chapitre. Le deuxième sera consacré à l'élaboration des nanofibres à partir de chitosane sulfoné à propriétés antithrombotiques. La liste des réactifs, des produits, du matériel et des techniques de caractérisation sera ainsi détaillée. La synthèse des chitosanes sulfonés et l'évaluation de leur activité biologique et les conditions optimales d'électrofilage seront investiguées dans un troisième chapitre.

Pour terminer, dans la quatrième partie, nous présenterons la position de la membrane nanofibreuse au regard de la réglementation européenne.

PREMIERE PARTIE.

NANOFIBRES DE CHITOSANE POUR

APPLICATIONS BIOMEDICALES

Les textiles techniques représentent une part importante du marché mondial des textiles et sont en constante évolution en termes de technologies, d'applications, d'innovation ou de performance des produits. Ce marché devrait continuer à croître entre 2018 et 2026 de l'ordre de 3,5% par an¹.

Le « *textile technique* » couvre plusieurs secteurs, comme l'agriculture, le sport, l'automobile et le secteur médical. Selon « Research and Markets », d'ici 2022, le marché des textiles biomédicaux devrait atteindre 14,50 milliards de dollars contre 11 milliards en 2017, avec un taux annuel moyen de croissance de l'ordre de 5,7%, entre 2017 et 2022². Cette évolution du marché peut être attribuée à l'utilisation croissante de textiles médicaux dans des applications implantables ou non. Elle est également due à la population vieillissante, l'évolution des modes de vie (surpoids, maladies chroniques) ou encore à la menace accrue des nouveaux virus et de souches bactériennes qui induisent un besoin plus important de nouvelles stratégies de traitement^{3,4}. En effet, grâce à leurs multiples propriétés, les matériaux textiles sont considérés comme des candidats de choix, capables de répondre au mieux aux besoins des patients et des cliniciens.

Les biomatériaux textiles sont très utilisés, dans le domaine médical, surtout dans trois secteurs, à savoir les dispositifs de diagnostic et de surveillance (électrode et brassard pour tensiomètre, pacemakers), ceux de protection et d'hygiène (les linges hospitaliers jetables ou réutilisables, les systèmes de filtration) et ceux de soin et de thérapie⁵. Ces derniers, considérés comme des dispositifs médicaux d'un point de vue réglementaire, sont utilisés pour le soin des blessures ou pour la conception de prothèses de renforcement ou de remplacement de tissus qui ont été endommagés. On retrouve dans cette catégorie, les dispositifs médicaux implantables et non implantables (*cf. Figure 1*).

Les dispositifs textiles **non-implantables** à usage externe sont souvent destinés à être en contact avec la peau, comme pour les soins des plaies (pansements), les bandages, le plâtre, les vêtements sous pression ou pour les ceintures orthopédiques⁶. En revanche, les dispositifs textiles sont dits **implantables**, selon l'annexe II de la directive 93/42/CEE lorsqu'ils sont totalement introduits, chirurgicalement ou médicalement, dans le corps humain et sont destinés à y demeurer après l'intervention⁷. Ils comprennent les prothèses pour différents types de chirurgie, comme pour les prothèses orthopédiques, les pacemakers (dispositif médical implantable actif), les stents cardiovasculaires et les prothèses neurales.



Figure 1. Les différents types de textiles médicaux et leur utilisation dans le domaine biomédical, (a) Masque de protection, MEDICOM⁸ ; (b) Couvre-tête, MEDICOM⁹ ; (c) Champ opératoire, PRAXISDIENST¹⁰ ; (d) Tensiomètre, BEURER¹¹ ; (e) Lecteur de glycémie sanguine, BEURER¹² ; (f) Thermomètre, BEURER¹³ ; (g) Minerve, THUASNE¹⁴ ; (h) Bande extensible, URGO¹⁵, (i) Pansement, URGO¹⁶ ; (j) Fil de suture, PÉTERS SURGICAL¹⁷ ; (k) Lentilles de contact, COOPERVISION¹⁸ ; (l) Renforcement pour Hernie inguinale, COUSIN BIOTECH¹⁹

Pour ces raisons, les textiles médicaux sont appelés à se conformer à un cahier des charges, dont la teneur varie selon les applications visées tel qu'un caractère non allergène, non irritant, biostable ou biorésorbable, bactériostatique ou bactéricide, biocompatible, etc. Par ailleurs, les textiles évoluent de nos jours de façon à ce qu'ils assurent des interactions entre le dispositif médical et son environnement hôte ; ils participent activement à la cicatrisation, supportent la régénération des tissus (l'os, la peau), activent ou inhibent la thrombose, etc. On parle alors de textiles dits « bioactifs ».

Différentes technologies de filage, exemples la voie fondue, la voie humide ou encore l'électrospinning, exploitées pour la formation de textiles, possèdent des fonctionnalités très spécifiques²⁰. Ces textiles médicaux sont généralement des produits à base de polymères.

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement au procédé d'électrospinning, une technique qui est en plein essor pour la fabrication de membranes de nanofibres dans le domaine biomédical. L'historique, le procédé, l'influence des différents paramètres et les matériaux qui peuvent être utilisés seront traités dans la section suivante.

I. Electrospinning pour applications biomédicales

I.1. Historique

La technique de l'électrospinning est considérée comme la seule qui permette de produire des fibres continues à l'échelle nanométrique. L'idée d'utiliser un fort potentiel électrique pour induire la formation de gouttelettes liquides remonte à plus de 100 ans²¹⁻²⁵ (cf. Figure 2).

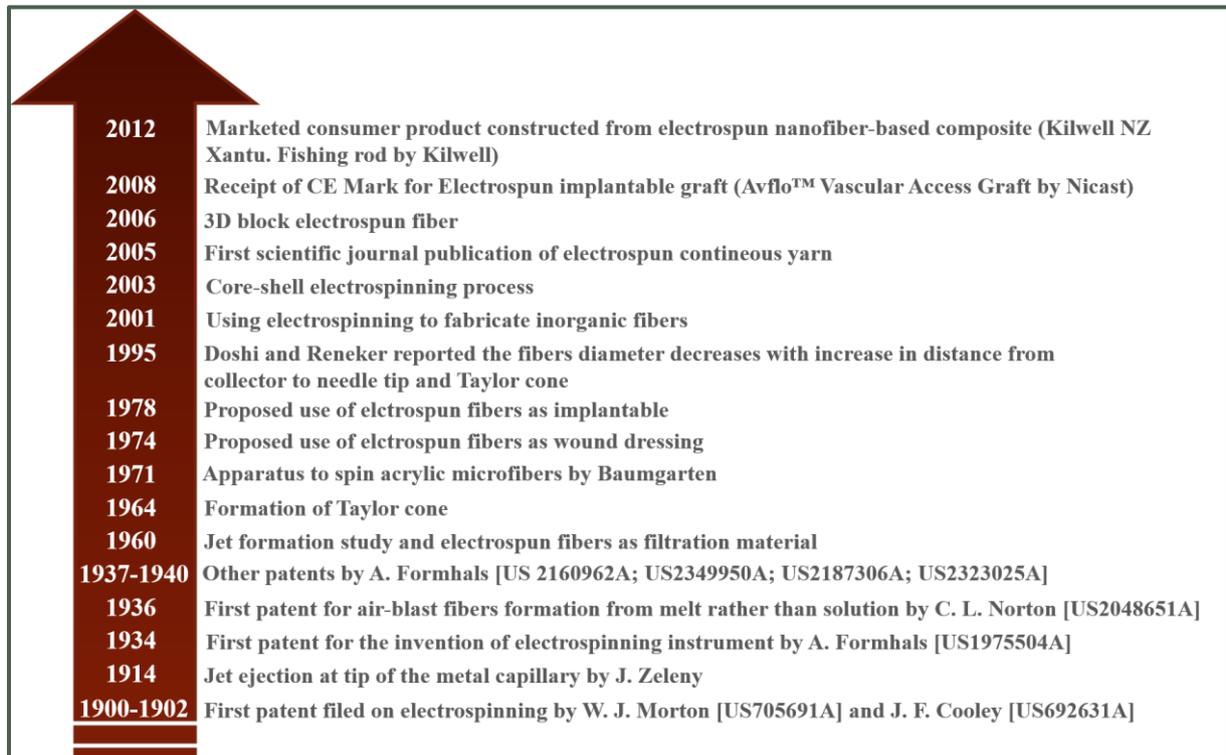


Figure 2. Chronologie de l'histoire de l'électrospinning^{26,27}

L'électrospinning a été découvert en 1897 par Raleigh²⁸ et breveté par Morton en 1900²⁴ et Cooley en 1902²². Seulement, cette technique n'a pas été adoptée industriellement, à cause des difficultés rencontrées lors de l'évaporation du solvant et la collecte des nanofibres pendant le processus, et de la compétition à laquelle elle a été confrontée avec les processus d'étirage mécanique qui permet de former des fibres de polymères.

En 1934, Formhals a décrit ce procédé d'électrospinning dans un brevet ; ce qui a suscité plus d'intérêt pour cette méthode. Formhals a rapporté le filage des fibres d'acétate de cellulose entre deux électrodes de polarité opposée²⁹. L'une des deux électrodes a été placée au niveau de la solution et l'autre sur le collecteur. Après quoi, Formhals a affiné sa première approche dans son second brevet qui traitait de la variation de la distance entre l'aiguille et le collecteur pour augmenter le temps d'évaporation du solvant³⁰.

Au cours des années 1960, des études ont été menées par Taylor au sujet du processus de formation du jet. Il a étudié la transformation de la goutte de solution de polymère en cône après application d'un champ électrique. Ainsi, la forme conique formée quand les forces électriques surmontent la tension de surface de la solution a été appelée plus tard, « cône de Taylor »^{31,32}. Au cours des années suivantes, la recherche a été orientée vers la caractérisation des nanofibres électrofilées et la compréhension des relations qui existent entre les différents paramètres du procédé et la morphologie des fibres³³.

Au début des années 1990, plusieurs groupes de recherche ont ravivé l'intérêt pour l'électrospinning. Reneker et ses pairs ont prouvé le potentiel de cette technique dans le domaine de la nanotechnologie, puisque les fibres obtenues possèdent des diamètres à l'échelle nanométrique³⁴⁻³⁶. Par ailleurs, une grande variété de polymères a pu être utilisée d'une façon rentable ; ce qui a permis le recours à l'électrospinning dans les laboratoires de recherche^{37,38}. Pour cela, la technique, qui a été appelée « filage électrostatique », s'appelle désormais l'« électrofilage » ou « electrospinning ». Elle est aujourd'hui largement employée dans la littérature en tant que technique viable pour la production de fibres ultrafines à partir d'une solution de polymère ou de polymère à l'état fondu (melt electrospinning), via l'application d'un champ électrique. Le nombre de publications issues des laboratoires de recherche, des Instituts de recherches et d'entreprises, qui est en constante augmentation (2 publications en 2000 contre 4300 en 2017), met en évidence l'intérêt croissant pour cette technique³⁹ (cf. Figure 3).

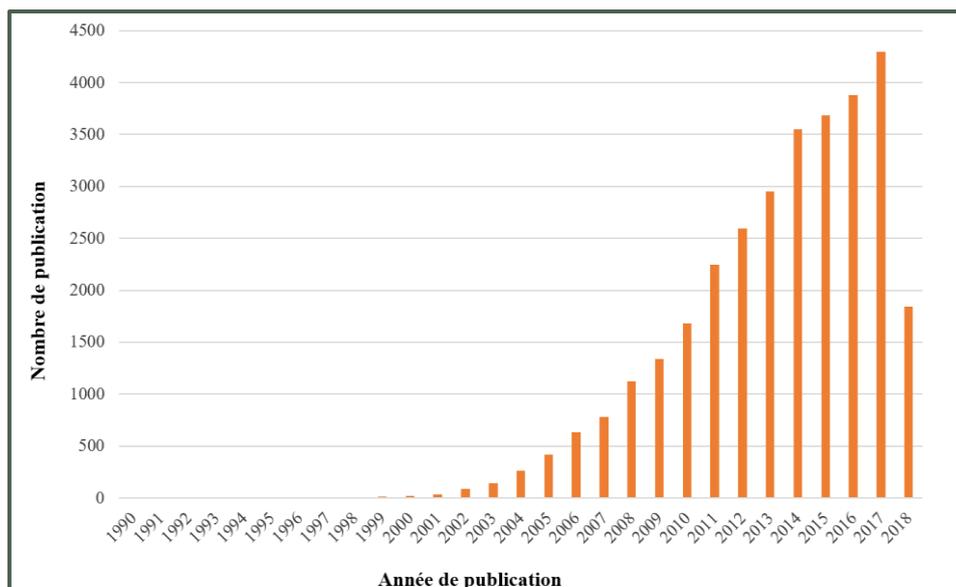


Figure 3. Nombre de publications liées au procédé electrospinning, source : Scopus, mots-clés: electrospinning ou electrospun, rapporté le 13 Mai 2018

I.2. Description du procédé

Plusieurs études ont été effectuées pour mieux comprendre le processus de formation du jet, à partir de la solution de polymère ou, plus rarement, à partir du polymère fondu^{35,40-43}.

Quatre composants majeurs sont nécessaires pour cette technique, à savoir un générateur pour produire le champ électrique, une pompe à seringue, un tube capillaire comportant une aiguille et un collecteur (*cf. Figure 4*). Une solution de polymère est introduite dans une seringue et est transférée jusqu'à l'aiguille grâce à une pompe à seringue qui permet de contrôler également le débit. L'aiguille peut être, soit reliée directement à la seringue, soit branchée à un tube capillaire connecté à la seringue. Un haut voltage est appliqué causant la déformation et l'étirement de la goutte de solution de polymère sous forme d'un cône.

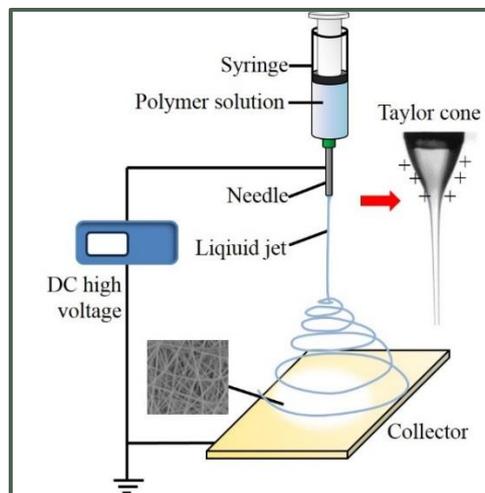


Figure 4. Représentation schématique du procédé electrospinning⁴⁴

Sous l'effet de la tension, la gouttelette de la solution de polymère à la sortie de l'aiguille devient statiquement chargée et les charges induites sont uniformément réparties à la surface. Cette accumulation de charges peut causer une protrusion, donnant ainsi à la goutte une forme conique appelée « cône de Taylor ». Lors de l'augmentation du champ électrique, les forces électrostatiques répulsives surmontent la tension de surface et le jet chargé est éjecté du cône de Taylor quand une valeur critique est atteinte. Le comportement du jet peut être réparti en trois phases : le cône de Taylor, le jet droit et le jet instable sous forme de fouet⁴⁵. Par la suite, cette instabilité est de plus en plus importante lorsque les fibres se dirigent vers le collecteur (« whipping »). Cette action contribue à l'étirement des fibres et l'évaporation du solvant. Ainsi, un dépôt aléatoire de nanofibres sur le collecteur est formé. Le procédé d'électrospinning et les différentes étapes de formation du jet et des fibres sont illustrés dans la *Figure 5* ci-dessous.

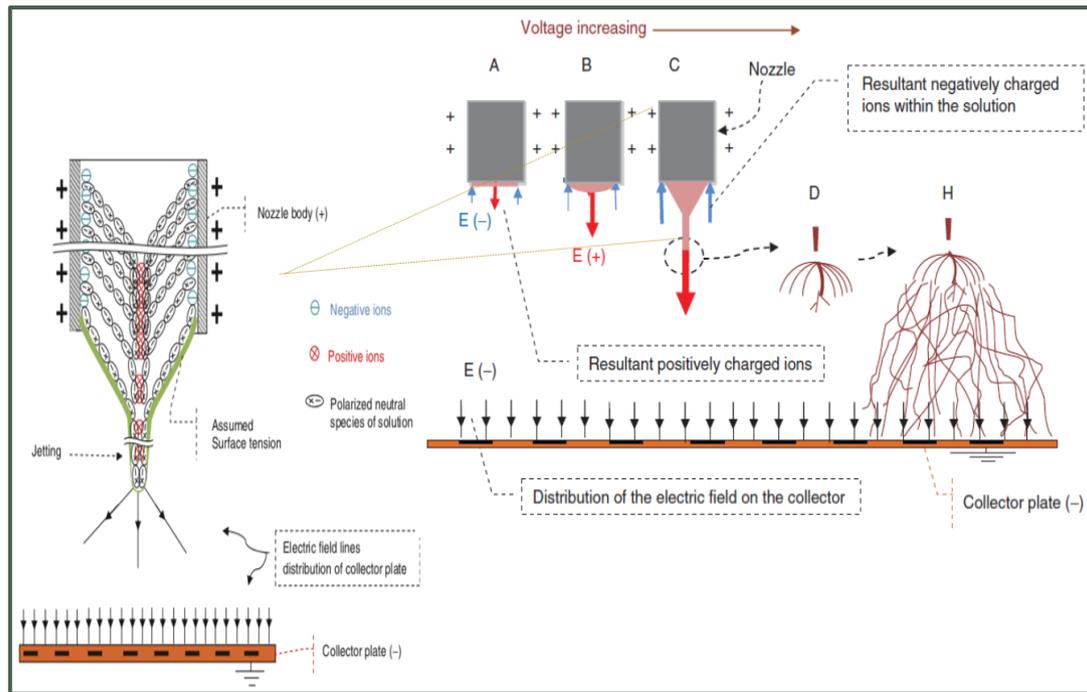


Figure 5. Représentation schématique du processus electrospinning étape-par-étape⁴⁶

I.3. Influence des différents paramètres

Le contrôle de la morphologie des nanofibres et de la structure de la membrane peut s'opérer à travers le réglage des paramètres de solution, en paramètres du procédé et en paramètres environnementaux^{28,32,47}.

I.3.1. Paramètres de solution

Les paramètres de solution, particulièrement la concentration, la masse molaire du polymère, la viscosité, la conductivité et la tension de surface sont les plus décisifs.

La **viscosité** de la solution dépend de sa concentration. A faible concentration, un mélange de fibres et de billes (en anglais « beads ») est obtenu, car la viscosité est faible et la tension de surface de la solution est élevée⁴⁸. De leur côté, Beachley *et al.* ont montré que le diamètre des fibres augmentaient avec l'augmentation de la concentration du polymère, mais que l'uniformité des fibres diminuait à forte concentration. En effet, trois régimes de concentration ont été identifiés par Colby *et al.* en mesurant la viscosité en fonction de la concentration d'un polymère en solution; dilué, semi-dilué et concentré⁴⁹. Le système semi-dilué peut être lui-même différencié en semi-dilué non enchevêtré et semi-dilué enchevêtré, qui sont délimités par une concentration d'enchevêtrement (C_e), la concentration minimale nécessaire pour permettre l'électrofilage de la solution de polymère (*cf. Figure 6*). Ainsi, l'obtention d'une concentration optimale est nécessaire pour la formation de nanofibres⁵⁰⁻⁵³.

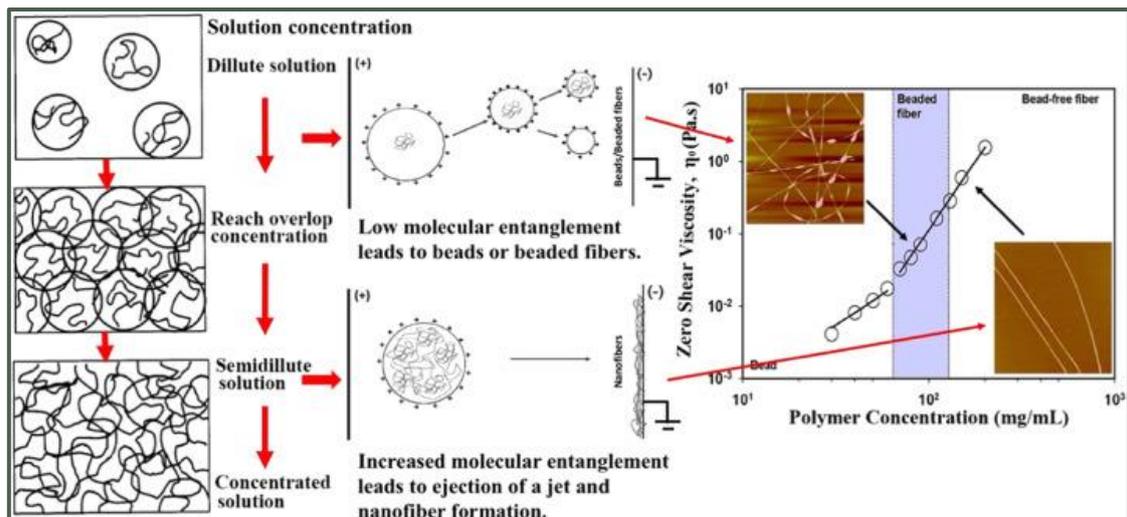


Figure 6. Influence de la concentration et de l'enchevêtrement moléculaire du polymère sur la morphologie des nanofibres obtenues par electrospinning⁵⁴

La **masse molaire** est un autre paramètre important. L'augmentation de la masse molaire induit l'augmentation de l'enchevêtrement des chaînes du polymère provoquant l'augmentation de la viscosité^{55,56}. Jacobs *et al.* ont prouvé qu'à concentration fixe, l'utilisation du poly (oxyde d'éthylène) (PEO) à masse molaire faible ($3 \times 10^5 \text{ g. mol}^{-1}$) et plus élevée ($9 \times 10^5 \text{ g. mol}^{-1}$), entraîne, respectivement, la formation de billes et de fibres ayant des diamètres très larges⁵⁷.

Une **tension de surface** élevée nécessite d'appliquer un voltage plus élevé pour produire des fibres⁵². Il a été rapporté par Persano *et al.* que la réduction de la tension de surface contribue à la formation de nanofibres sans billes³⁸, mais qu'une faible tension de surface n'est pas toujours adaptée pour les conditions optimales d'electrospinning^{58,59}. En outre, dans le cas des solvants organiques très volatiles, il est impossible d'obtenir des nanofibres car l'évaporation du solvant est trop rapide ; ce qui engendre le « séchage » de la solution au niveau de l'aiguille et donc son colmatage. Pour y remédier, il est nécessaire de saturer l'atmosphère de la chambre où se situe l'appareillage par des vapeurs de solvant.

Le solvant, le type de polymère ainsi que la présence de sels, ont également un impact sur la **conductivité** de la solution. Une solution dont la conductivité est élevée permet l'obtention de nanofibres ayant un diamètre faible. Casasola *et al.* ont étudié l'effet de plusieurs solvants sur l'electrospinning du PLA et ont montré que l'utilisation d'acétone permet d'obtenir des nanofibres grâce à sa forte conductivité et à sa faible tension de surface. A l'inverse, des billes et très peu de fibres ont été obtenues lorsque des solvants 1,4-dioxane et tétrahydrofurane (THF), ayant une faible conductivité et une forte tension de surface, sont utilisés⁶⁰. Lorsque la conductivité est faible, très peu de charges sont présentes à la surface de la goutte ; ce qui empêche le cône de se former. L'ajout de sels permettrait d'augmenter la conductivité et la

densité de charges de la solution⁶¹. En effet, Zhong *et al.* ont mis en évidence que l'ajout de sels (1 wt%) dans une solution de poly (acide D, L-lactique) (PDLLA) permet d'obtenir des fibres uniformes et sans billes mais que la morphologie des fibres dépend de la nature des sels ajoutés. L'utilisation de sels NaCl a permis l'obtention de fibres de diamètre moyen de l'ordre de 210 nm, alors que l'ajout de KH_2PO_4 , à la même concentration, a donné des fibres de diamètre beaucoup plus élevé (1000 nm)⁶².

I.3.2. Paramètres du procédé

Des paramètres du procédé influent également sur la structure et la morphologie des nanofibres, parmi lesquels on peut citer le voltage, le débit d'injection de la solution et la distance entre l'aiguille et le collecteur⁶³.

Le **voltage** est un facteur crucial pour l'élaboration de nanofibres. Afin de former un jet à partir de la solution de polymère, il est nécessaire que le voltage atteigne une valeur critique, un potentiel plus élevé que la tension de surface à l'interface solution/ environnement³⁸. Cette valeur critique varie d'un polymère à un autre. Quand la concentration ou la viscosité augmente, un champ électrique plus fort devient nécessaire pour surmonter la tension de surface et les forces viscoélastiques pour l'étirement des fibres. Une augmentation du voltage au-delà de la valeur critique entraîne la formation de gouttes ou de fibres contenant des billes, car la taille du cône de Taylor diminue et le jet est éjecté rapidement laissant parfois très peu de temps au solvant de s'évaporer⁵². En revanche, un voltage relativement faible est non favorable à la formation du cône de Taylor induisant un dépôt de gouttes sur le collecteur^{48,62}. Par exemple, Deitzel *et al.* ont montré que l'augmentation du voltage appliqué entraîne la formation de billes à partir d'une solution de PEO⁴⁸. Des résultats similaires ont été obtenus par Zong *et al.* qui ont étudié la morphologie des membranes de poly (acide lactique) (PLA) en fonction du voltage appliqué. A 20 kV, des membranes de fibres contenant peu de billes ont été obtenues. A 25 kV, le volume de la goutte est devenu plus petit et le cône de Taylor asymétrique engendrant la formation de fibres ayant plus de billes de diamètre moyen plus faible que celles obtenues à 20 kV. En augmentant le voltage (30 kV), le cône de Taylor a disparu et le nombre de billes sphériques a augmenté⁶². Ainsi, le voltage a un effet sur le diamètre des fibres, mais l'importance d'impact varie en fonction de la concentration de la solution et de la distance entre l'aiguille et le collecteur⁶⁴.

La **distance entre l'aiguille et le collecteur** est un autre facteur à prendre en considération pour contrôler les diamètres et la morphologie des fibres mais qui n'a pas autant d'impact que

les autres paramètres traités auparavant^{65,66}. Si la distance est très faible ou très grande, il y'a formation de gouttes⁶⁷. Ainsi, une distance minimale est requise pour permettre l'évaporation du solvant avant d'atteindre le collecteur, de même qu'une distance maximale car le champ électrique faiblit avec l'augmentation de la distance.

Le **débit** est un paramètre important car il influe sur la vitesse du jet. Plusieurs études ont mis en évidence la relation qui existe entre le débit, la morphologie et la taille des fibres⁶⁸. Un faible débit est privilégié parce que, de cette manière, le solvant a le temps de s'évaporer et des fibres fines, possédant un minimum de défauts, sont obtenues⁶². Un débit élevé engendre la formation de billes, vu que le solvant ne s'évapore pas totalement^{28,69}.

I.3.3. Paramètres environnementaux

Les conditions environnementales, telles que la température et l'humidité relative, peuvent avoir aussi un effet sur la morphologie et sur le diamètre des nanofibres⁷⁰⁻⁷². Une augmentation de la température provoque la diminution de la viscosité de la solution ; ce qui entraîne la formation de nanofibres plus fines. En outre, une humidité relative faible accélère l'évaporation lorsque l'eau est utilisée comme solvant ; sinon la condensation d'eau sur les nanofibres en solvant organique peut provoquer une porosité. Des fibres ayant un diamètre important sont alors obtenues. De plus, la température et l'humidité relative ont une influence sur la morphologie des nanofibres. En effet, Putti *et al.* ont mis en évidence la présence de nanopores sphériques à la surface des nanofibres de poly (ϵ -caprolactone) (PCL) au fur et à mesure de l'augmentation de la température et/ ou de l'humidité relative⁷³.

En conclusion, afin d'obtenir la morphologie des nanofibres désirées, il faut contrôler plusieurs paramètres qui sont dépendants les uns des autres. Ces différents paramètres et leurs effets sur la morphologie des fibres sont résumés dans le *Tableau 1* ci-après.

Tableau 1. Les différents paramètres d'electrospinning et leurs effets sur la morphologie des nanofibres²⁸

Paramètres	Effets sur la morphologie des nanofibres	Références
Paramètres de solution		
Concentration	Diamètre des fibres augmente quand concentration augmente	74
Viscosité	Diamètre des fibres augmente quand la viscosité augmente	75
Masse molaire	La présence de billes et de gouttes diminue quand la masse molaire augmente	76
Conductivité	Diamètre des fibres diminue quand conductivité augmente	56
Tension de surface	Augmentation de tension de surface entraîne l'instabilité des jets	69
Paramètres du procédé		
Voltage	Diamètre des fibres diminue quand voltage augmente	74
Débit	Diamètre des fibres diminue quand débit diminue	66
Distance aiguille-collecteur	Génération de billes quand distance très grande ou très faible	77
Paramètres environnementaux		
Humidité relative	Génération de nanopores sphériques quand augmentation de l'humidité	78
Température	Diamètre des fibres diminue quand température augmente	79

I.4. Propriétés des nanofibres et leurs applications biomédicales

Les nanofibres sont considérées comme étant des matériaux fibreux solides dont le diamètre est égal ou inférieur à 1 μm . Comme il a été indiqué précédemment, elles peuvent être générées à partir de plusieurs types de polymères ; ce qui permet de moduler leurs propriétés physiques, chimiques, mécaniques ou biologiques. De ce fait, les nanofibres peuvent être utilisées dans de nombreuses applications industrielles, notamment dans les semi-conducteurs⁸⁰, dans la purification des eaux⁸¹ ou dans la filtration d'air⁸², et plus spécifiquement dans le domaine biomédical.

La recherche actuelle est orientée vers l'utilisation de matrices à base de nanofibres pour mimer la matrice extracellulaire (MEC) native présente dans les tissus tels que les os, les

ligaments, la peau et les tissus vasculaires. Les nanofibres obtenues après electrospinning sont caractérisées par une surface spécifique élevée et une forte porosité avec des pores interconnectés de taille modulable, une structure similaire à celle de la MEC. Ainsi, les matrices de nanofibres constituent des candidates de choix en tant que supports susceptibles de favoriser l'adhésion, la migration et l'infiltration cellulaire. En outre, les membranes peuvent être fonctionnalisées afin d'améliorer leurs propriétés biologiques et d'élargir leur champ d'application. A titre d'exemple, la présence des facteurs de croissance (BMP, FGF) à la surface des nanofibres favorise la régénération osseuse⁸³, et la présence des cytokines réduit la réponse inflammatoire de l'hôte⁸⁴.

Pour ces raisons les matrices nanofibreuses ont été d'un grand intérêt pour différentes applications biomédicales, comme l'ingénierie tissulaire, la libération de principes actifs, le traitement des plaies (pansements), etc. (cf. Figure 7).

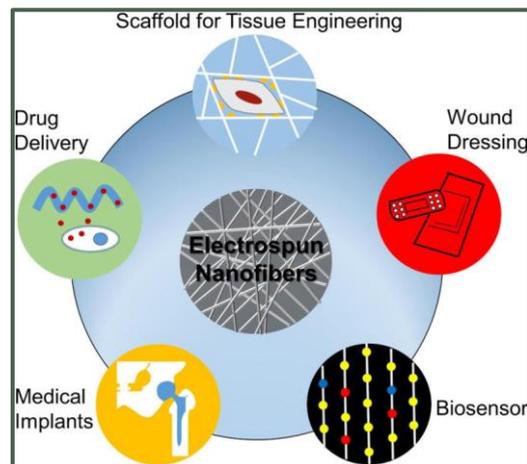


Figure 7. Les applications biomédicales des nanofibres⁸⁵

I.4.1. Systèmes de libération de principes actifs

La libération contrôlée des principes actifs par des matrices de nanofibres à base de polymères biocompatibles, et le plus souvent biodégradables, est abondamment étudiée. Grâce à leur architecture poreuse et à leur surface spécifique, les membranes nanofibreuses sont des candidates de choix pour cette finalité (cf. Figure 8). En effet, plus la surface spécifique est élevée et plus la vitesse de diffusion du principe actif est importante⁸⁶. Selon le matériau utilisé, la libération peut être modulée. En outre, l'incorporation des principes actifs au sein des matrices permettrait de bénéficier d'une activité thérapeutique locale et d'éviter des administrations médicamenteuses par voie orale ou intraveineuse. Dans la littérature, une grande variété de principes actifs a été incorporée dans des membranes à base de nanofibres, y compris les médicaments lipophiles et hydrophiles. Ghaebi Panah *et al.* ont étudié

l'électrospinning des nanotubes de verres bioactifs/ polyvinylpyrrolidone qui ont été chargés en ibuprofène afin d'élaborer des vecteurs mésoporeux pour la libération de principes actifs⁸⁷. Une étude a été effectuée sur le revêtement de stents avec des nanofibres bioabsorbables de PLGA pour la libération prolongée et contrôlée de rosuvastatine et de paclitaxel (27 et 70 jours, respectivement)⁸⁸. En outre, des nanofibres électrofilées de PDLA chargées en méfoxine ont montré une libération totale du principe actif en 24h avec une libération importante après 3h à cause de la présence des molécules de méfoxine à la surface des nanofibres⁶².

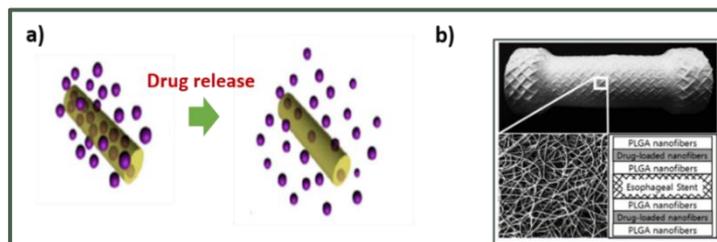


Figure 8. a) schéma d'une nanofibre chargée en principe actif et sa libération b) Stent œsophagien fonctionnalisé avec des nanofibres de PLGA chargées en principes actifs⁸⁹

I.4.2. Traitement des plaies (pansements)

Les pansements sont très utilisés au quotidien pour le soin des plaies suite à une blessure ou après un acte chirurgical. Le pansement doit respecter un cahier des charges spécifique à chaque niveau de la guérison (*cf.* HAS - Les pansements : indications et utilisations recommandées⁹⁰). Entre autres, il doit être hémostatique et perméable aux gaz, hydraté, capable d'absorber l'exsudat en excès, agir comme une barrière antibactérienne et protéger contre l'infection⁹¹. Les membranes à base de nanofibres sont utilisées en tant que pansements grâce à leur architecture micro- et nano-fibreuse et à leurs propriétés morphologiques⁹²⁻⁹⁵. Il est parfois nécessaire d'incorporer des agents antibactériens, telles que des nanoparticules d'argent, pour améliorer le processus de guérison⁹⁶ (*cf.* Figure 9).

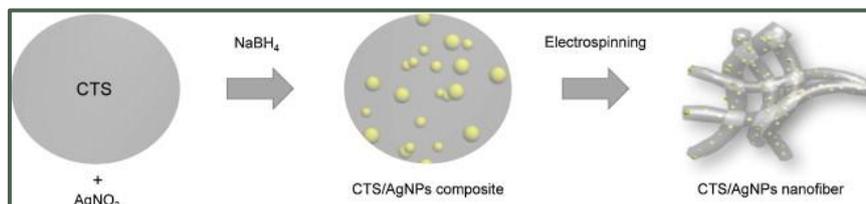
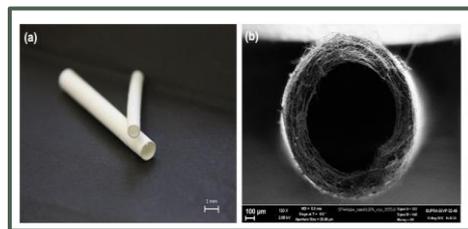


Figure 9. Méthode de préparation de nanofibres de chitosane contenant des nanoparticules d'argent⁹⁶

I.4.3. Prothèses

Les nanofibres sont également explorées pour la conception de dispositifs médicaux implantables. Elles peuvent être utilisées, soit en tant que matériaux nanofibreux pour fabriquer des prothèses comme les prothèses vasculaires (*cf.* Figure 10), soit en tant que revêtement des

prothèses pour améliorer leur intégration tissulaire^{63,97}. Des prothèses tubulaires à base de nanofibres de copolymères ϵ -caprolactame – hexaméthylènediaminadipate ont été préparées par Popryadukhin *et al.* Ces dispositifs médicaux ont donné des résultats biologiques *in vivo* excellents puisqu'une absence de sténose a été observée au bout de 14 mois d'implantation chez les rats au niveau de l'aorte abdominale (*cf. Figure 10*)⁹⁸. En outre, il a été démontré que le revêtement nanofibreux peut prévenir l'infection des prothèses articulaires⁹⁹. Ashbaugh *et al.* ont élaboré un revêtement de prothèses orthopédiques dont l'efficacité antibactérienne permet la prévention d'une infection associée à la formation d'un biofilm au niveau de l'implant orthopédique. Ce revêtement est constitué de nanofibres de PLGA incorporées dans un film de PCL afin de co-délivrer localement des antibiotiques à la surface de l'implant¹⁰⁰.



*Figure 10. Exemple de prothèse vasculaire à base de nanofibres*⁹⁸

I.4.4. Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire qui combine les principes de l'ingénierie et de la biologie. Elle vise à développer des substituts biologiques biomimétiques dans le but de restaurer, de maintenir ou d'améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé (os, cartilage, peau, vaisseaux sanguins, muscles). Les scaffolds sont associés à des facteurs de croissance et/ ou de cellules (triade de l'ingénierie tissulaire). L'électrospinning permet d'obtenir des matrices de nanofibres poreuses, bi- ou tri-dimensionnelles et dont la structure mime celle de la MEC. Par conséquent, ces supports nanofibreux constituent des candidats de choix pour être utilisés en ingénierie tissulaire¹⁰¹. De plus, en variant les paramètres, tels que le choix du matériau, l'orientation des fibres, la porosité ou la modification de surface, les propriétés biologiques des membranes de nanofibres sont modulées. En effet, l'adhésion, la prolifération et l'infiltration cellulaire dépendent de l'architecture des supports. Les cellules qui adhèrent aux matrices microscopiques s'aplatissent et s'étendent comme si elles sont cultivées sur des surfaces planes. Quant aux matrices nanostructurées, elles offrent une plus grande surface spécifique pour l'absorption des protéines et présentent donc plus de sites d'attachement cellulaire (*cf. Figure 11*)¹⁰².

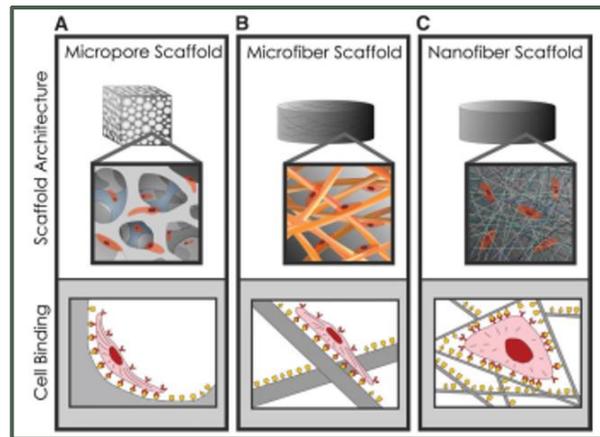


Figure 11. Représentation schématique de l'adhésion et la migration cellulaire en fonction de l'architecture du « scaffold »

La recherche actuelle s'oriente vers la fabrication de supports à partir de polymères biocompatibles et biodégradables pour permettre la formation du tissu néoformé et la dégradation simultanée du dispositif. L'ingénierie tissulaire est appliquée pour la restauration des nerfs, des cellules cardiaques, de l'os ou de la peau (cf. Figure 12).

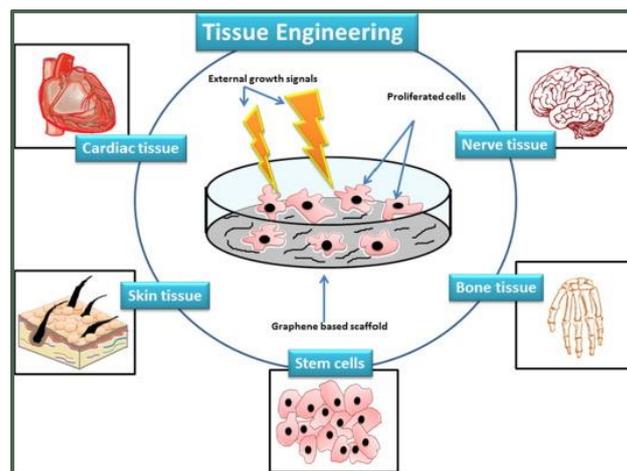


Figure 12. Schéma des différents domaines de l'ingénierie tissulaire¹⁰³

I.5. Polymères utilisés en electrospinning

Plusieurs polymères ont été utilisés pour élaborer des nanofibres par electrospinning^{43,101,104-106}. Ils sont différents en termes de nature chimique, de propriétés mécaniques, de biocompatibilité et de biorésorbabilité. Quelques exemples de polymères synthétiques et naturels parmi les plus utilisés, seront présentés dans cette section¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

I.5.1. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques, plus spécifiquement les biodégradables, présentent un grand intérêt dans le domaine de l'electrospinning. Par exemple, poly (acide lactique), poly (acide

lactique-co-glycolique), poly (caprolactone) ou encore poly (oxyde d'éthylène), ont été largement étudiés dans la littérature pour former des nanofibres synthétiques.

Le **poly (acide lactique) (PLA)** est un polyester biosourcé issu par exemple de l'amidon de maïs. Il s'agit d'un polymère hydrophobe, biodégradable et biocompatible et qui, en raison de ses propriétés mécaniques, est largement utilisé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire¹¹⁰. Selon la masse molaire et l'isomérisation, le PLA se dégrade entre les six mois et les deux ans qui suivent son implantation dans le corps humain¹¹¹. Le PLA peut être électrofilé à partir de sa solution dans des solvants organiques, tels que le dichlorométhane et le chloroforme¹¹². Afin de moduler ses propriétés, notamment sa vitesse de dégradation, des copolymères PLA-PEG-PLA ont été élaborés¹¹³.

Le **poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA)** est un polyester biodégradable synthétique^{114,115} qui a été approuvé par la FDA (Food and drug administration). Il possède des propriétés mécaniques modulables en fonction de sa composition et fait partie des matériaux biodégradables les plus utilisés¹¹⁶. Stachewicz et al. ont préparé des membranes de nanofibres de PLGA qui favorisent l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes pour une application éventuelle en régénération osseuse¹¹⁷. Toutefois, le PLGA est hydrophobe et possède peu de groupements bioactifs, ce qui limite leur interaction avec des cellules spécifiques^{118,119}. De plus, ses produits de dégradation induisent une diminution locale du pH¹²⁰.

La **poly (ε-caprolactone) (PCL)** est un polyester hydrophobe, biocompatible et biorésorbable très utilisé pour des applications biomédicales, tel que le soin des plaies^{121,122}. Elle est fortement cristalline ; ce qui permet de lui conférer des propriétés mécaniques stables et un taux de dégradation faible, de l'ordre d'une année voire de deux ans, via l'hydrolyse de ses groupements esters¹²³. Elle est soluble dans des solvants organiques, notamment dans le chloroforme, le tétrahydrofurane ou le N,N-diméthylformamide pour produire des nanofibres¹²⁴. La PCL est fréquemment mélangée ou fonctionnalisée avec d'autres polymères afin d'améliorer ses propriétés et donc d'élargir son champ d'application¹²⁵. En effet, des membranes de nanofibres de PCL/ chitosane quaternaire¹²² et des membranes de PCL/ nanotubes de carbone fonctionnalisées avec du chitosane (CHT)¹²⁴ ont été élaborées pour, respectivement, le traitement des plaies et des propriétés antibactériennes.

Le **poly (oxyde d'éthylène) (PEO)** est un des polymères synthétiques des plus étudiés dans la littérature pour des applications biomédicales, en raison de ses bonnes propriétés biologiques, et a été approuvé par la FDA et par plusieurs organismes de réglementation des médicaments.

Le PEO est un polyéther soluble dans l'eau ; ce qui permet son électrofilage à partir de solutions aqueuses¹²⁶. Toutefois, sa solubilité dans l'eau rend le matériau instable dans des environnements biologiques. Pour cette raison, le PEO est souvent associé, soit à d'autres polymères synthétiques^{127,128}, soit à des polymères naturels¹²⁹⁻¹³¹. Wang *et al.* ont élaboré des membranes à base de nanofibres de PEO/ PDLA chargées en rapamycine, un principe actif antiprolifératif, pour le traitement du glioblastome¹²⁷.

I.5.2. Polymères naturels

Les polymères naturels les plus utilisés en electrospinning peuvent être classés en deux grandes catégories : les protéines (collagène, gélatine, fibroïne de soie) et les polysaccharides (cellulose et ses dérivés, chitine, chitosane).

Le **Collagène** est la protéine la plus abondante chez l'animal, qui se présente sous différentes formes (I, II et III) dans les tissus conjonctifs. Il assure l'intégrité structurelle et la résistance mécanique de la MEC. Le collagène est fortement employé pour des applications biomédicales grâce à ses propriétés biologiques, notamment sa non toxicité, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, sa non immunogénicité, sa faible antigénicité, sa forte affinité avec l'eau et sa faible réponse inflammatoire^{132,133}. Des nanofibres de collagène ont été élaborées par Rho *et al.* et ont montré une application potentielle en tant que pansements ou « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire¹³⁴.

La **Gélatine** est quant à elle obtenue à partir de l'hydrolyse partielle du collagène. La gélatine possède des propriétés mécaniques similaires à celles du collagène mais son coût est beaucoup plus faible. Toutefois, la gélatine présente l'avantage d'être soluble dans l'eau à des températures supérieures à 37°C, mais gélifie à température ambiante. Ainsi, elle est souvent dissoute dans des solvants organiques¹³⁵ (hexafluoroisopropanol, trifluoroéthanol) ou acides¹³⁶ (acide formique, acide acétique) pour préparer des nanofibres par electrospinning. Elle doit être réticulée pour qu'elle soit stable dans des environnements aqueux. Dias *et al.* ont étudié la réticulation *in situ* des membranes nanofibreuses à base de gélatine avec 1,4-Bis(oxiran-2-ylmethoxy) butane et ont démontré leur potentiel pour la régénération de la peau¹³⁷. De leur côté, Tonda-Turo *et al.* ont utilisé γ -glycidoxypropyltriméthoxysilane afin de réticuler les nanofibres de gélatine et d'améliorer leur stabilité dans des environnements aqueux¹³⁸.

La **cellulose** est le polysaccharide naturel le plus abondant et a été longtemps employée pour élaborer des pansements¹³⁹. Elle est composée de longues chaînes de polymère qui consistent en l'enchaînement de monomères de D-glucose liés entre eux par des liaisons β -

(1→4). La cellulose est fortement cristalline et est soluble dans des solvants très peu volatiles, tel que N-oxyde de N-méthylmorpholine¹⁴⁰. L'élaboration de nanofibres de la cellulose via l'électrospinning est donc très difficile. Afin de surmonter ces difficultés, les recherches ont été orientées vers la fabrication de nanofibres à partir de dérivés de cellulose, en utilisant l'eau ou le mélange eau : éthanol (1:1) comme solvants. Aydogdu *et al.* ont préparé des membranes de nanofibres homogènes à partir du mélange hydroxypropylméthylcellulose et PEO pour des applications en emballage alimentaire¹⁴¹, ou encore l'électrospinning des dérivés carboxyméthylcellulose et méthylcellulose qui a été étudié par Frenot *et al.*¹⁴². Son *et al.* ont élaboré des nanofibres d'acétate de cellulose qui ont été par la suite désacétylées pour récupérer la forme native de la cellulose¹⁴³.

La **chitine**, qui constitue le polysaccharide le plus abondant après la cellulose, est extraite des exosquelettes des crustacés, tels que les crabes, les crevettes, les insectes, ou d'autres arthropodes. La chitine est un polymère à longue chaîne contenant des unités répétitives de N-acétylglucosamine liées entre elles par des liaisons β -(1→4). Le degré d'acétylation (DA) est supérieur à 50%. Elle a été très utilisée pour plusieurs applications biomédicales et industrielles, en tant que fils chirurgicaux, comme système de libération des médicaments ou d'adsorption des colorants, etc¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. La chitine peut être dissoute dans l'hexafluoroisopropanol afin de produire des nanofibres. Cependant, l'utilisation de solvants toxiques représente un désavantage. La désacétylation de la chitine conduit à l'obtention du chitosane qui sera traité dans le prochain chapitre.

I.6. Conclusion

L'électrospinning constitue un procédé simple de mise en œuvre des polymères permettant à partir de solutions de polymères ou, plus rarement, de polymères à l'état fondu l'élaboration de membranes de micro- ou nano- fibres sous l'application d'un haut voltage. La membrane de nanofibres est caractérisée par une porosité modulable par une interconnectivité spatiale qui facilite la communication cellulaire et par une grande surface spécifique qui permet d'incorporer des molécules bioactives. Grâce à ces avantages, les nanofibres électrofilées ont été très explorées dans différents domaines biomédicaux, telles que l'ingénierie tissulaire et la libération de principes actifs.

En outre, une grande variété de polymères synthétiques et naturels peut être utilisée pour former des nanofibres à différentes propriétés. Contrairement aux polymères synthétiques, les polymères d'origine naturelle présentent une meilleure biocompatibilité et une faible

immunogénicité. Ils présentent l'avantage d'être similaires aux substances macromoléculaires qui sont présentes dans le corps humain. Ainsi, l'environnement biologique est capable de reconnaître et d'interagir avec les polymères naturels, ce qui favorise leur intégration. Ces derniers sont, par conséquent, des candidats de choix pour des applications biomédicales en raison de leurs propriétés intrinsèques.

Dans ce contexte, nous nous intéresserons plus spécifiquement au chitosane, un polymère naturel, qui sera présenté et dont la structure et les propriétés physicochimiques et biologiques seront détaillées dans le prochain chapitre. Les applications du chitosane sous forme de nanofibres seront également discutées.

II. Electrospinning du chitosane

II.1. Généralités sur le chitosane

II.1.1. Définition, structure du chitosane

Le chitosane (CHT) est un polysaccharide linéaire constitué de deux unités répétitives ; 2-amino-2-désoxy- β -D-glucopyranose (D-glucosamine) et 2-acétamido-désoxy- β -D-glucopyranose (N-acétyl-D-glucosamine), liées entre elles par des liaisons β -(1 \rightarrow 4) (cf. *Figure 13*)¹⁴⁸. En raison de sa structure proche de celle de l'acide hyaluronique, le chitosane est souvent apparenté à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) ; des polysaccharides présents dans la MEC des tissus conjonctifs des mammifères¹⁴⁹.

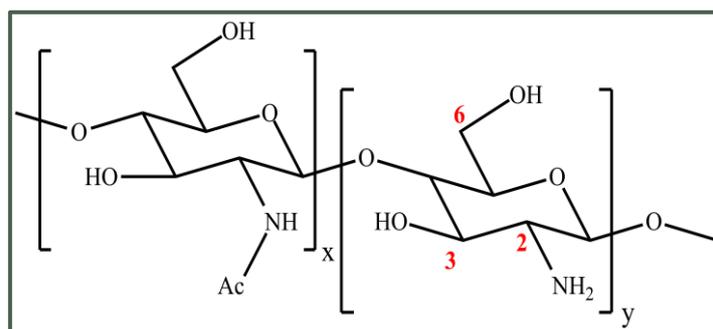


Figure 13. Structure chimique du chitosane ($x < y$) et de la chitine ($x > y$)

II.1.2. Sources du chitosane

Le chitosane peut être produit industriellement à partir de la chitine¹⁵⁰. Les deux polymères possèdent la même structure chimique, mais diffèrent par leur masse molaire et le degré d'acétylation (DA). Le DA correspondant au pourcentage d'unités acétylées (D-glucosamine) par rapport au nombre d'unités totales (D-glucosamine + N-acétyl-D-glucosamine). La chitine

possède un DA supérieur à 50% alors que celui du chitosane est inférieur à 50%¹⁵¹. Néanmoins, cette valeur peut être variable en fonction de la source.

Ainsi, afin de produire le chitosane, une désacétylation de la chitine, qui a subi au préalable plusieurs traitements de purification, est nécessaire. Pour ce faire, soit un traitement enzymatique par l'intermédiaire de chitine-désacétylases¹⁵², soit un traitement chimique est appliqué¹⁵³. La désacétylation chimique consiste en le traitement de la chitine avec des groupements hydroxydes à des températures élevées (généralement $T > 80^{\circ}\text{C}$). La désacétylation peut se produire très rapidement (~ 2 heures) si la concentration en NaOH est très élevée (50 - 60%) et si la température est comprise entre 130°C et 150°C . Cependant, dans des conditions plus drastiques, la masse molaire du chitosane peut diminuer. Le traitement chimique est préféré en raison de son coût inférieur et de sa pertinence pour une production de masse¹⁵⁴. Le chitosane peut être considéré comme étant la forme N-désacétylée de la chitine, même si la désacétylation est rarement totale¹⁵⁵.

Le chitosane peut également être extrait et purifié à partir de sources fongiques alimentaires ou biotechnologiques, telles que *Agaricus bisporus* et *Aspergillus niger*¹⁵⁶.

II.2. Propriétés du chitosane

II.2.1. Solubilité du chitosane

Plusieurs facteurs, y compris le DA, la masse molaire et la source, sont à prendre en compte car ils influencent les propriétés physicochimiques du CHT, notamment sa solubilité.

La solubilité du CHT à pH acide est possible grâce à la protonation de ses fonctions amines libres. Dans un milieu aqueux acide, il devient un polyélectrolyte cationique¹⁵⁷ et donc soluble en raison des répulsions électrostatiques entre les fonctions amines et des interactions hydrogène avec l'eau. Son insolubilité à pH neutre et basique est due à la présence de nombreuses liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyle, amine, acétamide et éther.

En augmentant le pH au-delà de 6,5, la déprotonation des fonctions amine provoque la précipitation du CHT. Sorlier *et al.* ont montré sur une gamme de DA comprise entre 5 et 89% que le pK_{a0} intrinsèque du CHT augmentait avec le DA ($\text{pK}_{a0} \sim 6,5$ pour les DA $< 25\%$ et $\text{pK}_{a0} > 6,8$ pour les DA $> 60\%$)¹⁵⁸. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs avancent que l'hydrophobie apportée par les motifs acétylés augmente le caractère cationique des groupements ammonium. De ce fait, la basicité des fonctions amines croît avec le DA, augmentant donc leur caractère cationique autour du pH neutre. Cependant les unités acétylées

apportent un caractère hydrophobe au chitosane, contrebalançant l'effet précédent¹⁵⁹. Il est cependant nécessaire de préciser que la dissolution à pH neutre et basique ne peut pas être directe. La solvataion des chaînes étant toujours liée à la protonation des fonctions amines, il est impossible de solubiliser directement un chitosane de DA 50-60% dans des solutions neutres ou basiques. Une pré-étape de dissolution en milieu acide est donc nécessaire afin de protoner les fonctions amines. Le pH peut être par la suite ajusté par ajout d'une base sans provoquer la précipitation du chitosane dans le cas du chitosane de haut DA et/ou de faible masse molaire.

Il est impératif de prendre en compte la masse molaire du chitosane car elle joue un rôle important dans la solubilité du chitosane. En effet, plusieurs études montrent qu'une augmentation de la masse molaire entraîne la diminution de la solubilité du chitosane^{159,162-165}. Le chitosane possède une forte viscosité dans les milieux acides et se comporte généralement comme un matériau pseudo-plastique, en raison de sa haute masse molaire et sa structure linéaire non ramifiée¹⁴⁸.

II.2.2. Propriétés biologiques du chitosane

II.2.2.1. Biocompatibilité

La non-toxicité du chitosane a été étudiée et prouvée dans la littérature. Plusieurs évaluations cliniques réalisées n'ont pas montré de réaction inflammatoire ou allergique, à la suite d'une implantation ou d'une injection du chitosane dans le corps humain^{148,166-170}. Les doses létales 50 (DL50) ont été déterminées chez le rat à 15 g/Kg et à 0,3 g/Kg pour, respectivement, la voie orale et la voie intra-péritonéale. Chez la souris, la DL50 a été évaluée à 16 g/Kg (valeur supérieure à celle du saccharose de 12 g/Kg) par voie orale et à 10 g/Kg et 5,2 g/Kg pour des administrations respectives en sous-cutanée et intra-péritonéale¹⁷¹.

La cytocompatibilité du chitosane a été prouvée par de nombreuses études, notamment vis-à-vis des chondrocytes¹⁷², des ostéoblastes^{173,174}, des kératinocytes^{175,176}, des fibroblastes^{177,178} et des cellules de Schwann¹⁷⁹. Néanmoins, elle dépend des paramètres du chitosane, notamment la masse molaire et le DA. En effet, Rami *et al.* ont démontré que la cytocompatibilité des hydrogels à base de chitosane vis-à-vis des cellules souches mésenchymateuses augmentait avec la diminution du DA¹⁸⁰.

Il est important de noter qu'il est préférable d'évaluer la biocompatibilité du dispositif médical lui-même, plutôt que des matériaux qui le constituent. En effet, selon la forme physique

(hydrogel, film, nanofibres, nanoparticules), la fonctionnalité du dispositif et les conditions d'implantation, le biomatériau peut présenter des propriétés et une bioactivité différentes.

II.2.2.2. Biodégradabilité

La biodégradabilité d'un dispositif médical est une propriété fondamentale car elle affecte les performances à long terme du biomatériau et la réponse du tissu hôte. Le chitosane est biodégradable, en raison de son squelette glycosidique hydrolysable, via principalement des phénomènes enzymatiques. Les principaux acteurs chez l'Homme sont les lysozymes et les chitinases¹⁸¹⁻¹⁸³. Cependant, la dégradation des portions désacétylées, dont le mécanisme est peu connu, est plus lente malgré l'intervention suspecte des agents oxydants naturellement produits par l'organisme comme le monoxyde d'azote¹⁸⁴. Les oligosaccharides, produits lors de la dégradation du chitosane, sont par la suite métabolisés par l'organisme^{148,185}.

Le taux de dégradation dépend notamment du DA. En effet, un chitosane de faible DA présente une vitesse de dégradation, *in vivo*, plus lente pouvant atteindre plusieurs mois¹⁸⁰.

II.2.2.3. Propriété antimicrobienne

L'une des propriétés qui confèrent au chitosane un grand intérêt en vue d'une application médicale est son activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'un large spectre de bactéries et de champignons. Il a été démontré que le chitosane inhibe la croissance de nombreux types de champignons, de levures et de bactéries, y compris *Candida albicans*^{186,187}, *Escherichia coli*^{188,189}, *Pseudomonas aeruginosa*^{190,191}, *Staphylococcus aureus*^{192,193}, *Streptococcus pyogenes*^{194,195} et *Enterococcus faecalis*¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Le mécanisme d'action repose sur le caractère cationique du chitosane. Les charges positives des unités glucosamines (-NH₂), qui se trouvent protonés (-NH₃⁺) en solution, interagissent avec la surface de la membrane externe des bactéries chargée négativement. Ces interactions entraînent la perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne diminuant ainsi la stabilité osmotique, la lyse de la membrane et éventuellement la fuite des éléments intra-bactériens¹⁹⁹.

L'activité antimicrobienne peut être influencée par différents paramètres, parmi lesquels le pH, la masse molaire et le DA. Un chitosane de faible masse molaire peut traverser plus facilement la paroi bactérienne et donc inhiber la synthèse des ARNm (Acide ribonucléique messenger)²⁰⁰. La diminution du DA favorise l'activité antibactérienne²⁰¹.

II.2.3. Applications biomédicales du chitosane

Outre les propriétés biologiques précédemment citées, les groupements fonctionnels présents dans le chitosane lui permettent de bénéficier de propriétés biologiques intrinsèques supplémentaires, à savoir l'hémostase, l'antioxydation et l'activité cicatrisante²⁰². De ce fait, en raison de ses multiples applications, un grand intérêt est porté au chitosane en tant que support pour la libération de principes actifs²⁰³ ou encore pour la cicatrisation des plaies²⁰⁴. De plus, le chitosane a été utilisé comme composant actif dans plusieurs pansements produits aux Etats-Unis, comme Chito-Seal®, Tegisorb®, Syvek Patch® et ChitoFlex²⁰⁵⁻²⁰⁷.

II.3. Nanofibres de chitosane

II.3.1. Elaboration des nanofibres de chitosane

Le chitosane est soluble dans de nombreux acides, y compris l'acide acétique (AA) et l'acide trifluoroacétique (TFA). En milieu aqueux acide, il devient un polyélectrolyte cationique à cause de la protonation des groupements amine. Seulement, la viscosité de ces solutions est élevée en raison des fortes liaisons hydrogène présentes entre les chaînes du polymère, rendant de ce fait le processus d'électrospinning très difficile. De plus, la présence d'interactions répulsives intramoléculaires entre les groupements ammonium provoquant l'extension des macromolécules qui est défavorable aux enchevêtrements nécessite l'application d'un voltage élevé. Ainsi, il est souvent nécessaire d'ajouter un autre polymère qui favorise les enchevêtrements et qui facilite l'électrofilage.

Toutefois, très peu d'études ont rapporté l'électrospinning du chitosane seul. Des membranes à base de nanofibres ont été préparées avec succès à partir du chitosane seul^{208,209}. Ohkawa *et al.* ont étudié l'impact du solvant et de la concentration de la solution sur la morphologie des nanofibres obtenues²⁰⁸. Ils ont démontré que l'utilisation du TFA comme solvant est nécessaire pour obtenir des nanofibres car les groupements amine du chitosane peuvent former des sels avec le TFA ; ce qui permet de détruire les interactions entre les molécules de chitosane et de faciliter ainsi le procédé d'électrofilage²¹⁰. De plus, il a été observé que l'utilisation du dichlorométhane (DCM), en association avec le TFA, améliore l'homogénéité des nanofibres obtenues. Un autre groupe a également utilisé le TFA pour produire des nanofibres de chitosane qui ont été par la suite réticulées avec le glutaraldéhyde pour leur stabilisation²¹¹. Cependant, l'utilisation des nanofibres obtenues à partir de solutions du chitosane solubilisé dans du TFA avec ou sans DCM s'est avérée limitée à cause de la perte de la structure fibreuse dans des milieux aqueux basiques ou neutres, sans doute due à la

dissolution complète des membranes²⁰⁹. L'utilisation de l'acide acétique comme solvant a été également considérée^{66,212}.

Afin d'améliorer le procédé de l'électrospinning, la recherche s'est orientée vers l'incorporation de polymères naturels (collagène, fibroïne de soie) ou synthétiques (PEO, PLA, poly (vinyl alcool), poly (vinyl pyrrolidone) dans la solution de chitosane. A titre d'exemple, des nanofibres à base de mélange de chitosane et de poly (vinyl alcool) (PVA) ont été élaborées car le PVA est facilement électrofilable. De même, plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation du mélange chitosane/ PEO pour l'élaboration des nanofibres car le PEO est soluble dans l'eau. Elles ont décrit que l'augmentation de la proportion du chitosane entraîne la diminution du diamètre moyen des fibres. Bhattarai *et al.* ont montré que l'introduction du PEO permet de réduire la viscosité de la solution via des interactions hydrogène avec le CHT et ont identifié que le ratio optimal chitosane/ PEO est de 90/10 car la morphologie fibreuse est conservée après 7 jours d'immersion dans l'eau^{213,214}.

II.3.2. Applications biomédicales

Comme il a été précédemment décrit, les nanofibres obtenues par electrospinning présentent de nombreuses caractéristiques qui favorisent leur application dans le domaine biomédical.

Chen *et al.* ont prouvé l'importance de l'utilisation des nanofibres de chitosane/ collagène en tant que dispositif pour le traitement des plaies, puisque la membrane favorise la cicatrisation des plaies et induit la migration et la prolifération des cellules²¹⁵. De leur côté, Jiang *et al.* ont développé des supports nanofibreux à base de poly (éthylène glycol) (PEG)-g-chitosan et de PLGA chargés en ibuprofène pour la libération contrôlée du principe actif²¹⁶. La présence de PEG-g-chitosane permet de modérer, d'une manière significative, l'effet « burst » de la libération de l'ibuprofène. Par ailleurs, des études ont également démontré l'efficacité des nanofibres à base de chitosane pour une utilisation en ingénierie tissulaire osseuse. Parmi lesquelles, celle explorée par Bhattarai *et al.* qui a permis de mettre en évidence la capacité des membranes de chitosane/ PEO de favoriser l'adhésion des cellules ostéoblastes humaines et des chondrocytes, ainsi que le maintien de la morphologie fibreuse et la viabilité des cellules pendant cinq jours²¹³.

III. Objectifs de la thèse

Les membranes de nanofibres de chitosane sont explorées en vue d'applications dans un grand nombre de domaines. En raison de leurs propriétés biologiques favorables (la non-toxicité, la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'activité antibactérienne), ces nanofibres constituent des candidats prometteurs pour l'amélioration de l'adsorption des médicaments, de l'immobilisation d'enzymes, de l'adhésion et de la prolifération cellulaire ainsi que pour la cicatrisation des plaies et l'ingénierie tissulaire

A la lumière de toutes ces informations, ce projet, supporté par la Métropole Européenne de Lille et l'Université de Lille- Sciences et Technologies, a pour ambition de mettre au point deux biomatériaux ; d'une part à base de nanofibres de chitosane biorésorbables à propriétés ostéoinductrices, et d'une autre part à base de nanofibres de chitosane sulfoné biorésorbables à propriétés antithrombotiques. La valeur ajoutée de ce travail consiste en l'utilisation de chitosane de grade médical et sa modification pour moduler ses propriétés intrinsèques et diversifier ses applications thérapeutiques sans utiliser de principes actifs.

En conséquence, les travaux de recherche se répartissent en deux parties (*cf. Figure 14*) :

- Dans la première partie, nous aborderons **l'élaboration de nanofibres de chitosane à propriétés ostéoinductrices.**

Tout d'abord, une étude bibliographique décrivant la place des nanofibres de chitosane au sein de l'ingénierie tissulaire osseuse et les différentes stratégies de fonctionnalisation de surface des biomatériaux sera développée. Ensuite, l'électrospinning du chitosane sera traitée en présentant les paramètres optimaux pour l'élaboration de nanofibres homogènes. De même, la fonctionnalisation des matrices fibreuses par dépôt d'un revêtement de polydopamine sera exploitée en faisant varier le temps d'immersion dans la solution de dopamine. Différentes caractérisations physicochimiques, qualitatives ou quantitatives, seront étudiées dans le but d'identifier les paramètres optimaux de la modification chimique et de mettre en évidence la présence de la couche de polydopamine. Enfin, des essais biologiques seront effectués pour évaluer la cytocompatibilité et la bioactivité du biomatériau, et plus spécifiquement sa capacité à induire le processus de biominéralisation *in vitro*.

- La deuxième partie traitera de **l'electrospinning du chitosane sulfoné à propriétés antithrombotiques.**

Tout d'abord, une étude bibliographique présentant les différents traitements de surface antithrombotiques et la sulfonation du chitosane sera développée.

Ensuite, La synthèse des deux séries des dérivés sulfonés de chitosane (CHT1S et CHT2S) en greffant des groupements sulfonate via une réaction d'amination réductrice sera développée. Différents ratios molaires des deux agents de sulfonation par rapport aux groupements amine libres du chitosane seront exploités. Des caractérisations physicochimiques, entre autres, la ^1H -RMN, IRTF et l'analyse élémentaire ont été étudiées afin de mettre en évidence le greffage des groupements sulfonate et de déterminer les degrés de substitution. Puis, des études biologiques seront présentées pour vérifier la cytocompatibilité et l'hémocompatibilité des biomatériaux, et en particulier l'activité anticoagulante de ces dérivés.

L'originalité de ce projet réside dans l'élaboration des nanofibres de CHT1S et CHT2S. Pour ce faire, une étude d'optimisation des paramètres d'electrospinning sera réalisée.

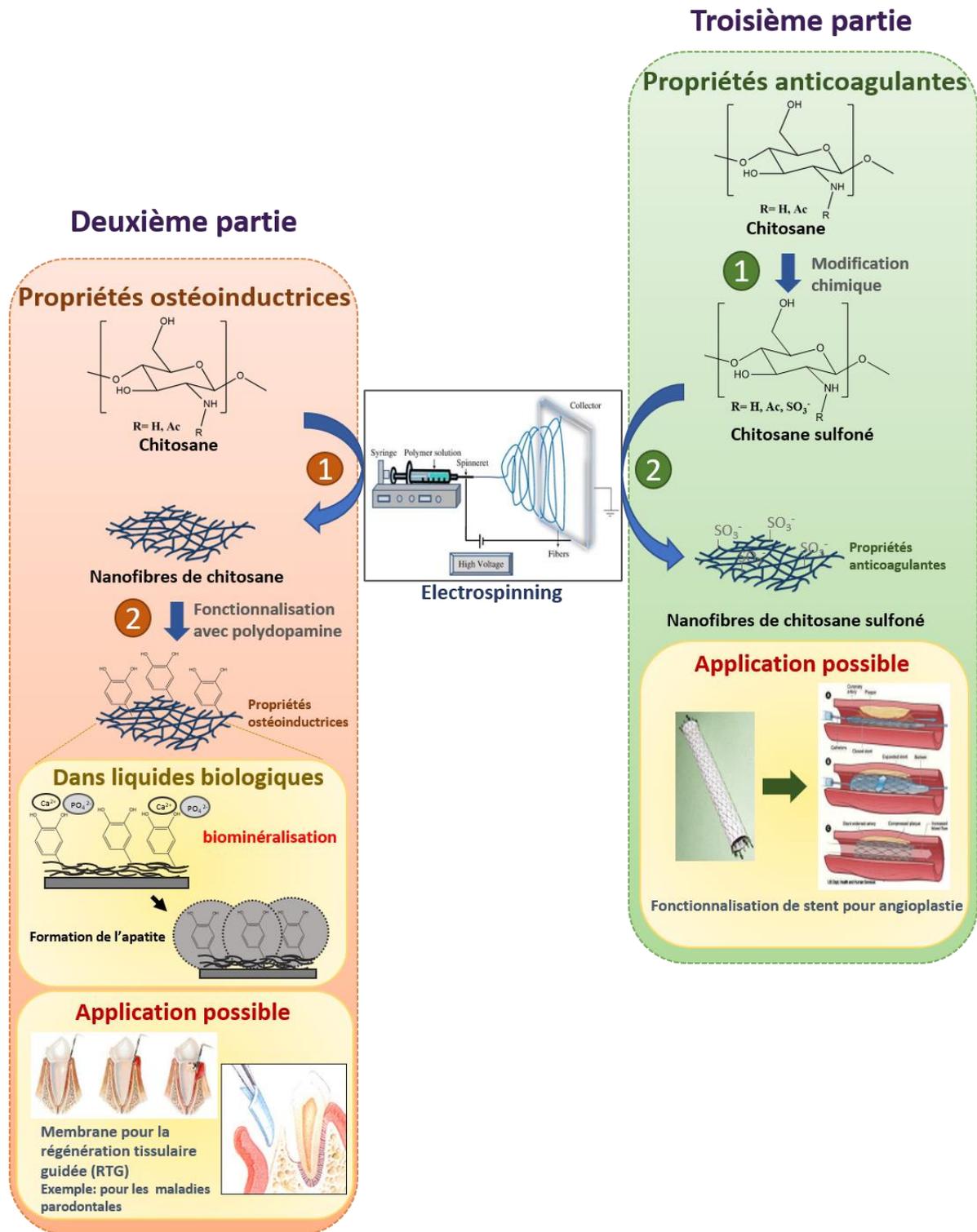


Figure 14. Schéma récapitulatif des deux stratégies développées au cours de ce projet

DEUXIEME PARTIE.

NANOFIBRES DE CHITOSANE À PROPRIETES

OSTEOINDUCTRICES

Chapitre I. Etude bibliographique

I. Le tissu osseux

I.1. La physiologie de l'os

L'os est un tissu dynamique et complexe structurellement et fonctionnellement. Le squelette humain est composé de plus de 206 os, allant des os longs au niveau des membres, des os courts dans les poignets et les chevilles, des os plats dans le sternum et le crâne, aux os irréguliers tels que ceux du bassin et des vertèbres. En fonction de sa densité, le tissu osseux peut être divisé en deux catégories ; **l'os compact** (ou cortical) qui, fortement calcifié, représente environ 80% du squelette et joue un rôle principalement structurel et protecteur, et **l'os trabéculaire** (ou spongieux) qui, moins fortement calcifié, ne représente que 20% du squelette adulte et possède une plus grande surface qui lui permet d'être métaboliquement actif²¹⁷.

De par sa structure et ses fonctions, le tissu osseux possède quatre fonctions (i) une **fonction protectrice** : les os protègent les organes vitaux, comme le système nerveux central qui est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres ; (ii) une **fonction biomécanique** : le tissu osseux est un des plus résistants de l'organisme, il est capable de supporter l'effet de la pesanteur et de résister aux contraintes mécaniques extérieures et aux forces de contractions musculaires ; (iii) une **fonction hématopoïétique** : les os renferment dans leur espace médullaire la moelle hématopoïétique qui contient, au voisinage des cellules osseuses, des cellules souches qui sont à l'origine de trois lignées de globules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes) ; (iv) une **fonction métabolique** : le tissu osseux est un tissu dynamique qui, en étant constamment remodelé sous l'effet des pressions mécaniques, entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux et assure ainsi le maintien de l'équilibre phosphocalcique.

Comme tous les organes du corps, le tissu osseux a une organisation hiérarchique de l'échelle macroscopique jusqu'aux composantes nanostructurées (*cf. Figure 15*). Il est composé de cellules et de matrice extracellulaire (MEC) qui comprend, principalement, des fibres de collagène de type I et qui est calcifiée de manière homogène par des cristaux minéraux (phosphate de calcium ou CaP) bien dispersés. Ainsi, l'os peut être considéré comme un matériau composite hybride. La structure nanocomposite (fibres de collagène résistantes et flexibles renforcées par hydroxyapatite, HA) fait partie intégrante de la résistance à la compression requise et de la haute ténacité à la rupture de l'os. En effet, la phase organique lui

confère flexibilité et résilience, tandis que la phase inorganique lui attribue dureté et rigidité. La synergie de ces deux phases contribue grandement aux propriétés structurelles uniques du tissu osseux.

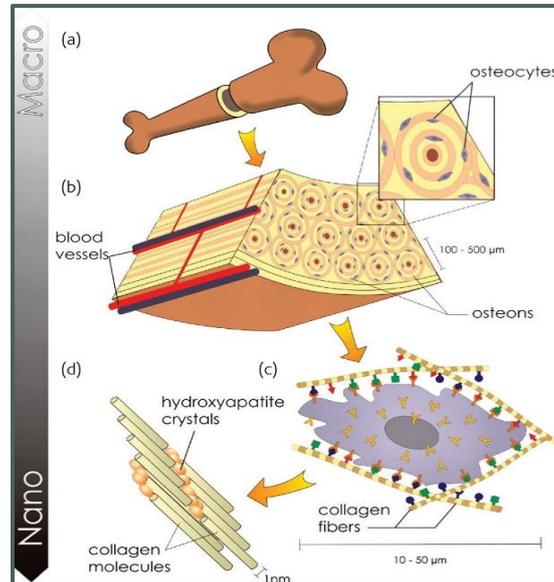


Figure 15. Organisation hiérarchique de l'échelle macroscopique à nanoscopique²¹⁸

En outre, la matrice organique est composée de plus de 200 types de protéines matricielles non collagéniques, telles que des glycoprotéines, des protéoglycanes, des ostéonectines, des ostéocalcines, des sialoprotéines, ainsi que des facteurs de croissance qui contribuent à l'abondance des signaux dans l'environnement extracellulaire. Par conséquent, la phase organique peut être divisée en plusieurs groupes de biomolécules ; des signaux, des protéines structurales, des molécules médiatrices d'adhésion cellulaire, etc.

Le tissu osseux contient également quatre types de cellules²¹⁹⁻²²¹ ; (1) les **ostéoblastes** : des cellules ostéoformatrices mononuclées, cubiques, situées à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance ; (2) les **ostéocytes** : des ostéoblastes différenciés, incapables de se diviser et qui sont entièrement entourés par la MEC osseuse minéralisée ; (3) les **cellules bordantes** : des ostéoblastes « au repos », susceptibles, s'ils sont sollicités, de redevenir des ostéoblastes actifs et (4) les **ostéoclastes** : cellules ostéorésorbantes, très volumineuses, plurinuclées, hautement mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre (cf. Figure 16). Les cellules ostéoformatrices dérivent des cellules souches mésenchymateuses ou stromales, alors que les cellules ostéorésorbantes dérivent de la lignée hématopoïétique contenant les cellules sanguines et immunitaires, dont la lignée monocyte-macrophage. Ainsi, malgré son aspect inerte, l'os est un organe très dynamique qui est continuellement résorbé par les ostéoclastes et néoformé par les ostéoblastes²²²⁻²²⁴.

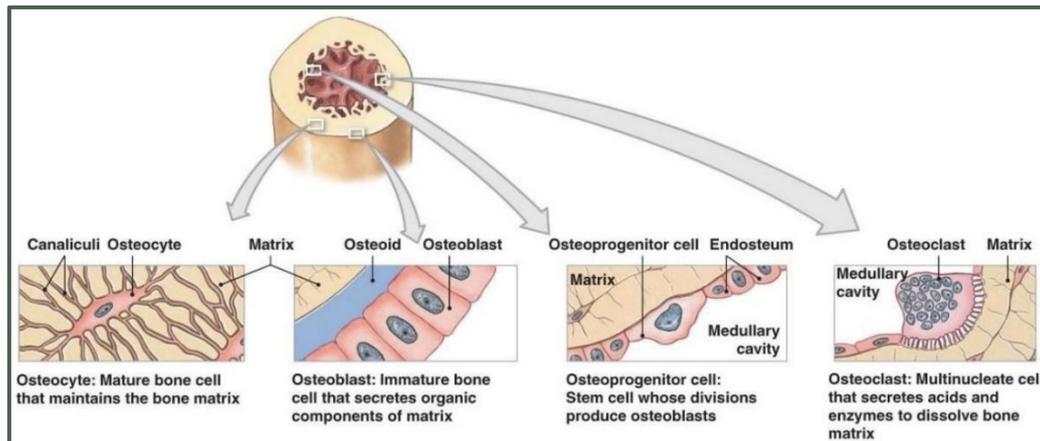


Figure 16. Représentation schématique des différents types de cellules osseuses²²⁵

I.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus très complexe par lequel l'ancien os est remplacé par un nouvel os²²⁶. Ce renouvellement se présente sous forme d'un cycle qui passe par plusieurs phases (cf. Figure 17). Ce processus se produit grâce aux actions coordonnées des ostéoclastes, des ostéoblastes et des ostéocytes qui forment ensemble une structure définie, appelée *unité multicellulaire de base* (en anglais « Basal Multicellular Unit », BMU).

Le remodelage est initié par une étape **d'activation** des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive. Ces cellules s'activent et, tout en se rétractant, dégradent la couche collagénique sous-jacente grâce aux facteurs ostéorésorbants (hormone parathyroïdienne, vitamine D3). Par conséquent, elles attirent les préostéoblastes sur la matrice osseuse par chimiotactisme. Par la suite, des ostéoclastes actifs, qui adhèrent à la surface osseuse, ont été formés par fusion des préostéoblastes ; c'est la phase de **résorption**. Cette étape a une durée de 1 à 3 semaines. La phase **d'inversion** correspond au remplacement des ostéoclastes, morts par apoptose, par des cellules mononucléées de type macrophagiques, qui sont responsables du dépôt d'une ligne cémentante (membrane non minéralisée ou substance pré-osseuse) comblant ainsi la lacune. Après quoi, le recrutement des ostéoblastes dans cette lacune qu'ils comblent intervient, en apposant le tissu ostéoïde, une nouvelle matrice organique, qui sera minéralisé ; c'est la phase de **formation**. La production de la matrice osseuse est stimulée par de nombreuses hormones, telles que les œstrogènes, les androgènes et la vitamine D. La minéralisation secondaire est parachevée et les minéraux sont accumulés dans la matrice durant la phase de **quiescence**.

Plusieurs facteurs, exogènes et endogènes (facteurs hormonaux, locaux et contraintes mécaniques), interviennent au cours du renouvellement du tissu osseux afin de moduler

l'activité cellulaire. Un cycle de remodelage dure environ 4 mois chez l'adulte ; la phase de formation étant plus longue que celle de la résorption.

Le remodelage osseux est nécessaire car il constitue un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique. Ce qui réduit le risque de fracture et permet de répondre à des besoins métaboliques, comme la régulation du métabolisme phosphocalcique et l'homéostasie²²⁷.

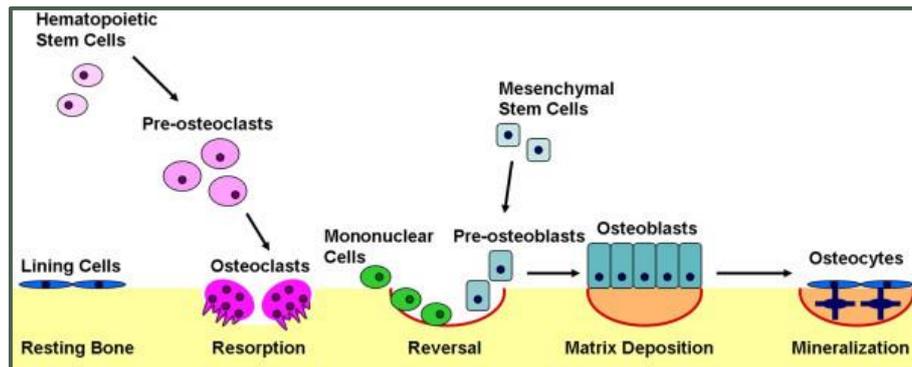


Figure 17. Schéma du remodelage osseux²²⁸

Néanmoins, dans le cas où le tissu osseux est déficient, le remodelage osseux peut durer de nombreuses années avant que la guérison complète ne soit atteinte. De ce fait, il est souvent nécessaire d'intervenir de façon chirurgicale afin d'accélérer le processus.

I.3. Les besoins cliniques

Les lésions osseuses qui concernent principalement une population de plus en plus âgée, de même que les maladies dégénératives ou les traumatismes de l'os, compromettent assez significativement la qualité de vie. La greffe osseuse constitue la seconde forme d'intervention après la greffe vasculaire. Plus de 500 000 greffes osseuses sont effectuées chaque année aux Etats-Unis et plus de 2,2 millions dans le monde. Toutes ont pour objectif de réparer ou de remplacer les défauts osseux en chirurgie orthopédique, neurochirurgienne et cranio-maxillofaciale²²⁹.

Les solutions actuelles de reconstruction osseuse privilégient l'apport des tissus osseux autologues, non vascularisés²³⁰ ou vascularisés²³¹. En terme de régénération osseuse, la greffe osseuse autologue est considérée comme le « gold standard » puisqu'elle répond à l'ensemble des caractéristiques qui sont nécessaires à la reconstruction osseuse, à savoir l'ostéoinduction, l'ostéoconduction, l'ostéogenèse et la compatibilité immunitaire²³². Malgré tout, le recours à ces techniques n'est pas sans limites, en raison de la quantité limitée des réserves osseuses mobilisables et de la morbidité du site donneur²³³. Pour cette raison, l'allogreffe a été proposée

comme une alternative aux autogreffes. Son utilisation est toutefois limitée, à cause du risque, inhérent, de transmission de pathologies infectieuses qu'elle peut présenter.

Les solutions actuelles de prise en charge des patients souffrant de pathologies osseuses nécessitent le développement de nouvelles technologies pour la reconstruction du tissu osseux. Grâce aux avancées récentes dans le domaine de la biologie cellulaire et de la Science des matériaux, des substituts osseux artificiels, capables de remplacer ou de réparer les tissus osseux défectueux, sont développés dans le but de remplacer les greffes osseuses actuelles d'origine biologique. Ces biomatériaux sont au centre de la nouvelle technologie, appelée ingénierie tissulaire osseuse.

II. L'ingénierie tissulaire osseuse

L'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) a trouvé sa place au cours des années 90 et a connu au fil des ans une croissance exponentielle comme en témoigne l'histogramme ci-après qui recense les travaux publiés par an sur l'ITO dans la *Figure 18*. Ce domaine est pluridisciplinaire et fait appel à des experts en médecine clinique, en génie mécanique, en science des matériaux et en génétique²³⁴.

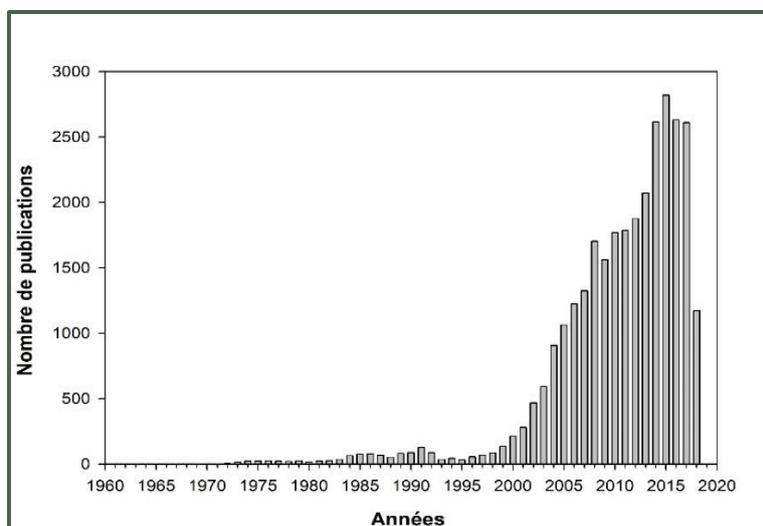


Figure 18. Nombre de publications en fonction des années. Données obtenues à partir de Scopus, le 27 juin 2018. Mot clé: « Bone tissue engineering ».

L'ITO repose sur la combinaison de trois éléments ; un « scaffold » (un support à base de biomatériau d'origine synthétique ou naturelle, biodégradable ou non) qui sera particulièrement détaillé dans la suite de l'étude bibliographique, des signaux et des cellules réparatrices²³⁵⁻²³⁹. On parle alors de triade de l'ITO (cf. *Figure 19*).

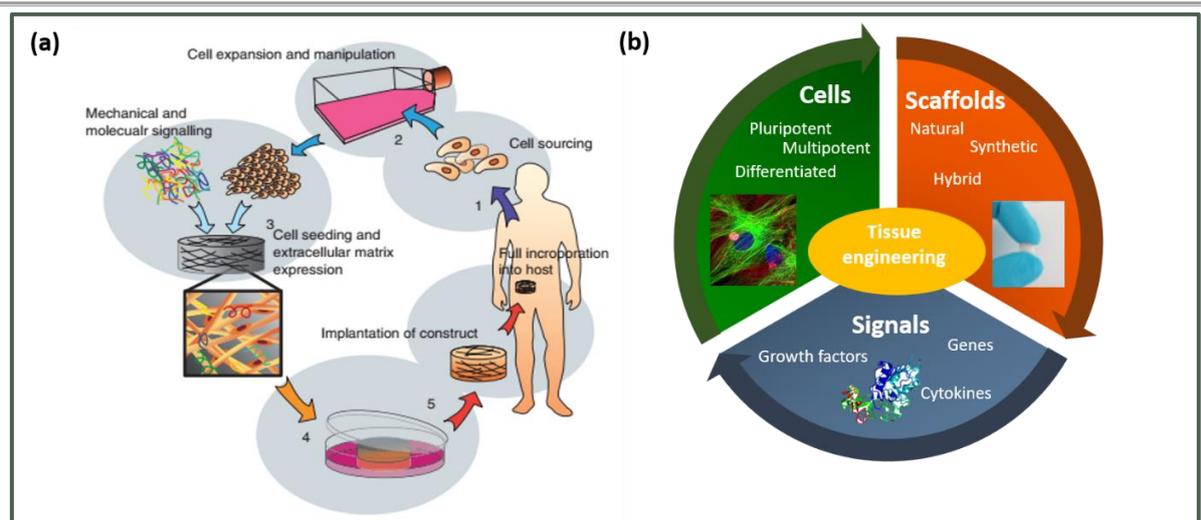


Figure 19. Schéma (a) du concept et des étapes²⁴⁰ (b) de la triade de l'ingénierie tissulaire

Le « scaffold » est un support physique, et éventuellement bioactif, dont le but est de fournir un environnement tridimensionnel pour que les cellules et les molécules biologiques puissent s'y développer et régénérer les tissus. Dans le cas des os, les matériaux devraient, de préférence, être ostéoinducteurs (stimulation du développement de la lignée cellulaire ostéoblastique à partir de cellules pluripotentes, primitives ou indifférenciées et induction de l'ostéogenèse), ostéoconducteurs (propriété passive à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire) et permettre l'ostéointégration (interactions structurelles et fonctionnelles entre l'os vivant et la surface de l'implant)^{233,241,242}. Ainsi, le « scaffold » idéal doit respecter un certain cahier des charges (cf. Tableau 2).

Tableau 2. Le cahier des charges d'un substitut osseux

Propriétés	Description
Biocompatible	Capable de remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'organisme vivant hôte
Poreux	Infiltration des cellules et des nutriments et diffusion de l'oxygène Favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire Création d'un réseau vasculaire tridimensionnel La porosité idéale est de 90%. La taille de pores idéale pour un tissu osseux en croissance est de 200 – 350 µm mais diminution des propriétés mécaniques
Biodégradable	Se résorbe en laissant place au nouveau tissu osseux Pas de chirurgie invasive supplémentaire pour le retrait de l'implant Les produits de dégradation sont non-toxiques et facilement excrétés par les voies métaboliques
Propriétés mécaniques	Stable pour la manipulation chirurgicale Capables de résister aux forces exercées par le corps Similaires à celles de l'os d'accueil
Stérilisable	La stérilisation ne doit pas altérer les propriétés et la morphologie du biomatériau

La plupart des biomatériaux développés au cours des deux dernières décennies se compose soit de céramiques bioactives (hydroxyapatite, β -phosphate tricalcique, phosphate de calcium biphasique)²⁴³⁻²⁴⁸, de verres bioactifs²⁴⁹⁻²⁵², de polymères²⁵³⁻²⁵⁵ naturels²⁵⁶⁻²⁵⁸ ou synthétiques^{259,260} soit de composites²⁶⁰⁻²⁶⁷ (mélange de plusieurs types de matériaux). En fonction de la taille du site défectueux (grands ou petits défauts osseux), des dispositifs de morphologies variables ont été élaborés allant des hydrogels injectables²⁶⁸⁻²⁷², des films²⁷³⁻²⁷⁵, des membranes de nanofibres^{105,256,276,277}, de micro-²⁷⁸⁻²⁸⁰ ou nano-sphères²⁸¹⁻²⁸³ jusqu'aux éponges²⁸⁴⁻²⁸⁷. Nous pouvons également citer comme exemples de dispositifs médicaux mis sur le marché, l'éponge InFUSE™ développée par Medtronic²⁸⁸ ou encore le céramique en β -phosphate tricalcique Cerasorb M par Curasan AG²⁸⁹. En raison de la présence de plusieurs composants à l'échelle nanométrique dans la MEC, les supports à structure nanofibreuse biomimétiques favoriseraient la régénération osseuse.

De nombreuses techniques, telles que la séparation de phase^{290,291}, l'autoassemblage^{292,293} et la lyophilisation²⁹⁴⁻²⁹⁶, ont été utilisées pour produire des « scaffolds » tridimensionnels poreux. Cependant, elles présentent plusieurs inconvénients puisqu'elles nécessitent l'utilisation de solvants organiques dont les traces résiduelles peuvent persister au sein des « scaffolds » et la maîtrise parfaite des conditions de lyophilisation. L'électrospinning est une

des méthodes utilisées pour la préparation des nanofibres et constitue un nouveau domaine émergent en matière de production des supports pour l'ITO.

III. Les nanofibres pour l'ingénierie tissulaire osseuse : état de l'art

Comme il a été décrit précédemment, il est très important de développer des substituts osseux qui miment la MEC d'un point de vue morphologie et propriétés mécaniques. L'électrospinning est une technique de plus en plus populaire dans le domaine de ITO puisqu'elle permet d'élaborer des nanofibres dont la structure est très similaire à celle de la MEC, comme peut le témoigner l'histogramme présenté dans la *Figure 20*. Cette similitude offre aux cellules un environnement familier, favorisant ainsi leur adhésion et leur différenciation.

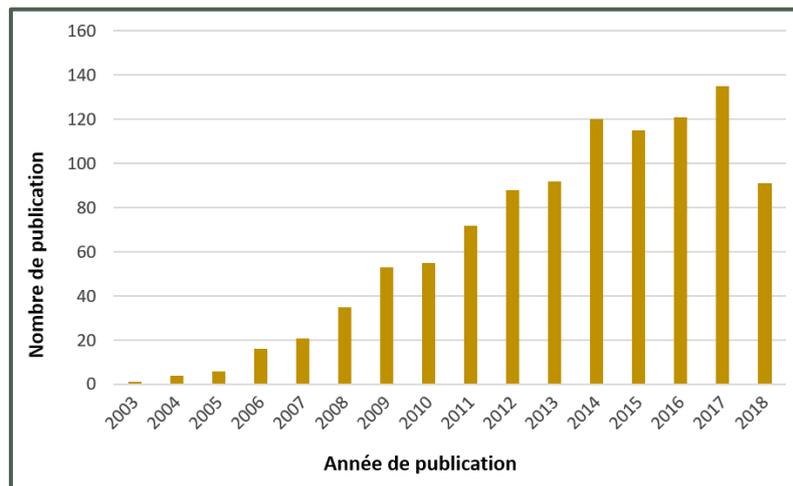
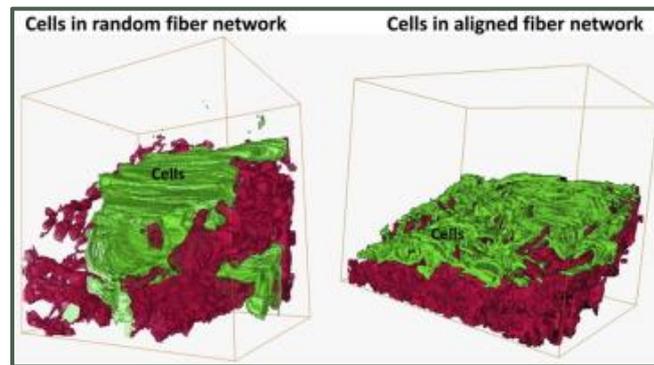


Figure 20. Nombre de publications liées aux nanofibres pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse, source : Scopus, mots-clés : Nanofibers or nanofibres and bone tissue engineering

En outre, l'optimisation des paramètres de la solution et du procédé permet de moduler la morphologie des nanofibres, à savoir la taille des diamètres des fibres et des pores. L'orientation des fibres peut être également modifiée, en fonction du collecteur utilisé. Un collecteur « plat » donne des fibres avec une orientation aléatoire, tandis qu'un collecteur rotatif avec une vitesse de rotation élevée donne lieu à des fibres alignées²⁹⁷. Il a été prouvé par la littérature que la réponse cellulaire dépend de la morphologie de la surface des biomatériaux. En effet, il a été démontré par Dalby *et al.* que l'adhésion et la différenciation des ostéoblastes sont favorisées lorsque les nanofibres présentent une orientation aléatoire²⁹⁸. Lorsque les nanofibres sont alignées, les cellules adhèrent et prolifèrent le long des fibres. En revanche, la porosité du support est plus importante pour des nanofibres aléatoires ; ce qui permet la migration des

cellules au sein du biomatériau (cf. *Figure 21*)¹¹⁷. Les « scaffolds » à base de nanofibres représentent donc des candidats de choix pour l'ITO, grâce à leurs propriétés intrinsèques.



*Figure 21. Illustrations, par imagerie 3D, du comportement cellulaire en fonction de l'orientation des nanofibres ; à gauche les nanofibres ont une orientation aléatoire, à droite les nanofibres sont alignées*¹¹⁷

Les polymères étudiés pour l'élaboration des nanofibres à cet effet peuvent être divisés en deux catégories, les polymères synthétiques et naturels.

III.1. Nanofibres à base de polymères synthétiques

De nombreux polymères synthétiques, le plus souvent biodégradables, ont été utilisés pour former des nanofibres pour une application en ITO²⁹⁹⁻³⁰⁸. A titre d'exemple, Yoshimoto et al. ont préparé des matrices nanofibreuses microporeuses à base de PCL et ont évalué le comportement des cellules souches mésenchymateuses, dérivées de la moelle osseuse³⁰⁹. Les résultats ont révélé que les cellules ont bien adhéré à la surface du biomatériau, ont proliféré et ont migré au sein du support ; ce qui a permis la production de la MEC en une semaine. A partir de 4 semaines de culture, la biominéralisation du support et la présence du collagène de type I sont observées. Jiang *et al.* ont développé des supports nanofibreux de PLGA -hydroxyapatite (HA) chargés en simvastatine et ont démontré que ces matrices favorisent la prolifération et la différenciation ostéogénique des cellules ostéoblastes MC3C3-E3 après 14 jours de culture *in vitro*³¹⁰.

III.2. Nanofibres à base de polymères naturels

Les polymères naturels, utilisés pour développer des supports nanofibreux en ITO, peuvent être classés en deux catégories, les protéines (collagène, fibroïne de soie, gélatine) et les polysaccharides (chitosane, alginate).

Le collagène est souvent utilisé en combinaison avec d'autres types de matériaux, que ce soit des polymères synthétiques (PCL, PLA)³¹¹⁻³¹⁵, ou des céramiques (hydroxyapatite, β -

phosphate tricalcique)³¹⁶⁻³²¹. Jin *et al.* ont élaboré des fibres à base de fibroïne de soie avec un diamètre moyen de 700 ± 50 nm et ont prouvé que ces matrices favorisent l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules stromales de la moelle osseuse, *in vitro*³²². Quant à Chia-Cherng *et al.*, ils ont étudié la formation de composites nanofibreux à base d'alginate, de chitosane, de collagène et d'hydroxyapatite par électrospinning et ont démontré que ce dispositif permet l'infiltration et la croissance cellulaire, réduisant ainsi sa désintégration, comparé au support qui est uniquement constitué de collagène conventionnel³²³.

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanofibres à base du chitosane dont les propriétés et les avantages en vue d'une utilisation en ITO seront discutés dans la prochaine section.

IV. Les nanofibres de chitosane pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Le chitosane présente une structure similaire à celle des glycosaminoglycanes, un des constituants majeurs de la MEC^{42,324}. Des études ont rapporté que le chitosane améliore l'adhésion, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes ainsi que la minéralisation³²⁵⁻³²⁹. Bien que le chitosane ait fait ses preuves et soit très utilisé en ITO, son utilisation sous forme de nanofibres élaborées par électrospinning reste peu explorée.

Les avantages des nanofibres de chitosane au regard de leurs propriétés (la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'adhésion et la prolifération cellulaire) seront discutées dans les sections suivantes.

IV.1. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des tissus osseux varient en fonction de leur nature. Un os cortical possède un module d'Young et une résistance à la compression de 15-20 GPa et 100-200 MPa, alors que l'os trabéculaire se situe respectivement entre 0,1-2 GPa et 2-20 MPa³³⁰. Pour cette raison, il est important de considérer les propriétés mécaniques du substitut osseux en fonction de l'application visée. Il a été démontré que les nanofibres électrofilées sont résistantes aux forces mécaniques appliquées lors du remodelage osseux^{331,332}.

Le chitosane possède une résistance mécanique qui peut être renforcée par ajout de polymères et/ ou de céramiques tout en conservant son activité ostéogénique. Schiffman *et al.* ont montré que des nanofibres de chitosane de masse molaire moyenne possèdent un module d'Young de l'ordre de $0,15 \pm 0,04$ GPa²¹¹. Frohbergh *et al.* ont développé des matrices

nanofibreuses à base de chitosane contenant des nanoparticules d'hydroxyapatite qui ont été réticulées avec la génipine³³³. La moyenne des diamètres des fibres a augmenté de 227 ± 154 nm jusqu'à 335 ± 119 nm après l'étape de réticulation. Ces nanofibres composites ont montré un module d'Young de l'ordre de 142 ± 13 MPa, qui est similaire à celui au périoste naturel (une membrane conjonctive et fibreuse qui constitue l'enveloppe de l'os). Ils ont mis en évidence que ces supports ont facilité la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules ostéoblastes.

IV.2. Biodégradabilité

La biodégradation implique la scission des liaisons dans les chaînes polymères via un mécanisme hydrolytique ou enzymatique (lysozyme). Les produits issus de la dégradation doivent posséder deux propriétés primordiales, à savoir la non-toxicité et la non-immunogénicité. Ils doivent également être de petites tailles afin d'être dissous dans les fluides corporels et être ainsi éliminés par l'organisme^{334,335}. Le taux de dégradation est également un paramètre important à prendre en compte, parce qu'il est nécessaire que la vitesse de dégradation concorde avec la vitesse de formation du tissu cible. Pour une régénération qualitative et quantitative du tissu osseux, l'espace généré par la dégradation doit contribuer au dépôt de la matrice et donc à la reconstruction du tissu hôte.

La dégradation contrôlée et la nature biocompatible du chitosane favorisent son utilisation comme membrane qui est susceptible de servir comme barrière pour la régénération osseuse guidée (ROG)³³⁶. Norowski *et al.* ont élaboré des nanofibres de chitosane réticulées à la génipine qui favorisent la croissance et la prolifération des cellules ostéoblastiques et ont montré que la réticulation permet de prolonger la durée de dégradation.

IV.3. Biocompatibilité

Les interactions biomatériau-cellules jouent un rôle primordial dans l'intégration du dispositif médical dans son environnement hôte. Ces interactions peuvent être régulées grâce aux propriétés de surface du matériau, telles que la structure et la composition chimique, la rugosité et l'énergie de surface³³⁷. Une des exigences que le biomatériau doit respecter est la biocompatibilité. Un dispositif médical biocompatible peut être capable d'interagir avec les cellules hôtes sans produire d'effets indésirables.

Des études récentes ont démontré le potentiel des nanofibres de chitosane pour l'ITO et l'affinité des cellules osseuses avec les « scaffolds » nanofibreux^{105,329,338-342}. Des nanofibres

de PCL et de chitosane ont été préparées et ont montré que le chitosane favorise l'adhésion et la prolifération des cellules ostéoblastes MC3C3-E3, le dépôt de calcium, l'activité des phosphatases alcalines et l'expression de l'ostéopontine³⁴³. Bhattarai *et al.* ont démontré la capacité des nanofibres à base de chitosane et de PEO à améliorer la fixation et la viabilité des cellules ostéoblastiques humaines²¹³. De la même manière, Toskas *et al.* ont développé des nanofibres hybrides à base de chitosane, de PEO et de silice qui ont contribué à l'adhésion et à la prolifération des cellules osseuses. En outre, il a été prouvé que l'ajout de l'hydroxyapatite au sein des nanofibres favorisait la prolifération cellulaire et l'activité des phosphatases alcalines³⁴⁴.

IV.4. Adhésion et prolifération cellulaire

La surface du biomatériau doit être capable de promouvoir l'adhésion des cellules pour permettre leur prolifération et leur différenciation. Les structures nanofibreuses facilitent la fixation des ostéoblastes et de chondrocytes, et maintiennent la morphologie et la viabilité cellulaire dans le temps. En effet, des nanofibres de chitosane et de PEO préparées par électrospinning, favorisent l'adhésion des cellules, notamment les ostéoblastes, sans entraver leur morphologie et leur structure^{213,345}. De plus, il a été démontré que la porosité et la morphologie des pores des nanofibres de PVA/ chitosane améliorent la migration des cellules et la vascularisation. Elles ont également permis le passage des nutriments entre les cellules, favorisant ainsi la prolifération cellulaire³⁴⁶.

La bioactivité du biomatériau peut être modulée par l'adsorption des protéines. Une étude menée par Zhang *et al.* a décrit comment l'adsorption des protéines, telles que la fibronectine et la vitronectine, sur les nanofibres à base de chitosane et d'hydroxyapatite peut faciliter l'interaction avec les intégrines. Shalumon *et al.* ont étudié l'effet de l'ajout du verre bioactif et d'hydroxyapatite, à l'échelle nanométrique, sur la bioactivité des nanofibres de chitosane et de PCL pour une application en ingénierie tissulaire parodontale³⁴⁷. Ils ont démontré que l'incorporation des deux composants permet d'augmenter l'adsorption protéique et l'activité des phosphatases alcalines.

V. Fonctionnalisation des biomatériaux

Les interactions entre la surface du biomatériau et les cellules sont cruciales pour la régénération des tissus. Une fois le biomatériau implanté dans son environnement hôte, un enchaînement d'événements cellulaires et matriciels complexes et fortement interdépendants a

lieu à l'interface. Par conséquent, les propriétés de surface, telles que la rugosité, la porosité et la composition chimique, constituent des facteurs importants qu'il faut prendre en compte. La recherche s'est orientée vers la modification de surface des substituts osseux pour mieux répondre aux exigences de la régénération osseuse^{348,349}.

De nombreux revêtements (organiques ou inorganiques) ont été étudiés afin d'induire la formation du tissu osseux à l'interface biomatériau – environnement hôte^{339,350-354}. A titre d'exemples, une étude menée par Li *et al.* consistait en la fonctionnalisation de fibres composites à base de soie/ PEO et d'hydroxyapatite avec les facteurs de croissance BMP-2 qui ont promu la différenciation des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse humaine³⁵¹. Schuessele *et al.* ont étudié l'immobilisation des protéines BMP-2 en comparant l'utilisation des aminobiphosphates pamidronate et alendronate (agents chélateurs du Ca) avec la technique de silanisation. Ils ont expliqué qu'après fonctionnalisation, l'activité de la phosphatase alcaline était 2,5 fois plus élevée³⁵⁵. Le chargement des « scaffolds » en antibiotiques a également été exploré dans le but de prévenir les infections préopératoires qui pourraient altérer la régénération du tissu³⁵⁶.

La fonctionnalisation des biomatériaux a été très étudiée dans la littérature, en vue d'améliorer les propriétés mécaniques des supports, l'adhésion et la prolifération cellulaire, de favoriser l'adsorption des protéines et la minéralisation³⁵⁷. Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à la biominéralisation.

La biominéralisation est un processus régulé par lequel les organismes vivants produisent des minéraux. Elle constitue une exigence essentielle pour le développement squelettique normal du tissu osseux. Par conséquent, des études ont été menées afin d'améliorer les interactions à l'interface entre l'apatite et le substitut osseux. La fonctionnalisation de surface est considérée comme une méthode efficace pour améliorer son activité biologique, en particulier pour favoriser la croissance de la phase apatitique CaP (le plus souvent de l'hydroxyapatite) à la surface et au sein de la matrice osseuse. Ceci permettrait de promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules osseuses, et donc de stimuler la formation de l'os et la régénération du tissu osseux naturel.

Les différentes méthodes de fonctionnalisation qui ont été développées pour induire le phénomène de biominéralisation seront discutées ci-après.

V.1. Incorporation de charges

Les oligo-éléments tels que le magnésium et le zinc, présentent d'excellentes activités biologiques lors de la régénération osseuse. Par exemple, les ions Mg^{2+} peuvent influencer indirectement le métabolisme des minéraux en activant la phosphatase alcaline^{358,359}. Il a été démontré qu'une déficience en Mg^{2+} peut restreindre la prolifération des ostéoblastes entraînant une diminution de la densité osseuse³⁶⁰. Il est de même des cations Zn^{2+} qui sont capables de promouvoir la formation du « nouveau » tissu osseux³⁶¹. Par conséquent, des études sur l'incorporation de ces ions ont été effectuées afin d'optimiser l'ostéointégration et l'ostéoinduction³⁶²⁻³⁶⁷. A titre d'exemples, Cabrejos-Azama *et al.* ont synthétisé des ciments de phosphate de calcium dopés avec du magnésium afin d'évaluer l'effet du magnésium sur la réponse des cellules ostéoblastes. Ils ont ainsi prouvé que l'incorporation du magnésium permet d'améliorer la prolifération cellulaire, la biominéralisation et la régénération osseuse *in vitro* et *in vivo*³⁶⁸. Pour leur part, Cai *et al.* ont étudié l'incorporation simultanée du magnésium et du fluor dans l'hydroxyapatite qui est déposée sous forme de revêtement sur des support en titane via un procédé sol-gel³⁶⁹. Les résultats qu'ils ont obtenus montrent que le fluor permet une meilleure incorporation du magnésium dans la structure cristalline de l'hydroxyapatite et que le magnésium rend les revêtements bioactifs, ce qui favorise la régénération de l'os.

V.2. Traitement par plasma

La fonctionnalisation par traitements plasma est une méthode simple et efficace ; elle permet de fixer des groupements fonctionnels, tels que des fonctions amines, hydroxyles et carboxyles à la surface du dispositif sans altérer la structure chimique globale des polymères^{357,370,371}. Venugopal *et al.* ont développé des nanofibres de PCL et d'hydroxyapatite modifiées via un traitement par plasma sous oxygène dans le but d'introduire des groupements hydroxyle³⁷². Ils ont démontré que les surfaces traitées améliorent significativement la prolifération des cellules osseuses et la minéralisation du support. Les nodules minéraux formés par les ostéoblastes sont similaires à l'apatite de l'os naturel. De même, Sanker *et al.* ont formé des fibres de PCL, à l'échelle micro- et nano-métrique, soumises à un traitement par plasma d'azote et d'argon à basse pression³⁷¹. Les résultats obtenus ont prouvé que les supports fibreux sont devenus polaires après la fixation des groupements polaires favorisant ainsi la biominéralisation et l'ostéoconduction du support fibreux. Toutefois, cette technique présente plusieurs inconvénients, à savoir l'hétérogénéité des espèces réactives générées par le plasma,

la puissance et le temps du traitement qui peuvent altérer les propriétés mécaniques et la morphologie du biomatériau accélérant sa dégradation.

V.3. Fonctionnalisation chimique

De nombreuses modifications chimiques des substituts osseux ont été étudiées dans le but de favoriser le phénomène de biominéralisation. Parmi lesquelles, la sulfonation^{373,374}, la phosphorylation^{375,376} et l'hydrolyse³⁷⁷⁻³⁸⁰ de la surface. Il a été prouvé que les groupements acide carboxylique^{377,381-383}, hydroxyles^{377,384}, sulfonates³⁷⁴ et phosphates^{375,385} peuvent interagir avec les cations Ca^{2+} et donc amorcer la nucléation des cristaux d'apatite. Des études menées par Liao *et al.* ont mis en évidence la formation de la couche minérale sur les supports nanofibreux de PLGA qui est due à la présence des groupements carboxyle et carbonyle dans le PLGA³⁸⁶.

Des acides aminés et des peptides ont été greffés à la surface des scaffolds³⁸⁷⁻³⁹⁰. Rautaray *et al.* se sont intéressés à la précipitation de l'hydroxyapatite en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide aspartique. Ils ont observé que la présence du revêtement favorise la formation de la phase minérale grâce aux interactions entre les groupements acide carboxylique présents dans l'acide aspartique et les cations Ca^{2+} ³⁹¹. De plus, les acides aminés chargés, notamment l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'arginine, ont démontré, en plus de la minéralisation, leur capacité à favoriser l'adsorption des protéines et la prolifération des ostéoblastes³⁹²⁻³⁹⁴.

En outre, l'utilisation de bisphosphonates a été rapportée dans la littérature pour améliorer la biominéralisation du dispositif et la régénération du tissu osseux³⁹⁵⁻³⁹⁷. Un hydrogel hybride injectable à base d'acide hyaluronique a été synthétisé par Yang *et al.* Ils ont mis en évidence que la minéralisation est facilitée grâce aux interactions entre les résidus bisphosphonates et les ions Ca^{2+} constituant le point de départ de la phase de nucléation³⁹⁸. Cependant, l'usage clinique répandu et prolongé des bisphosphonates a donné lieu à des rapports d'expertise décrivant des effets indésirables, rares mais graves, notamment l'ostéonécrose maxillaire et les fractures atypiques sous-trochantériennes ou dyaphysaires du fémur³⁹⁹.

Par conséquent, des stratégies plus simples, efficaces et douces ont été développées, parmi lesquelles une stratégie bio-inspirée qui consiste en la fonctionnalisation des biomatériaux avec la polydopamine. Il sera plus spécifiquement question de cette stratégie, dont le principe et les propriétés biologiques seront discutés, plus loin dans cette étude.

VI. Fonctionnalisation de surfaces avec la polydopamine

VI.1. Source et mécanismes de préparation de la polydopamine

En 1981, Waite et Tanzer ont identifié que les groupements catéchol étaient responsables de l'adhérence polyvalente des moules au bois et aux pierres, malgré les conditions humides et les contraintes mécaniques de l'eau⁴⁰⁰. Des études approfondies ont été par la suite effectuées afin d'identifier les protéines responsables des propriétés adhésives des moules et leur mode d'action. Il a été considéré que l'acide aminé 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA) était l'élément principal requis pour cette adhérence (cf. Figure 22)^{401,402}. Ces protéines se trouvent dans les filaments qui sont produits par la glande de byssus, située à la base du « pied » de la moule, *Mytillus edulis*. Le DOPA est le précurseur de la dopamine qui polymérise dans des conditions alcalines pour former la polydopamine (pDA)⁴⁰³.

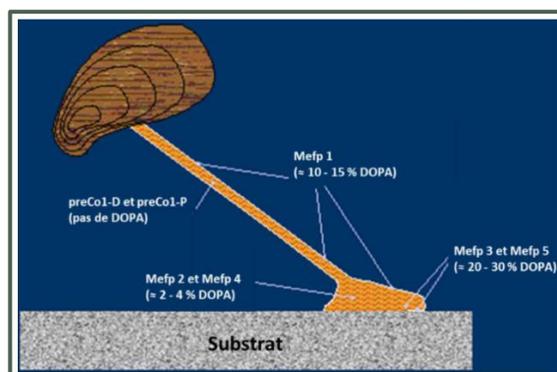


Figure 22. Représentation schématique de la localisation et de la proportion de DOPA contenue dans les protéines adhésives sécrétées par les moules^{404,405}

Ensuite, Messersmith *et al.* ont démontré pour la première fois l'autopolymérisation des catécholamines de la dopamine dans des conditions basiques pour former la pDA *in situ* à partir d'une solution tamponnée de dopamine à pH 8,5⁴⁰⁵. Lorsqu'un substrat est immergé dans la solution, un film de pDA est alors déposé *in situ* à la surface (cf. Figure 23). L'épaisseur du film de pDA greffé peut être modulable en faisant varier le temps d'immersion dans la solution de dopamine. Néanmoins, une épaisseur maximale de 50 nm ne peut être dépassée après 24 heures de traitement dans ces conditions⁴⁰⁵. Afin de pallier à ce problème et augmenter l'épaisseur du film, il est possible de faire varier la concentration initiale en dopamine⁴⁰⁶, la température⁴⁰⁷ ou d'utiliser un oxydant autre que l'oxygène⁴⁰⁸. Il a été démontré que cette approche permet de fonctionnaliser une large gamme de matériaux, y compris les surfaces hydrophobes^{403,409}.

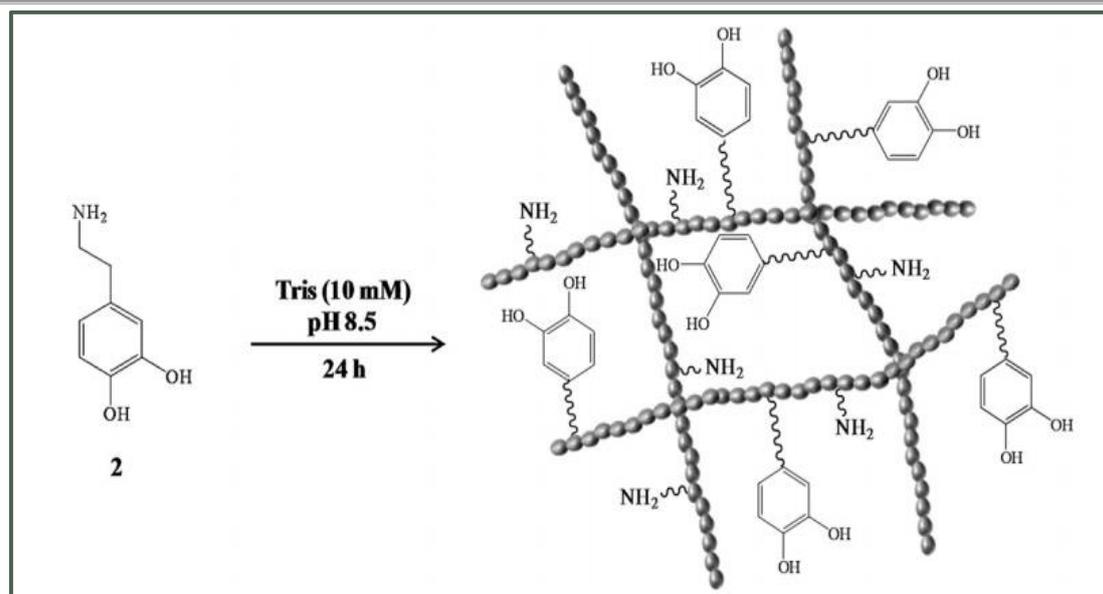


Figure 23. Réseau de polydopamine développé par Messersmith et al.⁴⁰⁵

La fonctionnalisation des dispositifs médicaux avec la pDA s'est révélée être une méthode de revêtement de surface simple et réalisable en une seule étape⁴⁰⁵. Toutefois, le mécanisme conduisant à la formation de la polydopamine reste relativement complexe en raison notamment de la génération de nombreux intermédiaires réactionnels. En effet, le réseau de pDA est probablement formé via des réactions de type addition de Michaël et/ ou la formation de bases de Schiff qui impliquent les groupements quinone de la dopamine oxydée et ses fonctions amines primaires⁴¹⁰⁻⁴¹². Jusqu'à présent, la structure exacte de pDA fait encore défaut dans la littérature mais certaines propositions sont discutées par différentes études (cf. Figure 24). Herlinger *et al.* ont rapporté que l'oxydation de la dopamine, suite à une voie de réaction à plusieurs étapes, conduit au dopaminochrome (composé 10 de la Figure 24) qui peut autopolymériser et produire des polymères avec des groupements catéchol libres disponibles pour d'autres réactions chimiques (composés 11 et 12 de la Figure 24)⁴¹³. Ces fonctions catéchols sont responsables de la forte adhésion du réseau polymère sur diverses surfaces organiques et inorganiques⁴¹⁴⁻⁴¹⁸.

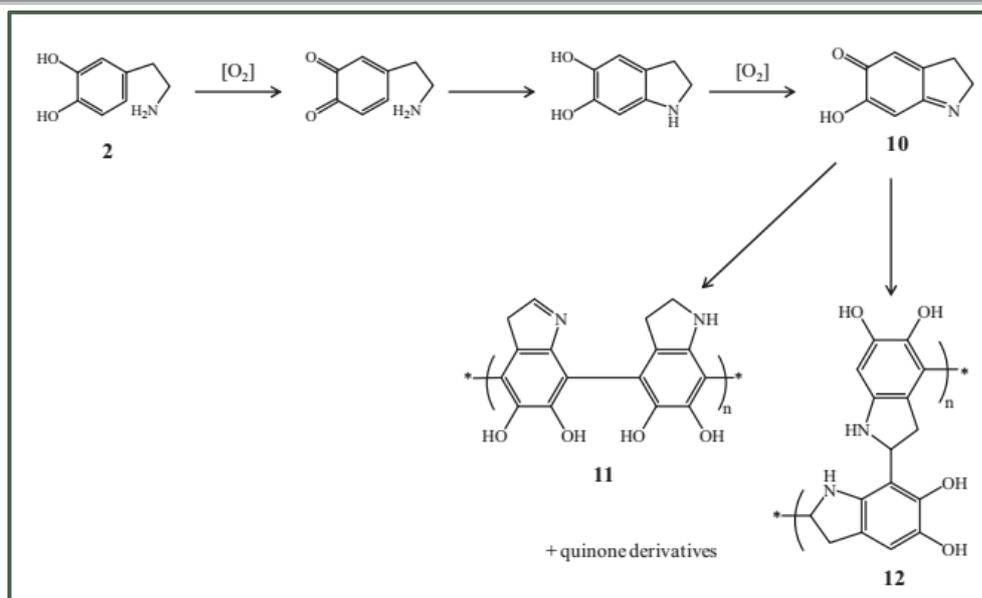


Figure 24. Mécanisme réactionnel de la formation de la pDA (11 et 12) par auto-polymérisation de la DA (2) par l'intermédiaire du dopaminochrome (10)⁴¹³.

Une autre étude menée par Dreyer *et al.* a proposé une structure différente dans laquelle les espèces sont reliées entre elles via des interactions supramoléculaires de type liaisons hydrogène, interaction π - π et des complexes à transfert de charges (*cf.* Figure 25)⁴¹⁹.

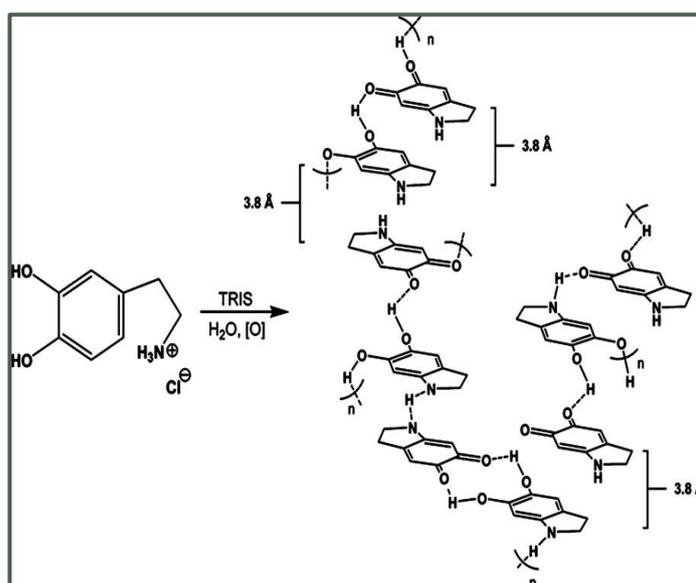


Figure 25. Structure de la polydopamine formée de dérivés indoles qui se sont auto-assemblés via des interactions supramoléculaires⁴¹⁹

Quant à Hong *et al.*, ils ont mis en évidence la présence de trimères composés de deux unités de dopamine et d'une unité 5,6-dihydroxyindole, qui s'auto-assemblent pour former des complexes stables emprisonnés au sein du réseau réticulé de polydopamine (*cf.* Figure 26)⁴²⁰. Ils ont également prouvé que ces trimères peuvent induire une cytotoxicité partielle du film de polydopamine.

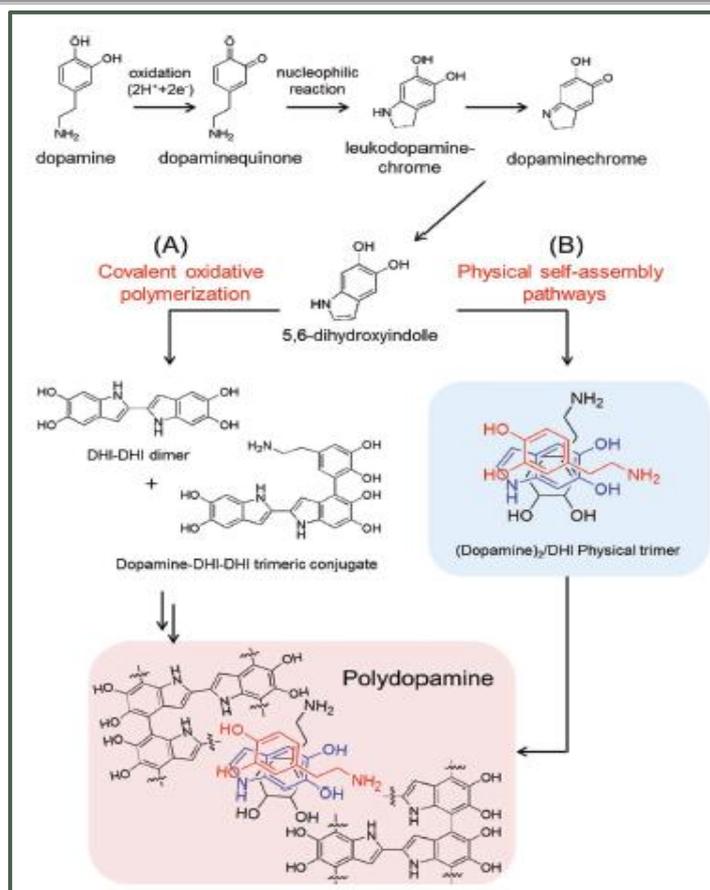


Figure 26. Synthèse de la polydopamine selon Hong et al.⁴²⁰

Le film de polydopamine présente ainsi diverses fonctions réactives dans sa structure qui ont été largement exploitées pour la fonctionnalisation des biomatériaux et qui ont montré d'excellentes propriétés biologiques.

VI.2. Propriétés biologiques de la polydopamine

Depuis sa découverte, la pDA a suscité un grand intérêt dans plusieurs domaines de la nanomédecine, allant des biosenseurs jusqu'à l'ingénierie tissulaire et aux prothèses à libération des principes actifs⁴²¹⁻⁴²⁵ (cf. Figure 27). La pDA possède en effet plusieurs propriétés biologiques, notamment la biocompatibilité⁴²⁶⁻⁴²⁸ et la capacité à induire l'endothélialisation^{429,430}.

Dans cette étude, nous nous sommes plus spécifiquement intéressées aux propriétés biologiques de la polydopamine en vue d'une utilisation en ingénierie tissulaire osseuse, notamment l'adhésion et la prolifération des cellules, l'ostéodifférenciation et la biominéralisation qui sera particulièrement discutée ci-après.

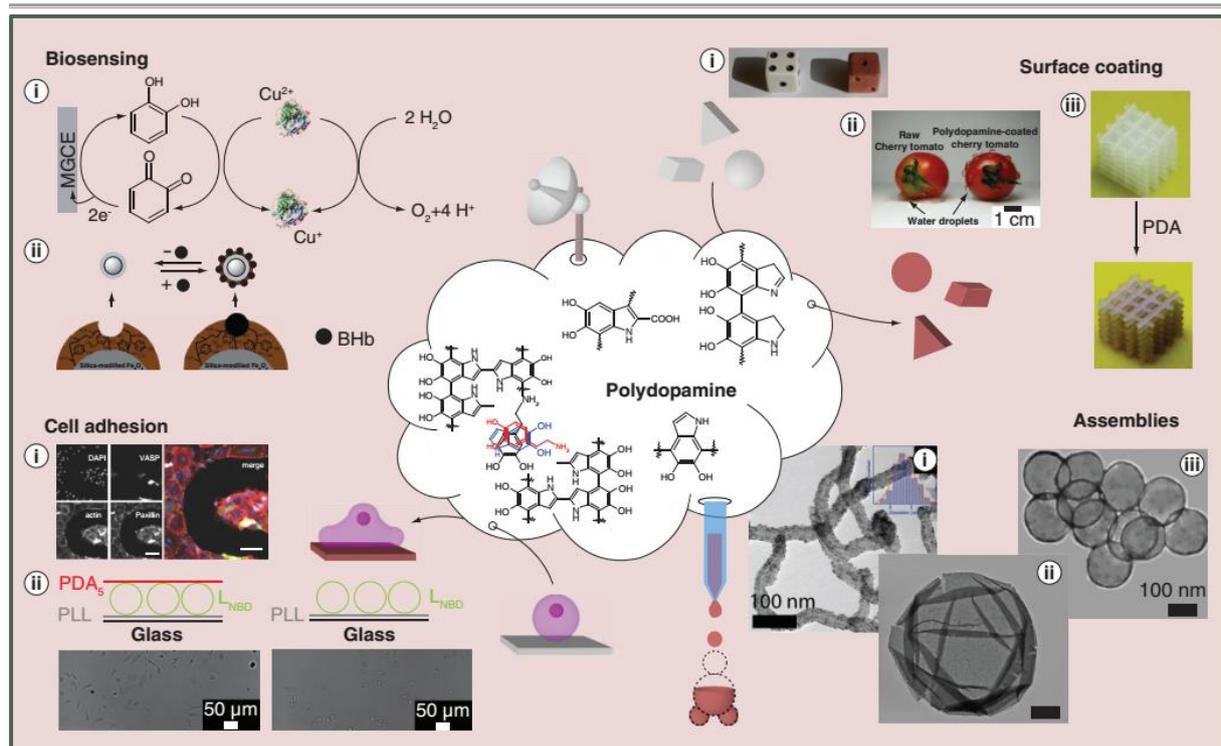


Figure 27. Schéma récapitulatif des applications biomédicales de la polydopamine

VI.2.1. Fixation des biomolécules

Les fonctions catéchols présentes dans la structure chimique de la pDA permettent aux nucléophiles, tels que les amines, les thiols ou encore les imidazoles, de se conjuguer de manière covalente. Ainsi, les revêtements de pDA présentent des affinités avec de nombreuses biomolécules actives, notamment les peptides et les facteurs de croissance osseux, sans altérer leur activité^{405,431}. Ko *et al.* ont étudié le greffage de peptides dérivés du facteur morphogénétique osseux 2 (BMP-2) sur des films de PLGA fonctionnalisés avec la polydopamine. Ils ont mis en évidence la capacité de ces matériaux de réguler la différenciation ostéogénique et la minéralisation *in vitro* et *in vivo* des cellules souches adipeuses humaines (hADSC)⁴³² (*cf. Figure 28*). De même, Cho *et al.* ont décrit l'immobilisation des facteurs de croissance BMP-2 à la surface des nanofibres de PCL recouvertes de pDA afin d'améliorer la régénération osseuse *in vivo*⁴³³. Le greffage des phosphatases alcalines sur des surfaces en titane ou en PTFE a également été traité par Nijhuis *et al.*⁴³⁴.

Pour conclure et en comparaison avec les techniques traditionnelles, le greffage assisté par la pDA améliore significativement les performances d'ancrage des biomolécules⁴³⁵.

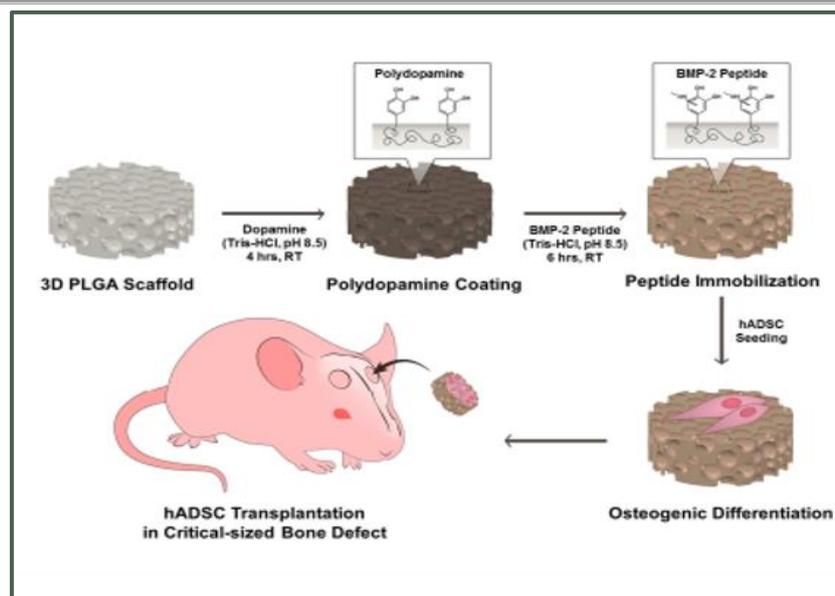


Figure 28. Illustration schématique des étapes de greffage des peptides⁴³²

VI.2.2. Adhésion cellulaire

Plusieurs études ont prouvé que les revêtements de pDA favorisent l'adhésion, la prolifération et la différenciation ostéogénique *in vitro* de différents types de cellules^{352,436,437}. Rim et al. ont fonctionnalisé des fibres électrofilées de poly (L-lactide) avec la pDA afin de moduler la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC). Ils ont révélé que le revêtement de pDA a induit la fixation et la prolifération cellulaire, ainsi que la différenciation ostéogénique via la régulation de l'expression du gène ostéogénique et de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline³⁵². De leur côté, Wu *et al.* ont développé une méthode d'autoassemblage dans le but de préparer des biocéramiques fonctionnalisées avec des nanocomposites de phosphate de calcium/ pDA. Ceci a permis de stimuler l'adhésion et la prolifération des cellules stromales de la moelle osseuse humaine (hBMSC) et l'activité de la phosphatase alcaline⁴³⁶.

VI.2.3. Régénération osseuse in vivo

Selon la littérature, le revêtement de pDA permet d'améliorer la bioactivité des substituts osseux dans un environnement *in vivo*. Lee et al. ont implanté des fibres électrofilées alignées ou aléatoires, fonctionnalisées avec la pDA, dans un modèle de souris possédant un défaut au niveau de la calotte crânienne⁴³⁸. Ils ont démontré que les zones de régénération osseuse étaient plus nombreuses dans le cas de fibres alignées et fonctionnalisées. L'alignement des fibres a contribué à l'orientation des cellules hMSC et la pDA a amélioré la bioactivité du biomatériau. Cette synergie a contribué à la régénération osseuse *in vivo*⁴³⁸. Une autre étude a été réalisée

par Hong *et al.* au cours de laquelle des substituts de PLA ont été modifiés par un revêtement de pDA. Ils ont mis en évidence la réduction de la toxicité *in vivo* du biomatériau implantable ou injectable grâce à la présence des nanocouches biocompatibles de pDA à la surface⁴²⁷.

VI.2.4. Biominéralisation

Il a été rapporté que la pDA peut être également utilisée pour promouvoir la biominéralisation des surfaces des substituts osseux. Comme indiqué auparavant, l'os est majoritairement constitué de collagène et de nanocristaux d'hydroxyapatite. Ainsi, la capacité des substituts osseux à induire la biominéralisation *in vivo*, c'est-à-dire la cristallisation de nano-hydroxyapatite, est primordiale afin d'assurer la régénération du tissu osseux⁴³⁹.

Ryu *et al.* ont introduit une voie de biominéralisation universelle, capable de former des cristaux d'hydroxyapatite à la surface de divers matériaux, y compris les céramiques, les métaux nobles, les semi-conducteurs et les polymères synthétiques⁴⁴⁰. Ils ont mis en évidence que les groupements catécholamine, présents dans la pDA, étaient responsables de l'adhésion et de la nucléation de l'hydroxyapatite en présence d'ions Ca^{2+} à l'interface. Après incubation pendant deux semaines dans un « fluide corporel simulé » (« Simulated body fluid » (SBF)), l'implant métallique à base de titane fonctionnalisé a été entièrement recouvert et de façon uniforme de minéraux de phosphate de calcium (CaP), contrairement au biomatériau vierge (*cf.* Figure 29).

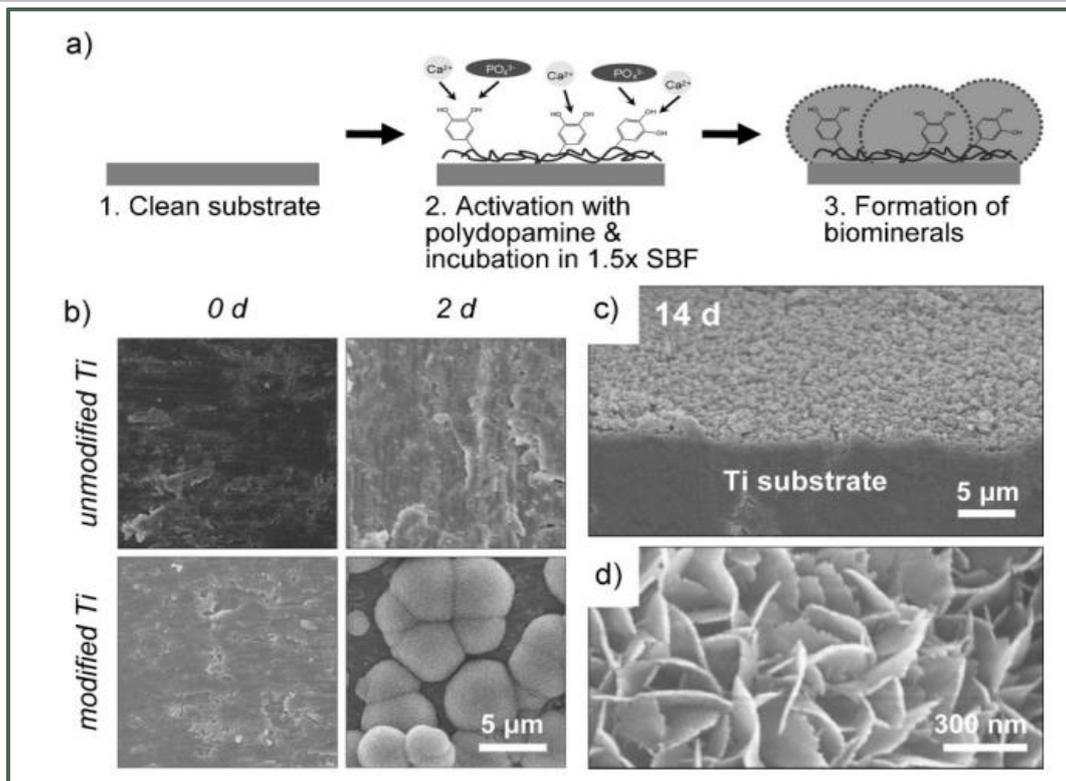


Figure 29. Formation de cristaux de phosphate de calcium facilitée par le revêtement de polydopamine (a) Schéma de formation des cristaux minéraux (b) Les images obtenues par microscopie électronique à balayage montrant les effets du revêtement de pDA sur la formation des cristaux CaP après incubation su substrat dans le fluide corporel simulé pendant 2 et 14 jours⁴⁴⁰

La solution SBF est riche en ions calcium Ca^{2+} et phosphate PO_4^{3-} dont la concentration est similaire à celle du plasma sanguin, à température et pH physiologiques. Introduite pour la première fois par Kokubo *et al.* pour évaluer les changements de surface d'une biocéramique bioactive⁴⁴¹, elle est très utilisée comme méthode de caractérisation *in vitro* pour étudier la formation de la couche d'apatite à la surface des implants et pour ainsi prédire leur bioactivité osseuse *in vivo*^{442,443}.

La Figure 30 ci-après schématise le mécanisme de formation des cristaux CaP. Globalement, les ions Ca^{2+} présents dans la solution SBF vont interagir avec les groupements catéchol entraînant la chélation des ions Ca^{2+} . Les interactions électrostatiques entre les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} vont ensuite induire la formation d'apatite. Afin de totalement biominéraliser la surface du biomatériau, il est nécessaire d'immerger le substrat dans le SBF pendant au moins 7 jours. C'est ainsi que Hu *et al.* ont étudié l'incorporation de nanocristaux d'hydroxyapatite dans la solution afin d'accélérer le processus et d'augmenter le nombre des cristaux à la surface⁴³⁹.

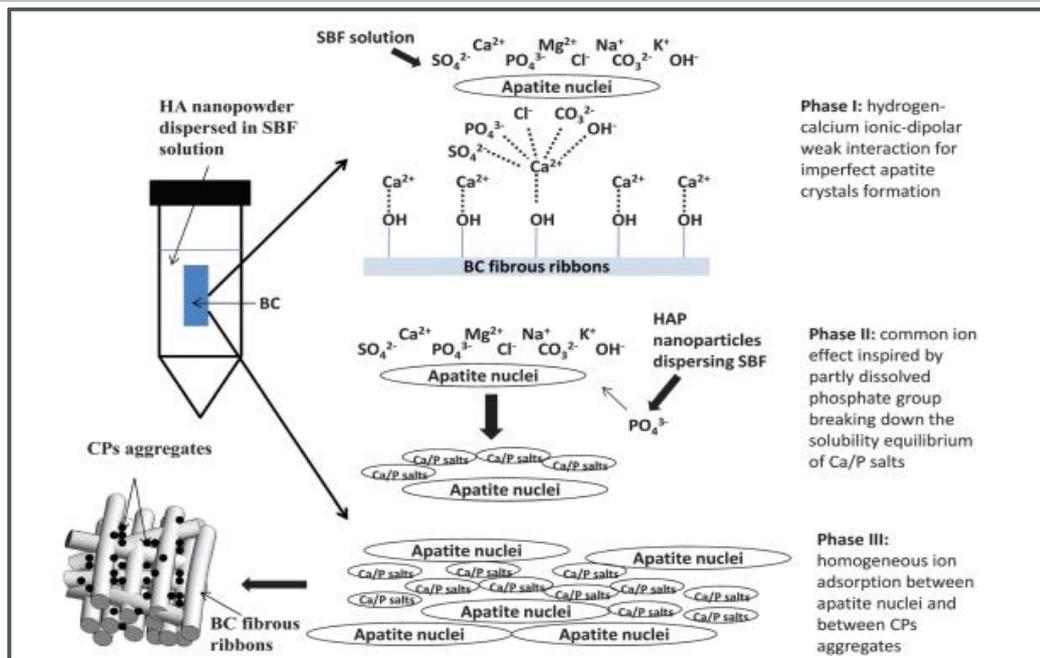


Figure 30. Représentation schématique du mécanisme de formation des cristaux CaP sur des composites biorésorbables de cellulose dans une solution SBF contenant des nanocristaux d'hydroxyapatite⁴³⁹

Une autre étude menée par Liu et al. montre l'évolution d'un biomatériau à base de ciment de CaP dans le SBF en variant le temps d'immersion pendant 14 jours⁴⁴⁴. Le biomatériau est principalement constitué de α -phosphate de tricalcium et de phosphate dicalcium dihydraté. Les résultats obtenus ont montré que la pDA a favorisé la conversion des deux constituants en hydroxyapatite durant les premiers jours d'immersion (jusqu'à 7 jours), mais a inhibé cette conversion pour un temps d'immersion supérieur à 10 jours. La pDA a ainsi accéléré la minéralisation et a permis de former une couche d'hydroxyapatite à l'échelle nanométrique⁴⁴⁴.

Il a été en outre montré que la pDA permet non seulement de biominéraliser les substituts osseux mais aussi d'améliorer leurs propriétés mécaniques. Xie et al. ont étudié la fonctionnalisation des fibres de PCL avec la pDA pour réguler la minéralisation et d'améliorer ainsi les propriétés mécaniques⁴⁴⁵. Ils ont montré que la morphologie, la taille des cristaux et l'épaisseur de la couche apatitique pouvaient être contrôlées en ajustant la composition de la solution minéralisée, les propriétés de surface et la durée de biominéralisation. De plus, ils ont expliqué comment les fibres obtenues possédaient une forte rigidité, une résistance à la traction et une ténacité, qui sont très similaires à celles du tissu osseux (cf. Figure 31). La couche minérale a significativement amélioré les propriétés mécaniques des fibres.

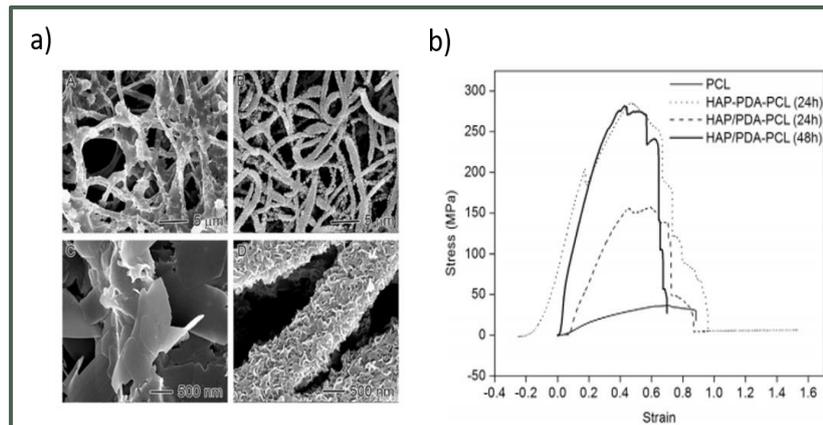


Figure 31. (a) Images MEB des nanofibres de PCL enduites de pDA pendant 4h et minéralisées dans une solution de 10 x SBF contenant 0,01M (A,C) ou 0,04 M (B, D) à 37°C pendant 24 h (b) Les courbes contrainte-déformation des différents échantillons fibreux⁴⁴⁵

VII. Conclusion

L'ingénierie tissulaire osseuse est considérée comme susceptible de constituer une approche alternative efficace aux méthodes de greffes « traditionnelles ». Elle fait appel à l'élaboration des « scaffolds » biomimétiques dans le but de favoriser la régénération du tissu osseux. Parmi les techniques utilisées pour la fabrication des substituts osseux, l'électrospinning représente une méthode de choix car elle permet de préparer, en toute simplicité, des structures fibreuses à l'échelle nanométrique. Ceci permet un excellent contrôle spatial de l'architecture, y compris la modulation de la taille des pores, de la géométrie et de l'interconnectivité. Les matrices de nanofibres ainsi obtenues sont caractérisées par une forte porosité, par une grande surface spécifique et par une structure très similaire à celle de la matrice extracellulaire. Ceci permet de promouvoir les interactions dispositif médical – environnement biologique hôte et donc la formation du « nouveau » tissu osseux. Les nanofibres de chitosane ont été explorées pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse en raison des propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane.

Différentes méthodes de fonctionnalisation des substituts osseux ont été étudiées afin d'améliorer leur bioactivité, notamment l'adsorption des facteurs de croissance en vue de favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules osseuses.

Dans le cadre de cette thèse, il nous est apparu original de modifier chimiquement la surface des nanofibres à base de chitosane avec la polydopamine, une méthode de fonctionnalisation simple et efficace, dans l'optique d'induire le phénomène de biominéralisation du support et donc de lui attribuer des propriétés ostéoinductrices et d'améliorer sa biointégration. Pour ce faire, nous avons appliqué le protocole décrit par Messersmith *et al.*⁴⁰⁵ et nous nous sommes

basés sur les travaux de recherche de Ryu et al.⁴⁴⁰. Ces derniers ont fonctionnalisé des supports en titane avec la polydopamine et ont mis en évidence leur capacité à induire la nucléation de l'hydroxyapatite à leur surface. Nous avons donc adapté cette stratégie sur des nanofibres de chitosane.

Chapitre II. Produits, matériels et techniques de caractérisation

I. Elaboration de nanofibres par electrospinning à partir du chitosane

I.1. Les polymères utilisés

I.1.1. Le chitosane

Le CHT utilisé pour cette étude provient de la société WISapple (batch n° WA1603121). Il est extrait des champignons et présente un DD de 98,26%. Sa masse molaire est estimée par le fournisseur à 200 000 g.mol⁻¹. Afin de vérifier la concordance des résultats, le DD a été mesuré par IR et par ¹H-RMN. Les deux protocoles sont détaillés en *Annexe 1*.

Les résultats obtenus par IRTF donnent un DD de 98,35 ± 0,85 et ceux obtenus par ¹H-RMN donnent un DD de 96,26 ± 0,58.

De même, la masse molaire du CHT a été déterminée par viscosimétrie capillaire à l'aide d'un viscosimètre SCHOTT AVS 360 à une température de 20 °C en utilisant un capillaire de diamètre 53 mm (cf. *Annexe 2*). Une solution mère de CHT a été préparée à une concentration massique mère de C₀ = 10 g.L⁻¹ par solubilisation dans un solvant composé d'acide acétique et d'acétate de sodium (0,3 M et 0,2 M respectivement). Puis, des dilutions ont été réalisées (C₁=C₀/2 ; C₂=2C₀/5 ; C₃=C₀/3 et C₄=2C₀/7). Pour chaque solution, quatre points de mesure du temps d'écoulement sont effectués.

La relation de Mark-Houwink a permis de déterminer la masse viscosimétrique des polymères suivant l'équation :

$$M_v = \sqrt[\alpha]{\frac{[\eta]}{K}}$$

Avec α et k les paramètres prédéterminés par Rinaudo *et al.* pour des chitosans de degré d'acétylation de 2% et dans les conditions opératoires précédemment décrites ($\alpha=0,76$ et $K=82.10^{-5} \text{ dL.g}^{-1}$)⁴⁵³.

Les différents résultats obtenus sont comparés à ceux fournis par la société WISapple dans le *Tableau 3* ci-dessous.

Tableau 3. Données fournies par la société WISapple et les résultats expérimentaux obtenus concernant le CHT étudié. La M_v a été déterminée par viscosimétrie capillaire et le DD par IRTF et ¹H-RMN

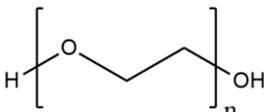
		CHT (batch n° WA1603121)
Données fournisseur	DD (%)	98,26
	M _v (g.mol ⁻¹)	200 000
Expérimental	DD (%)	98,35 (IRTF); 96,27 (¹ H-RMN)
	M _v (g.mol ⁻¹)	96 400

I.1.2. Le poly (oxyde d'éthylène)

Le poly (oxyde d'éthylène) (PEO) a été ajouté au CHT pour faciliter son électrofilage. De plus, il est biocompatible.

Pour cette étude, le PEO, provenant de la société Sigma Aldrich, a été associé au CHT afin de faciliter son electrospinning. Ses caractéristiques sont résumées dans le *Tableau 4*.

Tableau 4. Les caractéristiques du PEO

Produit	Poly (oxyde d'éthylène)
Abréviation	PEO
N° CAS	25322-68-3
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	900 000
Structure	

I.2. Electrospinning

I.2.1. Préparation de la solution

Le CHT et le PEO en poudre ont été pesés dans les proportions massiques de CHT/PEO 90/10 dans un pilulier en verre, puis ont été dissouts dans de l'acide acétique à 90% (v/v). La concentration massique en CHT/PEO de la solution a été fixée à 3,3 wt%. La solution est laissée sous agitation mécanique à 300 tr.min⁻¹ pendant 12 heures, jusqu'à dissolution complète des deux polymères. Une solution limpide de couleur jaunâtre a été obtenue.

I.2.2. Dispositif d'electrospinning du laboratoire

Le dispositif d'electrospinning utilisé pour cette étude a été fabriqué au sein du laboratoire UMET (cf. *Figure 32*). Il est constitué d'un générateur (1) (tension maximale de 25 kV) et d'un pousse seringue (Fisher Scientific). L'aiguille (21 jauge, TERUMO) (5) est fixée sur un support en téflon (4) relié au pôle positif (2) pouvant effectuer des allers-retours sur une largeur fixée. Le tout est fixé à une potence (3) qui permet de contrôler la distance requise entre l'aiguille et le collecteur. Les nanofibres obtenues sont collectées sur un cylindre rotatif (6) tournant à une vitesse de rotation maximale de 300 tr.min⁻¹ et relié au pôle négatif. L'appareil est piloté par un ordinateur. Enfin, un thermomètre et un hygromètre (7) est positionné à l'intérieur de la cabine afin de contrôler la température et ajuster l'humidité relative (HR).

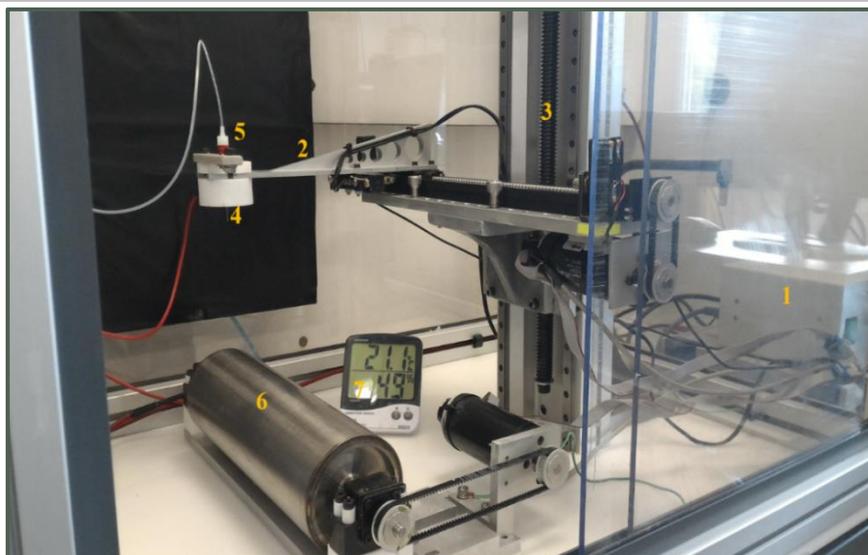


Figure 32. Photographie d'un des dispositifs d'électrospinning disponibles au laboratoire UMET

I.2.3. Conditions d'électrospinning

La solution de CHT/ PEO est introduite dans une seringue de 5 mL puis placée sur le pousse-seringue. La solution est alors conduite à travers une tubulure en polyéthylène de diamètre interne 1 mm (VYGON) jusqu'à l'aiguille. Un voltage de haute tension est appliqué et provoque la formation d'un jet qui s'étire et les nanofibres se déposent sur le collecteur rotatif. Les conditions environnementales au sein de la cabine sont fixées à $T=21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et à $\text{HR}=33\% \pm 2\%$. L'HR est contrôlée en ajoutant des cristallisoirs contenant du gel de silice et éventuellement des blocs de glace lorsque l'HR est très élevée. Les paramètres optimaux utilisés pour l'électrospinning du CHT/PEO sont regroupés dans le *Tableau 5*.

Tableau 5. Les paramètres optimaux d'électrospinning afin d'obtenir des nanofibres de CHT/PEO

Paramètres du procédé	Nanofibres CHT/PEO
Voltage (kV)	12-15
Débit (mL.h^{-1})	0,3
Distance (cm)	20
Diamètre interne de l'aiguille (mm)	0,8
Vitesse du collecteur rotatif (tr.min^{-1})	150
Vitesse du chariot (mm.s^{-1})	12

I.3. Réticulation thermique

Afin de rendre les nanofibres insolubles dans les environnements aqueux, les membranes de nanofibres à base de CHT/PEO ont été réticulées par traitement thermique. Les membranes

ont été placées dans une étuve sous-vide, afin d'éliminer toutes traces de solvant, et thermostatée à 140 °C pendant 4h.

II. Fonctionnalisation des nanofibres par la polydopamine

Un revêtement de polydopamine (pDA) a été déposé à la surface des nanofibres précédemment élaborées par électrospinning. Pour ce faire, des membranes découpées sous forme de disque de diamètre 11 mm ont été immergées dans une solution tampon de dopamine préparée en solubilisant du chlorhydrate de dopamine dans le tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris) (10 mM) à une concentration de 2 mg.mL⁻¹. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 8,5. La couleur de la solution vire au marron foncé/ noir due à la réaction de « polymérisation oxydante » qui conduit à la pDA en présence d'oxygène (cf. *Figure 33*).

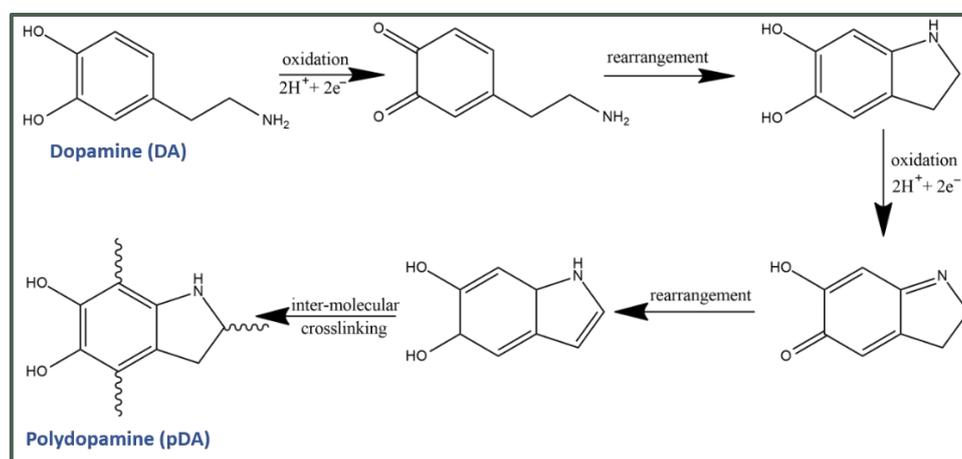


Figure 33. Le mécanisme de formation de la polydopamine via la polymérisation par oxydation spontanée de la dopamine

La fonctionnalisation des supports par la pDA s'opère par une méthode simple d'immersion dans la solution de dopamine à température ambiante, sous agitation mécanique et à l'air libre pour favoriser l'oxydation de la dopamine. Différents temps de trempage ont été étudiés (2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 72h, 96h et 120h) (cf. *Figure 34*). La solution de dopamine a été renouvelée toutes les 24 h. Les membranes ont été fixées sur des cadres en téflon de 4 x 4 cm afin de les maintenir et éviter leur repliement dans la solution (cf. *Figure 34b*). Après modification des surfaces, les membranes sont abondamment rincées à l'eau distillée suivi de trois passages au bain ultrasons afin d'éliminer le surplus de pDA, puis sont séchées à l'air libre.

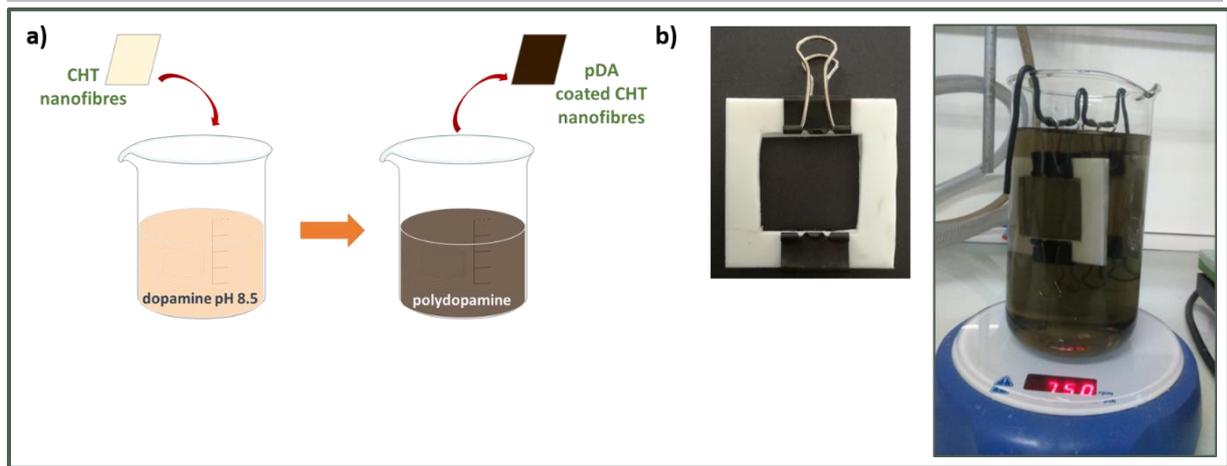


Figure 34. a) Illustration du procédé de traitement des membranes des nanofibres de CHT par la pDA b) Photographie du support (en haut) et du montage avant (en bas à gauche) et après (en bas à droite) immersion dans la solution de dopamine

III. Caractérisations du support

III.1. Caractérisations physicochimiques

III.1.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La morphologie des nanofibres a été étudiée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB, Higuchi S-4700SEM FEG) qui opère sous une tension de 5 kV et une intensité de 10 μ A. Une couche conductrice de carbone (200 Å) ou de chrome (100 Å) a été déposée au préalable à la surface des membranes.

La mesure des diamètres des nanofibres et de leur distribution a été effectuée à l'aide du logiciel *ImageJ* en sélectionnant une cinquantaine de fibres de façon aléatoire.

III.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre Perkin Elmer (Spectrum One) équipé du logiciel Spectrum a été utilisé pour effectuer les spectres infrarouges en mode ATR (Réflexion totale atténuée). Les spectres ont été récupérés après 16 scans entre 650 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

III.1.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse par ATG des membranes a été effectuée grâce à un appareil TGA Q50 (TA Instruments) à partir de la température ambiante jusqu'à 700 °C avec une vitesse de chauffage de 10 °C par minute. Les échantillons ont été placés dans un creuset en platine sous flux d'azote (balance 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, four 90 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

III.1.4. Quantification colorimétrique des groupements amine

La quantification des groupements amine, présents à la surface des nanofibres et qui proviennent à la fois du CHT et de la pDA, a été réalisée en effectuant un dosage colorimétrique par les sels de sodium d'orange II (acide orange II, AO, MM de 350,32 g.mol⁻¹, ≥ 85%, Sigma Aldrich™). L'AO est un colorant orange chargé négativement capable d'interagir, en milieu acide, avec des fonctions amines chargées positivement. Une représentation schématique du dosage est donnée dans la *Figure 35*.

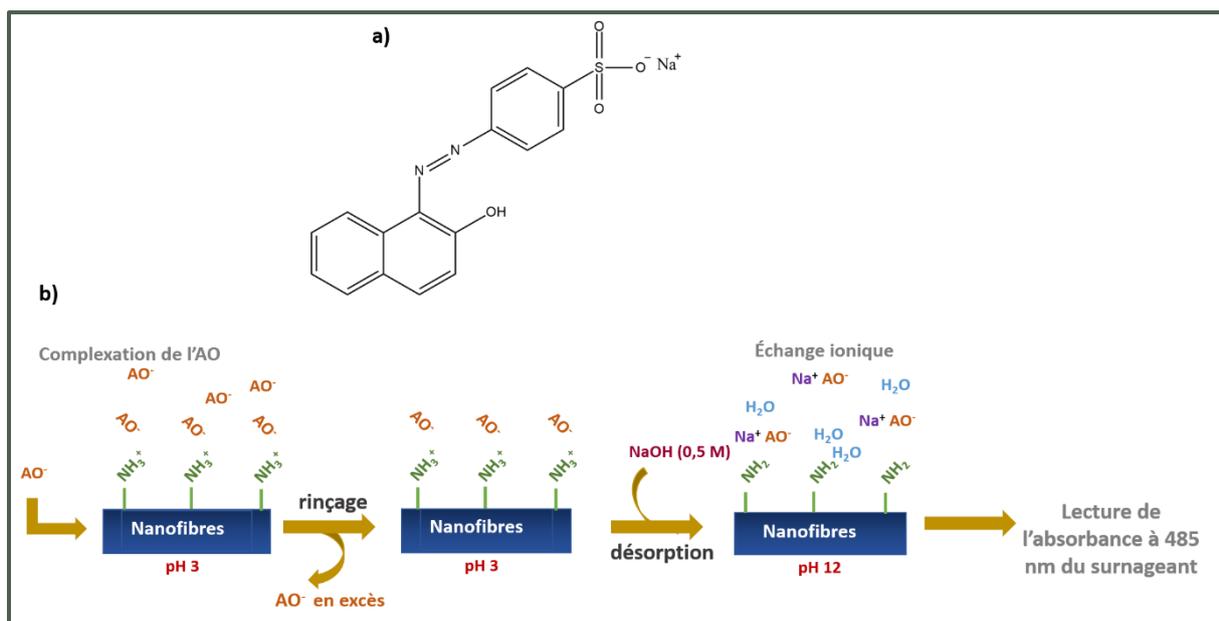


Figure 35. a) Formule chimique du sel de sodium orange II, b) représentation schématique de la quantification des fonctions amines primaires libres par échange d'ions

Une solution aqueuse d'AO à 2,5.10⁻² mol.L⁻¹ a été préparée dans l'eau ultrapure et son pH a été ajusté à 3 par ajout d'une solution d'HCl à 0,5 mol.L⁻¹. Chaque échantillon (11 mm de diamètre) a été imprégné dans 10 mL de cette solution, sous agitation orbitale de 70 tr.min⁻¹ à température ambiante pendant une nuit à l'abri de la lumière. Les échantillons ont été ensuite rincés à trois reprises pendant 5 minutes, sous agitation orbitale, dans trois fois 20 mL d'eau ultrapure ajustée à pH 3 avec une solution d'HCl à 0,5 mol.L⁻¹ afin d'éliminer l'excès d'AO. La désorption de l'AO est réalisée par immersion des échantillons dans 10 mL d'eau ultrapure dont le pH a été ajusté à pH 12 avec du NaOH à 0,5 mol.L⁻¹ pendant une nuit à température ambiante et sous agitation orbitale de 70 tr.min⁻¹ à l'abri de la lumière. Puis, la lecture de l'absorbance est effectuée à 485 nm après avoir ajusté le pH des différentes solutions à pH 3 par ajout d'1 mL de solution d'HCl à 0,1 mol.L⁻¹.

Une courbe d'étalonnage a été préalablement réalisée à partir d'une solution mère d'AO à 25 mM afin de déterminer la quantité totale de groupements amine selon la formule suivante :

$$\text{Fonctions} - \text{NH}_2 \text{ (mmol.cm}^{-2}\text{)} = \frac{\text{absorbance} \times \text{volume (L)}}{\text{coefficient d'extinction molaire (cm}^{-1}\text{.mM}^{-1}\text{)} \times \text{surface (cm}^2\text{)}}$$

Où le coefficient d'extinction molaire a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage ($\epsilon = 19,755 \text{ L.mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$)

III.1.5. Dosage colorimétrique des groupements catécholamine

Les groupements catécholamines ont été quantifiés grâce au dosage colorimétrique par l'acide bicinchoninique (BCA). Ce dosage est très utilisé pour déterminer les concentrations des protéines. Il repose principalement sur deux réactions. Tout d'abord, les liaisons peptidiques dans la protéine réduisent les ions Cu^{2+} du sulfate de cuivre (II) en Cu^+ . Deux molécules de BCA chélatent avec chaque ion Cu^+ formant un complexe de couleur pourpre qui absorbe fortement la lumière à une longueur d'onde de 562 nm (cf. *Figure 36*). Bien que cette méthode soit appliquée aux protéines, il a été démontré qu'elle peut être transposée pour la quantification des groupements catécholamine^{433,455,456}.

Pour ce faire, un kit de dosage micro-BCA (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), qui contient trois solutions différentes MA, MB et MC, a été utilisé. Cette méthode utilise le BCA comme réactif de détection des ions Cu^{+1} qui résultent de la réduction des ions Cu^{+2} par les groupements catécholamines. Un produit de couleur pourpre est formé lors de la chélation de deux molécules de BCA avec un ion Cu^{+1} .

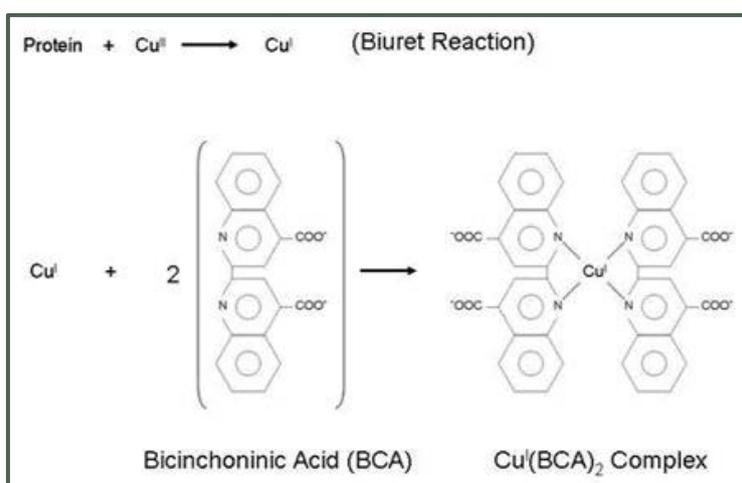


Figure 36. Principe du dosage des protéines par le BCA ($\lambda_{\text{max}}=562 \text{ nm}$)

a. Préparation des étalons

Une solution de métabolites de catécholamine (5de concentration massique 1 mg.mL⁻¹ (acide 5-hydroxyindole-3-acétique, acide homovanillique et acide (±)-vanilmandélique) Catecholamine Metabolites Mix Solution, Sigma Aldrich) a été utilisée pour préparer la gamme étalon (cf. *Tableau 6*). L'eau ultrapure a été utilisée comme solvant.

Tableau 6. Préparation de la gamme étalon ($\epsilon = 18,84 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Flacon	Volume du diluent (µL)	Volume (µL) et source de la solution mère	Concentration finale (µg.mL ⁻¹)
A	0	150	1000
B	500	500	500
C	600	400 de B	200
D	500	500 de C	100
E	600	400 de D	40
F	500	500 de E	20
G	500	500 de F	10
H	500	500 de G	5
I	500	500 de H	2,5
J	600	400 de I	1
K	500	500 de J	0,5
L	150	0	0

b. Préparation du réactif micro-BCA

Tout d'abord, le volume total du réactif BCA nécessaire a été déterminé selon l'équation :

$$\text{Volume total de BCA} = (\text{nombre de standards} + \text{nombre d'échantillons}) \times (\text{nombre de réplicats}) \times (\text{volume de BCA nécessaire pour chaque produit})$$

Puis, le réactif BCA a été préparé en mixant les trois solutions disponibles dans le kit en respectant ce ratio MA/MB/MC, 25/24/1. Le flacon contenant ce mélange est protégé de la lumière par du papier aluminium.

c. Procédure expérimentale

Trois réplicas de 150 µL de chaque solution étalon ont été ajoutés dans des puits d'une microplaque à 96 puits. Les différentes membranes ont été découpées au préalable sous forme de disque de 6 mm de diamètre à l'emporte-pièce. Chaque disque a été introduit dans un puit de la microplaque (n=3). Par la suite, 150 µL du réactif BCA a été additionné dans chaque puit contenant les étalons ou les échantillons. La plaque multipuits a été agitée grâce à une plaque d'agitation orbitale pendant 30 secondes, puis a été placée dans un incubateur à 37°C à l'abri de la lumière. Après 2h d'incubation, la plaque multipuits est récupérée et les absorbances ont

été mesurées à température ambiante à 562 nm grâce à un lecteur de plaque (MULTISKAN FC, Thermo Scientific).

III.1.6. Mesure dynamique de sorption d'eau

La capacité d'absorption d'eau (ou de désorption) des membranes a été mise en évidence par gravimétrie à l'aide d'une DVS (« Dynamic Vapor Sorption ») (Q5000SA, TA Instruments). Cet appareil permet de contrôler l'humidité relative dans laquelle est placé l'échantillon entre 0% et 98%, la température d'analyse pouvant varier entre 5°C et 85°C.

Les analyses ont été réalisées sur des membranes de nanofibres d'environ 5 mg. L'échantillon est tout d'abord desséché (HR=0%, T=60%) pendant 3h, puis placé à 37°C. L'HR est augmentée par pas de 5% jusqu'à 95%, puis abaissée à 0%. La condition de stabilité à chaque étape correspond à une variation de masse inférieure à 0,01% pendant 5 min. la mesure n'est fiable que si cette condition est atteinte avant les 3h, ce qui a été vérifié pour tous les paliers.

III.1.7. Etude de dégradation des membranes

Les membranes de nanofibres ont été soumises à une étude de dégradation en batch dans un milieu alcalin (pH 7,4) à savoir le tampon phosphate salin (PBS, « phosphate buffered saline »). Des rectangles 1cm x 3cm ont été découpés et introduits individuellement dans 20 mL de PBS sous une agitation de 100 tr.min⁻¹ sur un banc oscillant thermostaté à 37°C (Thermoshake, Gerhardt, les essart-le-Roi, France). Au temps choisi, l'échantillon a été récupéré du milieu, rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les traces de sels, séché à 60°C pendant 30 minutes puis pesé pour suivre l'évolution de masse au cours du temps. Les résultats donnés sont la moyenne d'un triplicata. La perte de masse (PM), exprimée en pourcentage, est calculée selon l'équation ci-dessous.

$$PM (\%) = \frac{M_0 - M_t}{M_i} \times 100$$

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

III.2. Evaluation biologique

Les caractérisations biologiques sont réalisées au sein de l'Unité INSERM U1008 : « Médicaments et biomatériaux à libération prolongée : mécanismes et optimisation » de l'Université de Lille.

Des lignées de cellules ostéoblastes (MC3T3-E1) ont été cultivées dans le Milieu Essentiel Minimum de Eagle (α MEM, Gibco[®], LifeTechnology) contenant 50 μ g/mL de gentamicine (Panpharma), 250 μ g/mL de fungizone (Gibso BRL) et 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Eurobio), dans un incubateur (Binder) à 37°C avec un taux en CO₂ de 5% et en HR de 100%.

III.2.1. Cytotoxicité (méthode d'extraction)

Les cellules ont été par la suite repiquées dans une plaque de 96 puits à une densité de 4000 cellules par puits en triplicata et placées dans un incubateur (Binder) à 37°C avec un taux en CO₂ de 5% et en humidité relative de 100% pendant 24 heures. Pendant ce temps, 40 mg de chaque échantillon ont été ajoutés dans des tubes Eppendorf contenant 1 mL du milieu de culture et ont été incubés à 37°C sous agitation orbitale de 80 rpm pendant 24 heures. Après quoi, le milieu de culture cellulaire a été remplacé par le milieu d'extraction qui a été préalablement filtré grâce à des filtres stériles de 0,22 μ m.

Après 24 heures d'incubation, la viabilité cellulaire a été évaluée par dosage calorimétrique en utilisant le AlamarBlue™ (Interchim, Montluçon, France) comme indicateur de la fonction métabolique cellulaire⁵⁵². Pour ce faire, le milieu de culture a été extrait de chaque puits et a été remplacé par 200 μ L de milieu de culture contenant 10% (v/v) de AlamarBlue™. Après 2 heures d'incubation, 150 μ L du surnageant ont été transférés dans une plaque opaque à 96 puits. Enfin, l'intensité de la fluorescence a été 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.

III.2.2. Prolifération cellulaire (méthode directe)

Après réticulation des membranes de nanofibres, des pastilles de 11 mm de diamètre ont été découpées. Avant la mise en contact avec les cellules, un lavage à l'éthanol pur a été réalisé afin de décontaminer la surface des membranes pendant 1 min, puis trois rinçages dans une solution HBSS (Hank's Balanced salt solution) stérile de 15 min et un lavage dans un milieu de culture pendant 24 h pour stabiliser les nanofibres. Ces pastilles ont été ensuite placées dans des plaques de culture à 48 puits (Falcon[®], VWR, France) en triplicata (comparativement au témoin TCPS (100%)). Les cellules ont étéensemencées (10 000 cellules.cm⁻²) sur les pastilles et cultivées pendant 3 jours sans renouvellement du milieu de culture. Enfin, la viabilité cellulaire a été évaluée par dosage fluorimétrique en utilisant le AlamarBleu™ (Interchim, Montluçon, France), qui est un indicateur d'oxydoréduction et produit un changement colorimétrique et un signal fluorescent en réponse de l'activité métabolique cellulaire. Pour

cela, le milieu de culture est remplacé par 500 μL du milieu MEM contenant 10% (v/v) de AlamarBleu™. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 150 μL du surnageant est transféré dans une plaque de 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.

III.3. Biominéralisation *in vitro*

La biominéralisation *in vitro* permet de mettre en évidence la capacité des biomatériaux à induire le dépôt d'une phase apatitique (CaP) voire de l'hydroxyapatite (HA) *in vitro* dans des conditions physiologiques. Pour ce faire, chaque échantillon a été immergé dans une solution 1,5×SBF (la concentration est 1,5 fois plus élevée que la solution SBF) (*cf. Page 59*).

a. Préparation de la solution 1,5×SBF

La solution 1,5×SBF a été préparée selon la méthode introduite par kokubo⁴⁵⁷. Pour 1 L de solution, 750 mL d'eau ultrapure ont été introduits dans un bécher de 1L et mise sous agitation mécanique. La température a été maintenue à 36,5°C. Les réactifs donnés dans le *Tableau 7* ci-après, ont été ajoutés l'un après l'autre (le réactif doit être complètement dissout avant d'ajouter le suivant), dans l'ordre donné dans le tableau. Le réactif 9 doit être introduit dans la solution petit à petit (à chaque fois <1g) afin d'éviter une augmentation rapide du pH entraînant la précipitation de la solution. Une fois tous les réactifs ajoutés (1-9), le pH a été ajusté à 7,25 par ajout d'une solution de HCl à 1 mol.L⁻¹. Par la suite, la solution a été transféré dans une fiole jaugée de 1L et le volume a été ajusté jusqu'à atteindre un volume de 1L de solution.

Afin de stériliser la solution, celle-ci a été filtrée sous PSM (Les postes de sécurité microbiologiques) grâce des filtres à seringue de 0,2 μm de taille de pores (cellulose régénérée, VWR, France), dans une bouteille en verre stérile. La solution est conservée à 4°C.

b. Préparation des échantillons

Les membranes de nanofibres ont été découpées au préalable en échantillons de 3 x 3cm et « désinfectées » à l'éthanol pur, puis ont été introduites dans différents flacons stériles (un échantillon par flacon) en triplicata. 50 mL de solution 1,5×SBF a été introduite dans chaque flacon dans des conditions stériles. Enfin, les échantillons sont incubés à 37°C et agités à 80 rpm pendant 7 jours. La solution 1,5×SBF est renouvelée tous les 2 jours afin, entre-autres, d'éviter une contamination microbienne.

Tableau 7. Quantité des réactifs pour la préparation de la solution 1,5×SBF

Ordre	Réactif	V _{total} = 1000mL
0	Eau ultra-pure	750 mL
1	NaCl	11,994 g
2	NaHCO ₃	0,525 g
3	KCl	0,336 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,342 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,458 g
6	HCl 1M	60 mL
7	CaCl ₂	0,417 g
8	Na ₂ SO ₄	0,107 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	9,086 g
10	HCL 1M	Ajuster le pH

La biominéralisation des échantillons a été caractérisée par la MEB et par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS), ainsi que par IRTF et diffractométrie de rayons X (DRX) afin d'identifier le type de cristaux CaP formés.

II.3.1. Diffractométrie de rayons X

La diffraction de rayons X permet de mesurer l'évolution de la composition et de la cristallisation des phases formées après traitement thermique par analyse des paramètres de maille du réseau cristallin. Les phases d'HAp, de β-TCP et de CaO peuvent être quantifiées, ce qui permet de mesurer le ratio Ca/P pour des poudres déficitaires (Ca/P<1,667) ou excédentaires en calcium (Ca/P>1,667) par rapport à l'HAp stœchiométrique. Cette méthode rapide et fiable a été proposée pour pallier les limites de l'analyse élémentaire

Des courbes d'étalonnage sont réalisées à partir d'échantillons aux proportions de phases connues, puis sont associées aux pics d'intensité relative 18% de l'HAp ($2\theta = 28,96^\circ$) et 100% du β-TCP ($2\theta = 31,03$). Les proportions des phases peuvent alors être déduites par le calcul des rapports d'intensité. Cette méthode est désormais préconisée par la norme AFNOR 2008 : NF ISO 13779-3

Les phases cristallines et la pureté du produit ont été évaluées par diffraction de rayons X (X'Pert Pro MRD®, PANalytical). Les diffractogrammes ont été obtenus dans le domaine de 5 à 70° (pas 0,02°, temps de comptage 120 s), avec un détecteur (X'Ceelerator®, PNAalytical) muni d'une fente anti-divergence 0,5° et 1° et d'un masque de 10 mm).

Afin d'identifier la phase minérale, Les échantillons de CHT-PDA 2j-Sbf 7j ont été introduits dans un creuset en alumine puis calcinés à 1000°C sous air pendant une heure.

La poudre calcinée a été déposée sur une lame de verre pour être analysée par DRX.

Chapitre III. Résultats et discussion

I. Elaboration et caractérisation de nanofibres à base de chitosane

Afin de développer des supports à base de nanofibres de CHT par electrospinning, il est nécessaire dans un premier lieu d'étudier les paramètres de solution et du procédé d'électrofilage du CHT. Pour ce faire, l'étude d'optimisation, précédemment effectuée par Dr. Safa Ouerghemmi au cours de ses travaux de thèse⁴⁵⁸ en variant le ratio acide acétique (AA) / eau (utilisé comme solvant) et le ratio CHT/PEO, a servi de base à notre étude.

Les paramètres de solution et du procédé d'electrospinning du mélange CHT/ PEO de rapport massique 90/10 sont donnés dans le *Tableau 8*. La température et l'humidité relative ont été respectivement fixées à $20 \pm 3^\circ\text{C}$ et à $35 \pm 5\%$ (en dehors de ces conditions hygrométriques, des membranes contenant des billes sont obtenues).

Tableau 8. Les paramètres de solution et du procédé d'electrospinning utilisé pour l'élaboration des nanofibres de CHT/ PEO. L'humidité relative et la température sont respectivement fixées à $35 \pm 3\%$ et $23 \pm 2^\circ\text{C}$

	Rapport massique (w/w)	AA/H ₂ O (v/v)	Concentration CHT/PEO % (m/v)	Voltage (kV)	Débit (mL.h ⁻¹)	Distance (cm)
CHT/ PEO	90/10	90	3,3	12-15	0,5	20

Une observation au MEB a prouvé la présence de nanofibres rectilignes et uniformes. Les diamètres des nanofibres ont montré une faible polydispersité puisque le diamètre moyen est de l'ordre de 247 ± 36 nm (cf. *Figures 37a et 37b*). Ainsi, ces paramètres ont été utilisés pour l'élaboration de tous les supports développés dans cette étude.

Les nanofibres obtenues à partir du mélange CHT-PEO sont très peu stables dans un milieu aqueux. En effet, les membranes ont été immergées dans une solution de PBS à pH 7,4 et on remarque d'après la *Figure 37c* que les nanofibres gonflent jusqu'à la disparition totale de l'architecture fibreuse et poreuse. Après séchage, celles-ci sont déformées et la membrane devient cassante.

Une étape de réticulation est par conséquent indispensable afin de stabiliser les nanofibres en milieux aqueux. Dans la littérature, différents procédés de réticulation des nanofibres de CHT ont été décrits, notamment la réticulation à la génipine⁴⁵⁹ et au glutaraldéhyde⁴⁶⁰. Néanmoins, ces méthodes peuvent présenter plusieurs inconvénients à cause de la toxicité du glutaraldéhyde et de la présence de génipine qui n'a pas réagi. De ce fait, une étape de rinçage est nécessaire. Dans notre cas, un traitement thermique, en effectuant un recuit à 140°C pendant

4h dans une étuve sous-vide afin d'éliminer les traces de solvant, a été choisi. La température et le temps de recuit ont été fixés suite à une optimisation effectuée lors des travaux d'une thèse précédente développée par Dr. Safa Ouerghemmi⁴⁵⁸. Les images MEB obtenues révèlent que le traitement thermique a un effet sur la stabilité des nanofibres dans un environnement aqueux (cf. *Figure 37d*). En effet, contrairement à l'image 37c, la membrane réticulée qui a été immergée dans une solution de PBS à pH 7,4 a préservé sa morphologie fibreuse (pas de phénomène de gonflement).

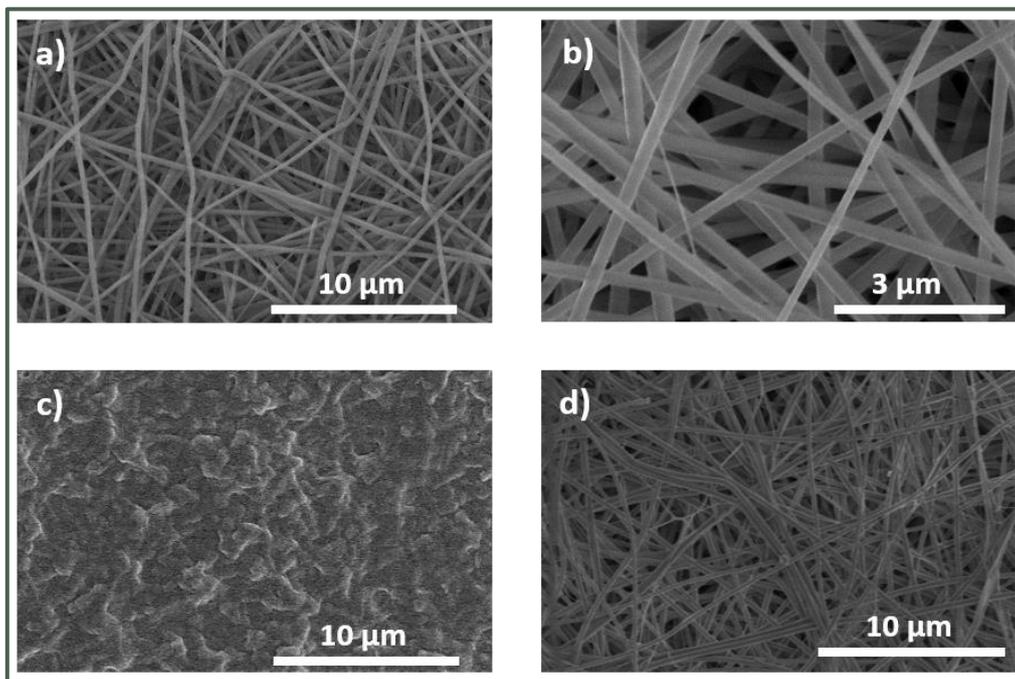


Figure 37. Clichés MEB des nanofibres de CHT/ PEO avec un rapport massique de 90/10, a) avant $\times 5k$; b) $\times 15k$; c) après immersion dans la solution PBS à pH 7,4 ($\times 5k$) et d) réticulées à $140^{\circ}C$ pendant 4h après immersion dans le PBS ($\times 5k$)

Afin d'approfondir notre étude, la prise en eau des échantillons recuits (4h sous vide à $140^{\circ}C$) a été comparée à celle des échantillons non recuits, à $T=37^{\circ}C$, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (cf. *page 73*). Les courbes de sorption et de désorption sont reportées sur la *Figure 38*. Que ce soit pour les échantillons recuits ou pas, on remarque que la courbe de désorption est similaire à celle de sorption, avec un écart qui n'est pas significatif. Le comportement des échantillons en humidité croissante ou décroissante peut donc être considéré comme identique.

Nous remarquons également, que la capacité d'absorption des membranes est pratiquement linéaire jusqu'à RH 85% et atteint environ 0,2 g d'eau/ g d'échantillon, puis augmente de façon exponentielle entre RH 80% et 95% pour atteindre 0,45 g d'eau/ g d'échantillon. Le comportement des échantillons recuits est le même que celui des échantillons non recuits, ce

qui montre que le traitement thermique lors du recuit ne modifie pas l'hydrophilie des membranes. De plus, d'après les clichés MEB obtenus avant et après l'absorption/ desorption d'eau, nous remarquons que les échantillons ont préservé leur morphologie fibreuse.

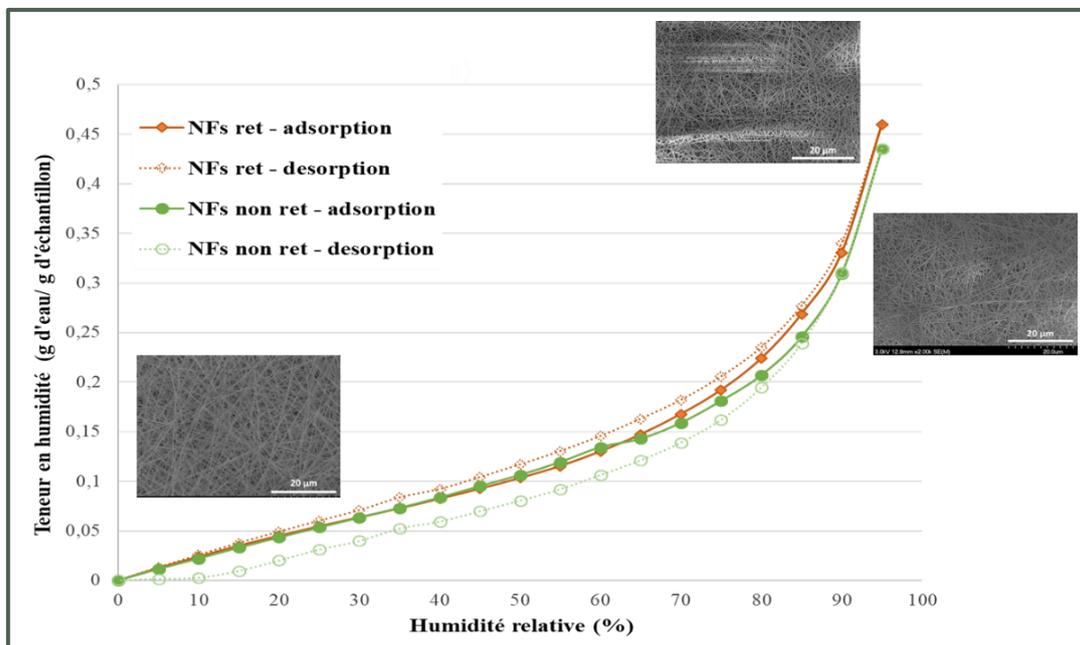


Figure 38. Isothermes DVS des membranes réticulées et non réticulées

II. Fonctionnalisation des nanofibres de chitosane avec la polydopamine

La fonctionnalisation des nanofibres est mise en évidence tout d'abord par le changement de couleur des membranes (cf. Figure 39). En effet, la membrane non fonctionnalisée noircit avec le temps d'immersion dans la solution de dopamine.

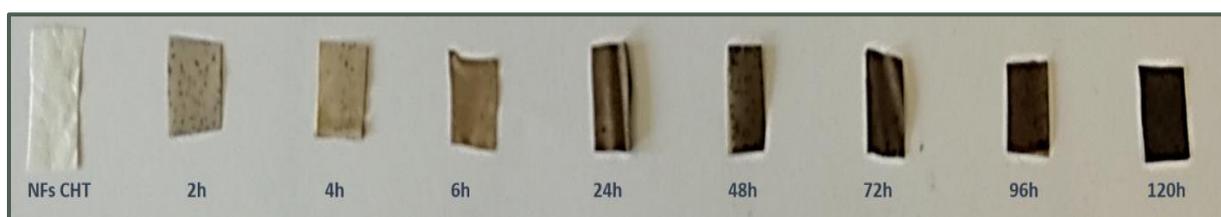


Figure 39. Evolution de la couleur des membranes en fonction du temps d'immersion dans la solution de dopamine

L'impact de la fonctionnalisation sur la morphologie des nanofibres est observé par MEB (cf. Figure 40B). Nous remarquons que les membranes ont conservé leur morphologie fibreuse et poreuse après immersion dans la solution de dopamine avec une augmentation du diamètre moyen des fibres avec le temps de fonctionnalisation, ce qui confirme l'enrobage des fibres par la pDA (cf. Figure 40A). Peu de particules de pDA sont observées pour un temps d'immersion inférieur ou égal à 72h (cf. Figures 40B.b., 40B.c, 40B.d, 40B.e, 40B.f et 40B.g). En revanche,

nous constatons la présence d'agrégats de pDA à la surface des membranes après 96 heures de fonctionnalisation (*cf. Figures 40B.h et 40B.i*). Ces résultats sont en accord avec les travaux obtenus par Shin *et al.* qui ont étudié la modification chimique des nanofibres de PCL par la pDA⁴⁶¹ et qui ont montré que la morphologie de surface est dépendante de la concentration de la solution de dopamine. En effet, les nanofibres immergées dans une solution de dopamine à 2 mg.mL⁻¹ contiennent très peu de particules de pDA alors qu'une concentration de 20 mg.mL⁻¹ fournit des nanofibres avec une plus grande quantité de particules de pDA sous forme d'agrégats. Ce comportement s'explique par le fait que la dopamine polymérise à la surface des nanofibres en formant une fine couche de pDA, et que des apports plus élevés en dopamine conduisent à la formation de nanoparticules de pDA qui s'aggrègent sur les nanofibres.

Par conséquent, un temps d'immersion inférieur ou égal à 72h a été privilégié.

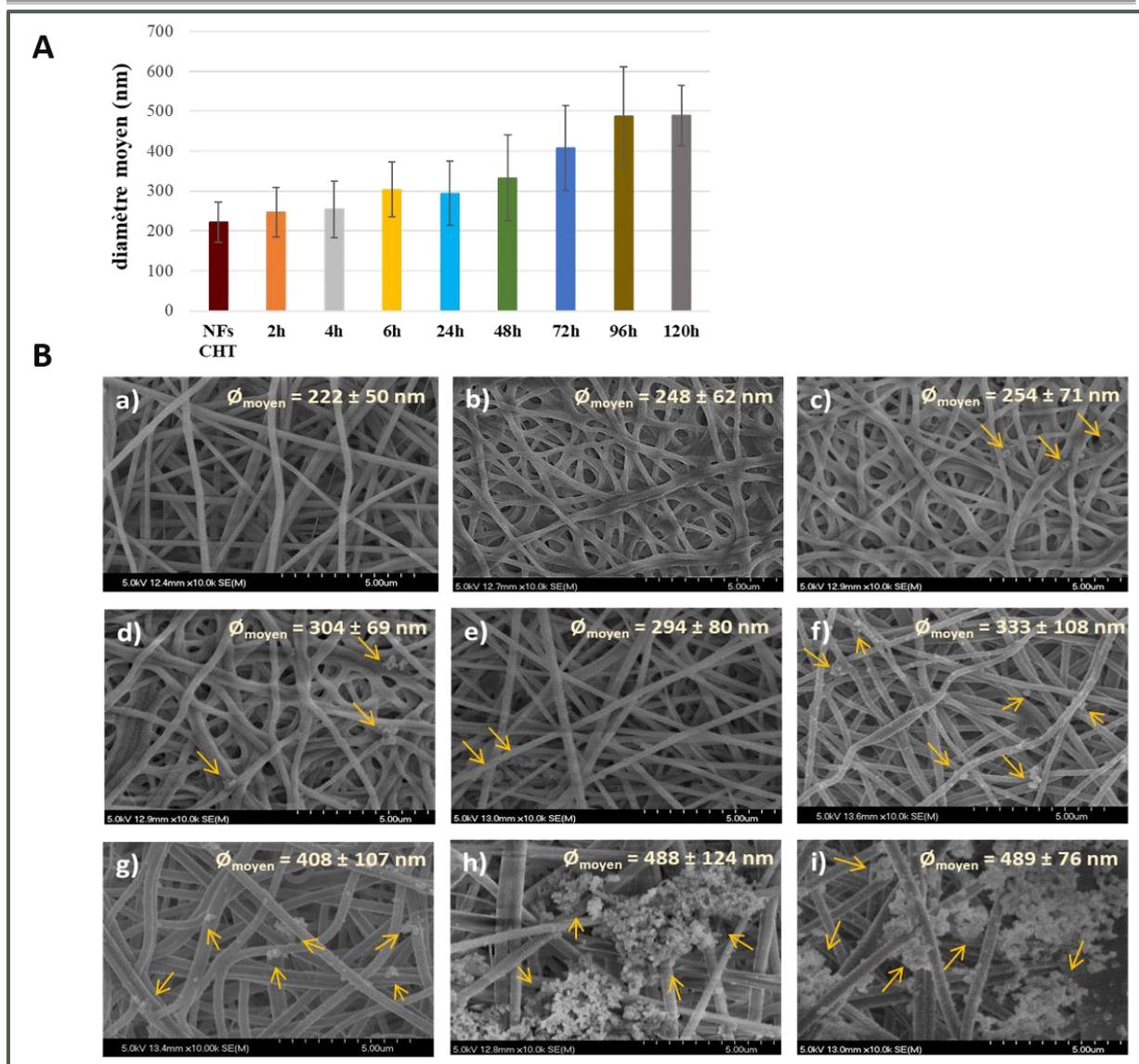


Figure 40. A. Photographies des membranes avant et après fonctionnalisation, B. Images MEB (x10k) des nanofibres de CHT-PEO a) non fonctionnalisées et fonctionnalisées avec la polydopamine pendant b) 2h, c) 4h, d) 6h, e) 24h, f) 48h, g) 72h, h) 96h et i) 120h. Les diamètres moyens sont indiqués sur les figures respectives. Les flèches jaunes indiquent les particules de polydopamine présentes à la surface des nanofibres

III. Caractérisations physicochimiques des supports

III.1. Spectroscopie à infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La nature chimique de surface des nanofibres de CHT-PEO non fonctionnalisées (NFs CHT) et fonctionnalisées avec la pDA (NFs pDA) a été analysée par IRTF en mode réflexion totale atténuée (ATR). Les spectres obtenus sont représentés dans la *Figure 41*. La pDA sous forme de nanoparticules (pDA poudre) a été utilisée afin de mettre en évidence les pics caractéristiques de la pDA. Celles-ci ont été obtenues en préparant une solution de dopamine dans les mêmes conditions que précédemment. L'agitation mécanique est maintenue pendant

24 heures, puis la solution est filtrée afin de récupérer les nanoparticules de pDA sous forme d'aggrégats.

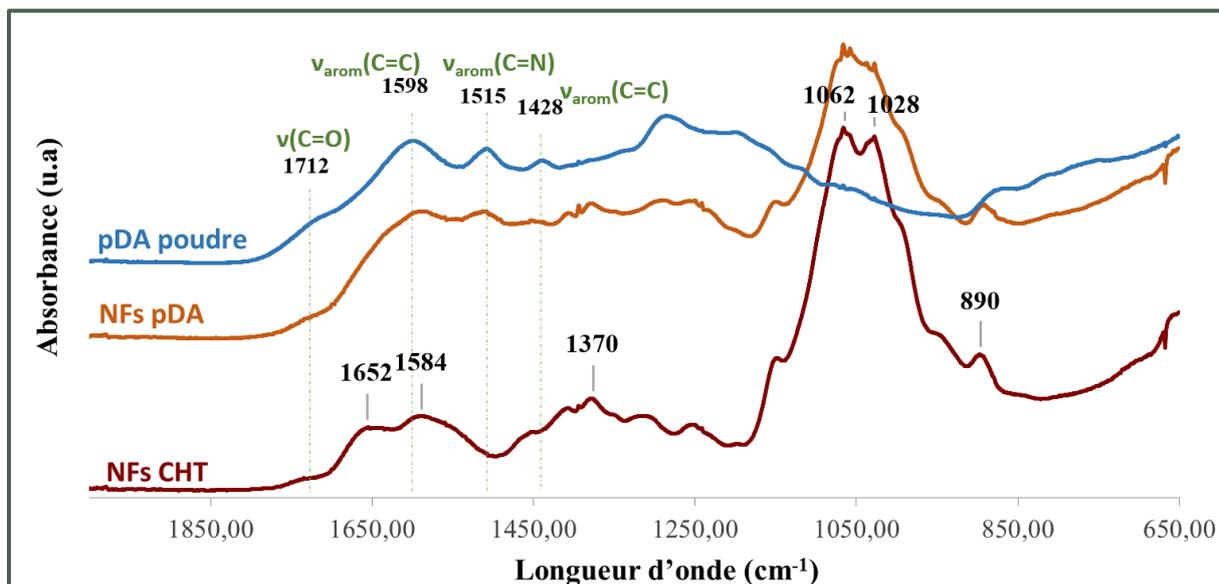


Figure 41. Les spectres IRTF-ATR des nanofibres avant (NFs CHT) et après fonctionnalisation avec la polydopamine (NFs pDA) et les nanoparticules de polydopamine

Le spectre des nanofibres de CHT montre des bandes caractéristiques telles que les bandes à 1652 cm^{-1} et 1584 cm^{-1} associées, respectivement, à l'élongation des liaisons C=O des fonctions amides et à la déformation N-H des amines primaires. La bande observée à 1370 cm^{-1} correspond à la déformation asymétrique de la liaison C-H des méthyles du groupement acétamide, celles à 1062 et 1028 cm^{-1} sont associées à l'élongation des C-O. et à 890 cm^{-1} correspondant aux C-O-C des polysaccharides et à la vibration des liaisons glycosidiques.

En observant le spectre des nanofibres fonctionnalisées avec la polydopamine, nous remarquons que de nouveaux pics sont apparus. En effet, comparé au spectre des nanofibres de CHT, nous constatons l'apparition de pics à 1598 et 1428 cm^{-1} assignés au chevauchement des vibrations de résonance C=C du cycle aromatique, et un pic à 1520 cm^{-1} relatif aux vibrations C=N confirmant la présence de groupements indoles, qu'on retrouve dans le spectre IRTF de des nanoparticules de la pDA⁴⁶²⁻⁴⁶⁴. Un pic peut également être observé à 1718 cm^{-1} correspondant aux groupements quinone constitutives du film de pDA. En outre, une diminution de l'intensité des pics caractéristiques du CHT, notamment ceux à 1652 cm^{-1} et à 1062 cm^{-1} est observée. De ce fait, ces résultats confirment la présence de la couche de polydopamine à la surface des nanofibres de CHT réticulées.

III.2. Analyse thermogravimétrique

Les nanofibres de CHT non fonctionnalisées et fonctionnalisées avec la pDA, ainsi que la pDA en poudre, ont été analysées par ATG. Les thermogrammes sont présentés dans la *Figure 42*.

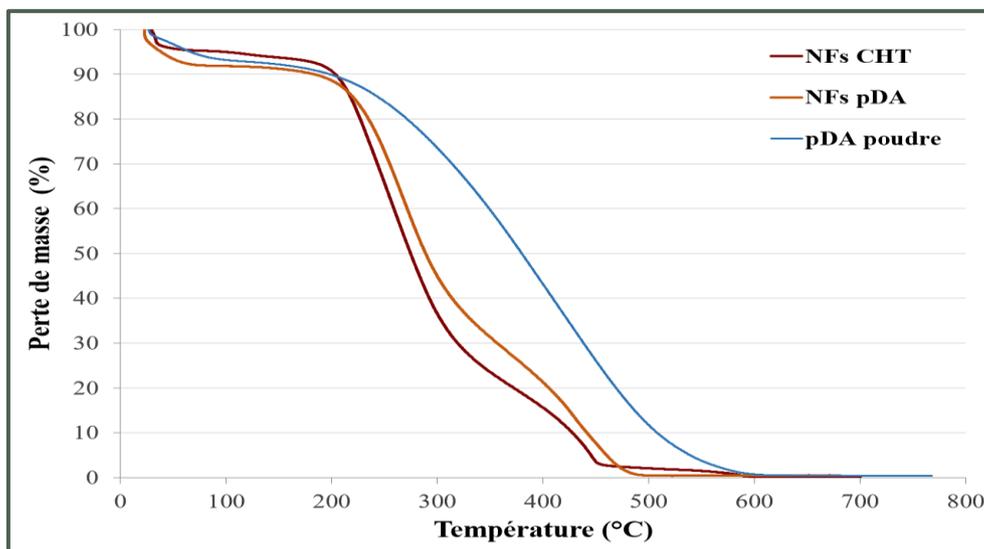


Figure 42. Thermogrammes des NFs CHT, NFs pDA, et de la polydopamine en poudre obtenues entre 25°C et 700 °C

Le thermogramme des nanofibres de CHT présente une première perte de masse entre 25°C et 90°C qui correspond à la perte d'eau absorbée par la membrane. La deuxième perte de masse qui débute à 200°C correspond à la dégradation du CHT et du PEO ; les deux constituants des nanofibres. A partir de 320°C, une troisième perte de masse attribuée à la dégradation d'un résidu « charbonné » est observée.

La pDA présente une perte de masse en une seule étape entre 25°C et 80°C, qui est due à la déshydratation de la poudre puis se dégrade entre 200°C et 600°C.

Les nanofibres ayant un revêtement de polydopamine (NFs pDA) montrent une perte de masse entre 25 et 50°C attribuée à l'évaporation d'eau et une deuxième perte de masse entre 200°C et 500°C qui est la conséquence de la dégradation des trois produits la constituant (PEO, CHT et pDA). Ces résultats révèlent que les deux membranes présentent des profils de perte de masse similaires et que les nanofibres fonctionnalisées montrent un décalage du à la décomposition de la pDA qui se produit à une température supérieure à celle du CHT. En outre, nous remarquons que la dégradation de l'échantillon est totale (absence de résidu).

III.3. Quantification des groupements amine

L'influence du temps d'imprégnation (de 2h à 120h) sur la quantité des fonctions amines présentes sur la surface des échantillons a été mise en évidence par un dosage à l'Acide Orange II à 485 nm (cf. *Figure 43*).

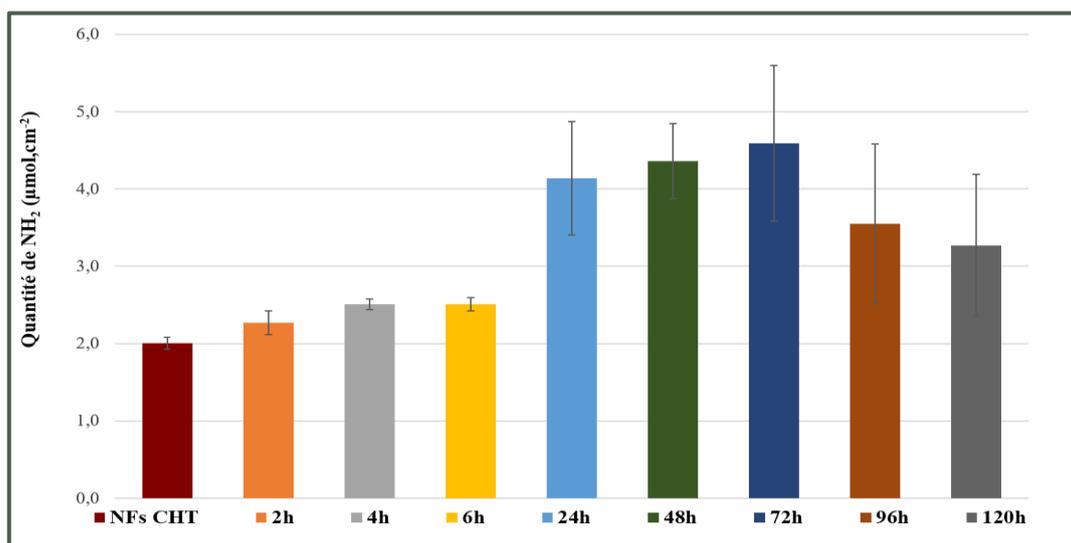


Figure 43. Quantification des groupements amine sur les NFs CHT et les NFs pDA avec différents temps d'immersion dans la polydopamine allant de 2h jusqu'à 120h (n=3)

Une quantité de 2 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ de fonctions amines est mesurée pour les nanofibres de CHT non modifiées. En ce qui concerne les nanofibres fonctionnalisées avec la pDA, nous constatons, comme attendu, que la quantité des groupements amine augmente avec le temps d'immersion dans la solution de dopamine. Après 2h d'imprégnation, la quantité de fonctions amines est de 2,3 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ puis atteint 4,6 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ après 72h d'immersion ; ce qui indique un taux important de recouvrement en pDA. En revanche, une modification de la surface pendant plus de trois jours provoque une diminution de la quantité d'amines libres présentes à la surface des nanofibres. Cette réduction de la quantité des groupements amine est en accord avec l'observation au MEB (cf. *Figure 40B*) puisque la présence d'agrégats de polydopamine au sein des nanofibres peut compromettre la disponibilité des amines libres à la surface des fibres.

Il est intéressant de noter que ces valeurs sont très élevées comparées à celles qui sont obtenues par Kang *et al.* sur des supports métalliques en titane et en acier inoxydable⁴⁶⁵. En effet, pour une fonctionnalisation de 24h, dans les mêmes conditions, ils ont obtenu une quantité de groupements amine d'environ 1,875 nmol.cm^{-2} pour le support en titane et de 3,125 nmol.cm^{-2} pour le support en acier inoxydable. Cette étude montre donc l'impact de la nature du support sur la fonctionnalisation avec la polydopamine. Par conséquent, les valeurs très élevées

obtenues au cours de notre étude peuvent être attribuées à la surface spécifique qui caractérise nos « scaffolds ».

III.4. Quantification des groupements catécholamine

La quantité des fonctions catécholamines présente à la surface des nanofibres a été évaluée via le test colorimétrique micro-BCA. Les résultats sont représentés dans la *Figure 44* ci-dessous.

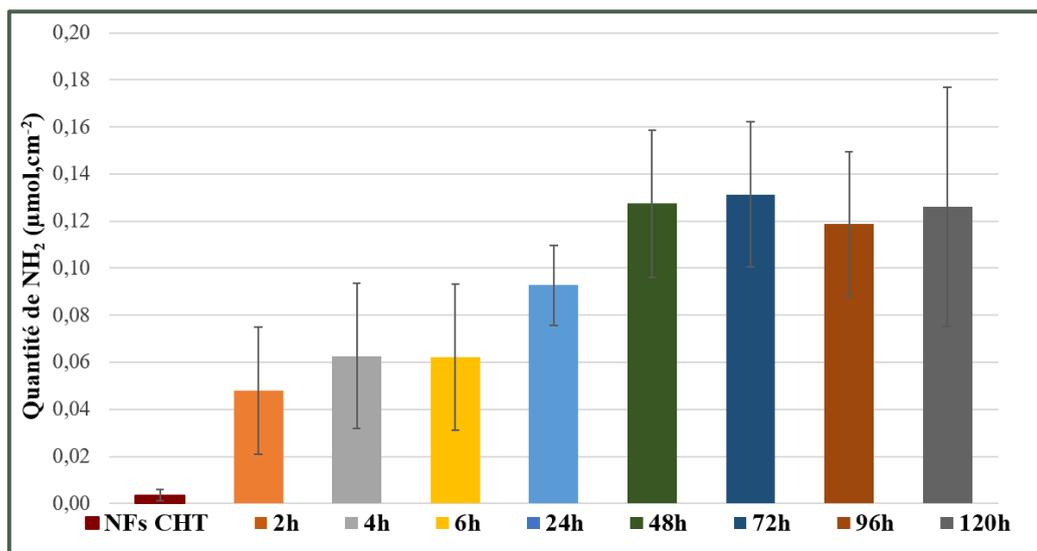


Figure 44. Quantification des groupements catéchol sur les NFs CHT et les NFs pDA avec différents temps d'immersion dans la polydopamine allant de 2h jusqu'à 120h (n=2) via la méthode micro-BCA

Tout d'abord, nous remarquons que, comme attendu, la quantité de groupements catéchol est quasiment nulle pour les nanofibres de CHT. Puis, nous constatons que la quantité de polydopamine présente à la surface des nanofibres dépend fortement du temps d'immersion dans la solution de dopamine. En effet, la quantité des fonctions catéchols croît de 0,048 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ jusqu'à atteindre 0,131 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ pour des temps d'imprégnation respectifs de 2h et 72h. Néanmoins, nous observons une diminution non significative pour des temps d'immersion supérieurs à 72h, probablement due à la présence d'amas de polydopamine au sein de la matrice nanofibreuse. Ces observations sont en concordance avec les résultats obtenus par MEB et par la quantification des groupements amine. Plusieurs études ont rapporté que l'épaisseur de la couche de polydopamine augmentait avec le temps d'imprégnation des échantillons dans la solution de dopamine. Shin *et al.* par exemple ont montré que la quantité de polydopamine croît de 6,6 à 23,5 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ pour des temps d'immersion allant de 10 minutes à 60 minutes⁴⁶¹.

III.5. Absorption dynamique de vapeur d'eau

L'effet du revêtement de polydopamine sur la capacité d'absorption de l'eau des nanofibres est évalué par DVS à 37°C (cf. *Figure 45*).

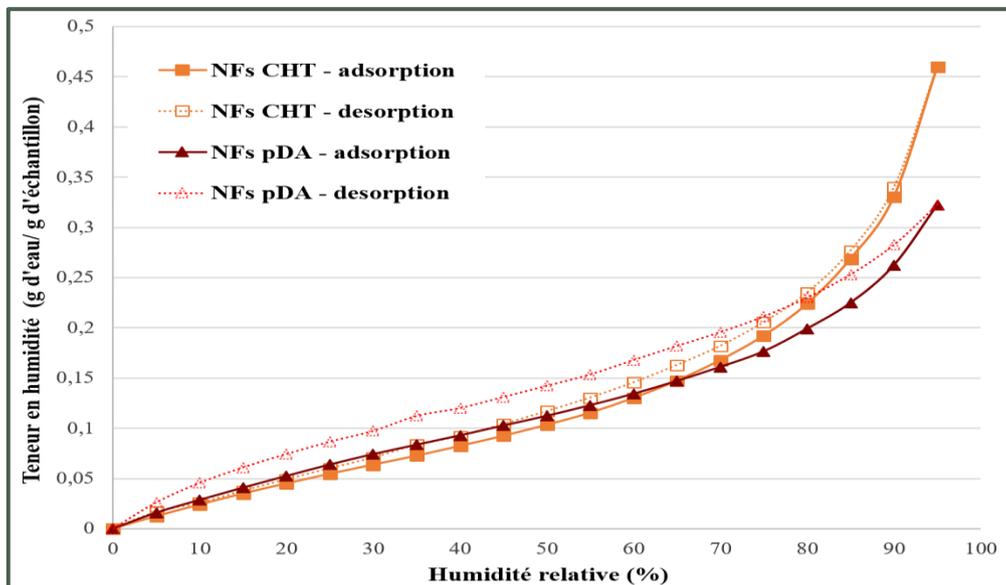


Figure 45. Isothermes d'absorption de vapeur d'eau des nanofibres de CHT non fonctionnalisées et fonctionnalisées avec la pDA

Nous remarquons, dans un premier temps, que les courbes de désorption sont toujours situées au-dessus de la courbe de sorption, avec une hystérésis relativement faible. Dans un second temps, nous constatons que la capacité d'adsorption d'eau varie de façon linéaire jusqu'à 80% de HR, puis de façon exponentielle jusqu'à atteindre 95% de HR, pour les deux types d'échantillon. A 80% de HR, les nanofibres non modifiées et fonctionnalisées montrent respectivement une teneur en humidité d'environ 0,235 et 0,230 g d'eau/ g d'échantillon (gains de poids respectifs de 24% et 23%). Les deux membranes atteignent respectivement 0,460 et 0,322 g d'eau/ g d'échantillon (gains de poids respectifs de 46% et 32%) lorsque HR est de 95%. Pour des HR comprises entre 0 et 80%, les deux échantillons présentent deux profils d'adsorption d'eau similaires. En revanche, au-delà de 80%, la teneur en humidité des nanofibres de CHT devient supérieure à celle des nanofibres fonctionnalisées par la pDA. Par conséquent, la fonctionnalisation des nanofibres engendre une diminution de leur hydrophilie.

III.6. Test de dégradation

La *Figure 46A* présente les profils de dégradation des échantillons dans le PBS à 37°C.

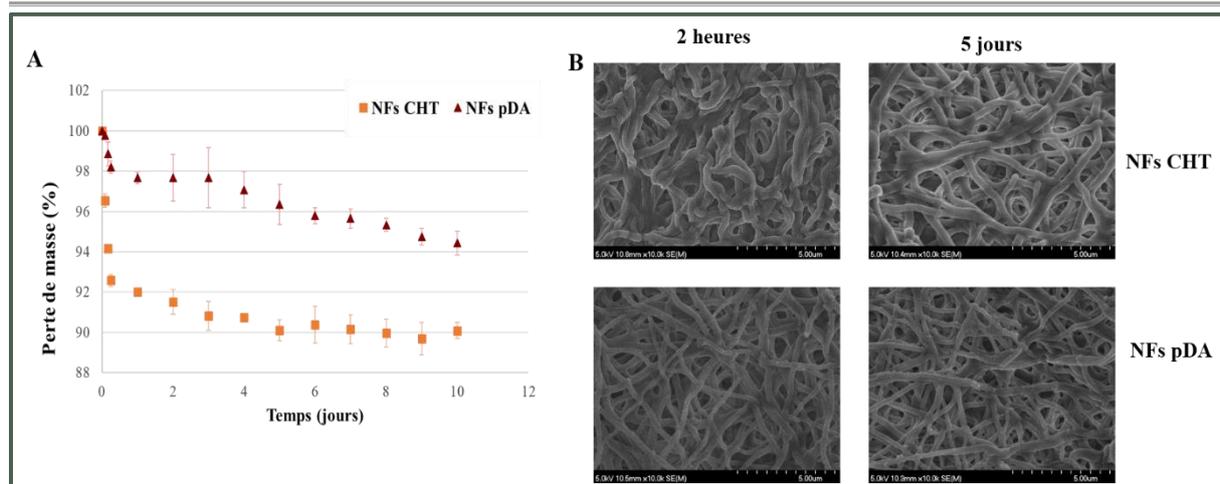


Figure 46. A. Suivi de dégradation des NFs CHT et NFs pDA ($n=3$) en fonction du temps dans la PBS à 37°C, B. Images MEB des échantillons après 2 h et 5 j de dégradation

Tout d'abord, nous constatons que les deux profils présentent une première phase jusqu'à un jour de dégradation où la dégradation est rapide, puis une deuxième phase plus lente. Nous remarquons qu'à 1 jour, il y'a une perte de masse importante de 8% et 2% pour les NFs CHT et NFs pDA, respectivement. Puis, les jours suivants, la cinétique de dégradation est ralentie puisqu'on atteint au bout de 10 jours une perte de masse respective de 10% et 6%. Nous pouvons donc conclure que le revêtement de polydopamine permet de stabiliser et de ralentir la dégradation des nanofibres. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés à travers une observation au MEB (cf. Figure 46B). Cette dernière révèle un phénomène de gonflement pour les nanofibres de chitosane apparaissant dès le début de la dégradation (2 heures). Alors que la morphologie fibreuse et poreuse est conservée pour les nanofibres modifiées qui ont perdu leur caractère rectiligne.

Il serait par ailleurs intéressant d'étudier la dégradation des membranes en présence de lysozyme qui est une protéine qui intervient dans la dégradation du CHT dans l'organisme des animaux.

III.7. Conclusion

Des nanofibres à base de chitosane ont été élaborées par electrospinning à partir d'un mélange CHT-PEO, réticulées par traitement thermique, puis fonctionnalisées avec un revêtement de polydopamine afin d'induire la cristallisation des phosphates de calcium. L'influence du temps d'immersion des échantillons dans la solution de dopamine a été étudiée par plusieurs techniques de caractérisation, notamment les deux techniques quantitatives ; à savoir le dosage des groupements amine par l'acide orange II et la quantification indirecte des groupements catéchol via le test micro-BCA. Ces techniques ont montré que la quantité de

polydopamine augmente avec le temps d'imprégnation dans la solution de dopamine pour une fonctionnalisation inférieure ou égale à 72h. Pour un temps d'immersion supérieur à 72h, une légère diminution a été observée en raison de la présence d'agrégats de particules de polydopamine. Ces résultats étaient en accord avec les observations effectuées au microscope électronique à balayage.

En outre, la présence d'une couche de polydopamine a été démontrée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier dont les spectres obtenus ont révélé la présence des pics caractéristiques de la polydopamine.

Enfin, il a été montré que l'étape de modification de la surface des nanofibres n'a pas d'impact significatif sur leur dégradation pyrolytique et diminue la capacité du biomatériau à absorber l'eau. La polydopamine contribue à la stabilisation des nanofibres en milieu aqueux et ralentit leur dégradation.

A la suite des caractérisations physicochimiques, des tests biologiques ont été effectués afin de s'assurer de la cytocompatibilité des membranes avant de démontrer leur capacité de biominéraliser.

IV. Cytocompatibilité des supports

Les dispositifs à base de nanofibres de CHT-PEO fonctionnalisés sont destinés à être implantés au niveau d'un défaut osseux et favoriser l'ostéoinduction. Il est donc important qu'ils soient cytocompatibles.

De ce fait, la prolifération cellulaire sur des nanofibres de CHT et CHT fonctionnalisées avec la polydopamine a été évaluée sur des cellules ostéoblastes MC3T3-E1 par contact direct (ISO 10993-5). Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme dans la *Figure 47*.

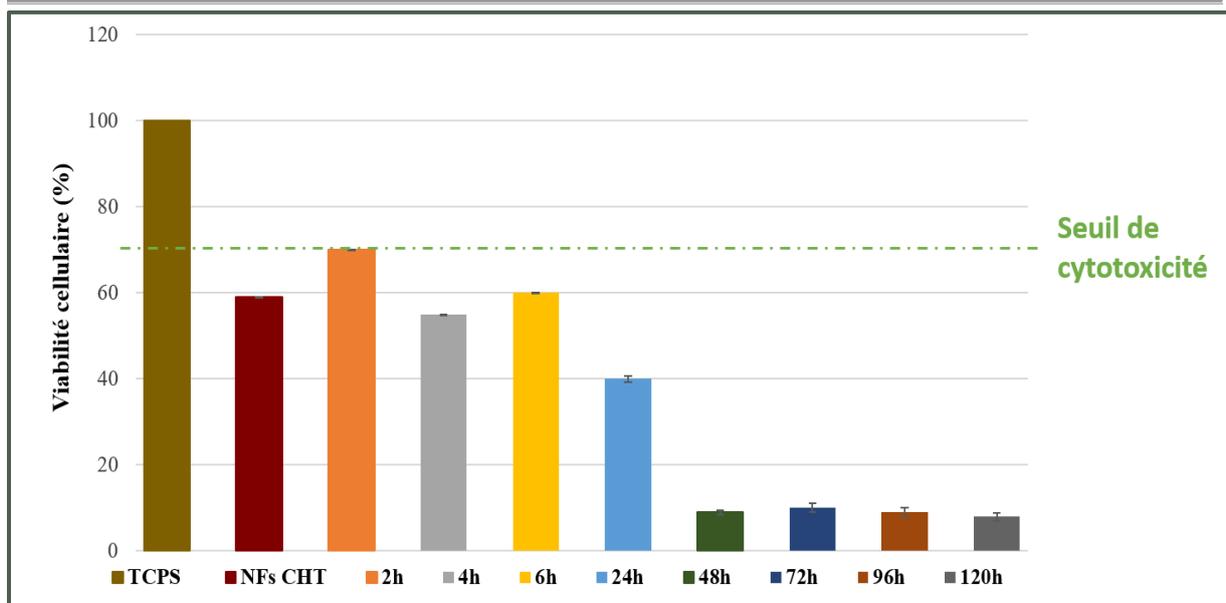


Figure 47. La viabilité des cellules MC3T3-E1 sur des membranes avant et après fonctionnalisation avec la pDA par contact direct (n=3). Le témoin TCPS correspond au fond de la boîte de culture cellulaire en polystyrène

Dans un premier temps, nous constatons que le temps d’immersion des échantillons dans la solution de dopamine a un impact sur la viabilité cellulaire. En effet, une prolongation du temps d’imprégnation des membranes entraîne une diminution de la viabilité cellulaire. Les nanofibres immergées dans une solution de dopamine pendant 2h montrent une viabilité cellulaire de 70 % qui diminue lorsque le temps de fonctionnalisation augmente, avec une chute significative au-delà de 24h d’immersion (8%). Par conséquent, la membrane de nanofibres immergée pendant 2h dans la solution de dopamine a été sélectionnée.

Dans un second temps, nous remarquons que les nanofibres de chitosane non modifiées présentent seulement 59% de viabilité cellulaire. Ce résultat est surprenant, puisque le chitosane est connu pour ses propriétés biologiques et il a été prouvé dans la littérature que la topographie nanofibreuse obtenue par electrospinning favorisait l’adhésion et la prolifération cellulaire^{468,469}. Nous avons donc approfondi notre étude à ce sujet, en évaluant l’effet du traitement thermique. Pour ce faire, un traitement thermique allant de 90°C jusqu’à 140°C a été appliqué sur la poudre de chitosane ; après quoi la viabilité cellulaire a été étudiée par la méthode d’extraction. Les résultats obtenus sont représentés dans la *Figure 48*.

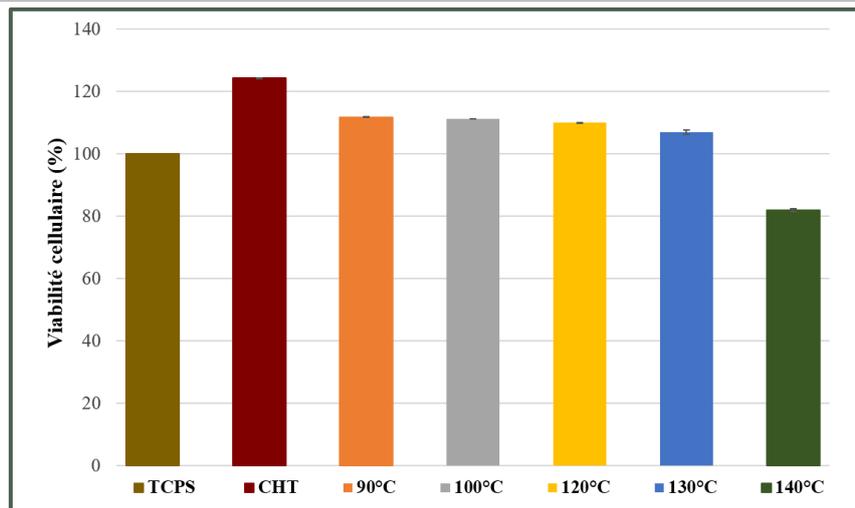


Figure 48. La viabilité cellulaire des poudres de CHT chauffées à des températures allant de 90 jusqu'à 140°C (n=3). Le témoin TCPS correspond au fond de la boîte de culture cellulaire en polystyrène et des cellules MC3T3-E1

Ces résultats prouvent que tous les échantillons présentent une viabilité cellulaire supérieure au seuil de cytotoxicité, à savoir 70%. Néanmoins, une diminution progressive de la viabilité cellulaire avec l'augmentation de la température de chauffe peut être observée. Ceci signifie qu'un traitement thermique à haute température peut provoquer une cytotoxicité. Cette baisse de viabilité cellulaire provoquée par le traitement thermique peut provenir de la dégradation des dérivés de sucres constituant le chitosane (réactions d'oxydation)

En conclusion, il serait intéressant d'approfondir cette étude sur des nanofibres de CHT chauffées à différentes températures afin de déterminer la température et le temps de recuit optimaux afin de trouver un compromis entre la stabilité des nanofibres et la cytocompatibilité.

V. Etude des propriétés ostéoinductrices des nanofibres

La capacité du biomatériau à induire la formation des cristaux de phosphate de calcium (CaP) a été évaluée *in vitro* en immergeant les échantillons dans une solution de 1,5×SBF pendant 7 jours et en renouvelant la solution tous les deux jours. Différentes caractérisations physicochimiques ont été menées dans le but de mettre en évidence la présence des cristaux CaP et d'identifier leur composition.

V.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images obtenues par MEB sont données dans la *Figure 49A* ci-après. Nous remarquons que suite à l'imprégnation dans la solution 1,5×SBF, la surface des nanofibres, fonctionnalisées préalablement avec la pDA pendant 2 heures, est recouverte d'agglomérats de CaP sous form

sphérique⁴⁴³ d'environ 7 μm de diamètre (cf. *Figure 49A.a*). En revanche, la membrane de CHT non modifiée ne présente aucune particule à sa surface après une incubation pendant 7 jours (cf. *Figure 49A.b*). Cette étude permet donc de prouver que le revêtement de pDA est indispensable pour induire la nucléation des cristaux CaP.

En outre, une étude évaluant le temps nécessaire d'immersion dans la solution 1,5×SBF pour induire la biominéralisation a été menée. Les échantillons ont été fonctionnalisés avec la polydopamine puis biominéralisés *in vitro* dans la solution 1,5×SBF pendant 1 à 7 j. Nous observons sur les clichés obtenus par MEB la présence de la phase minérale à partir de 6 jours d'immersion dans la solution (cf. *Figure 49B*).

Pour compléter cette étude, la microanalyse par spectroscopie de dispersion d'énergie (EDS) a été effectuée afin d'identifier les éléments atomiques qui sont présents à la surface du dispositif (cf. *Figure 49C*). Cette analyse cartographique démontre la présence de deux pics prédominants correspondant au calcium et au phosphore dont le ratio Ca / P, calculé à partir des abondances relatives de chaque atome, est de l'ordre de 1,76. Cette valeur est proche de celle de l'HA dont le ratio Ca/P théorique est de 1,67. Néanmoins, cette étude est semi-quantitative et ne nous permet pas d'affirmer la présence d'hydroxyapatite à l'état pur.

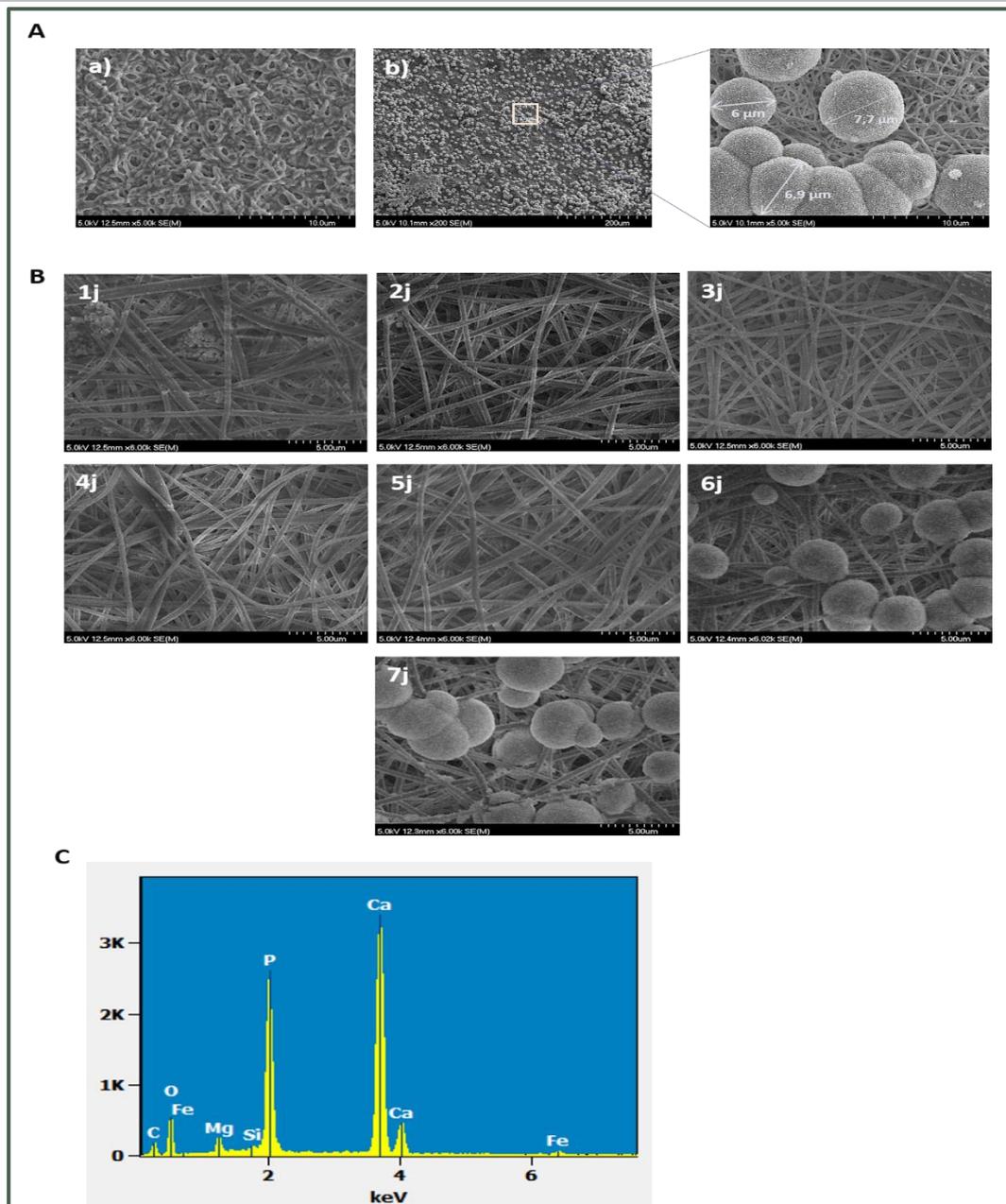


Figure 49. A. Images MEB obtenues après biominéralisation pendant 7 jours des nanofibres (a) sans revêtement de polydopamine (x5k), b) fonctionnalisées avec la polydopamine pendant 2h (x200), B. Clichés MEB des nanofibres de CHT fonctionnalisées avec la pDA puis biominéralisées pendant 1 à 7 j (x5k), C. analyse de surface des membranes après immersion dans la solution 1,5×SBF par spectre EDS

V.2. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les nanofibres fonctionnalisées par la pDA puis biominéralisées ont été analysées par ATG (cf. Figure 50).

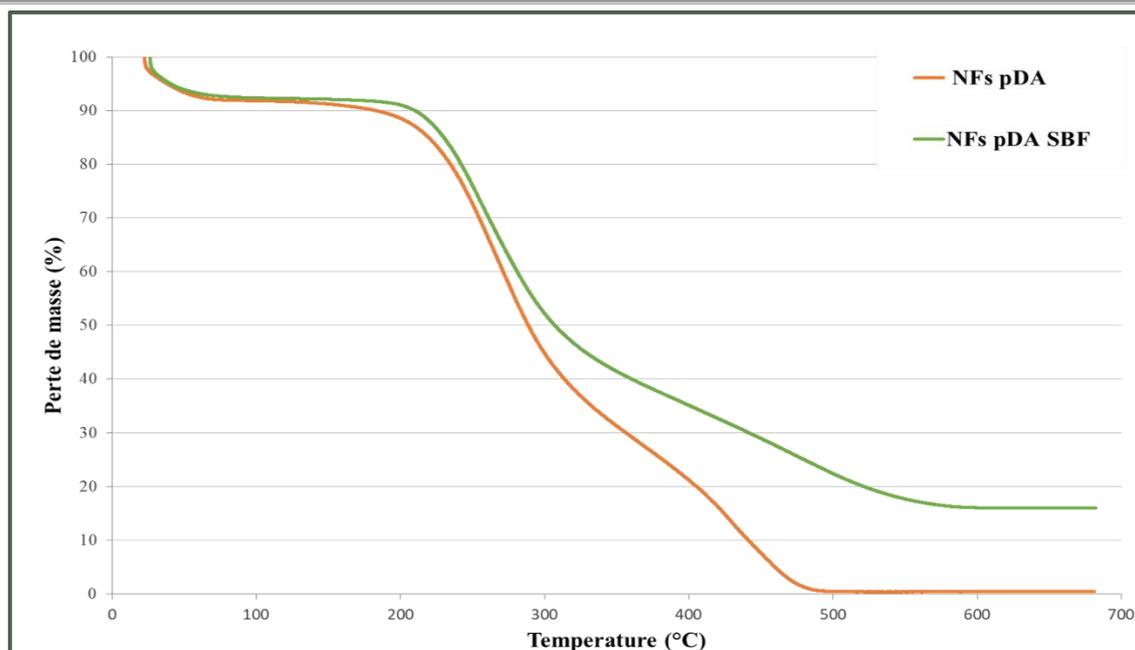


Figure 50. Thermogrammes des nanofibres avant et après immersion dans la solution 1,5×SBF pendant 7 jours

Le thermogramme des nanofibres recouvertes de pDA montre une dégradation complète à 600°C. en revanche, les nanofibres obtenues après biominéralisation présentent une première perte de masse entre 25°C et 90°C qui correspond à la perte d'eau. La deuxième perte de masse qui débute à 200 °C correspond à la dégradation des constituants ; le CHT, le PEO et la pDA (cf. Figure 50). A 600°C, la perte de masse se stabilise et atteint un plateau d'environ 16% qui correspond au résidu minéral. Cette étude confirme la présence d'une phase minérale à la surface du dispositif après immersion dans la solution 1,5×SBF (cf. Figure 49A.b).

V.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La structure chimique de la surface des nanofibres après immersion dans la solution 1,5×SBF a été analysée par IRTF en mode réflexion totale. Une poudre d'HA a été également analysée afin de mettre en évidence les pics caractéristiques. Les spectres sont présentés dans la Figure 51. Les nanofibres contenant les cristaux CaP montrent une diminution de l'intensité des pics relatifs au CHT et à la pDA (entre 1250 et 1700 cm^{-1}) et une apparition d'un pic étroit aux alentours de 1000 cm^{-1} que nous retrouvons dans le spectre de l'HA en poudre et qui correspond aux vibrations d'élongation des P-O⁴⁴³. Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les cristaux formés au sein des matrices à base des nanofibres correspondent aux cristaux d'HA.

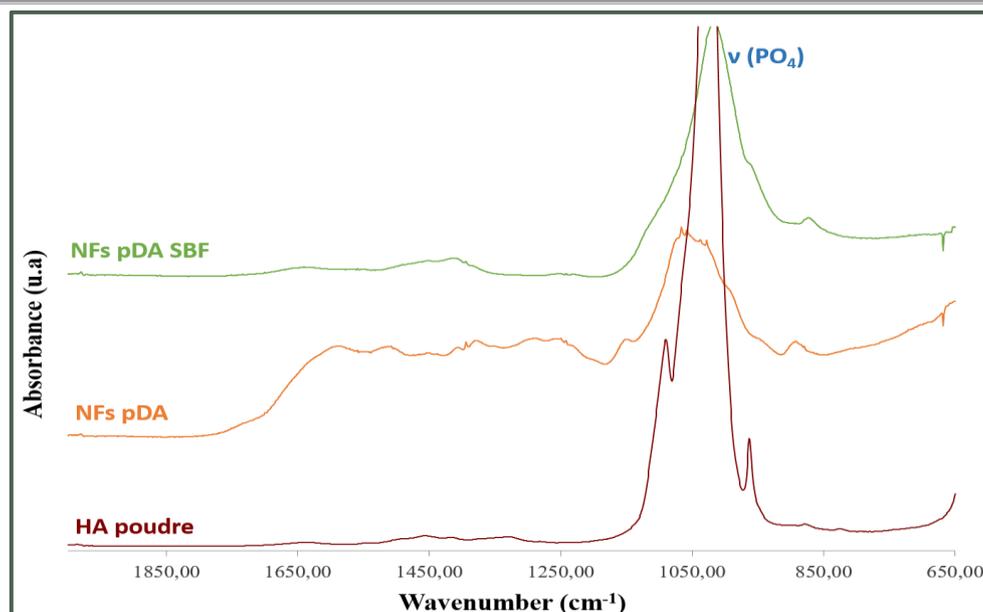


Figure 51. Les spectres IRTF-ATR des nanofibres modifiées avec la pDA pendant 2h après immersion dans la solution 1,5×SBF et la poudre d'hydroxyapatite

Pour conclure, ces résultats ont montré que le revêtement de pDA induit la biominéralisation du dispositif dans une solution 1,5×SBF, et permettent d'avancer l'hypothèse que les minéraux CaP formés à la surface des nanofibres correspondent aux cristaux d'HA. Néanmoins, cette hypothèse doit être confirmée par des études supplémentaires, notamment par diffractométrie de rayons X (DRX).

V.4. Diffractométrie des rayons X (DRX)

La Figure 52 représente les différents diffractogrammes obtenus à partir des nanofibres de CHT fonctionnalisées avec la pDA (rouge) et biominéralisées avant (bleu) et après (vert) calcination. Nous observons la présence d'un pic à $2\theta=20^\circ$ correspond au chitosane constituant principal de la matrice des nanofibres. L'épaule observé à $2\theta=28^\circ$ est attribué au PEO.

En outre, les diffractogrammes des nanofibres biominéralisées avant calcination (courbe en bleu) montrent un léger épaulement à $2\theta=32^\circ$ témoignant la présence d'une phase apatitique. Les membranes obtenues après calcination montrent la présence d'une phase cristalline caractéristique des phosphates de calcium. Le spectre du résidu calciné présente une superposition des pics d'hydroxyapatite (majoritaires) ainsi que d'autres phosphates de calcium tels que la Whitlockite et les phosphates de magnésium et calcium (minoritaires) (cf. Annexe 3 page 214). Ainsi, une phase apatitique constituée principalement d'hydroxyapatite a été obtenue.

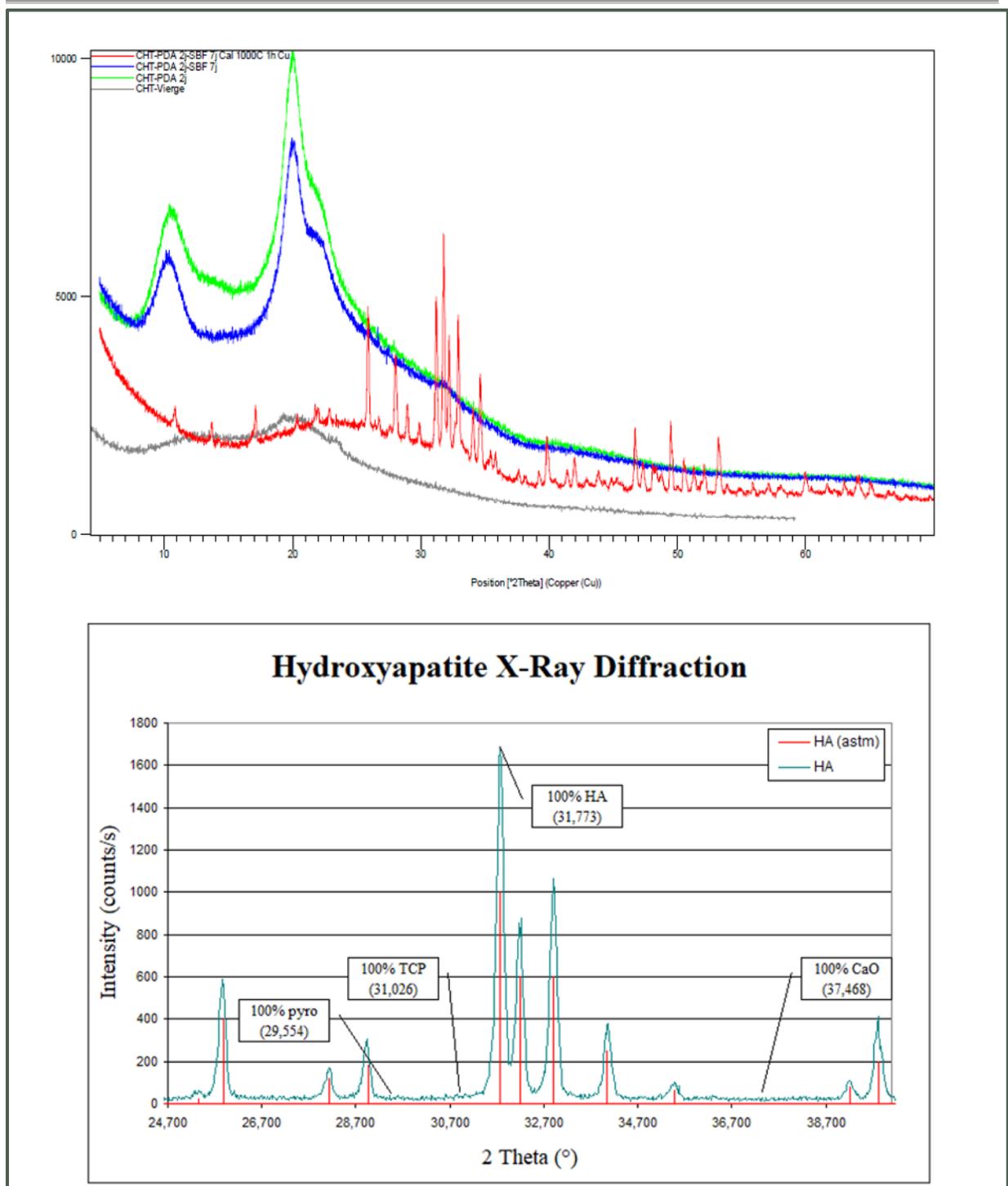


Figure 52. Diffractogrammes (en haut) des nanofibres de CHT modifiées par la pDA (rouge), des nanofibres biominéralisées pendant 7j (bleu) et du résidu de la calcination de la membrane biominéralisée (vert), (en bas) de l'hydroxyapatite pure

VI. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons élaboré des nanofibres de CHT par electrospinning à partir d'un mélange CHT-PEO afin de faciliter l'électrofilage du CHT. Ces membranes ont par la suite été réticulées via un traitement thermique pour les rendre stables dans des environnements aqueux et pour préserver leur morphologie fibreuse lors de la fonctionnalisation avec la pDA et la biominéralisation.

Dans un second temps, les supports précédemment élaborés ont été fonctionnalisés par dépôt d'un revêtement de pDA. La pDA a permis de stabiliser les nanofibres en milieu aqueux et de ralentir leur dégradation. Nous avons démontré que des nanofibres contenant très peu de particules de pDA sont obtenues pour un temps d'imprégnation dans la solution de dopamine inférieur ou égal à 72 heures et qu'au-delà de 72 heures, les matrices ont montré la présence de nombreuses nanoparticules de pDA sous forme d'agrégats qui ont présenté une cytotoxicité. La membrane fonctionnalisée pendant 2 heures a montré la meilleure viabilité cellulaire.

Enfin, une étude de biominéralisation *in vitro* a prouvé l'importance de ce revêtement de pDA pour induire la formation de cristaux CaP au sein du support et donc la biominéralisation du biomatériau. Une étude DRX a mis en évidence la présence d'une phase cristalline de phosphate de calcium. Cependant, des tests supplémentaires sont encore nécessaires, comme l'identification des cristaux de phosphate de calcium formés et l'évaluation biologique *in vivo*.

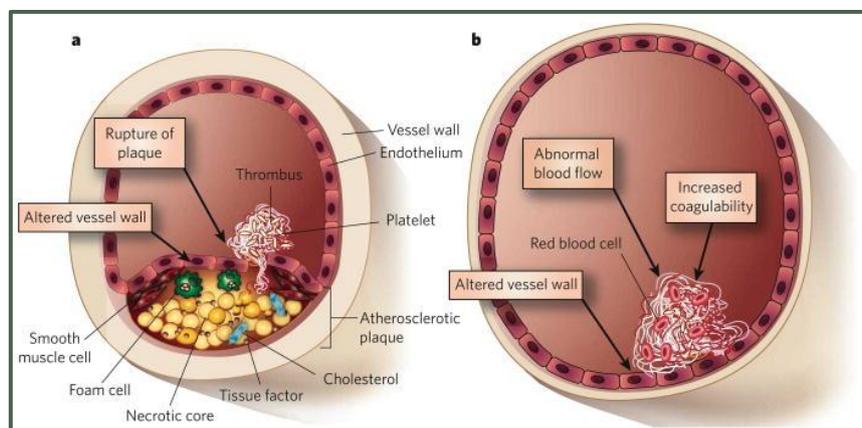
TROISIEME PARTIE.
ELABORATION DE NANOFIBRES DE CHITOSANE
SULFONIQUE À PROPRIETES
ANTITHROMBOTIQUES

Chapitre I. Etude bibliographique

Les pathologies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux et présentent un véritable problème de santé publique. Selon les statistiques, en 2013, plus de 17,3 millions de personnes sont décédées à la suite des pathologies cardiovasculaires ; ce qui représente un décès sur quatre dans le monde. Ce nombre devrait atteindre les 23,6 millions d'ici 2030⁴⁷⁰.

Le plus souvent, leur traitement est chirurgical et consiste à remplacer le vaisseau lésé par des substituts biologiques vasculaires. Toutefois, ces substituts biologiques (autogreffes veineuses et artérielles qui représentent le « gold standard ») ne répondent pas tout à fait aux attentes des chirurgiens en raison de leur disponibilité limitée et de la morbidité du site donneur. Afin de remédier à ces problèmes, des substituts synthétiques ont été développés. Leur utilisation accrue au fil des années, est due au vieillissement de la population, à la prévalence croissante de l'obésité, du diabète et de l'athérosclérose⁴⁷¹.

Pour cela, différents biomatériaux à base de polymères synthétiques ou naturels, de métaux ou de céramiques ont été utilisés en tant que dispositifs médicaux pour diverses pathologies cardiovasculaires^{472,473}. A titre d'exemple, le premier cœur artificiel CARMAT mis sur le marché est composé de plusieurs types de matériaux, parmi lesquels le PTFE, le titane et le péricarde de veau. Néanmoins, ces substituts sont encore à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques en raison de leur hémocompatibilité insuffisante⁴⁷⁴. Cette limitation est susceptible de provoquer des réactions indésirables dont la plus courante est la formation de thrombus (principalement constitué de plaquettes, de fibrine et de globules rouges) menant à une occlusion des vaisseaux malgré l'utilisation de traitements antiplaquetaires et anticoagulants (le plus souvent l'héparine)⁴⁷⁵. La thrombose (cf. *Figure 53*) est une cause majeure de morbidité et de mortalité⁴⁷⁶.



*Figure 53. Thrombose artérielle (a) et veineuse (b)*⁴⁷⁶

Par conséquent, les substituts doivent répondre à un cahier des charges spécifique et posséder des propriétés mécaniques et biologiques adaptées, à savoir l'hémocompatibilité et la capacité de résister aux contraintes exercées sur les parois vasculaires et de s'adapter aux variations de pression sanguine. A ce jour, aucune avancée clinique majeure n'a encore été notée, mais cette problématique fait malgré tout l'objet de nombreuses études de recherche.

L'hémocompatibilité consiste en l'étude de la réponse thrombotique induite par le biomatériau en contact avec le sang, y compris l'activation de la cascade de la coagulation, la réponse plaquettaire et l'activation du complément. Pour cette raison, il est primordial de prendre en compte la bioactivité de la surface du biomatériau lors de l'évaluation de l'hémocompatibilité car elle agit comme intermédiaire lors des interactions biomatériau – tissu hôte. De nombreuses stratégies, visant à améliorer l'hémocompatibilité, ont été axées sur la modification de surface des biomatériaux.

I. Traitements de surface antithrombotiques

La technique de modification de surface a été identifiée comme une approche efficace qui permet d'améliorer et d'assurer l'hémocompatibilité. La thrombogénicité d'un biomatériau va dépendre des groupes fonctionnels présents à la surface du support ainsi que de la charge et de la morphologie. Plusieurs types de revêtement ont fait l'objet d'études préliminaires, notamment la modification à l'oxyde nitrique, le greffage de molécules bioactives et le dépôt de divers revêtements organiques.

I.1. Traitement à l'oxyde nitrique

La libération de l'oxyde nitrique est une alternative prometteuse pour l'amélioration de l'hémocompatibilité de la surface d'un biomatériau. L'oxyde nitrique est produit par les cellules endothéliales et est capable d'inhiber l'agrégation et l'activation plaquettaire ainsi que la prolifération et la migration des cellules musculaires^{477,478}. Deux classes de molécules capables de libérer l'oxyde nitrique, le diazeniumdiolate et le nitrosothiol, ont été identifiées par Kapadia *et al.*⁴⁷⁹. De ce fait, des études ont été axées sur le greffage de ces molécules⁴⁸⁰. Gu *et al.* ont prouvé l'immobilisation covalente de la sélénocystamine sur une surface de polyuréthane afin de catalyser la libération de l'oxyde nitrique à partir du S-nitrosothiol⁴⁸¹. La fixation de la sélénocystine chirale sur un film à base d'oxyde de titane et l'influence de la chiralité des acides aminés sur la libération de l'oxyde nitrique ont été investiguées. Les résultats ont montré que,

même si la quantité de L-sélénocystine immobilisée à la surface est pratiquement identique à celle de la D-sélénocystine fixée, la L-sélénocystine génère une plus grande quantité d'oxyde nitrique et inhibe significativement l'adhésion et l'activation plaquettaire⁴⁸². Toutefois, cette stratégie nécessite une validation clinique^{483,484}.

I.2. Immobilisation d'agents thérapeutiques

Plusieurs approches pharmaceutiques, actives ou passives, ont été exploitées pour lutter contre la thrombose. Deux stratégies sont généralement suivies ; le greffage des molécules actives à la surface et leur incorporation au sein des dispositifs. La libération locale d'agents thérapeutiques permettrait d'augmenter l'efficacité du traitement tout en limitant les pertes et la toxicité inhérente à l'administration systémique de ces molécules. Les agents thérapeutiques comprennent des protéines, des peptides et des principes actifs d'origine naturelle ou synthétique (cf. *Tableau 9*).

Tableau 9. Les agents bioactifs utilisés pour la modification de surface des dispositifs hémocompatibles

Agents bioactifs	Propriétés	Références
Inhibiteurs de la coagulation		
Héparine	Polysaccharide sulfaté chargé négativement Catalyse l'activité inhibitrice de l'antithrombine III contre la thrombine et le FXa	485,486
Hirudine	Polypeptide d' <i>Hirudo medicinalis</i> Inhibition directe de la thrombine	487,488
Argatroban	Dérivé synthétique de la L-arginine Inhibition directe de la thrombine	489
Benzamidine	Inhibition directe de la thrombine et d'autres facteurs de la coagulation	490,491
Thrombomoduline	Protéine membranaire des cellules endothéliales Modifie la spécificité du substrat de la thrombine pour l'activation de la protéine anticoagulante C	492,493
Inhibiteurs plaquettaires		
Dipyrimadole	Vasodilatateur Inhibition plaquettaire	494,495
Prostacycline	Inhibition de l'agrégation plaquettaire	496
Apyrase	Diminution de l'adhésion et l'activation des plaquettes	497
Abciximab, Tirofiban	Inhibition des plaquettes, bloqueur des récepteurs GPIIb/IIIa	498

I.2.1. Les agents antiplaquettaires

Les recherches récentes, effectuées sur l'immobilisation d'agents antiplaquettaires, ont porté sur les différents stades du métabolisme plaquettaire en ciblant les récepteurs ADP et GP IIb/ IIIa) ou les enzymes plaquettaires (cyclooxygénase)⁴⁹⁹. Aldenhoff *et al.* ont rapporté le dépôt d'un revêtement à base de dipyridamole par des liaisons covalentes sur des prothèses vasculaires en polyuréthane^{494,495}. Le dipyridamole, un principe actif non toxique, inhibe l'activation et l'agrégation des plaquettes via l'inhibition de la phosphodiesterase cyclique, ce qui entraîne la réduction de la dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et donc l'augmentation des taux d'AMPc aux dépens de l'ADP. Ainsi, la synthèse du thromboxane A2 (TXA2) est inhibée d'une façon irréversible entraînant l'inhibition de l'agrégation plaquettaire⁴⁹⁹. L'ilomédrine (Iloprost®), un analogue de synthèse des prostaglandines qui inhibe l'agrégation des plaquettes et favorise la vasodilatation, a été utilisé en association avec l'hirudine pour fonctionnaliser des prothèses en PTFE⁵⁰⁰. D'autres agents pharmaceutiques, notamment la ticlopidine, qui traitent l'activation et l'agrégation des plaquettes par inhibition des récepteurs de l'ADP, ont également été exploités pour la modification de la surface des stents⁵⁰¹.

I.2.2. Les agents thrombolytiques

Les traitements thrombolytiques sont basés sur l'administration de composés recombinants tels que l'alteplase, la reteplase ou la teneceplase, ou d'activateurs du plasminogène, notamment l'activateur tissulaire du plasminogène (TPA). Le TPA est un agent puissant qui dégrade les complexes de fibrine et produit une thrombolyse. Les stratégies qui impliquent l'utilisation du TPA visent à mimer l'activation du mécanisme fibrinolytique et la libération du TPA immobilisé à la surface⁵⁰². A titre d'exemple, l'utilisation de surfaces fibrinolytiques qui entraînent la dissolution de la fibrine et donc du caillot sanguin est prometteuse pour fonctionnaliser des cathéters. Des surfaces à base de lysine sont ainsi exploitées pour la capture du TPA plasmatique dans le but d'induire la fibrinolyse (cf. *Figure 54*)⁵⁰².

La libération de TPA à la surface a également été exploitée sur une large gamme de dispositifs, allant des tubes de fibro-collagène⁵⁰³, du polyuréthane⁵⁰⁴ jusqu'aux hydrogels à base de poly (éthylène glycol)⁵⁰⁰.

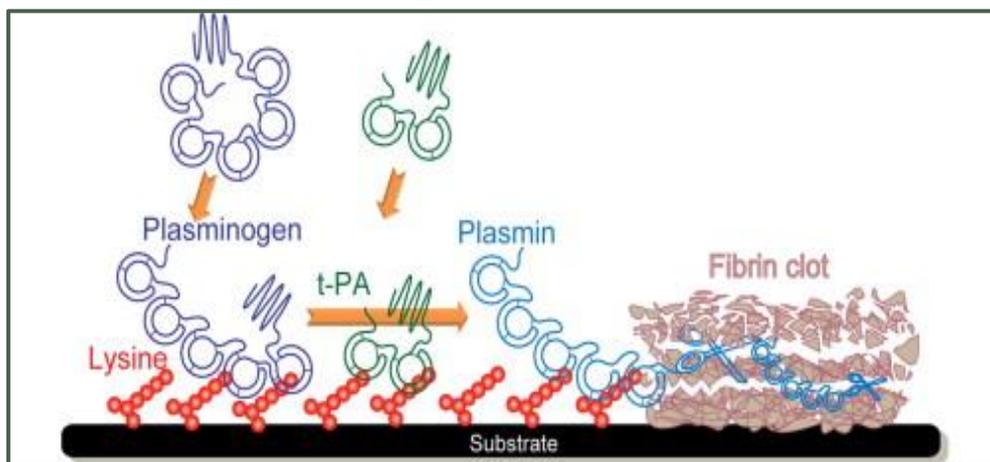


Figure 54. Représentation schématique de la lyse d'un caillot sur une surface fonctionnalisée avec la lysine⁵⁰²

I.2.3. Les agents anticoagulants

I.2.3.1. Héparine

L'héparine appartient à la famille des glycosaminoglycanes sulfatés et est utilisée comme agent anticoagulant en pratique clinique depuis 1935. Elle se lie à la protéine plasmatique, l'antithrombine-III, pour neutraliser la thrombine et le facteur activé (Xa), prévient également l'adhésion des plaquettes et améliore la biocompatibilité⁵⁰⁵. De ce fait, l'héparine a été exploitée pour fonctionnaliser la surface des dispositifs médicaux sous de nombreuses formes dans le but d'améliorer leur hémocompatibilité *in vitro* et *in vivo*⁵⁰⁶⁻⁵¹⁰. L'héparine a été fixée à la surface du lumen d'un dispositif vasculaire à base de fibroïne de soie en utilisant des complexes hydroxy-fer comme lieux afin d'améliorer les propriétés antithrombotiques⁵¹¹. Elle a également été immobilisée via des interactions électrostatiques grâce à ses groupements sulfate chargés négativement à la surface des prothèses vasculaires⁵¹². A titre d'exemple, elle a été incorporée dans des hydrogels ou des matrices de polymères qui enrobent les prothèses ou les stents vasculaires en vue d'une libération *in situ* au cours de la dégradation du polymère dans l'organisme^{513,514}.

La fonctionnalisation des surfaces avec l'héparine peut être effectuée par adsorption physique ou par des liaisons covalentes⁵¹⁵. En raison de la faible stabilité de l'immobilisation physique, la stratégie chimique a été privilégiée⁴⁸⁵. Néanmoins, l'héparine liée par covalence peut être inactivée par des modifications structurelles dues à des réactions d'immobilisation⁵¹⁶. De plus, son caractère hydrophile ne permet pas de la fixer directement sur des nombreuses surfaces de dispositifs hydrophobes. Ainsi, l'immobilisation de l'héparine est réalisée au moyen

d'un bras espaceur (en anglais « *spacer* »), comme le PEG ou le PEO, rendant la molécule plus accessible⁵¹⁷⁻⁵¹⁹. La méthode de modification de surface Carmeda BioActive (de Carmeda Inc., San Antonio, Texas) et une technique d'immobilisation en « *end-point* » qui consiste à dépolymériser l'extrémité réductrice de la chaîne linéaire de l'héparine formant un groupe aldéhyde capable d'être conjugué par une amine primaire à la surface de la prothèse ou du stent vasculaire fonctionnalisé⁵⁰⁸. Il existe une autre technologie « BibaHepcoat » (Tyco Healthcare) qui a été développée par Medtronic pour la fonctionnalisation des produits de pontage cardiopulmonaires et a été commercialisée sous le nom de « Trillium® biosurface ». Il s'agit d'un revêtement de polymères qui contient de l'héparine et dont la structure est très proche des caractéristiques critiques de l'endothélium vasculaire, à savoir une surface hydrophile chargée négativement qui comporte de l'héparine^{477,520}.

Toutefois, l'héparine peut avoir des effets secondaires indésirables, comme les complications hémorragiques et la thrombocytopénie⁵²¹. Par conséquent, des composés qui miment l'héparine (« *heparin-like* »), tels que des polymères chargés négativement et/ ou modifié chimiquement ont été exploités⁵²²⁻⁵²⁶.

I.2.3.2. Polymères « Heparin-like »

Des nombreuses études ont été effectuées pour développer des matériaux anticoagulants ou antithrombotiques synthétiques, dont la structure mime celle de l'héparine. La plupart de ces matériaux, principalement des polymères, possède des groupements sulfate, sulfamide ou acide carboxylique présents sur l'héparine⁵²⁷.

Une des approches qui permet de préparer des analogues de l'héparine est la synthèse de glycopolymères sulfatés. Huang *et al.* ont développé des glycopolymères synthétiques à base de polyurée contenant du glucose, du mannose, de la glucosamine ou du lactose sulfaté en tant que groupes pendants⁵²⁸. Les résultats obtenus ont montré que les polymères à base de mannose et de lactose présentent les activités anticoagulantes les plus élevées.

La synthèse de polymères sulfonés a également été exploitée. Divers homopolymères et copolymères anioniques ont été préparés soit par polymérisation de monomères anioniques soit par sulfonation des groupements hydroxyle après polymérisation. Par exemple, des homopolymères de styrène sulfoné insolubles dans l'eau ont été élaborés par sulfonation des résines de polystyrène et ont montré une activité anticoagulante^{529,530}. Tang *et al.* ont étudié la sulfonation des membranes de polyéthersulfone, qui a été ensuite mélangée avec du

poly (acrylonitrile-co-acide acrylique-co-vinyl pyrrolidone) pour introduire des groupements carboxyle qui ont montré une activité anticoagulante, proche de celle de l'héparine, et une inhibition de l'adhésion plaquettaire⁵³¹.

En outre, d'après la littérature, les flavonoïdes sulfatés et leurs dérivés, d'origine synthétique ou naturelle, possèdent une activité anticoagulante⁵³². Guglielmone *et al.* ont mis en évidence l'activité anticoagulante de la quercétine trisulfatée et tétrasulfatée. Ces derniers accélèrent l'inhibition de la thrombine⁵³³. De leur côté, Pinto *et al.* ont mis au point une série de conjugués flavonoïdes-saccharides persulfurés et ont prouvé que les 3-O-rutinosides inhibent directement le facteur Xa de la cascade de la coagulation et que les 7-O-rutinosides inhibent ce facteur à travers l'antithrombine⁵³⁴.

Divers polysaccharides sulfatés, qui ont montré une activité anticoagulante, résultent de la sulfonation des polysaccharides peu ou pas sulfonés, souvent d'origine naturelle. La sulfatation du dextrane, un glucane ramifié de dextrose, a été très explorée pour le développement d'analogues d'héparine ayant une activité anticoagulante⁵³⁵⁻⁵³⁸. Le galactomannane a également été sulfaté et a présenté une activité anticoagulante en inhibant à la fois le facteur FII et le facteur FXa de la cascade de coagulation^{539,540}. Les dérivés sulfonés ou sulfatés du chitosane, obtenus après sulfonation, sont largement explorés dans la littérature en raison de leur activité anticoagulante.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à la sulfonation du chitosane qui sera détaillée dans la prochaine section.

II. Sulfonation du chitosane

Comme il a été décrit précédemment, le chitosane est composé de deux unités répétitives ; D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, liées par des liaisons de type β -(1 \rightarrow 4). Sa structure chimique possède des groupements amine libres qui lui confèrent un caractère cationique et le rend de ce fait soluble dans des solvants aqueux neutres ou acides (pH < 6), en fonction du degré de désacétylation, de sa masse molaire et de sa source. De par ses propriétés physico-chimiques et biologiques, le chitosane a suscité un grand intérêt dans de nombreux domaines, en particulier pour des applications biomédicales, tels que la libération des principes actifs ou le traitement des plaies. Des modifications chimiques du chitosane ont été explorées dans le but d'obtenir des propriétés améliorées ou nouvelles selon la nature des fonctions tout en

conservant ses propriétés d'origine afin d'élargir son champ d'application dans le domaine biomédical.

De nombreuses études ont investigué la sulfonation du chitosane. En greffant des groupements sulfonate sur les chaînes polymères du chitosane, les dérivés sulfonés possèdent une structure proche de celle de l'héparine et devraient donc montrer une activité anticoagulante.

Dans la littérature, de nombreuses équipes se sont intéressées à la fonctionnalisation du chitosane par introduction des groupements sulfonate via des réactions de sulfonation. Pour ce faire, divers réactifs de sulfonation ont été explorés. La modification chimique peut se produire soit de manière sélective au niveau des groupements amine libres ou des groupements hydroxyle (des deux unités du chitosane), soit non sélective. Ainsi, différents dérivés sulfonés ont montré des propriétés physicochimiques et biologiques différentes, en fonction de la régiosélectivité et du réactif de sulfonation.

Un état de l'art des différentes stratégies de synthèse des dérivés sulfonés et sulfatés du chitosane, en se focalisant plus particulièrement sur la régiosélectivité des réactions, de l'impact de la modification chimique sur les propriétés physicochimiques et biologiques et des applications biomédicales, a été établi et publié sous forme d'un article de revue dans le journal « *Carbohydrate Polymers* »⁵⁴¹. La revue se compose de deux grandes parties ; la première a été consacrée à l'étude des différentes stratégies de sulfonation et les propriétés physicochimiques des dérivés du chitosane et, la deuxième, à la présentation des propriétés biologiques et les applications biomédicales respectives. La *Figure 55* représente le résumé graphique de l'article de revue.

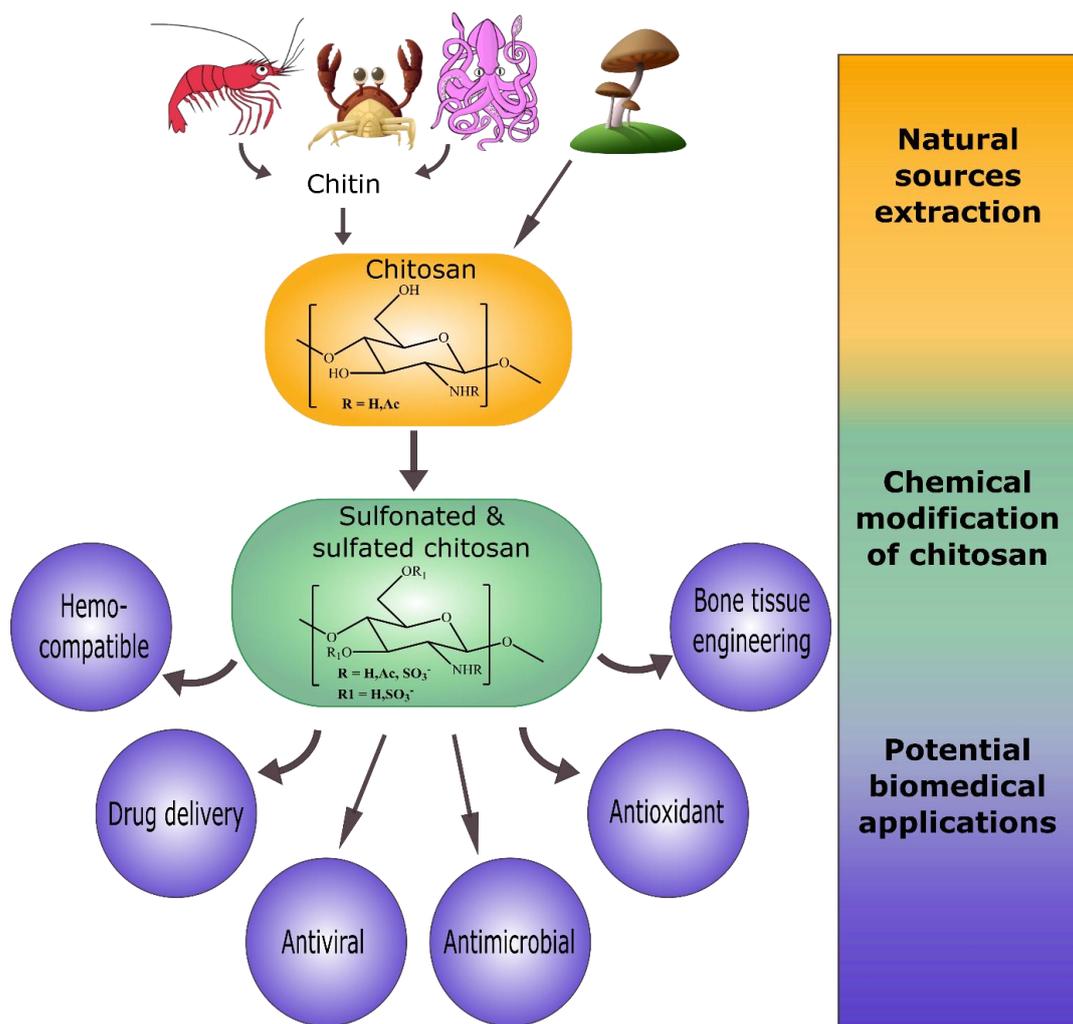


Figure 55. Résumé graphique de l'article de revue⁵⁴¹

III. Conclusion

De nombreuses stratégies de modification de surface des biomatériaux destinés à être en contact avec le sang ont été étudiées dans le but d'améliorer leur hémocompatibilité. Parmi lesquelles, la fonctionnalisation avec l'héparine et ses analogues. La recherche actuelle s'est orientée vers la sulfonation des polymères, en particulier le chitosane.

L'article de revue publié au cours de cette thèse met en évidence la diversité des dérivés sulfonés du chitosane due à la réactivité des trois sites fonctionnels présents dans les unités répétitives du polymère. Plusieurs facteurs (conditions opératoires, origine du chitosane, agents de sulfonation) doivent être pris en compte pour plus ou moins contrôler la régiosélectivité et le degré de substitution. En comparaison avec le chitosane brut, les dérivés sulfonés présentent différentes propriétés physicochimiques particulières dues à leur caractère polyampholytique, favorisant par exemple les interactions avec les protéines ou encore avec les plaquettes. Cela leur confère diverses propriétés biologiques (anticoagulantes, anticalcifiantes, antivirales, antimicrobiennes) qui permet d'étendre leur champ d'application. Selon l'application visée, ces polyélectrolytes ont été exploités sous différentes formes, comme des micelles, des films, des hydrogels ou des revêtements.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons synthétisé dans un premier temps des chitosanes sulfonés (CHTS) possédant différents degrés de substitution. La synthèse du CHTS a été effectuée via une amination réductrice, selon un protocole décrit et publié par notre groupe en 1995, en utilisant deux réactifs de sulfonation ; les sels de sodium de l'acide 2-formylbenzènesulfonique (BZ1S) et de l'acide 4-formyl-1,3-benzènedisulfonique (BZ2S), afin de fonctionnaliser des textiles enduits de CHT et obtenir ainsi des échangeurs de cations pour éliminer des métaux lourds dans les milieux acides⁵⁴². De même, cette stratégie a été appliquée à la solution de chitosane et les dérivés mono- et di-sulfonés, appelés CHT1S et CHT2S respectivement, ont été utilisés pour piéger des métaux lourds et des colorants textiles dans des milieux aqueux⁵⁴³⁻⁵⁴⁷. Dans le cadre des applications environnementales, afin de greffer la quantité maximale de groupements sulfonate et d'atteindre la capacité d'échange de cations maximale, un excès molaire d'aldéhydes sulfoniques par rapport aux groupements amine du CHT a été utilisé. Néanmoins, en ce qui concerne les applications biomédicales, la présence de groupements amine primaire libres dans le squelette du CHT lui confère des propriétés biologiques bien spécifiques⁵⁴⁸. De ce fait, le contrôle du taux de modification du CHT en

position N- est nécessaire. Ainsi, les conditions de la réaction d'amination réductrice ont été contrôlées pour substituer partiellement les groupements amines du CHT avec des groupements benzènesulfonates. Pour cela, des rapports variables des deux aldéhydes sulfoniques, BZ1S et BZ2S, versus groupements amine du CHT ont été explorés. Différents degrés de substitution et taux de soufre ont été obtenus, permettant d'identifier le meilleur compromis entre les groupements sulfonate et les groupements amine pour bénéficier de la meilleure activité antithrombotique tout en conservant les meilleures propriétés biologiques du CHT.

Dans un second temps, nous avons mis en forme par électrospinning ces dérivés dans le but d'obtenir des membranes nanofibreuses à activité antithrombotique. En effet, des études récentes ont exploré l'utilisation des nanofibreuses sous forme de revêtement des stents. Elles couvrent entièrement les stents et permettent aux endoprothèses enduites de nanofibres d'assurer un écoulement sanguin régulier, permettant ainsi d'atténuer la resténose et la progression de la plaque⁵⁴⁹. Il en a résulté que les nanofibres constituent des candidats prometteurs pour une application en tant que matrices susceptibles d'être en contact avec le sang.

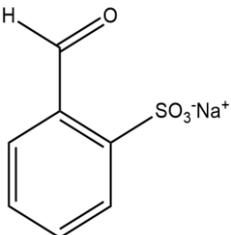
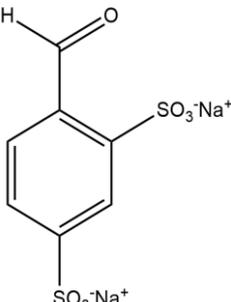
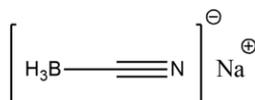
Enfin, et à notre connaissance, il n'existe encore à ce jour aucune étude qui a traité de l'électrospinning du chitosane sulfoné à propriété anticoagulantes intrinsèques.

Chapitre II. Produits, matériels et techniques de caractérisation

I. Synthèse des dérivés sulfonés du CHT

Le CHT utilisé pour cette étude est de grade biomédical et provient de la société WISapple (batch n° WA1603121). Il est extrait des champignons et présente un DD de 98,26%. Les sels de sodium de l'acide 2-formylbenzènesulfonique (BZ1S) et l'acide 4-formyl-1,3-benzènedisulfonique (BZ2S), de même que l'agent réducteur cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) proviennent de « Aldrich Chemicals » et ont été utilisés sans passer par une étape de purification supplémentaire (cf. *Tableau 10*).

Tableau 10. Caractéristiques et structures des réactifs utilisés pour la synthèse des deux dérivés du CHT, mono- et di-sulfoné

Produits	Sels de sodium de l'acide 2-formylbenzènesulfonique	Sels de disodium de l'acide 4-formyl-1,3-benzènedisulfonique	cyanoborohydrure de sodium
Abréviations	BZ1S	BZ2S	NaBH ₃ CN
N° CAS	1008-72-6	207291-88-1	25895-60-7
Masse molaire	208,17 g.mol ⁻¹	310,21 g.mol ⁻¹	62,84 g.mol ⁻¹
Formule			

La synthèse des deux CHT sulfonés, mono- (CHT1S) et di-sulfoné (CHT2S), a été effectuée via une réaction d'amination réductrice par utilisation respective des sels de sodium de l'acide 2-formylbenzènesulfonique (BZ1S) et de l'acide 4-formyl-1,3-benzènedisulfonique (BZ2S) (cf. *Figure 56*). La méthode a été auparavant décrite par Martel *et al.*⁵⁴².

Pour ce faire, 5 g de CHT ont été dissouts dans 500 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique à 1% v/v, qui a été diluée par la suite avec 450 mL de méthanol. Les réactifs BZ1S et BZ2S ont été dissouts, d'abord, dans 50 mL d'eau puis ajoutés dans la solution précédente. La quantité de BZ1S et BZ2S introduite a été déterminée en se basant sur le ratio molaire (R) des aldéhydes sulfoniques *versus* les groupements amine libres présents dans le squelette du CHT (6,1 mmol de fonctions amine pour 1 g de CHT) (le tableau qui indique les masses utilisées des différents réactifs est présente dans l'*Annexe 4*). Deux séries de CHT sulfonés, appelés CHT1S

et CHT2S, ont été obtenues. Différents ratios molaires (R) (0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1.5 et 2) ont été étudiés pour chaque série. 3 minutes après l'ajout de BZ1S ou BZ2S, la viscosité de la solution a significativement diminué et un précipité blanc est apparu. 5 minutes plus tard, 3 g de l'agent réducteur NaBH_3CN ont été ajoutés sous forte agitation mécanique maintenue pendant une heure. La suspension ainsi obtenue a été introduite dans des poches de dialyse (SpectraPor 12-14 kDa, diamètre 50 mm). La dialyse a été maintenue pendant 5 jours en renouvelant l'eau distillée deux fois par jour. Enfin, les échantillons purifiés ont été lyophilisés et des poudres de couleur blanc cassé ont été récupérées.

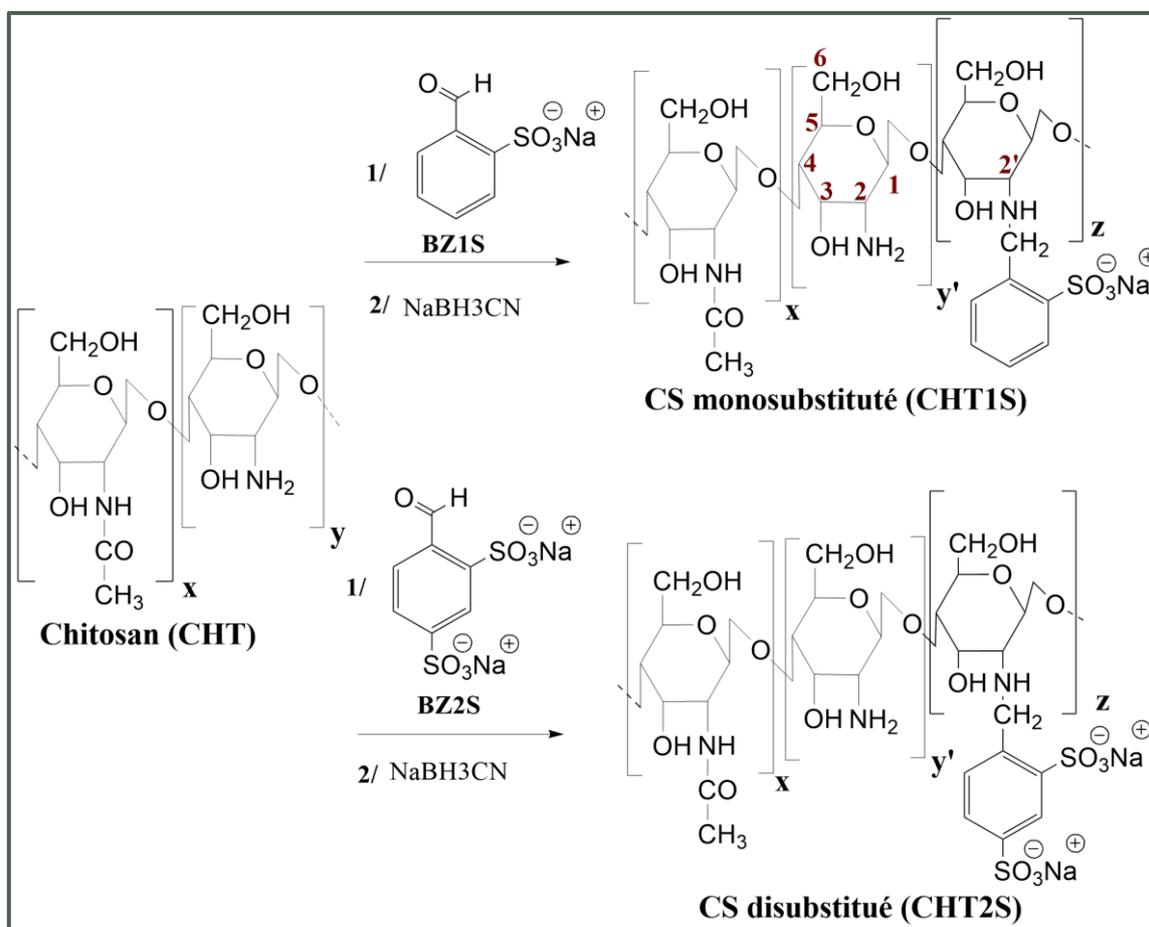


Figure 56. Schéma réactionnel entre le CHT et le BZ1S ou BZ2S via une amination réductrice en présence du NaBH_3CN . Les unités x , y , y' et z correspondent, respectivement, aux proportions relatives en unités acétyl glucosamine ($x=0.0174$), glucosamine libres avant ($y=0.9826$) et après réaction et aux glucosamines substituées par les groupes benzyl sulfonates. Z correspond donc au degré de substitution (DS).

Pour plus de clarté, la nomenclature CHT1S-1 ou CHT2S-1 a été utilisée pour les lots issus du rapport molaire $R=1$, et ceci a été étendu à toutes les valeurs de R (cf. *Tableau 11*).

Tableau 11. Nomenclature des séries CHT1S et CHT2S en fonction de R

	R = 0,25	R = 0,5	R = 0,75	R = 1	R = 1,5	R = 2
CHT1S	CHT1S-0,25	CHT1S-0,5	CHT1S-0,75	CHT1S-1	CHT1S-1,5	CHT1S-2
CHT2S	CHT2S-0,25	CHT2S-0,5	CHT2S-0,75	CHT2S-1	CHT2S-1,5	CHT2S-2

II. Techniques de caractérisation des dérivés CHT1S et CHT2S

II.1. Caractérisations physicochimiques

II.1.1. Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire du carbone, de l'hydrogène, de l'azote, et du soufre des deux séries CHT1S et CHT2S a été effectuée au Service central d'analyse (SCA) USR59, CNRS, Vernaison France. Le pourcentage du soufre (%S) expérimental déterminé par analyse élémentaire a été converti en degrés de substitution ($0 < DS < 0,9826$) qui est défini comme étant le ratio molaire des unités répétitives du CS substituées avec les groupements aryle sulfonique (la proportion des fonctions amines libres avant réaction a été substituées, unité z dans la *Figure 56*). Deux relations théoriques entre DS et %S ont été établies (dont la figure a été placée en *Annexe 5*) :

$$\text{Pour CHT1S : } DS = (5,3 \times 10^{-3} \times (\%S)^2) + (4,33 \times 10^{-2} \times (\%S)) \quad (\text{Equation1})$$

$$\text{Pour CHT2S : } DS = (2,9 \cdot 10^{-3} \cdot (\%S)^2) + (1,62 \cdot 10^{-2} \cdot (\%S)) \quad (\text{Equation2})$$

Sachant que les masses molaires des unités ; glucosamine acétylée, glucosamine et glucosamine substituée par le BZ1S ou BZ2S sont respectivement de $203 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $161 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $339 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $455 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, et que la valeur de %S est exprimée en pourcentage massique. Le CHT utilisé possède un DD de 98%

Ainsi, à partir de la composition en soufre déterminée par analyse élémentaire de nos chitosanes sulfonés, le calcul des valeurs expérimentales de DS et des groupements sulfonate (en $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) a été rendu possible.

II.1.2. ¹H-RMN

Les spectres ¹H-RMN ont été réalisés par spectromètre à 300 MHz (Bruker AC300). 9 g de CHT1S et CHT2S ont été dissouts dans 1 mL d'une solution de NaOD à 0,01M dans le D₂O. Toutes les mesures ont été effectuées à 20°C. Une analyse complète des spectres ¹³C-RMN et ¹H-RMN des deux séries mono- et di-sulfonés a été investiguée dans une étude antérieure^{545,546}.

Les spectres ¹H-RMN enregistrés ont permis de calculer les DS des CHT1S et CHT2S à partir des mesures, d'une part, d'intégrales des protons H2 et H2' (cf. *Figure 59*) présents respectivement dans les unités répétitives glucosamine non substituées et substituées et, d'autre

part, de l'intégrale des protons aromatiques du benzyle mono- et di-sulfonate observée entre 7 et 8 ppm.

Comme pour l'analyse élémentaire, le calcul de DS a été établi à partir de deux équations relatives à chaque série de CHT dans lesquelles 0,98 correspond au DD du CHT (98%):

$$\text{Pour CHT1S : DS} = \frac{(\text{Aire } H_{\text{arom}})}{4} \times 0,98 \quad (\text{Equation1})$$

$$\text{Pour CHT2S : DS} = \frac{(\text{Aire } H_{\text{arom}})}{3} \times 0,98 \quad (\text{Equation2})$$

II.1.3. Spectroscopie infrarouge

Un spectromètre Perkin Elmer (Spectrum One), équipé du logiciel Spectrum, a été utilisé pour effectuer les analyses infrarouges en mode ATR (Réflexion totale atténuée). Les spectres ont été réalisés à partir de 16 scans entre 650 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

II.1.4. Spectroscopie UV-visible

100 mg de CHT1S et CHT2S ont été dissouts dans 50 mL de NaOH à 0,05M. 3 mL de chaque échantillon ont été transférés dans une cellule en quartz de 10 mm et analysée à température ambiante entre 250 et 300 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1800).

II.1.5. Potentiel zêta

Le potentiel zêta a été évalué grâce à un zétamètre (Zetasizer nano Zs Model, Malvern). Les mesures ont été effectuées à différents pH, allant de 4 à 11. Les échantillons CHT1S et CHT2S ont été solubilisés dans NaOH (0,05M) à une concentration de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Puis, une solution d'HCl (0,1M) a été ajoutée afin d'ajuster le pH. Dans un même temps, une solution de CHT non substitué a été également préparée en le solubilisant, à $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dans une solution aqueuse d'acide acétique à 0,1% (v/v), dont le pH a été ajusté par ajout de NaOH (0,05M).

II.1.6. Domaine de solubilité en fonction du pH

Les échantillons ont été préparés selon le protocole précédent, suivi pour l'étude du potentiel zêta. Le spectrophotomètre UV-Visible (UV-1800, Shimadzu France) a été utilisé pour mesurer la transmittance à chaque pH permettant de mettre en évidence les transitions solubles-insolubles des dérivés CHTS.

II.1.7. Mesure de viscosité dynamique

Les viscosités dynamiques des solutions ont été mesurées à l'aide d'un rhéomètre (Anton Paar MCR301) équipé d'un accessoire plan/plan de diamètre 25 mm (PP25) à 25 °C et à une vitesse de cisaillement allant de 1 s⁻¹ à 1000 s⁻¹. Pour l'ensemble des produits analysés, nous avons constaté un comportement similaire, à savoir une droite légèrement descendante. Cela traduit un comportement non newtonien. De ce fait, toutes les mesures ont été comparées en se plaçant à la vitesse de 500 s⁻¹.

II.2. Caractérisations biologiques

Les caractérisations biologiques sont réalisées au sein de l'Unité U1008 : « Médicaments et biomatériaux à libération prolongée : Mécanismes et optimisation » à l'Université de Lille, avec la participation du Dr. Alexandre Ung du service Hémostase du CHRU-Lille.

II.2.1. Cytotoxicité par méthode d'extraction

Le protocole expérimental de l'évaluation de la cytotoxicité des échantillons par la méthode d'extraction suivi a été décrit dans la partie précédente (*cf. page 74*)

II.2.2. Etude d'hémocompatibilité

L'hémocompatibilité des polymères CHT1S et CHT2S a été évaluée en étudiant dans un premier temps leurs propriétés hémolytiques afin de s'assurer qu'ils ne détruisent pas les globules rouges et qu'ils peuvent être utilisés pour des applications destinées à être en contact avec le sang et, dans un second temps, leurs propriétés anticoagulantes.

II.2.2.1. Test d'hémolyse

Une représentation schématique du test d'hémolyse est donnée dans la *Figure 57*. 5 mg de CHT1S et CHT2S ont été introduits dans un 1 mL de sang complet, prélevé d'un donneur adulte. 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). Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 2 heures sous agitation à 80 tr.min⁻¹ et centrifugés à 2500 g pendant 10 minutes. Ensuite, le surnageant a été analysé par spectroscopie UV-Vis à 540 nm pour mesurer sa densité optique (OD). Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé selon l'équation :

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

D'après la norme ATM F756-00 (2000), le matériau est considéré comme hémolytique lorsque $IH\% > 5\%$, faiblement hémolytique quand $2\% < IH\% < 5\%$ et non hémolytique lorsque $IH\% < 2\%$ (IH : indice hémolytique)⁵⁵³.

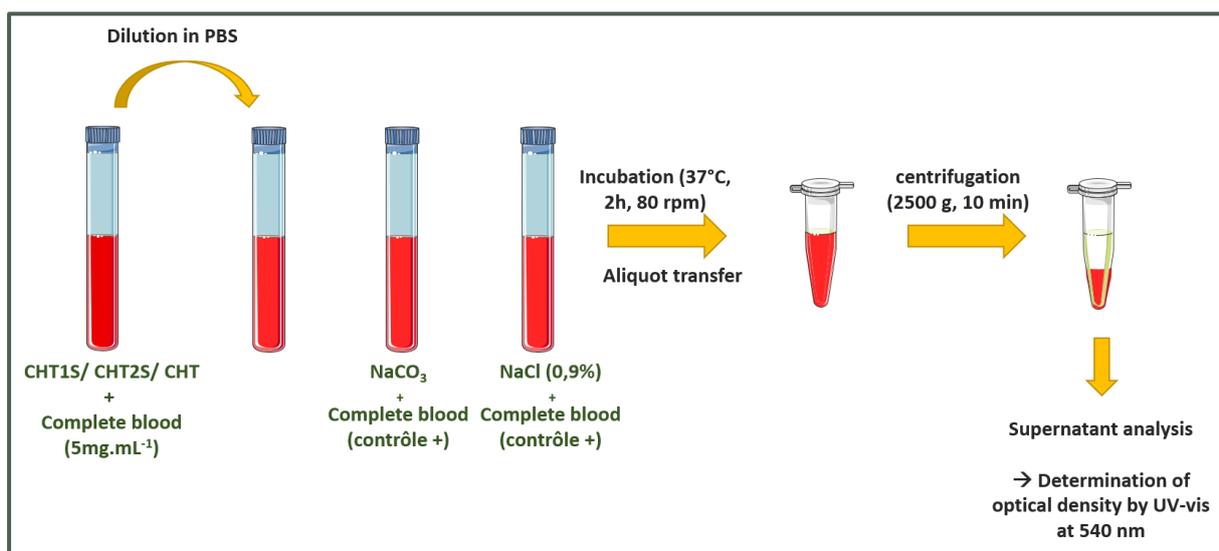


Figure 57. Représentation schématique du test d'hémolyse

II.2.2.2. Test de coagulation

L'activité anticoagulante des CHT1S et CHT2S a été évaluée par trois tests classiques de coagulation : le **TCA** (temps de céphaline activée), le **TP** (temps de prothrombine) et l'**anti-facteur Xa** (anti-Xa). Le test TCA représente les voies, intrinsèque et commune, et le test TP est un indicateur de l'activation ou non de la voie extrinsèque et de la voie commune. Tous deux évaluent la formation de caillots de fibrine. En revanche, le facteur Xa accélère la transformation de la prothrombine (Facteur II) en thrombine qui, elle-même, transforme le fibrinogène en fibrine responsable de la formation du caillot sanguin. Cette mesure d'activité est souvent utilisée pour la surveillance biologique des traitements par héparine ou par d'autres agents antithrombotiques (cf. Figure 58).

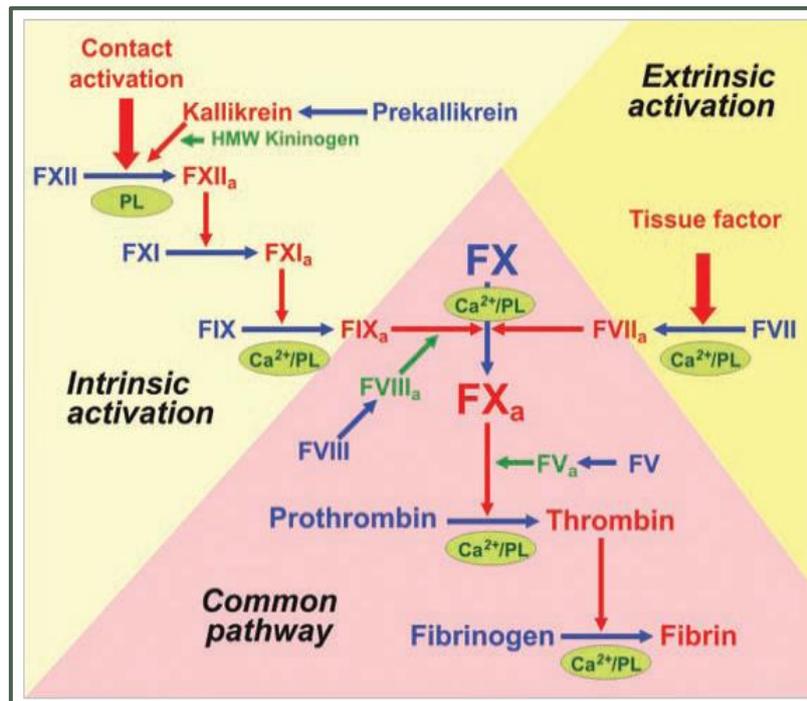


Figure 58. Schéma de la cascade de coagulation sanguine

Le sang humain utilisé a été prélevé chez des volontaires adultes dans des tubes citratés. Deux études ont été effectuées ; l'une consistait à comparer l'activité anticoagulante entre les deux séries CHT1S et CHT2S à une concentration fixe (1 mg.mL^{-1}) et l'autre permettait d'évaluer l'effet de la concentration ($0,05$; $0,1$; $0,2$; $0,4$ et 1 mg.mL^{-1}) sur l'activité anticoagulante de CHT1S-2 et CHT2S-2. Pour les deux études, les échantillons ont été comparés avec l'héparine sodique à 5000 UI.mL^{-1} (SANOFI, Paris, France) comme contrôle positif, et du sang complet citraté seul en tant que contrôle négatif.

Toutes les suspensions (sang complet contenant les poudres CHT1S et CHT2S) ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes avec une agitation orbitale de 80 rpm, puis centrifugées à $2500g$ pendant 15 minutes à 14°C afin de collecter le plasma pauvre en plaquettes qui est par la suite utilisé pour l'évaluation de l'activité anticoagulante des échantillons (cf. Figure 59).

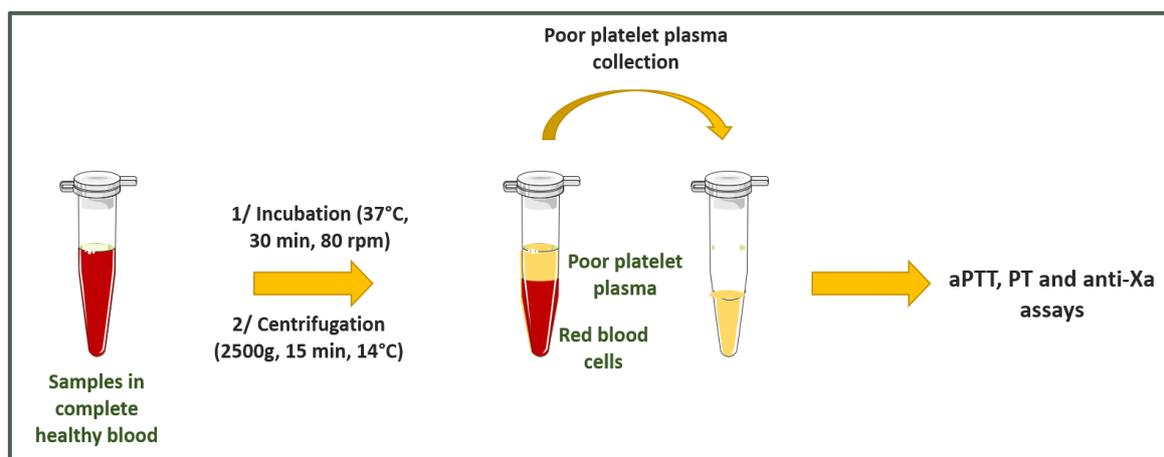


Figure 59. Représentation schématique de la méthode de préparation des échantillons pour l'évaluation de l'activité anticoagulante

Le test TCA : 50 μ L de chaque plasma pauvre en plaquettes (PPP) ont été incubés à 37°C pendant 1 minute, puis 50 μ L du réactif TCA (TriniCLOT™ aPTT HS, Tcoag®) ont été ajoutés. Ces solutions ont été incubées à 37°C pendant 5 minutes. Après quoi, 100 μ L de CaCl₂ (0,025 mol.mL⁻¹) ont été additionnés et le temps de coagulation a été mesuré.

Le test TP : 100 μ L de PPP ont été incubés à 37°C pendant 2 minutes. Ensuite, 200 μ L du réactif thromboplastine tissulaire (NEOPLATINE® R, Diagnostica Stago, Inc., France), pré-incubés à 37°C pendant 10 minutes, ont été ajoutés et le temps de coagulation a été enregistré.

Le test anti-Xa : le protocole indiqué par le fabricant (HYPHEN BioMed, France) a été suivi. Brièvement, Le facteur Xa humain (2,4 nkat.mL⁻¹) et antithrombine III humaine (0,17 U.mL⁻¹) ont été ajoutés à 100 μ L de ppp préalablement chauffés. Les mélanges ainsi obtenus ont été incubés pendant 2 minutes à 37°C. Afin de mesurer l'activité du facteur Xa résiduel, le substrat chromogène spécifique SXa-11 a été ajouté. L'augmentation de l'absorbance à 405 nm par minute a été enregistrée. L'activité anticoagulante a été reportée en équivalents de l'héparine thérapeutique en convertissant le temps de coagulation en plasma hépariné (UI.mL⁻¹) et en utilisant une courbe d'étalonnage d'héparine standard.

III. Elaboration de nanofibres par electrospinning

Les deux polymères, CHT1S-2 et CHT2S-2, ont été sélectionnés pour élaborer des membranes de nanofibres par electrospinning. Pour ce faire, deux solutions de CHT1S-2 et CHT2S-2 ont été préparées à 4,4% (w/v) et 3,7% (w/v), respectivement, en utilisant NaOH (0,05M) comme solvant. Afin de faciliter l'électrofilage, le PEO a été ajouté dans les solutions

à CHT1S-2 ou CHT2S-2/ PEO 80/20 (w/w). Les différents paramètres du procédé (cf. *Page 16*) ont été étudiés en variant paramètre par paramètre afin d'identifier les conditions optimales pour l'obtention de nanofibres « homogènes » de CHT1S-2 et CHT2S-2.

Chapitre III. Résultats et discussion

I. Synthèse et caractérisations des chitosanes sulfoniques

La voie de modification chimique du CHT adoptée consiste à greffer des aldéhydes benzyliques sulfonés sur ses unités glucosamines. Pour ce faire, le CHT 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 NaBH_3CN dans le but d'obtenir un N-benzyl CS mono- ou di-sulfoné (CHT1S et CHT2S) (cf. *Figure 59*). Différents CHT mono-et di-sulfonés ont été synthétisés en faisant varier le rapport molaire (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 et 0,25). Ces dérivés ont été caractérisés via diverses techniques qualitatives ou quantitatives : la ^1H -RMN, l'analyse élémentaire, l'IRTF, l'étude de solubilité et la mesure du potentiel zêta en fonction du pH.

I.1. Résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN)

Dans une précédente publication, des études RMN approfondies du proton et du carbone des composés CHT1S et CHT2S similaires obtenus uniquement à partir d'un rapport R = 4 ont été rapportées et ont permis d'identifier les signaux observés sur les spectres et de les attribuer aux protons correspondants^{545,546}. Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le degré de substitution (DS) des dérivés sulfoniques pourrait être calculé à partir du rapport des intégrations des signaux des protons aromatiques situés entre 7 et 8,5 ppm versus ceux des protons situés en position 2 des unités répétitives de glucosamine libre et substituée, à savoir H2 et H2', respectivement, à environ 2,5 ppm. Les spectres ^1H -RMN des deux dérivés sulfoniques CHT2S-2 et CHT1S-2 sont représentés dans la *Figure 60*.

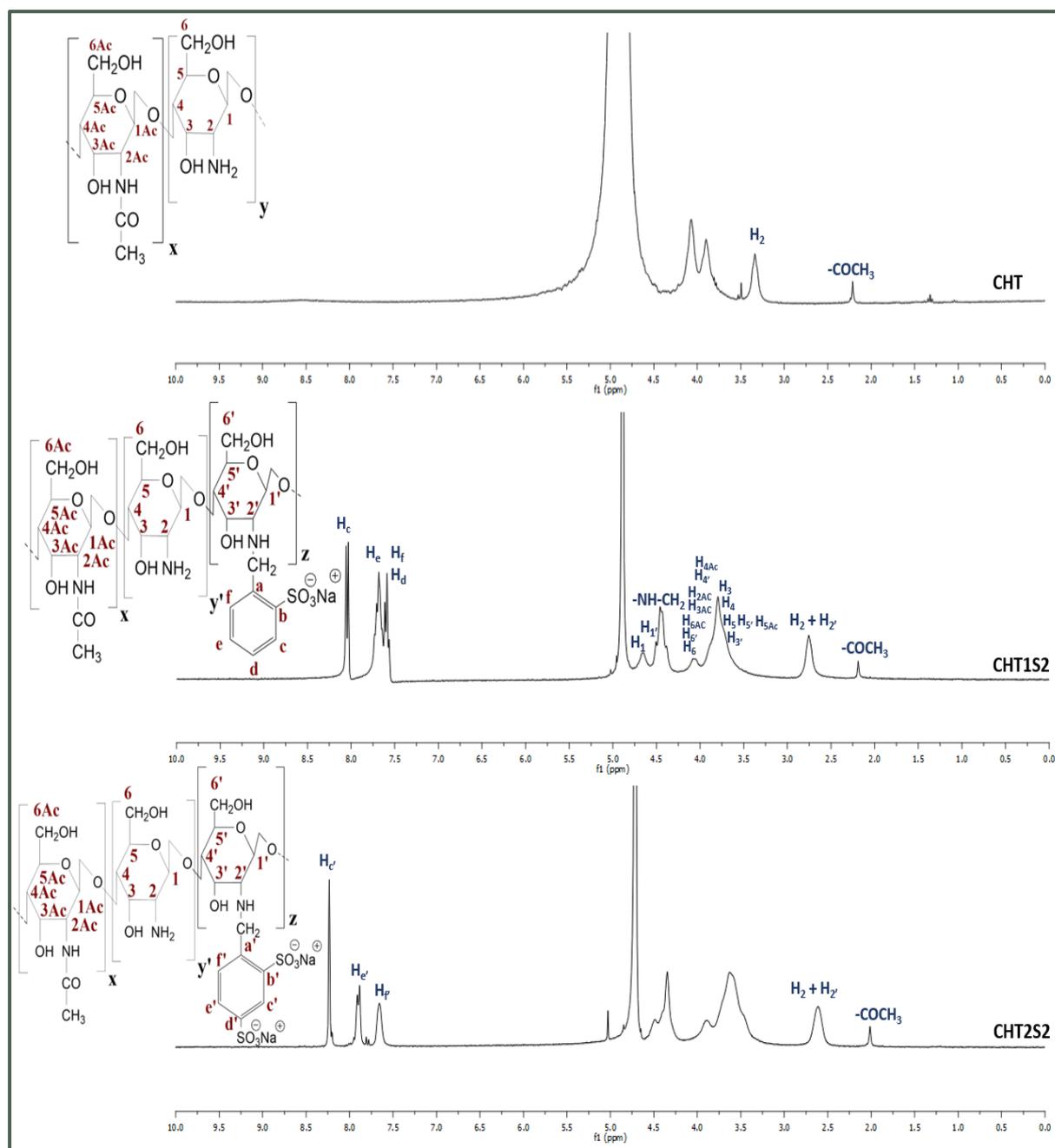


Figure 60. Les spectres ¹H-RMN des dérivés sulfoniques CHT1S-2, CHT2S-2 et du CHT (300MHz dans NaOD 0,01M)

La présence des signaux aromatiques entre 7 et 8,5 ppm dans les deux spectres confirme le greffage des groupements aryl sulfonate sur le squelette du CHT. Les DS obtenus à partir des différents ratios molaires ($0,25 < R < 2$) ont été calculés et présentés, ainsi que les valeurs d'intégration, dans le *Tableau 12* ci-dessous. Puis, à partir de ce tableau, les valeurs obtenues ont été tracées en fonction de R et les courbes de tendance sont données dans la *Figure 61*. Ces résultats montrent une augmentation significative du DS lorsque R augmente de 0,25 à 1, puis

une légère élévation menant à un plateau est observée pour des R supérieures à 1, atteignant les valeurs de 0,71 et 0,5 pour les CHT1S et CHT2S, respectivement.

Tableau 12. Valeurs des intégrales des signaux aromatiques et des protons situés sur la position 2 des unités

R	CHT1S			CHT2S		
	Aire H _{aromatiques}	Aire H ₂ + H ₂ '	DS	Aire H _{aromatiques}	Aire H ₂ + H ₂ '	DS
0,25		1,08	0,23		1,2917	0,254
0,5		0,6099	0,4		1,1485	0,285
0,75	1 (4H)	0,4246	0,58	1 (3H)	0,8224	0,398
1		0,3998	0,61		0,7114	0,460
1,5		0,3527	0,7		0,6805	0,481
2		0,3467	0,71		0,6582	0,498

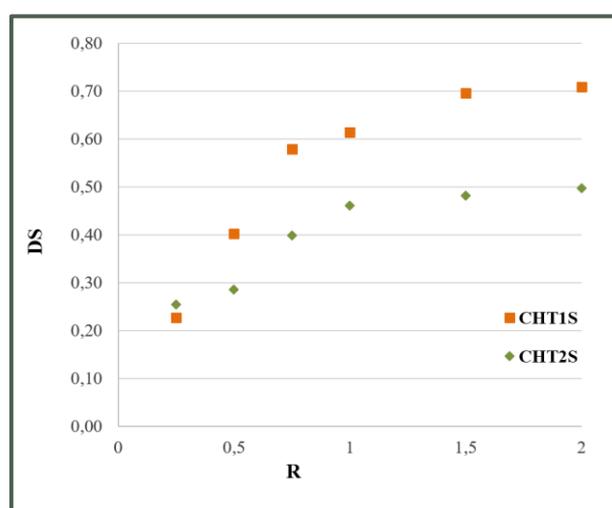


Figure 61. DS des dérivés CHT1S et CHT2S en fonction du rapport molaire (R) mesuré par RMN

I.2. Analyse élémentaire

Les proportions massiques atomiques en C, N, H et S de chaque polymère ont été déterminées par l'analyse élémentaire et ont été rapportées dans le *Tableau 13*. Les résultats montrent que la teneur en soufre des dérivés CHT1S et CHT2S augmente progressivement avec l'augmentation du R jusqu'à R=1, puis se stabilise lorsque R>1, contrairement au carbone, à l'hydrogène et à l'azote. Ceci est confirmé par la *Figure 62* obtenue à partir de la conversion du %S en DS par l'intermédiaire des deux équations (1) et (2) décrites dans la partie expérimentale. Le DS atteint les valeurs de 0,69 et 0,45 pour les CHT1S et CHT2S, respectivement.

Tableau 13. Pourcentages massiques des éléments C, H, N et S présents dans le CHT et les deux séries CHT1S et CHT2S déterminés par analyse élémentaire. Les valeurs calculées des degrés de substitution (DS) et teneur en groupements sulfonate (SO_3^-) sont exprimées en $mmol.g^{-1}$

	R	C%	H%	N%	S%	DS	SO ₃ ⁻ (mmol/g) %S
CHT	0	40,19	7,121	7,55	-	-	-
CHT1S	0,25	36,44	6,192	5,89	3,236	0,196	1,10
	0,5	35,42	5,955	5,2	5,499	0,398	1,72
	0,75	35,04	5,77	4,74	6,989	0,562	2,18
	1	34,53	5,988	4,55	7,436	0,615	2,32
	1,5	33,97	5,493	4,22	7,901	0,673	2,47
	2	33,22	5,439	4,12	7,981	0,683	2,49
CHT2S	0,25	39,76	6,596	6,19	5,82	0,193	1,82
	0,5	41,05	6,161	5,21	6,733	0,241	2,10
	0,75	41,46	5,853	4,61	8,499	0,347	2,66
	1	41,69	5,819	4,4	9,369	0,406	2,93
	1,5	41,88	5,79	4,26	9,908	0,445	3,10
	2	42,03	5,781	4,19	10,097	0,459	3,16

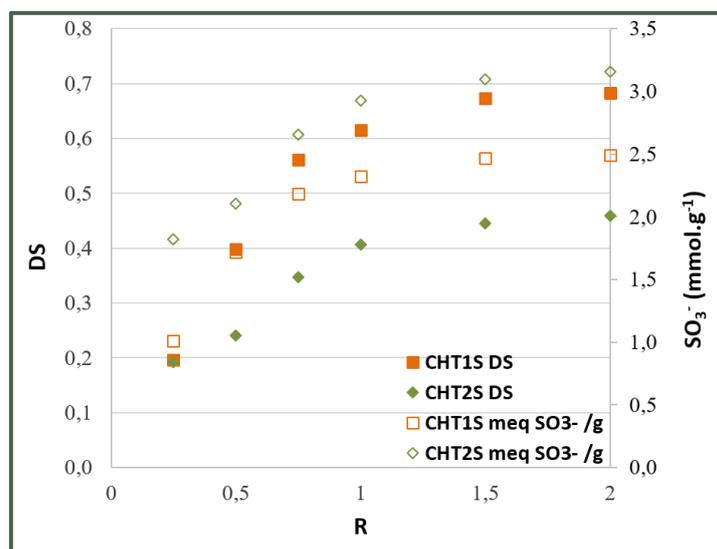


Figure 62. Les courbes des degrés de substitution et la teneur en SO_3^- des dérivés sulfonés en fonction du ratio molaire R, calculés à partir des relations empiriques (partie expérimentale)

Ces résultats sont en accord avec les valeurs calculées par 1H -RMN (DS=0,71 et 0,51 respectivement) et révèlent que, bien que la valeur maximale de DS soit inférieure, les copolymères CHT2S contiennent plus de groupements sulfonate que les CHT1S, en raison de la présence de deux groupements sulfonate par groupement benzyle.

Ainsi, la ^1H -RMN et l'analyse élémentaire sont deux méthodes de caractérisation quantitatives et fiables, qui prouvent que ; i) la composition des deux séries CHT1S et CHT2S peut être contrôlée par le rapport R, plus particulièrement pour $0 < R < 1$; ii) des dérivés CHT1S et CHT2S ayant respectivement des teneurs en soufre de 7,98% et 10,1% et des valeurs DS atteignant 0,69 et 0,46 lorsque $R=2$.

I.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-IRTF)

Les spectres obtenus à partir du CHT, CHT2S2, CHT1S2 ainsi que les deux agents de sulfonation BZ1S et BZ2S sont représentés dans la *Figure 63* suivante.

Le spectre du chitosane montre des bandes caractéristiques, notamment une bande large à $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ correspondant à l'élongation des liaisons O-H des groupements hydroxyle, ou encore des bandes à 1640 cm^{-1} et à 1572 cm^{-1} associées, respectivement, à l'élongation de la liaison C=O des fonctions amides et à la déformation N-H des amines primaires. La bande observée à 1366 cm^{-1} correspondant à la déformation asymétrique de la liaison C-H des méthyles du groupement acétamide et celles à 1053 cm^{-1} et 887 cm^{-1} sont associées à l'élongation des C-O et C-O-C des polysaccharides et la vibration des liaisons glycosidiques.

En observant les spectres des dérivés CHT1S et CHT2S, nous remarquons la diminution de l'intensité de la bande à 1572 cm^{-1} relative à la liaison N-H des amines primaires et l'apparition respective d'un nouveau pic à 1563 cm^{-1} et 1549 cm^{-1} , comparé à celui du CHT. En outre, les bandes observées à 1688 cm^{-1} dans les spectres des deux réactifs de sulfonation BZ1S et BZ2S et relatives aux groupements aldéhyde, disparaissent sur les spectres des deux dérivés. Ces résultats révèlent que la conversion des groupements amine primaire en amine secondaire a bien eu lieu ; ce qui confirme la réaction d'amination réductive entre les groupements amines primaires du CHT et les aldéhydes sulfoniques BZ1S ou BZ2S.

De plus, l'apparition de nouveaux pics dans les spectres du CHT1S et CHT2S, en particulier à 1145 cm^{-1} relatif à l'élongation des groupements sulfonate, à 1012 cm^{-1} correspondant à l'élongation symétrique des O=S=O, et entre 1170 cm^{-1} et 1092 cm^{-1} associé à la vibration des noyaux aromatiques, confirme la présence des groupements sulfonate. Les groupements benzyliques sont mis en évidence par les bandes caractéristiques à 759 cm^{-1} et 699 cm^{-1} pour le CHT1S-2 et à 683 cm^{-1} pour le CHT2S-2 qui correspondent aux vibrations de déformation des C-H présents dans les groupements aromatiques.

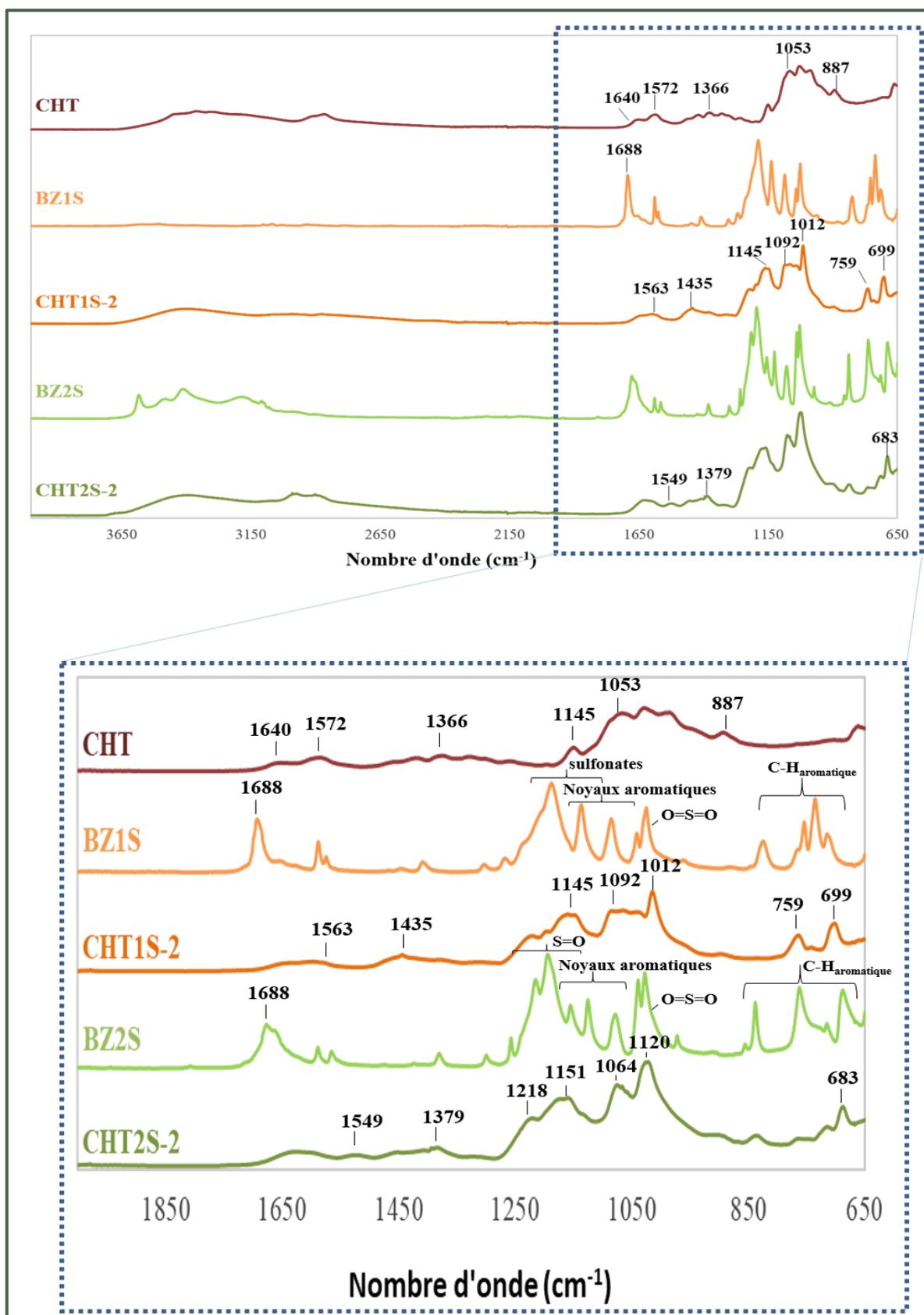


Figure 63. Les spectres FTIR-ATR du CHT, les réactifs aryl mono- (BZ1S) et di-sulfonés (BZ2S), CHT1S-2 et CHT2S-2

I.4. Spectroscopie UV

L'analyse par spectroscopie UV nous a permis de caractériser le greffage des groupements benzyles sur le squelette du CHT. Les spectres UV obtenus sont représentés dans la *Figure 64a*.

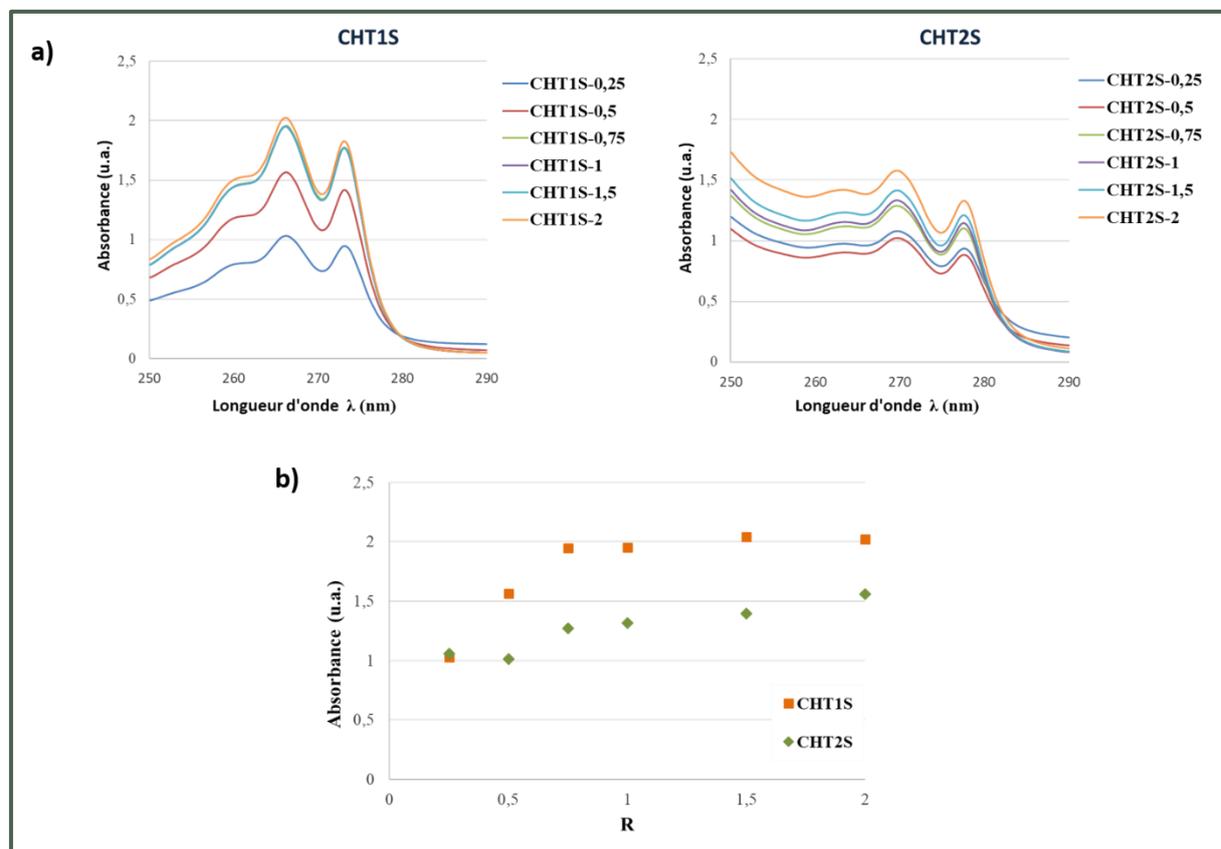


Figure 64. a) Courbes de l'absorbance des CHT1S et CHT2S en fonction du ratio R et b) Courbes de l'absorbance de la série CHT1S à $\lambda = 266$ nm et de la série CHT2S à $\lambda = 269$ nm en fonction du ratio R

Les spectres UV des produits sulfoniques ont révélé la présence de bandes d'absorption supplémentaires, comparé au CHT, à 260 nm, 266 nm et 273 nm pour la série des CHT1S et à 263 nm, 269 nm et 277 nm pour la série des CHT2S. Ces bandes spécifiques, qui sont le résultat de la présence des chromophores, confirment ainsi la présence des groupements aryl sulfonate.

A partir de ces résultats, les courbes d'absorbance maximale centrée à 266 nm et à 269 nm correspondant, respectivement aux CHT1S et CHT2S ont été tracées en fonction du ratio R (cf. *Figure 64b*). Le graphe présente une augmentation de l'absorbance (et donc du DS) lorsque R augmente jusqu'à 1, puis une stabilisation est observée lorsque $R > 1$. Ces observations sont en cohérence avec les résultats obtenus par la $^1\text{H-RMN}$ et l'analyse élémentaire.

I.5. Potentiel zêta

Le potentiel zêta (PZ) du chitosane et de ses dérivés a été mesuré en faisant varier progressivement le pH par ajout de NaOH ou de HCl, respectivement. Les résultats sont donnés dans la *Figure 65*.

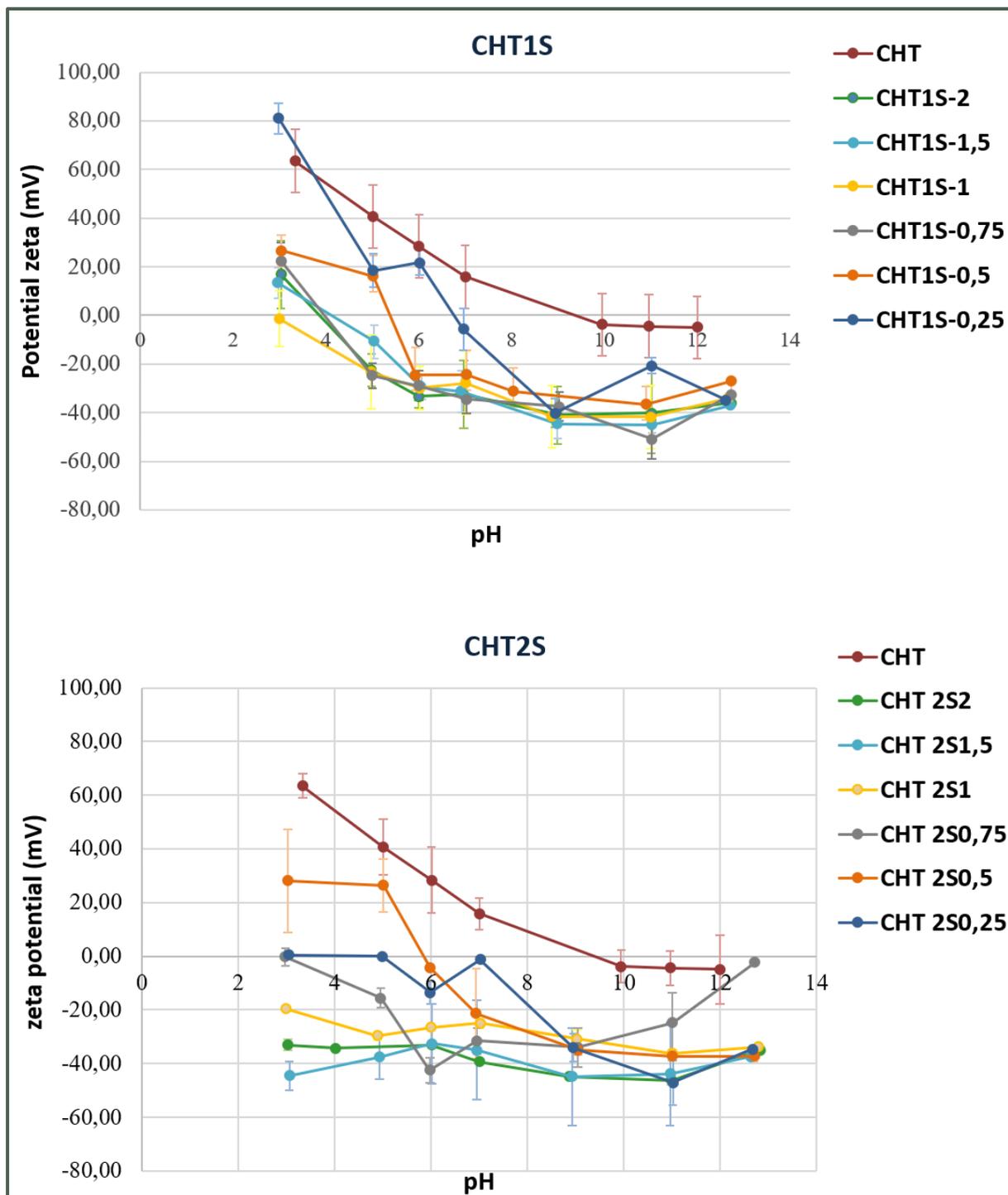


Figure 65. Evolution du potentiel zêta du CHT et des dérivés séries CHT1S et CHT2S en fonction du pH. Les points ont été reliés pour améliorer la lisibilité.

Le PZ du CHT brut non modifié, initialement solubilisé dans une solution aqueuse d'acide acétique dilué à 1% v/v, est de +70 mV à pH 4, et diminue progressivement lors de l'augmentation du pH jusqu'à atteindre une valeur légèrement négative de -10 mV. Ceci s'explique par la déprotonation des groupements ammonium lors de l'ajout de la soude pour former les fonctions amine⁵⁴⁸. En revanche, le PZ des dérivés CHT1S et CHT2S, initialement solubilisés dans NaOH à 0,01M, présente des valeurs négatives aux alentours de -50 mV. La *Figure 65* montre que le PZ des deux séries sulfoniques croît progressivement lors de la diminution du pH (de pH 11 au pH 4), ceci est dû à la protonation graduelle des résidus glucosamine présents dans le polymère lors de l'ajout du HCl dans le milieu.

Les points isoélectriques (PZ=0) de chaque échantillon sont reportés dans le *Tableau 14*.

Tableau 14. Les valeurs de pH au point isoélectrique de chaque dérivé des deux séries. L'incertitude est de 0,5

	R	pH isoélectrique
CHT		9,5
CHT1S	0,25	6,5
	0,5	5,5
	0,75	4,0
	1	3,0
	1,5	4,2
	2	4,0
CHT2S	0,25	5,0
	0,5	6,0
	0,75	3,0
	1	-
	1,5	-
	2	-

Ces résultats mettent en évidence que les groupements ammonium contrebalancent les charges négatives des groupements sulfonate à des valeurs de pH spécifiques. Quant aux CHT2S-2, CHT2S-1,5 et CHT2S-1 les plus substitués le PZ reste négatif (entre -20 et -45 mV approximativement) pour toute la gamme de pH allant de 11 à 4. En effet, la densité des groupements ammonium présents dans ces polymères n'est pas suffisante pour contrebalancer les charges négatives apportées par les groupements benzylsulfonate même à pH très acide.

En outre, les dérivés sulfoniques présentent des PZ fortement négatifs compris entre -20mV et -40 mV, excepté pour le CHT2S-0,25 qui atteint le point isoélectrique, à pH physiologique

(pH 7,4). Ainsi, ces résultats confirment le caractère polyampholytique des deux séries de chitosane sulfonés étudiées.

Cette étude est fondamentale car, au vu des applications biomédicales visées, les interactions de ces polymères avec des composants de l'environnement physiologique notamment des protéines du plasma sanguin et les plaquettes, vont dépendre du potentiel zêta⁵⁴⁸.

I.6. Etude de solubilité

L'étude de solubilité dans l'eau des deux séries CHT1S et CHT2S a été effectuée en faisant varier le pH par ajout de HCl et a été déterminée par observation à l'œil nu (cf. *Figure 66*) et par mesure de transmittance de la solution à 300 nm (*Annexe 6*).

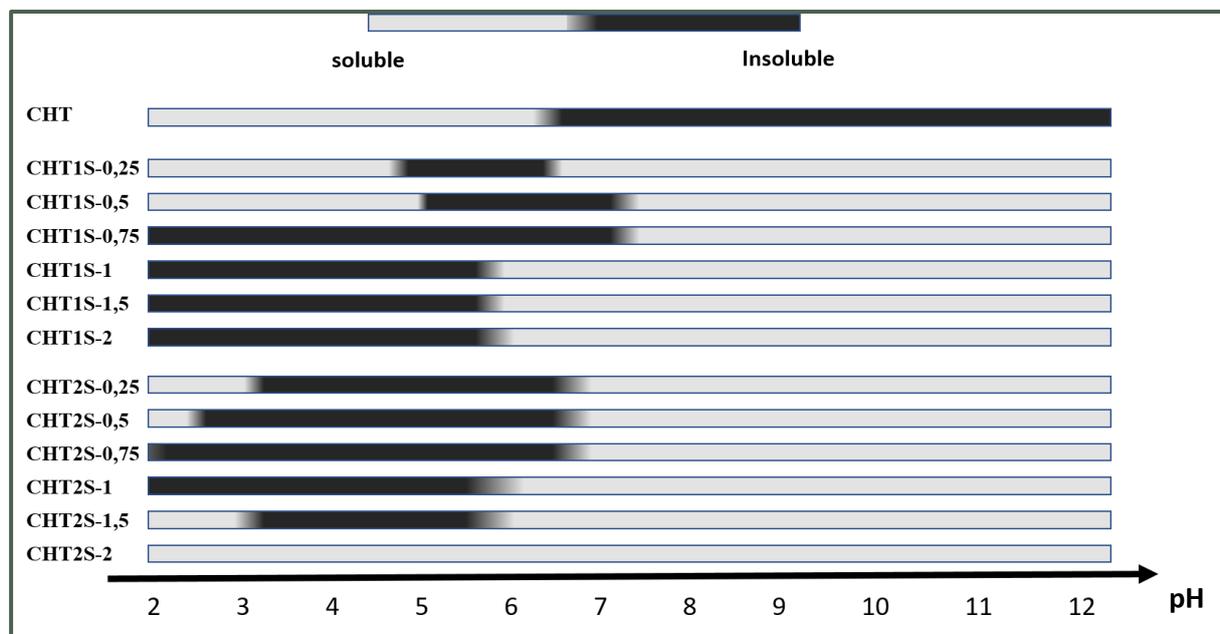


Figure 66. Les domaines de solubilité et d'insolubilité du CHT et des dérivés sulfonés

La *Figure 66* montre que les dérivés sulfoniques sont solubles en milieu basique et neutre (NaOH 0,05M) contrairement au CHT qui est soluble en milieu acide jusqu'à pH 6. Durant la préparation des solutions, une dissolution rapide des produits CHT1S-0,25 et CHT1S-0,5 a été observée, contrairement aux autres dérivés qui nécessitent beaucoup plus de temps (24h).

Lors de l'ajout du HCl, les solutions alcalines initialement limpides deviennent troubles donnant l'aspect de solution colloïdales. Puis, pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 8, le phénomène de floculation est observé. Nous observons que les « flocons » de CHT1S-0,25 ; CHT1S-0,5 et CHT2S-0,25 se re-solubilisent en milieu acide (pH < 6) et présentent ainsi deux

domaines de solubilité à pH acides ($\text{pH} < 6$) et pH basiques ($\text{pH} > 8$). Alors que les produits CHT1S-1 ; CHT1S-1,5 et CHT1S-2 ainsi que CHT2S-0,5 et CHT2S-1 montrent une solubilité à pH basique et une précipitation à pH neutre ($\text{pH} 7$). Enfin, une solubilité à travers toute la gamme de pH étudiée est observée pour le composé CHT2S-2 le plus riche en groupes sulfonates (3,10 meq/g).

Ces résultats résultent de la présence simultanée des groupements amine et aryl sulfonate dans les chaînes des polymères ; ce qui leur confère un caractère polyampholytique plus ou moins prononcé en fonction des DS des produits et de la présence d'un ou de deux groupements sulfonate par groupement benzylsulfonate. De plus, à $\text{pH} < 5$, les unités répétitives de glucosamine non substituées (base faible) sont largement protonées (pK_a du chitosane = 6,5) alors que les substituants aryl sulfonate dont le pK_a est de 2,5 restent sous forme ionique pour toute la gamme de pH étudiée. Les résultats obtenus mettent en évidence les domaines de solubilité des composés dépendent principalement de la balance entre les groupements ammonium et sulfonate présents au sein des chaînes du polymère. En effet, les groupements sulfonate, même en très faible quantité, assurent la solubilité dans le domaine basique alors que la présence des groupements ammonium résiduels permettent la solubilisation en milieu acide.

I.7. Etude de la viscosité dynamique

La viscosité dynamique de chaque produit des deux séries CHT1S et CHT2S, préalablement solubilisés dans NaOH à 0,05M, a été étudiée et présentée dans la *Figure 67*.

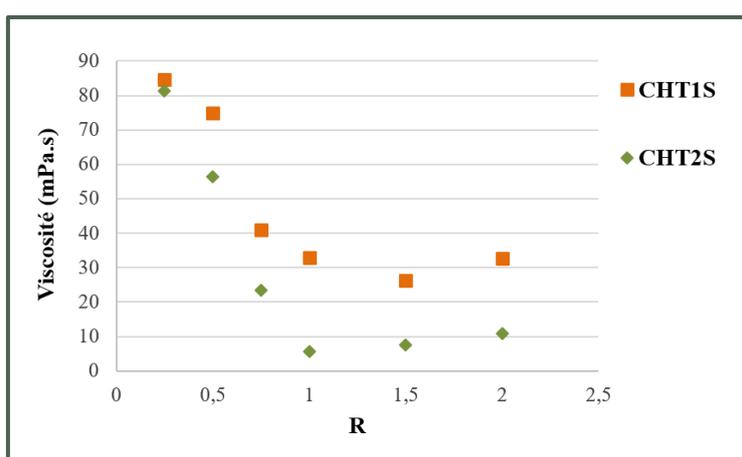


Figure 67. Les viscosités dynamiques des CHT1S et CHT2S à une concentration de 1 wt% solubilisés dans NaOH à 0,05 M en fonction de R

D'après la *Figure 67*, nous remarquons que la viscosité de la série CHT1S est supérieure à celle de CHT2S quelle que soit la valeur du rapport molaire R. De plus, pour les deux types des dérivés, la viscosité diminue quand R augmente. Cette baisse de viscosité est significative pour des rapports molaire R compris entre 0,25 et 1, et moins prononcée pour $R > 1$. De ce fait, lorsque R est faible, les chaînes de polymère sous forme de pelote dans la solution sont très enchevêtrées alors que pour $R > 1$, ces pelotes se replient, sont plus compactes et forment moins d'enchevêtrements. Finalement, la viscosité des produits sulfonés en solution dépend du DS mis en évidence précédemment par RMN, analyse élémentaire et UV-visible.

I.8. Conclusion

Deux séries de CHT sulfonés, CHT1S et CHT2S, ont été synthétisées via la réaction d'amination réductive à partir du CHT brut en utilisant respectivement deux réactifs formylbenzène mono- et di-sulfonés. L'influence du ratio molaire (R) a été étudiée par plusieurs techniques de caractérisation, notamment les deux techniques quantitatives ; la RMN et l'analyse élémentaire, qui ont mis en évidence que le degré de substitution (DS) augmentait avec R jusqu'à atteindre l'équimolarité entre les aldéhydes sulfoniques et les groupements amine libres présents dans le CHT ($R=1$) puis devenait stable pour $R > 1$. Il a été également démontré que, bien que la valeur maximale de DS soit inférieure à celle des CHT1S, les copolymères CHT2S contenaient plus de groupements sulfonate en raison de la présence de deux groupements sulfonate par groupement benzyle.

En outre, il a été prouvé que la réaction de substitution n'était pas complète malgré la présence en excès (deux fois plus) des aldéhydes sulfoniques. Les dérivés CHT1S et CHT2S résultants contenaient donc des groupements amine primaire résiduels, leur conférant un caractère polyampholytique mis en évidence par les mesures du potentiel zêta. Ces produits sulfonés, contrairement au CHT brut, étaient solubles dans des solutions aqueuses basiques et ont montré un potentiel zêta négatif à pH physiologique. Les dérivés sulfonés des deux séries de faible DS ont montré une solubilité aux pH extrêmes.

Enfin, les mesures de viscosité ont montré que la série CHT1S était moins visqueuse que celle des CHT2S et que la viscosité diminuait avec l'augmentation de R.

A la suite des caractérisations physicochimiques, des tests biologiques ont été effectués par la suite afin de s'assurer de leur activité antithrombotique et de leur biocompatibilité.

II. Propriétés biologiques

II.1. Test de cytocompatibilité

La viabilité cellulaire a été évaluée sur le CHT et les deux séries CHT1S et CHT2S par la méthode d'extraction grâce à la méthode du AlamarBlue™ en utilisant des cellules ostéoblastes MC3T3-E1.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme dans la *Figure 68* ci-dessous.

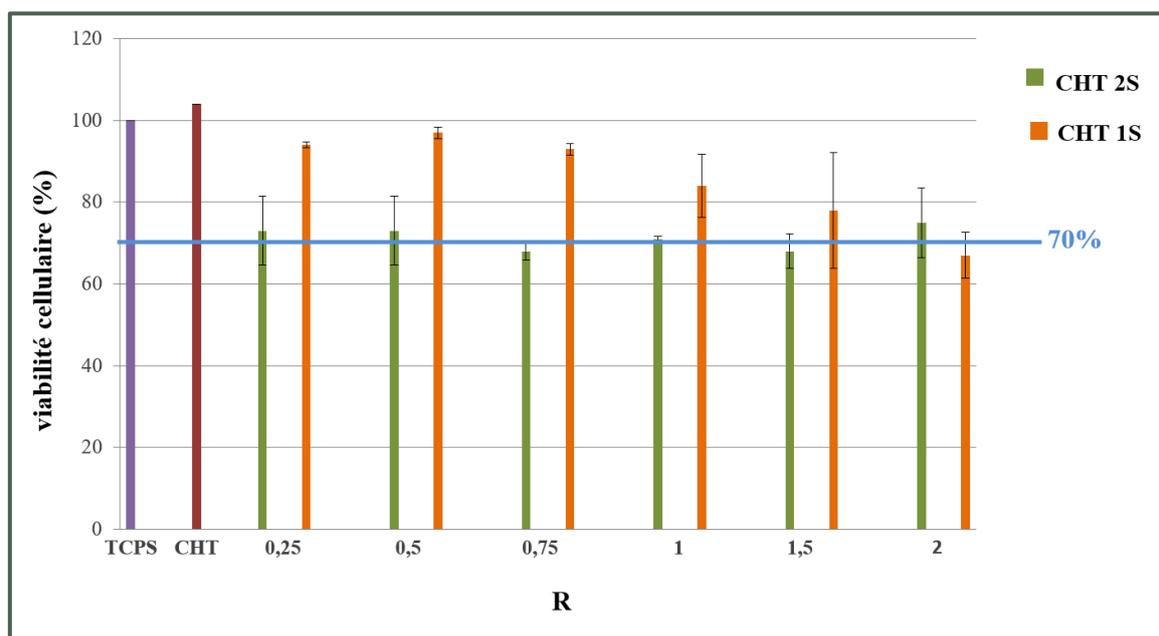


Figure 68. La viabilité cellulaire des polymères CHT, CHT1S et CHT2S en fonction de R déterminée après 24h d'incubation par méthode d'extraction (n=6). Le témoin TCPS correspond au fond de la boîte de culture cellulaire et des cellules ostéoblastes MC3T3-E1 ont été utilisées.

D'après cette figure, nous remarquons que le CHT brut présente une viabilité cellulaire d'environ 100%. Concernant les dérivés sulfonés, nous constatons que pour la série CHT1S, la viabilité cellulaire est quasi équivalente (95%) pour $R < 1$ puis diminue jusqu'à atteindre 70% lorsque R augmente. En revanche, les polymères CHT2S montrent une viabilité cellulaire quasi constante (70-75%) pour toute la gamme de R étudiée. Ceci peut être expliqué par une activité antiproliférative due à la similitude de la structure entre les CHTS et l'héparine. En effet, des études précédentes publiées par Mrabat *et al.* ont prouvé que l'héparine possédait des propriétés antiprolifératives des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire⁵⁵⁹ ou encore par Haroun-Bouhedja *et al.* qui ont rapporté que les groupements sulfonate des fucanes

(polysaccharides sulfatés) inhibaient la prolifération des cellules fibroblastes de type CCL-39 et ont prouvé que cette activité était dépendante de la structure des produits sulfatés, notamment le degré de substitution, la masse molaire et la position des groupements sulfonate^{560,561}. Nous pouvons émettre l'hypothèse que notre biomatériau est lui aussi antiprolifératif, ce qui pourrait expliquer la cytocompatibilité de 70% pour les dérivés disulfonés.

II.2. Etudes de l'hémocompatibilité

II.2.1. Test d'hémolyse

L'hémolyse est la libération dans le plasma de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges à la suite d'une rupture de la paroi de ces globules. Cette dernière est un phénomène naturel intervenant dans le cycle de vie d'un tissu sanguin. Néanmoins, l'hémolyse peut être provoquée suite à l'implantation d'un dispositif médical engendrant une anémie hémolytique (diminution du nombre de globules rouges) à cause de facteurs toxiques ou mécaniques. L'indice hémolytique (IH) (exprimé en %) indique la proportion de globules rouges détruite lors de la mise en contact de l'échantillon à étudier avec du sang complet.

Le test d'hémolyse a été effectué sur les poudres du CHT2S-2 synthétisées et sur le CHT brut. Les résultats montrent que tous les échantillons ne provoquent aucune destruction prématurée des globules rouges puisque tous les index hémolytiques obtenus sont nuls (IH=0%). Ces observations sont en accord avec d'autres études rapportées par la littérature, notamment par Zhou *et al.* et Shelma et Sharma qui ont respectivement prouvé que le CHT et le dérivé sulfonique du CHT ne présentent pas d'activité hémolytique.

Ainsi, au regard de la norme ASTM F756-00(2000), le CHT et le CHT2S-2 sont donc des polymères non hémolytiques.

II.2.2. Test de coagulation

Comme vu précédemment, la cascade de coagulation se caractérise par une voie intrinsèque, une autre extrinsèque et une troisième commune, et résulte d'un enchaînement de réactions protéolytiques qui implique l'activation progressive des facteurs de coagulation présents dans le plasma (cf. *Figure 58, page 119*). Ainsi, différents tests sont nécessaires afin d'étudier l'effet du biomatériau sur chaque voie de la cascade. Parmi les essais les plus courants, nous retrouvons le TCA (temps de céphaline activée), le TP (temps de prothrombine) et l'anti-facteur Xa (anti-Xa).

Ces tests de coagulation visent à étudier le temps que met le plasma pauvre en plaquettes (PPP) qui a été en contact avec le biomatériau à coaguler. Le PPP prélevé met normalement 28 à 30 secondes à coaguler. Ainsi, un temps de coagulation supérieur à 28–30 secondes démontre une transformation plus lente du fibrinogène en fibrine insoluble et retarde la formation du thrombus, ceci mettant en évidence l'activité antithrombotique du biomatériau.

Dans notre étude, nous avons étudié l'impact des deux séries CHT1S et CHT2S sur les voies intrinsèque, extrinsèque et commune de la cascade de coagulation en mesurant le TCA, le TP ainsi que l'activité anti-Xa du plasma sanguin pauvre en plaquettes. Nous avons évalué l'activité antithrombotique des différents polymères en fonction des ratios molaires utilisés pour leur synthèse (rapport R) et de leur concentration. Le PPP d'un adulte a été utilisé comme témoin négatif et le PPP contenant de l'héparine comme témoin positif.

II.2.2.1. Influence du rapport molaire R

La *Figure 69* présente la variation du TCA et du TP en fonction du rapport molaire (R) des deux dérivés CHT1S et CHT2S.

Tous les échantillons, y compris le CHT, les deux séries CHT1S et CHT2S ainsi que le PPP qui n'a pas été en contact avec les échantillons (témoin négatif), n'ont montré aucune activité anti-Xa ($0,09 \text{ U.mL}^{-1}$) contrairement au sang contenant de l'héparine qui a présenté une activité supérieure à 2 U.mL^{-1} .

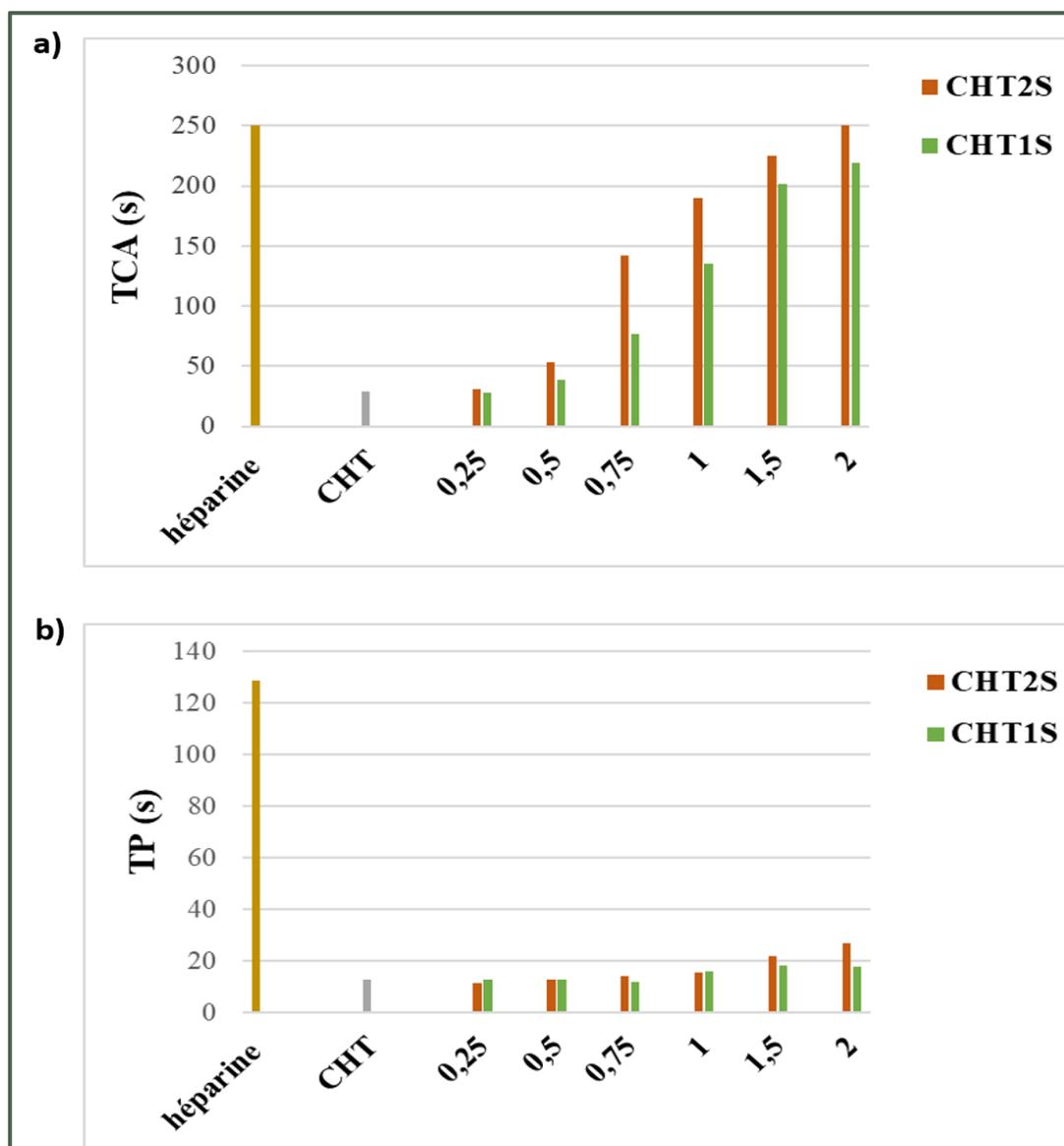


Figure 69. Histogrammes représentant (a) la variation de TCA et (b) la variation de TP en fonction du ratio molaire des deux séries de dérivés CHT1S et CHT2S, du CHT et de l'héparine (témoin positif). Il est important de noter que l'appareil de mesure utilisé ne peut détecter un temps de coagulation supérieur à 250 s. Le TCA du CHT2S-2 est supérieur à 250 s.

Nous remarquons que le CHT brut ne montre aucune activité anticoagulante puisque le TCA (30 s), le PT (12.8 s) et anti-Xa (0,09 UI/mL) obtenus sont identiques à ceux du contrôle négatif à savoir le PPP. En revanche, les dérivés sulfonés des deux séries, à concentration fixe de 1 mg.mL⁻¹, montrent une prolongation significative du TCA et du PT qui dépend du rapport molaire R. En effet, en augmentant R de 0,25 à 2, le TCA croît de 28 s à 219 s pour la série CHT1S et de 31 s jusqu'au-delà de 250 s pour les CHT2S. De la même manière, une augmentation de TP de 12,5 à 18 s pour les dérivés CHT1S et de 11 à 26,6 s pour les CHT2S

est observée. Ceci met en évidence l'influence de l'introduction des groupements sulfonate sur l'activité anticoagulante.

Selon la littérature, les polysaccharides sulfatés présentent de l'activité anticoagulante grâce aux interactions entre les groupements sulfonate chargés négativement et certaines séquences peptidiques des protéines impliquées dans la cascade de coagulation chargées positivement contrairement au CHT qui présente des propriétés hémostatiques à cause des interactions entre les groupements amine chargés positivement et les protéines du plasma chargées négativement⁵⁵⁴⁻⁵⁵⁶. La modification chimique du CHT induit une diminution de la densité des charges positives et une augmentation de la densité des charges négatives produites par les groupements sulfonate. Nous remarquons ici que les dérivés sulfonés ayant un R le plus élevé (R=2) montrent une activité anticoagulante plus importante. Ceci est probablement dû à la densité accrue des charges négatives qui leur a permis de neutraliser les charges positives des résidus d'acides aminés de la thrombine empêchant la transformation du fibrinogène et de prolonger ainsi le temps de coagulation⁵⁵⁷. Néanmoins, l'activité de TP demeure inférieure à celle de l'héparine (valeur maximale de 30 s pour le CHT2S-2 contre 128 s pour l'héparine). Ceci peut être dû à la poudre qui est en suspension dans le PPP et non sous forme dissoute contrairement à l'héparine.

En outre, nous constatons d'après la *Figure 69* que, pour une même valeur de R, l'activité anticoagulante de la série CHT2S est supérieure à celle des CHT1S ; ce qui peut s'expliquer par les mesures du potentiel zeta. A savoir, i) le caractère polyampholytique des dérivés où les groupements sulfonate coexistent avec les groupements ammonium, ii) à pH physiologique (pH=7,4), tous les CHT1S et CHT2S montrent un potentiel zeta négatif quel que soit le DS.

Les résultats obtenus à partir des tests PT et anti-Xa montrent que l'activité des CHT1S et CHT2S sur la voie extrinsèque est très faible et que le facteur-Xa est complètement inhibé. Ainsi, les CHT fortement sulfonés agissent principalement sur la voie intrinsèque.

II.2.2.2. Influence de la concentration

L'activité anticoagulante TCA des deux dérivés CHT1S-2 et CHT2S-2 ainsi que du CHT brut a été évaluée en faisant varier la concentration entre 0,05 et 1 mg.mL⁻¹. Les résultats sont représentés dans la *Figure 70* ci-dessous.

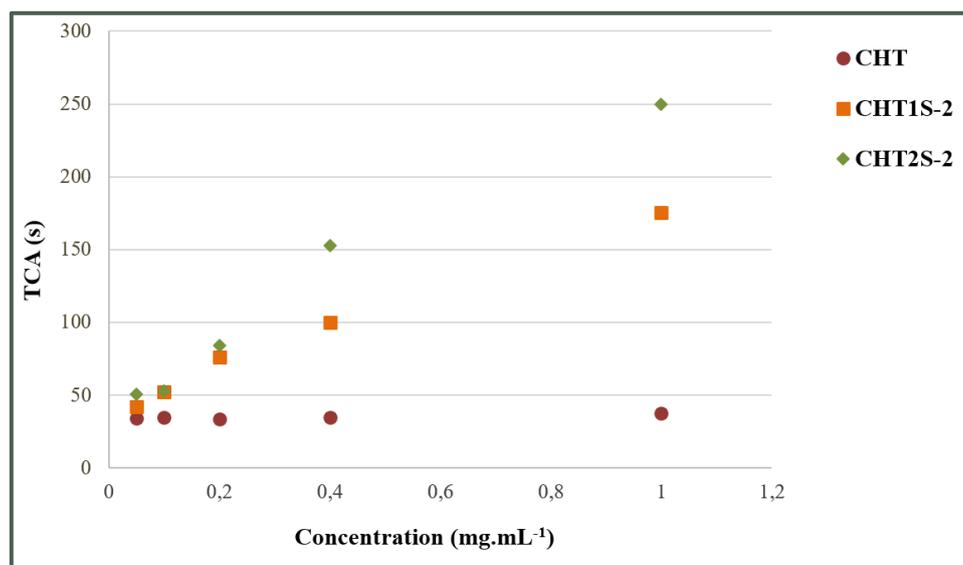


Figure 70. Evolution du TCA à partir de plasma pauvre en plaquettes pauvre en plaquettes en présence du CHT, du CHT1S et du CHT2S à différentes concentrations

Nous remarquons que lorsque la concentration augmente de 0,05 à 1 mg.mL⁻¹, le TCA est prolongé de 42 à 176 s pour le CHT1S-2 et de 51 jusqu'à 250 s pour le CHT2S-2, contrairement au CHT brut qui reste constant pour toute la gamme de concentration étudiée. Nous constatons également que l'activité du CHT1S-2 est plus faible que celle du CHT2S-2. Ces résultats sont en accord avec d'autres études publiées qui ont confirmé que l'activité anticoagulante des dérivés sulfonés était dépendante de la concentration^{554,557,558}.

Ces deux études nous permettent de conclure que le temps de coagulation est plus retardé avec les dérivés disulfonés que les monosubstitués et que l'activité anticoagulante dépend de la concentration des polymères ainsi que du DS.

Une fois les caractérisations physicochimiques et biologiques des poudres des deux séries CHT1S et CHT2S effectuées, nous avons par la suite procédé à l'électrospinning des deux polymères CHT1S-2 et CHT2S-2, car ils présentent la meilleure activité anticoagulante, afin d'élaborer des membranes de nanofibres à propriétés antithrombotiques.

III. Electrospinning du CHT2S-2 et CHT1S-2

Afin d'élaborer des nanofibres des deux polymères CHT1S-2 et CHT2S-2, les paramètres de solution (la concentration) et les paramètres d'électrospinning (le voltage, le débit, la distance) ont été étudiés. Dans un premier temps, l'électrospinning du CHT2S-2 a été exploré puis, dans un second temps, les paramètres optimaux identifiés ont été appliqués et ajustés pour l'électrofilage du CHT1S-2.

III.1. Optimisation de l'électrofilage du CHT2S-2

Le dérivé CHT2S-2 a été solubilisé dans une solution de NaOH à 0,05M. Néanmoins, les premiers essais d'électrospinning ont montré que cette solution ne pouvait pas former des nanofibres (NFs). Ensuite, une deuxième tentative a été étudiée en ajoutant cette fois-ci du NaCl afin d'écranter ces charges mais sans succès. De ce fait, le choix s'est porté sur l'utilisation du PEO qui permet l'électrofilage du CHT comme décrit dans la partie précédente (cf. page 66). Puis, plusieurs ratio massiques CHT2S-2/PEO ont été testés variant de 70/30 à 90/10 (w/w). Le rapport massique CHT2S-2/ PEO 80/20 a été sélectionné car des nanofibres sans défauts.

III.1.1. Influence de la concentration

Afin d'étudier l'influence de la concentration, différentes solutions de CHT2S-2/PEO (80/20) ont été préparées à des concentrations différentes, allant de 2 wt% (pourcentage massique) à 5 wt%, en utilisant NaOH à 0,05M comme solvant.

Dans un premier temps, une étude de l'évolution de la viscosité dynamique en fonction de la concentration a été menée à l'aide d'un rhéomètre et représentée dans la *Figure 71*.

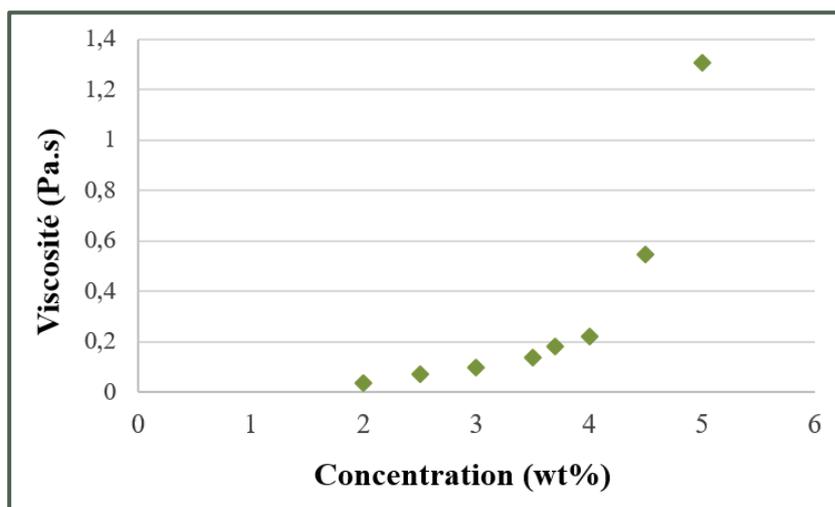


Figure 71. Mesure des viscosités dynamiques des solutions CHT2S2/PEO (80/20) (w/w) en fonction de la concentration

On remarque que la viscosité dynamique augmente avec la concentration notamment au-delà de 3,7 wt% où l'enchevêtrement des chaînes apparaît ($C \gg C^*$)

Dans un second temps, l'effet de la concentration sur l'électrofilage du CHT2S-2 a été étudié. Les paramètres du procédé ont été fixés ; le voltage est de l'ordre de 13-15 kV, le débit

est de $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$ et la distance est fixée à 20 cm. Les images obtenues par MEB sont présentées dans la *Figure 72* ci-dessous.

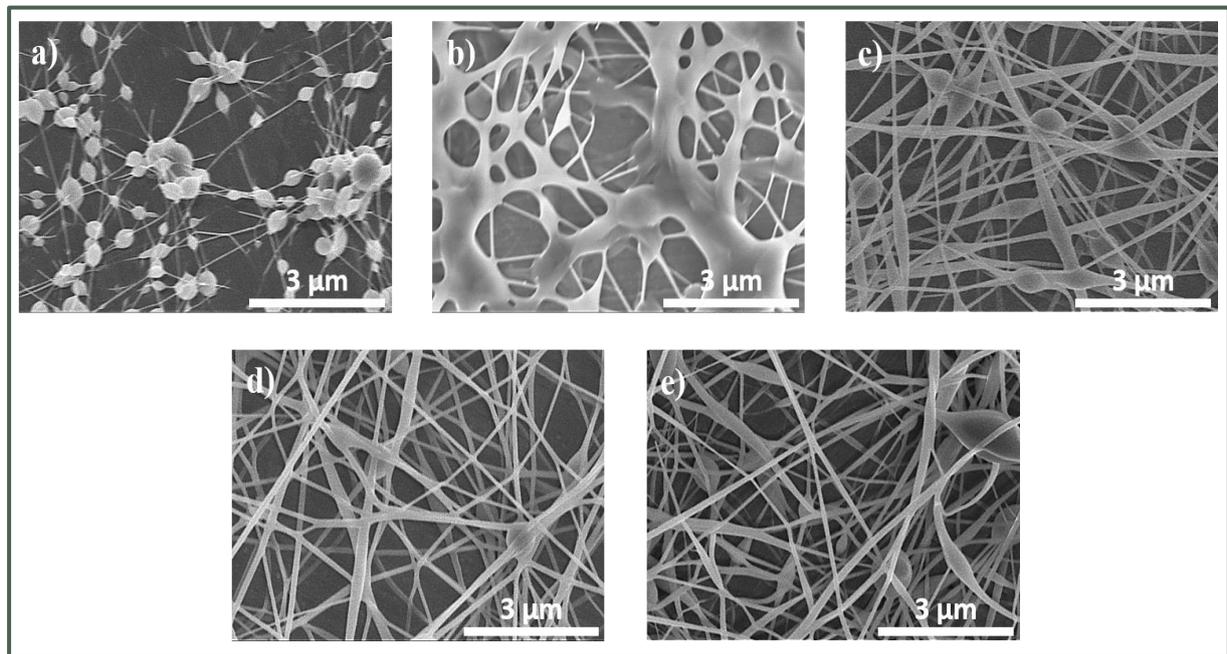


Figure 72. Clichés MEB des nanofibres de CHT2S-2/ PEO (80/20) à partir de différentes concentrations a) 2 wt% ; b) 3 wt% ; c) 3,5 wt% ; d) 3,7 wt% et e) 4 wt%. La température est fixée à $32 \pm 4^\circ\text{C}$, l'humidité relative est de $35 \pm 2 \%$ et tous les échantillons sont électrofilés pendant 15 minutes

Tout d'abord, nous avons étudié l'électrofilage des solutions CHT2S-2 à des concentrations fixes (2; 3; 4 et 5wt%). D'après la figure, on remarque qu'à 2wt%, un dépôt contenant majoritairement des billes est obtenu (*cf. Figures 72a*) alors qu'une concentration de 3 wt% donne un agglomérat de fibres interconnectées provoqué par une mauvaise évaporation de solvant (*cf. Figure 72b*). Lorsque la concentration est de 4 wt%, un dépôt majoritairement composé de nanofibres est observé (*cf. Figure 72e*). En revanche, en augmentant la concentration (5 wt%), la solution devient très visqueuse et impossible à électrofiler. Ainsi, des solutions dont les concentrations sont comprises entre 3,5 wt% et 4 wt% ont été préparées. A une concentration de 3,7 wt%, des nanofibres contenant très peu de billes sont observées (*cf. Figure 72d*). La réapparition de billes entre les concentrations 3,7 wt% et 4 wt% peut être due à l'augmentation de la viscosité des solutions.

En conclusion, la concentration optimale qui permet d'obtenir des nanofibres de CHT2S-2 contenant très peu de billes est de 3,7 wt%. L'optimisation des paramètres du procédé a ensuite été effectuée.

III.1.2. Influence du voltage

Le voltage a été optimisé afin d’obtenir des NFs avec peu, voire sans, billes possédant des diamètres réguliers et dont la dispersité est la plus étroite possible. Différents voltages ont été appliqués allant de 8 kV à 20 kV, en fixant la concentration à 3,7 wt%, le débit à 0,5 mL.h⁻¹ et la distance à 20 cm. Les figures obtenues par le MEB sont présentées dans la *Figure 73* ci-dessous.

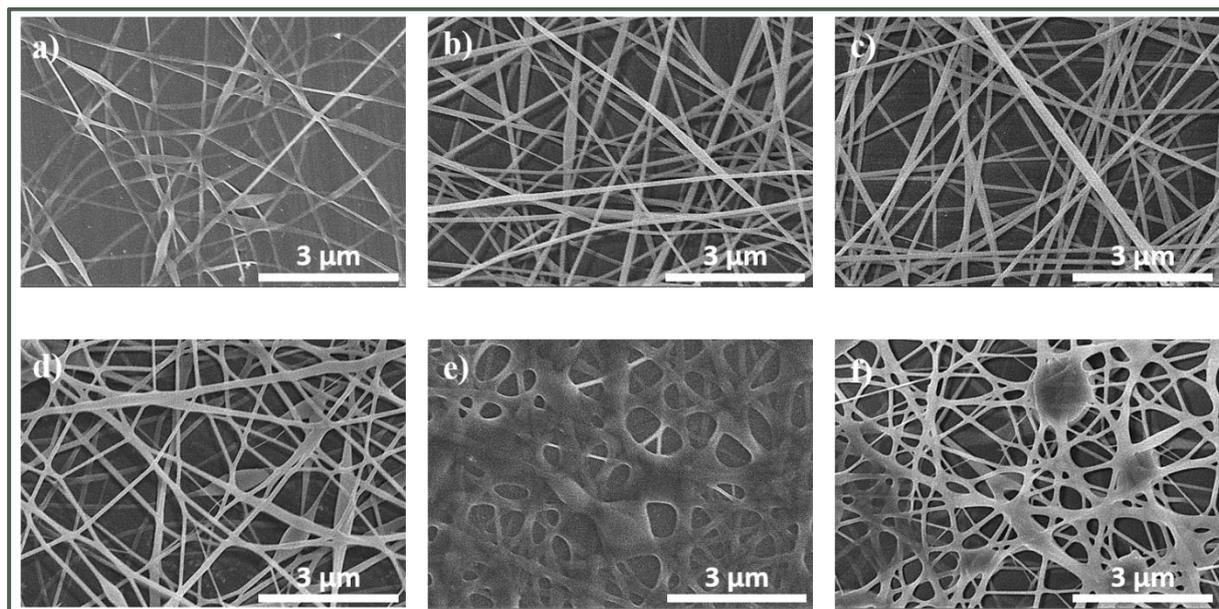


Figure 73. Clichés MEB des nanofibres de CHT2S-2/ PEO (80/20) préparées à une concentration fixe de 3,7 wt% et électrofilées à un voltage de a) 8 kV ; b) 11 kV ; c) 13 kV ; d) 15 kV ; e) 18 kV et f) 20kV. La température est fixée à $32 \pm 4^\circ\text{C}$, l’humidité relative est de $35 \pm 2 \%$ et tous les échantillons sont électrofilés pendant 15 minutes

Nous remarquons que, d’après la *Figure 73*, lorsque le voltage est de 8 kV, peu de nanofibres sont déposées car le voltage n’est pas suffisant pour étirer entièrement et de façon constante la goutte de polymère à la sortie de l’aiguille (cf. *Figure 73a*). En augmentant le voltage jusqu’à atteindre 11 kV et 13 kV, des nanofibres uniformes et sans billes sont déposées sur le collecteur (cf. *Figures 73b et 73c*). A partir d’un voltage de 15 kV, des billes apparaissent (cf. *Figure 73d*) et évoluent sous forme d’agglomérats de fibres interconnectées (cf. *Figure 73e*) jusqu’à atteindre des fibres interconnectées plus « fines » contenant des billes en augmentant le voltage (cf. *Figures 73f*). Ce phénomène peut être dû à l’instabilité du cône de Taylor. En effet, en augmentant le voltage, l’évaporation du solvant est plus rapide ce qui entraîne le « séchage » d’une partie de la goutte du polymère à la sortie de l’aiguille. Cette partie « sèche » va impacter

le débit « d'injection » de la solution du CHT2S-2 de l'aiguille et donc gêner la formation du cône de Taylor. Pour la suite de l'étude, le voltage a été fixé à 11-13 kV.

III.1.3. Influence de la distance aiguille-collecteur

La distance entre l'aiguille et le collecteur a été optimisée en la fixant successivement à 10 cm, 15 cm, 20 cm et 25 cm. Le débit est fixé à $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$ et le voltage est compris entre 11 et 13 kV. La *Figure 74* présente les images obtenues par MEB pour chaque distance étudiée.

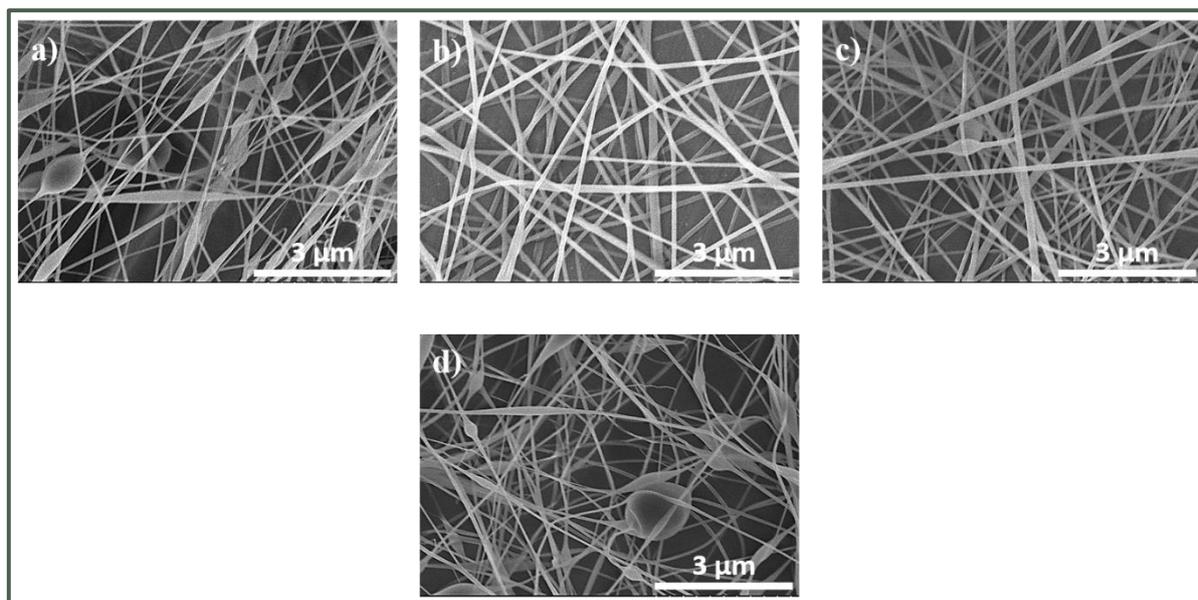


Figure 74. Clichés MEB des nanofibres de CHT2S-2/PEO (80/20) préparées à une concentration de 3,7% dans une solution de NaOH (0,05M) et électrofilées à une distance de a) 10 cm ; b) 15 cm ; c) 20 cm et d) 25 cm. La température est fixée à $32 \pm 4^\circ\text{C}$, l'humidité relative est de $35 \pm 2 \%$ et tous les échantillons sont électrofilés pendant 15 minutes

Nous remarquons que des nanofibres de CHT2S-2 contenant des billes sont obtenues lorsque la distance entre l'aiguille et le collecteur est courte (10 cm) et grande (25 cm) (*cf. Figures 74a* et *74d*). En effet, lorsque la distance est courte, le solvant n'a pas la distance minimale requise pour permettre son évaporation. Au contraire, lorsque la distance est très grande, le champ électrique appliqué (V.cm^{-1}) diminue ce qui empêche un étirement optimal du jet. Les solutions électrofilées à 15 et 20 cm permettent l'obtention de nanofibres plutôt régulières. Le calcul du diamètre moyen et de la distribution des diamètres nous a permis de faire un choix (*cf. Figure 75*). Nous constatons que des nanofibres les moins dispersées avec un diamètre moyen de 114 nm et un écart moyen faible de 37 nm ont été obtenues avec une

distance de 20 cm. Ainsi, pour la suite de l'optimisation, la distance entre l'aiguille et le collecteur a été fixée à 20 cm.

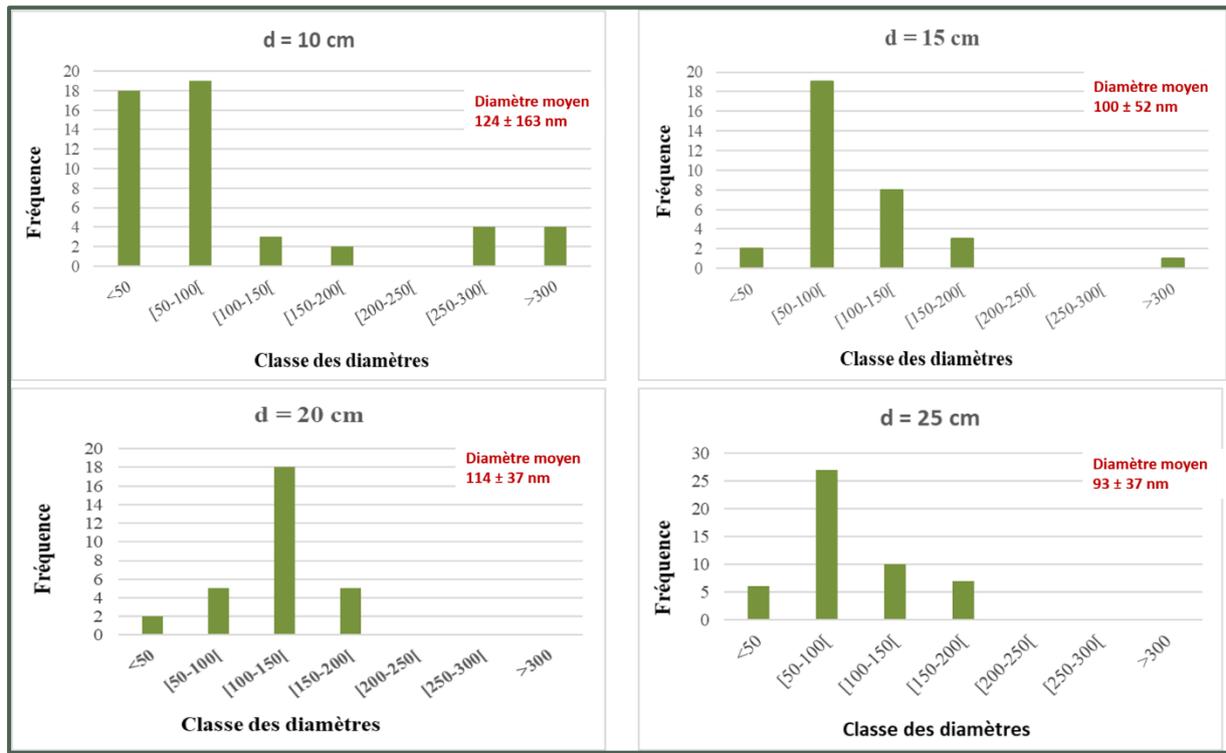


Figure 75. Les histogrammes des distributions des diamètres et les diamètres moyens associés à chaque distance étudiée

III.1.4. Influence du débit

Différents débits allant de $0,1 \text{ mL.h}^{-1}$ au 1 mL.h^{-1} ont été étudiés. Les images obtenues par le MEB sont présentées dans la Figure 76 ci-dessous.

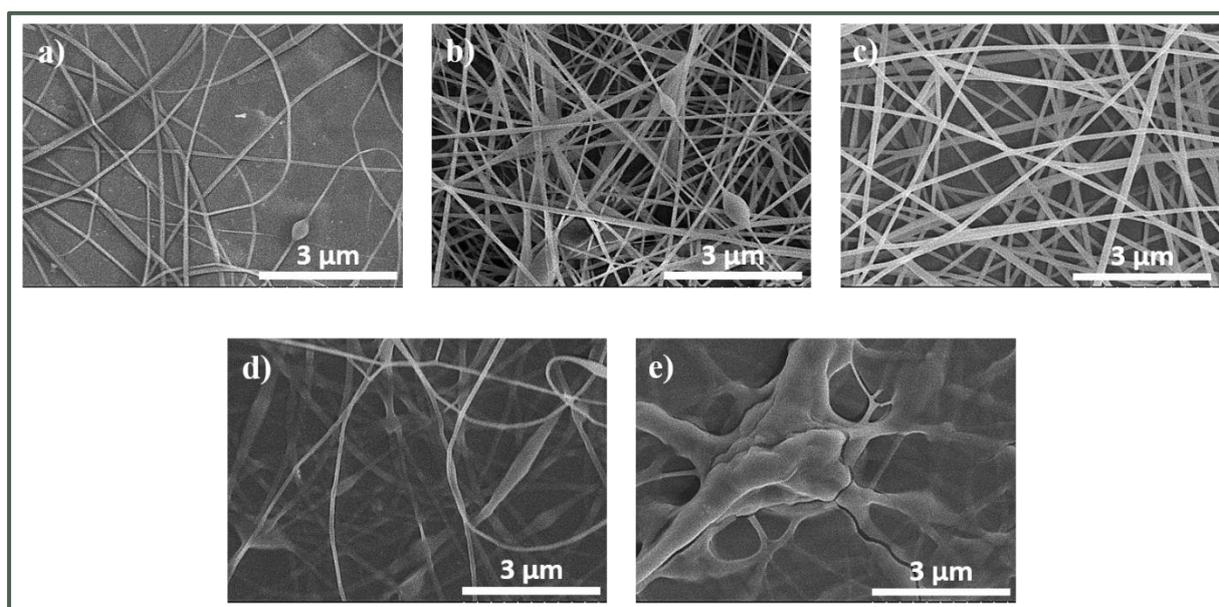


Figure 76. Clichés MEB des nanofibres de CHT2S-2/ PEO (80/20) préparées à une concentration de 3,7 wt% et électrofilées avec un débit de a) 0,1 mL.h⁻¹ ; b) 0,3 mL.h⁻¹ ; c) 0,5 mL.h⁻¹ ; d) 0,8 mL.h⁻¹ et e) 1 mL.h⁻¹. La température est fixée à 32 ± 4°C, l'humidité relative est de 35 ± 2 % et tous les échantillons sont électrofilés pendant 15 minutes

Nous remarquons que, pour un débit très faible (0,1 mL.h⁻¹), très peu de nanofibres sont obtenues (cf. *Figure 76a*). Lorsque le débit est de l'ordre de 0,3 mL.h⁻¹, des nanofibres contenant des billes sont déposées sur le collecteur, et un dépôt de nanofibres régulières est observé pour un débit de 0,5 mL.h⁻¹. Des agglomérats de fibres interconnectées sont obtenus pour des débits de 0,8 et 1 mL.h⁻¹. De ce fait, le débit optimal pour l'électrospinning du CHT2S-2 est de 0,5 mL.h⁻¹.

III.2. Electrofilage du CHT1S-2

Comme indiqué précédemment, les paramètres optimaux identifiés pour l'électrospinning du CHT2S-2 ont été appliqués et ajustés afin d'obtenir des nanofibres de CHT1S-2 sans défauts. Pour ce faire, une solution de CHT1S-2/PEO à 80/20 (w/w) a été préparée dans une solution aqueuse de NaOH (0,05M) à une concentration de 3,7 wt%. Cette solution a été électrofilée en fixant le voltage, la distance entre l'aiguille et le collecteur et le débit, respectivement à 11-13 kV, 20 cm et 0,5 mL.h⁻¹.

A une concentration de 3,7 wt%, des nanofibres contenant énormément de billes ont été obtenues, probablement dues à une faible concentration qui est insuffisante pour favoriser l'enchevêtrement des chaînes nécessaire à la formation de fibres régulières (cf. *Figure 77a*). De ce fait, d'autres concentrations ont été étudiées, notamment 4 wt% et 4,4 wt%. Les images

obtenues par MEB sont présentées aux *Figures 77b* et *77c*. Nous remarquons qu'à une concentration de 4 wt%, des nanofibres contenant moins de billes sont déposées sur le collecteur. Nous avons donc augmenté la concentration de la solution jusqu'à atteindre 4,4 wt% ; ce qui a permis d'obtenir des nanofibres sans défaut ayant un diamètre moyen de 135 ± 54 nm.

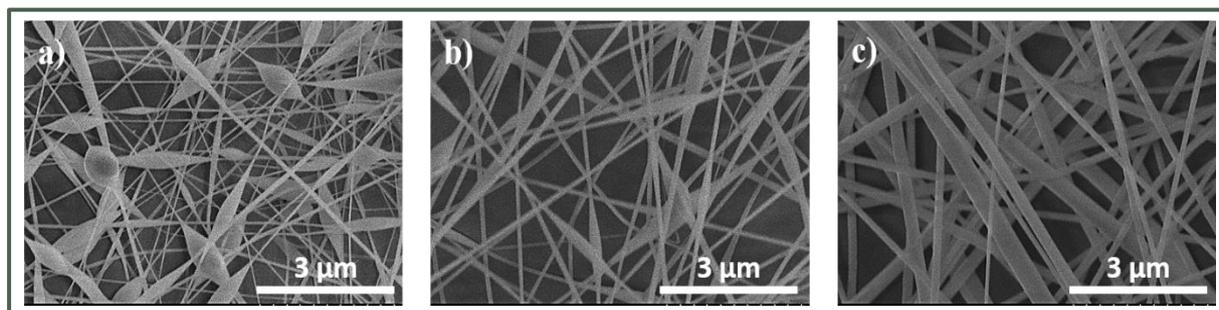


Figure 77. Clichés MEB des nanofibres de CHT1S-2/PEO (80/20) à une concentration de a) 3,7 wt%; b) 4 wt% et c) 4,4 wt%. La température est fixée à $32 \pm 4^\circ\text{C}$, l'humidité relative est de $35 \pm 2\%$ et tous les échantillons sont électrofilés pendant 15 minutes

III.3. Conclusion

Des nanofibres des deux dérivés CHT1S-2 et CHT2S-2 ont été obtenues dont les paramètres optimaux sont regroupés dans le *Tableau 15* ci-dessous.

Tableau 15. Les paramètres optimaux pour l'élaboration des nanofibres de CHT1S-2 et CHT2S-2

		CHT2S-2	CHT1S-2
Paramètres de solution	Ratio CHTS/PEO (w/w)	80/20	80/20
	Solvant	NaOH 0,05M	NaOH 0,05M
	Concentration	3,7 wt%	4,4 wt%
Paramètres du procédé	Voltage	11-13 kV	11-13 kV
	Distance	20 cm	20 cm
	Debit	0,5 mL.h ⁻¹	0,5 mL.h ⁻¹
Diamètres des fibres		114 ± 37 nm	135 ± 54 nm

IV. Stratégie alternative : sulfonation des nanofibres du chitosane

Contrairement aux travaux précédents qui présentaient l'électrofilage du chitosane sulfoné, cette stratégie consiste en l'electrospinning de CHT dans un premier temps et la sulfonation des nanofibres par l'utilisation des réactifs BZ2S dans un second temps.

Des nanofibres de chitosane ont été élaborées selon les conditions d'électrofilage déterminées dans la partie précédente du manuscrit (cf. page 79). La membrane nanofibreuse de 4 x 4 cm (10 mg) a été immergée dans une solution de BZ2S (25 mg) dans 10 mL de méthanol, à des temps d'immersion différents (5, 7 et 10 minutes). Après quoi, la membrane est introduite dans une solution d'agent réducteur NaBH_3CN (6,7 mg) dans 10 mL de méthanol pendant 30 minutes. La membrane fonctionnalisée est rincée à l'eau distillée et laissée sécher à l'air libre à température ambiante.

IV.1. MEB

L'effet de la fonctionnalisation sur la morphologie des nanofibres a été étudié en observant la membrane au MEB (cf. Figure 78).

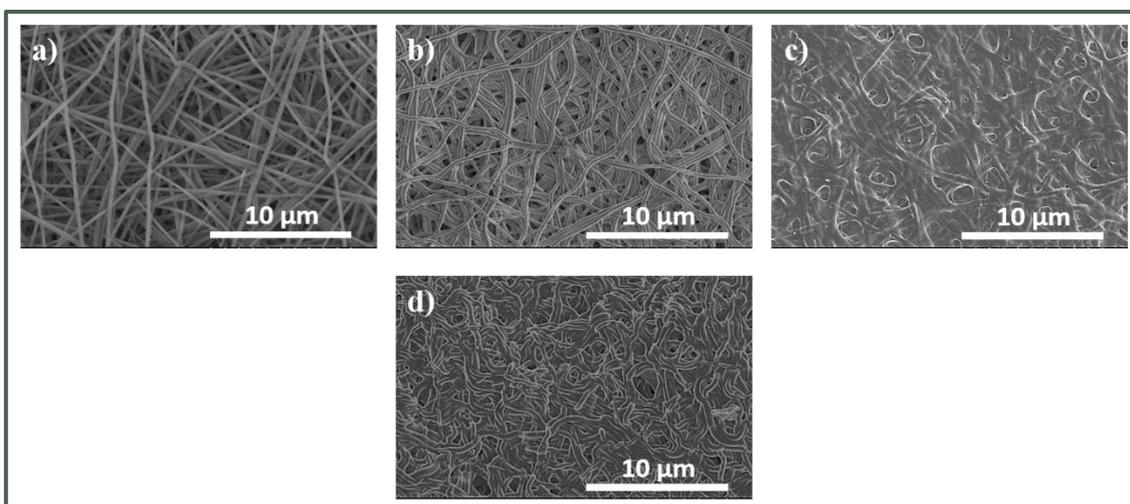


Figure 78. Clichés MEB des nanofibres avant (a) et après 5 min (b), 7 min (c) et 10 min (d) dans le BZ2S puis 30 min dans le NaBH_3CN

En observant les clichés obtenus, nous remarquons qu'une durée de traitement dans le bain de BZ2S pendant 5 minutes permet de préserver la structure fibreuse et poreuse de la membrane. En revanche, un phénomène de gonflement des nanofibres et une perte de la porosité sont observés pour un temps d'immersion supérieur à 5 minutes.

IV.2. IRTF-ATR

Une analyse par spectroscopie IRTF-ATR a été effectuée dans le but de confirmer la sulfonation de la membrane du chitosane (cf. Figure 79). Le spectre obtenu pour les NF de CHT fonctionnalisées (NF CHT2S) a été comparé avec celui du CHT, du BZ2S et du CHT2S-2 (poudre précédemment synthétisée).

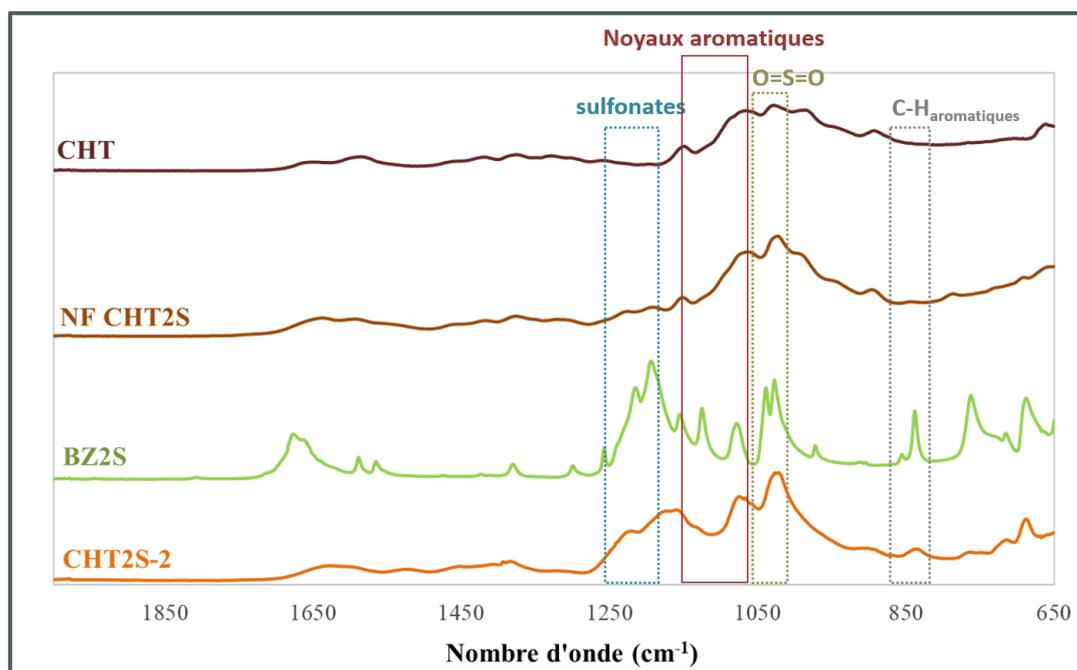


Figure 79. Spectres IRTF-ATR du CHT, CHT2S-2, du BZ2S et des nanofibres du CHT2S-2 (NF CHT2S)

Le résultat obtenu pour les NF CHT2S permet de mettre en évidence la présence des pics aux alentours de 1200 cm⁻¹ relatif à l'élongation des groupements sulfonate, à 1030 cm⁻¹ correspondant à l'élongation symétrique des O=S=O, et à 1090 cm⁻¹ associé à la vibration des noyaux aromatiques. Néanmoins, l'intensité de ces pics est relativement faible comparé au spectre de CHT2S-2 ce qui nous permet de supposer que les groupements sulfonate benzylique ont été greffés sur les nanofibres mais à très faible quantité. Ce faible signal des groupes aryl sulfonates peut s'expliquer par la modification chimique qui a lieu uniquement à la surface des nanofibres.

IV.3. ¹H-RMN

Le spectre ¹H-RMN à 300 MHz des nanofibres de CHT sulfonées dans le BZ2S pendant 5 minutes est présenté dans la Figure 80 et comparé au spectre du dérivé CHT2S-2.

En comparant les deux spectres, la présence d'un seul pic dans la zone des aromatiques (7-8 ppm) est observé. De plus, un signal à 2,5 ppm peu résolu (sous forme de massif) ne permet pas d'exploiter les résultats correctement. Le spectre des nanofibres de chitosanes sulfonés à posteriori montre donc une réaction de sulfonation peu prononcée via ce procédé en deux étapes. Toutefois, comme indiqué précédemment, comme cette sulfonation se produit uniquement en surface des nanofibres, il est possible que la densité de surface des groupements

sulofnates soit quand même comparable selon les deux stratégies. Ceci pourrait être approfondi dans une étude ultérieure.

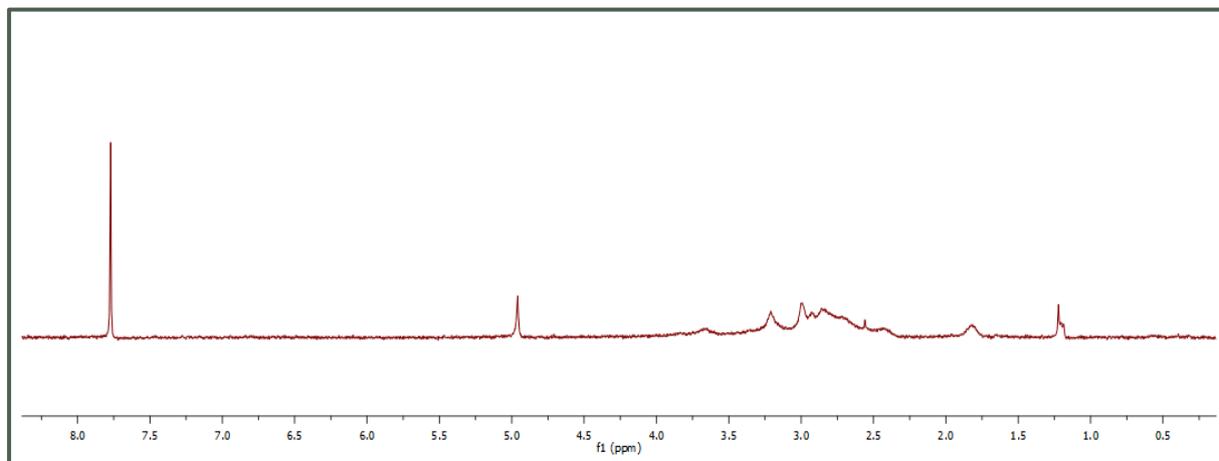


Figure 80. Spectre ^1H -RMN des nanofibres de CHT sulfonées pendant 5 minutes dans le BZ2S (bleu). Le spectre de la poudre CHT2S (noir) est fourni pour pouvoir comparer

V. Conclusion

Des nanofibres à base de dérivés sulfoniques du CHT ont été élaborées avec succès via l'électrospinning.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé deux séries de CHT sulfonés, mono- (CHT1S) et di-sulfonés (CHT2S) en greffant, respectivement, des groupements aryl monosulfoné ou disulfoné sur l'unité glucosamine du CHT par la réaction d'amination réductive. Différents ratios molaires R (rapport entre les unités de répétition glucosamines du CHT et les deux réactifs de sulfonation BZ1S et BZ2S) ont été étudiés. Il a été démontré que pour les deux séries, le degré de substitution et la teneur en groupements sulfonate dépendaient de R surtout quand R est compris entre 0,25 et 1. En revanche, quand $R > 1$, une influence réduite est observée. En outre, il a été prouvé que le DS de la série CHT1S est supérieur à celui des CHT2S mais que la teneur en groupements sulfoniques était supérieure pour les dérivés disulfoniques à cause de la présence de deux groupements sulfonate par noyau benzénique. Des caractérisations physicochimiques ont été effectuées et ont permis de mettre en évidence le caractère polyampholytique des deux séries sulfoniques.

Dans un second temps, des caractérisations biologiques ont été réalisées sur les poudres des polymères sulfoniques. Tout d'abord, la cytocompatibilité des polymères sulfoniques a été mise en évidence. Puis, il a été démontré que tous les dérivés étaient non-hémolytiques. Enfin,

trois tests de coagulation ont été effectués ; le TCA, le TP et l'anti-Xa. Les résultats obtenus ont montré que les polymères agissaient majoritairement sur la voie intrinsèque de la cascade de la coagulation. De plus, l'activité anticoagulante augmentait avec le rapport R et avec la concentration, et était plus importante au sein de la série CHT2S que celle des CHT1S.

Dans un troisième temps, l'électrospinning des deux polymères CHT1S-2 et CHT2S-2 a été étudiée. Les paramètres optimaux permettant d'obtenir des nanofibres uniformes sans défauts, notamment la concentration, le voltage, le débit et la distance entre l'aiguille et le collecteur, ont été identifiés. Des tests de coagulation sur les nanofibres de CHT sulfonés sont en cours afin de vérifier si le procédé d'électrofilage n'altère pas l'activité biologique du CHT sulfoné.

QUATRIEME PARTIE.

POSITION DE LA MEMBRANE ELECTROFILEE AU

REGARD DE LA REGLEMENTATION

EUROPEENNE

Un dispositif médical (DM) est un produit de santé qui a été défini par l'article 1, paragraphe 2a de la Directive Européenne 93/42/CEE du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux comme étant « *tout instrument, appareil, équipement, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, y compris le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostique et/ ou thérapeutique, et nécessaire pour le bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins :*

- *de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement ou d'atténuation d'une maladie,*
- *de diagnostic, de contrôle, de traitement, d'atténuation ou de compensation d'une blessure ou d'un handicap,*
- *d'étude ou de remplacement ou modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique,*
- *de maîtrise de la conception,*

Et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. ».

De cette définition, il résulte que les DM couvrent un ensemble assez vaste et hétérogène de dispositifs, allant d'une simple technologie (pansement, seringue) à une gamme plus complexe, comme la prothèse vasculaire ou le robot chirurgical.

Le cycle de vie d'un DM démarre d'une simple identification d'un besoin et se compose de cinq phases, allant de la mise en preuve du concept, la fabrication d'un prototype jusqu'à l'industrialisation et la distribution du DM (cf. *Figure 81*). Une des phases clés de ce processus, celle relative à la demande du marquage CE, sans laquelle la mise sur le marché du DM devient impossible.

Le marché des DM est extrêmement réglementé. En effet, la mise sur le marché d'un DM, et plus particulièrement des DM implantables (DMI), obéit à un cadre juridique précis, à la fois complexe et chronophage. Elle passe par plusieurs études techniques préalables dont l'objectif est de prouver la conformité du dispositif au regard des **exigences essentielles** qui ont été établies par le Conseil des Communautés Européennes. Ainsi, pour commercialiser un produit en Europe, le **marquage CE** est obligatoire et est obtenu, pour une durée de cinq ans, à la suite

d'un contrôle qui doit être, selon la Directive 93/42/CEE, effectué par un organisme notifié (ON).

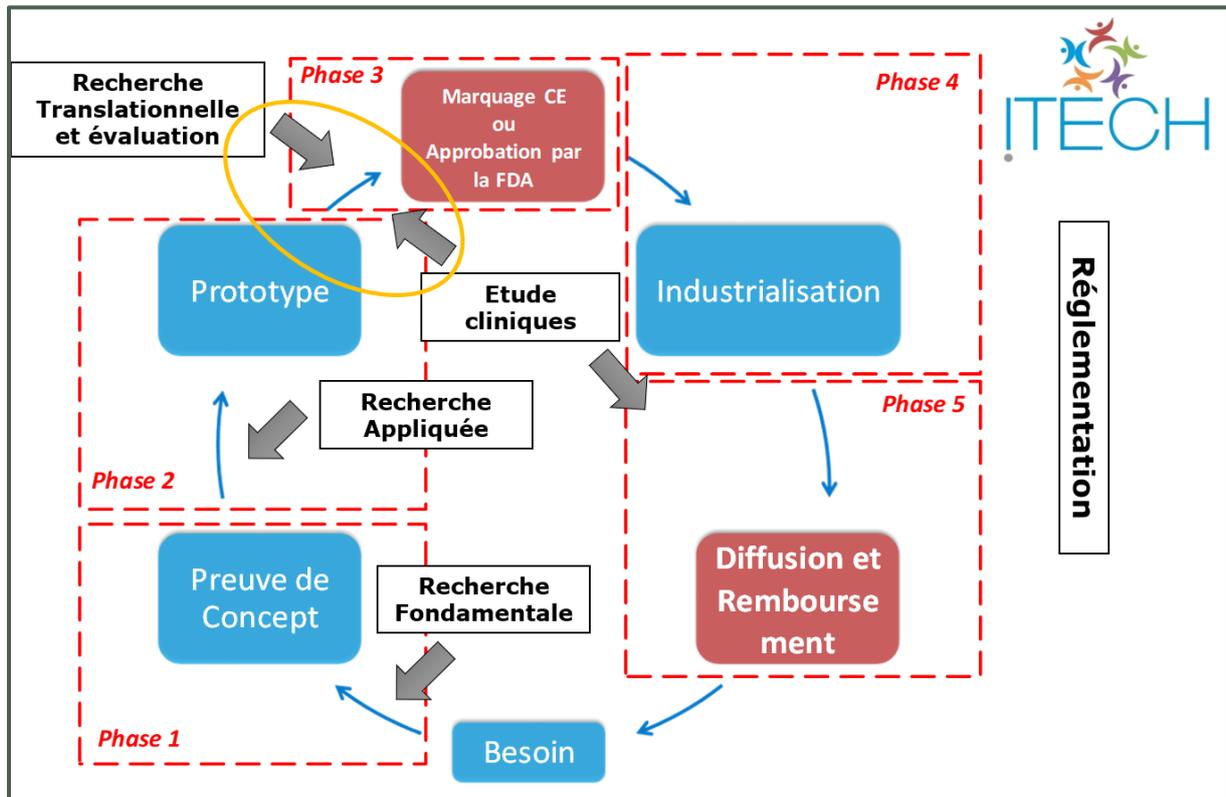


Figure 81. Représentation du parcours d'un dispositif médical

ETUDE DE CAS

Conception d'un biomatériau à base de nanofibres à propriétés ostéoinductrices pour l'ingénierie tissulaire osseuse

1. Développement du biomatériau

CAHIER DES CHARGES PRODUIT

Plusieurs considérations liées au produit doivent être prise en compte :

- Biocompatibilité : ISO 10993-5
- Stérilisation : ISO 11737

- Biodégradation : ISO 10993-13
- Propriétés mécaniques : ISO 17025
- Ostéoinduction (bioactivité) : ISO 22794 (matériaux implantables de comblement et de reconstruction osseuse en chirurgie orale et maxillo-faciale)
- Stabilité dans le temps : ISO 17025

QUELLE EST LA CLASSE DE CE PRODUIT ?

L'Agence de la « Global Medical Device Nomenclature » a établi une classification internationale dans laquelle quatre catégories ont été identifiées et définies en fonction du niveau de risque qu'elles peuvent engendrer sur les patients (I, IIa, IIb, III). La première, ou **classe I**, couvre les produits à risque faible (fauteuils roulants, bande de contention) ; la **classe IIa** couvre les produits à moyen-faible risque (aiguilles de seringue, tubes pour anesthésie) ; la **classe IIb** concerne les produits à moyen-haut risque (stylos injecteurs d'insuline, implants dentaires) et la **classe III** porte sur les produits qui sont à haut risque (pompes cardiaques, implants mammaires).

Afin d'identifier la classe de notre produit, il est nécessaire de se reporter à la règle 8 de l'annexe IX de la Directive 93/42/CEE à propos des dispositifs médicaux implantables. Dans notre cas, il s'agit d'un dispositif à base de nanofibres destiné à être implanté totalement pour réparer/régénérer un défaut osseux. Ainsi, notre biomatériau fait partie des dispositifs de la classe III.

2. Stratégie réglementaire

QUELLE STRATEGIE REGLEMENTAIRE ADOPTER ?

Dans le cas d'un dispositif de la classe III, plusieurs routes réglementaires s'offrent à nous pour obtenir le marquage CE. Prévues par l'article 11 de la Directive 93/42/CE relatif à l'évaluation de la conformité, elles portent sur la possibilité de suivre la procédure qui est relative à:

- La déclaration CE de conformité (système complet d'assurance de qualité), visée à l'annexe II
- L'examen CE de type visé à l'annexe III en association avec, soit la procédure de vérification CE visée à l'annexe IV, soit la procédure relative à la déclaration CE de conformité (assurance de la qualité de la production) visée à l'annexe V.

Même si ces procédures conduisent de façon identique au marquage CE, elles diffèrent néanmoins légèrement en ce qui concerne leurs approches comme nous le verrons plus loin :

ROUTE REGLEMENTAIRE ANNEXE II

Cette route réglementaire couvre le **système qualité complet** du fabricant et comprend les aspects **conception, fabrication et contrôle final** des produits. La vérification de la conformité de l'organisation sera réalisée sur site par l'ON lors de la réalisation d'un audit ad hoc.

L'étude de l'organisation et des procédures en place permettra de vérifier, d'une part, que le type qui est soumis au contrôle est conforme aux exigences essentielles et, d'autre part, que les procédures de fabrication et de contrôle permettront de garantir que la production soit conforme au type.

Cette route réglementaire implique un seul audit de la part de l'ON.

ROUTE REGLEMENTAIRE ANNEXE III ET ANNEXE IV

Dans ce cas spécifique :

- L'annexe III décrit la procédure par laquelle l'ON pourra attester que le « **type** » **fourni est conforme aux Exigences Essentielles**. Cela consistera en l'étude du dossier technique fourni par le fabricant. Cette étude doit contenir entre autres une description générale du type et des variantes prévues ainsi que l'utilisation envisagée, des dessins de conception et la méthode de fabrication envisagée, des normes utilisées pour l'obtention des résultats lors des essais de conception, des évaluations précliniques et cliniques réalisées, le projet d'étiquetage ainsi que diverses déclarations qui concernent la sécurité des éléments utilisés dans la conception.
- L'annexe IV est spécifique à la **vérification de la conformité au type initial d'un échantillon issu de la production**. A ce titre, soit chaque nouveau produit devra être contrôlé par l'ON, soit par le biais d'un prélèvement statistique d'un produit parmi un lot homogène de production.

ROUTE REGLEMENTAIRE ANNEXE III ET ANNEXE V

Cette route réglementaire induit l'étude par l'ON du dossier technique du type fourni pour vérification de sa **conformité aux Exigences Essentielles** (Annexe III) accompagnée d'une **évaluation système d'assurance qualité de la production** (Annexe V).

Dans ce cas, le champ d'application tourne autour des deux axes suivants: **la fabrication et le contrôle final des produits.**

Ainsi, le fabricant s'engage à respecter les procédures décrites et l'ON réalise un audit de contrôle sur site.

CONCLUSION

A la lumière de ces différents scénarios, il apparaît clair que du point de vue du fabricant la route réglementaire « Annexe II » est à privilégier pour des questions de coût et de délai. Elle est effectivement basée sur un « unique » audit alors que les autres sont applicables. Le but est d'avoir au préalable une étude sur table des dossiers techniques de nouveaux produits, suivie de différents audits sur site.

La route « Annexe II » est donc privilégiée dans notre cas.

QUELLE SONT LES EXIGENCES ESSENTIELLES APPLICABLES ?

La réponse à cette question se trouve dans l'Annexe I de la Directive 93/42/CE. Comme pour tous les dispositifs médicaux, notre dispositif devra répondre aux exigences générales numérotées 1 à 6bis et à d'autres exigences spécifiques au type et à la classe du dispositif. Dans notre cas les Exigences Essentielles (EE) qui doivent être appliquées sont : EE 7, EE 8, EE 9 et EE 13.

EE 1 : LA SANTE ET LA SECURITE DES PATIENTS, DES TIERS, OU DES UTILISATEURS

Utilisation du chitosane de grade médical : mise à disposition des fiches de spécification des produits et caractérisation des matières premières : qualité, impuretés.

Une **analyse de risque** doit être établie, dans laquelle chaque risque doit être identifié, évalué et maîtrisé (avec une évaluation de l'acceptabilité basée sur le rapport bénéfice/ risque).

Un **dossier de gestion des risques**, décrivant le produit et son contexte d'utilisation, dans lequel sont reportés la finalité du dispositif, les conditions d'utilisation prévues, le bénéfice thérapeutique, etc. est reporté.

Essai clinique de non infériorité : recueil des résultats de tolérance du produit.

Dans notre cas :

- **Chitosane** : l'un des composants du produit. Il s'agit d'un polysaccharide d'origine naturelle dont les sources sont très variables.
- **Stérilisation** : il est nécessaire d'étudier la méthode de stérilisation appropriée au dispositif pour qu'elle n'altère pas les propriétés et la morphologie du biomatériau. De plus, le dispositif doit maintenir la stérilité tout au long de son utilisation (Certification ISO 11737 : 2006 – Stérilisation des dispositifs médicaux)

EE 2 : LA SECURITE DE LA CONCEPTION

Une analyse de risque et un dossier de gestion des risques traitant ce point doivent être établis.

- **Méthode de conception** (electrospinning) : l'appareillage utilisé a été fabriqué au sein du laboratoire. Ceci peut poser problème lors du traitement du dossier de demande du marquage CE. Pour cette raison, il est recommandé d'adapter le procédé de fabrication sur une machine d'electrospinning industrielle. Depuis peu, le laboratoire dispose d'un appareil industriel, ainsi des essais de reproductibilité peuvent être effectués.

EE 3 : LE NIVEAU DE PERFORMANCE A ATTEINDRE

Une analyse de risque et un dossier de gestion des risques traitant ce point doivent être établis.

Dans notre cas, notre dispositif médical possède une activité ostéoinductrice qui doit répondre aux attentes.

EE 4 : LE MAINTIEN DU NIVEAU DE PERFORMANCE DURANT LA DUREE DE VIE DU DISPOSITIF

Caractérisation du produit (ISO 10993-18) à l'issue de la fabrication et lors des essais de dégradation (*cf.* EE7 et EE9).

EE 5 : LE MAINTIEN DU NIVEAU DE PERFORMANCE DURANT LE STOCKAGE ET LE TRANSPORT DU DISPOSITIF

Une analyse de risque et un dossier de gestion des risques traitant ce point doivent être établis. Des essais de dégradation permettront de prouver le maintien des caractéristiques physicochimiques et biologiques du dispositif. De plus, des essais de stabilité des dispositifs (~

pendant 3 ans) sont nécessaires. Dans notre cas, des premières études de DVS ont été effectuées afin d'étudier la stabilité de notre support dans un environnement « humide ».

EE 6 : LE NIVEAU D'EFFETS INDESIRABLES ACCEPTABLES

Les effets indésirables seront recueillis dans le cadre de l'étude de non infériorité (*cf.* EE 6bis) et mise en place d'un suivi grâce à la matériovigilance.

EE 6BIS : L'EVALUATION CLINIQUE DU DISPOSITIF

Pour répondre à cette EE, il est nécessaire de fournir les résultats des évaluations cliniques établies conformément à l'**annexe X**. Au même titre que la gestion du risque, elle doit être poursuivie durant toute la durée de vie du DM.

En ce qui concerne notre dispositif, il est nécessaire d'introduire la notion **d'investigation clinique**. En effet, tout DM qui présente un caractère innovant doit répondre à cette investigation afin de vérifier sa sécurité, sa performance et son bénéfice clinique.

Pour cela, l'obtention de données peut se faire par des études cliniques sur le dispositif lui-même, ou par des analyses de la littérature, avec des articles concernant des études sur le dispositif en question, ou des dispositifs dont l'équivalence peut être prouvée sur les plans clinique (indication, population cible, etc.), technique (méthode de conception, d'implantation, etc.) et biologique (matériau, biocompatibilité, tissus en contact, etc.), de même que par un suivi post-commercialisation. L'équivalence stricte avec un autre dispositif est rare. Il faut donc pouvoir justifier que les différences n'ont pas d'impact sur la performance et sur la sécurité du dispositif.

Les études cliniques sont indispensables pour les dispositifs implantables ou de classe III, sauf si le recours aux données cliniques existantes peut être justifié (revues de littérature, publications, bibliographie).

L'objectif de l'évaluation clinique est de :

- S'assurer que le DM est conforme aux revendications du fabricant dans des conditions normales d'utilisation
- Evaluer les effets indésirables
- Evaluer le caractère acceptable du rapport bénéfice/risque

Les investigations cliniques sont réalisées sur un nombre limité de sujets, sur une courte période et dans des conditions idéales. Les utilisateurs des DM évalués sont choisis et formés en fonction de la revendication du fabricant. Les résultats de ces évaluations sont ainsi consignés dans le dossier technique (ou documentation technique) afin d’être soumis à l’évaluation de l’autorité compétente.

Dans notre cas, l’investigation clinique est nécessaire. La réalisation d’essais pré-cliniques (*in vitro* puis *in vivo* sur un modèle animal) sera précisée et décrite. Après quoi des études sur l’Homme peuvent être élaborées sur un nombre limité de patients. En effet, l’un des composants de notre dispositif est le chitosane, un polysaccharide d’origine naturelle et dont la source, la masse molaire et le degré de désacétylation sont très variables. De plus, les procédures de fabrication et les sites d’implantation sont différents. Ce qui rend la reproductibilité et le processus de comparaison réglementaire avec les DMs qui existent déjà très difficile.

Si nous décidons de ne pas procéder à ces essais cliniques, il faudra alors que la démonstration d’équivalence soit validée par un ON.

EE 7 : LES PROPRIETES CHIMIQUES, PHYSIQUES ET BIOLOGIQUES

La caractérisation du biomatériau s’effectue en suivant la norme **ISO 10993-18 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux – Caractérisation chimique des matériaux**.

Pour prouver la biocompatibilité du dispositif, il est nécessaire de se référer à la norme **ISO 10993-1 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux – Evaluation et essais au sein d’un processus de gestion de risque**. Les essais à réaliser sur le produit sont déterminés en fonction de la nature du contact (cf. *Tableau 16*).

Dans notre cas, il s’agit d’un implant destiné à être en contact avec le tissu osseux pour une longue durée (> 30 jours).

Tableau 16. Tests de l'évaluation initiale à prendre en considération (ISO 10993-1 : Evaluation biologique des dispositifs médicaux, Partie 1, Annexe A, 2016). X : Tests d'évaluation ISO à prendre en compte, O : Tests supplémentaires recommandés par la FDA qui peuvent être applicables

Medical device categorization by			Biological effect												
Nature of Body Contact	Contact Duration														
Category	Contact		Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or Intracutaneous Reactivity	Acute Systemic Toxicity	Material-Mediated Pyrogenicity	Subacute/Subchronic Toxicity	Genotoxicity	Implantation	Hemocompatibility	Chronic Toxicity	Carcinogenicity	Reproductive/Developmental Toxicity#	Degradation@
	Tissue ⁺ /bone/dentin	A	X	X	X	O	O								
		B	X	X	X	X	O	X	X	X					
		C	X	X	X	X	O	X	X	X		O	O		
	Circulating blood	A	X	X	X	X	O		O ^A		X				
		B	X	X	X	X	O	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O	O		
Implant device	Tissue ⁺ /bone	A	X	X	X	O	O								
		B	X	X	X	X	O	X	X	X					
		C	X	X	X	X	O	X	X	X		O	O		
	Blood	A	X	X	X	X	O		O	X	X				
		B	X	X	X	X	O	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O	O		

Sur cette base, nous réaliserons les tests suivants :

- **ISO 10993-3** : Génotoxicité, cancérogénicité et toxicité reproductive
- **ISO 10993-5** : Cytotoxicité *in vitro*
- **ISO 10993-6** : Effets locaux après implantation
- **ISO 10993-10** : Irritation et sensibilisation cutanée
- **ISO 10993-11** : toxicité systémique

EE 8 : L'INFECTION ET LA CONTAMINATION MICROBIENNE

La caractérisation de la charge microbienne se fait selon la norme **ISO 11737.1 : Stérilisation des dispositifs médicaux**.

L'évaluation de la stérilité s'effectue sur la base de la Pharmacopée Européenne 2.6.1.

EE 9 : LA FABRICATION ET L'ENVIRONNEMENT

Les risques découlant du vieillissement des matériaux utilisés (contenu et contenant) seront évalués.

Différents tests seront réalisés pour prouver la conformité du produit aux spécifications établies lors de la conception.

EE 13 : LES INFORMATIONS FOURNIES PAR LE FABRICANT

Le fabricant doit fournir toutes les informations qui sont requises par la Directive, notamment un étiquetage adapté et une notice d'utilisation. Pour ce faire, la norme **ISO 15223 :2016- Symboles à utiliser avec les étiquettes, l'étiquetage et les informations à fournir relatifs aux dispositifs médicaux.**

3. Organisation

Une entreprise de dispositifs médicaux, souhaitant mettre sur le marché européen des dispositifs médicaux, est tenue de se conformer à ces nouveaux référentiels :

12. Directive 93/42/CEE : Référentiel Produit

13. Norme ISO 13485 : Référentiel pour l'organisation

LA DIRECTIVE 93/42/CEE

Le fabricant doit se doter d'un système qualité qui permet de garantir que le dispositif satisfait tout à fait aux dispositions de ladite Directive. La vérification de la conformité de l'organisation sera réalisée sur site par l'ON lors de la réalisation de l'audit ad hoc.

LA NORME ISO 13485 : DISPOSITIFS MEDICAUX – SYSTEMES DE MANAGEMENT DE LA QUALITE – EXIGENCES A DES FINS REGLEMENTAIRES

La présente norme établit les caractéristiques d'un système de management de la qualité pour ce qui concerne toutes les étapes de la vie du dispositif médical. La certification ISO 13485, non obligatoire mais fortement recommandée, ne sera obtenue qu'après passage de l'ON qui évaluera la capacité du fabricant à satisfaire aux exigences des clients et aux normes européennes qui sont applicables en ma matière.

Pour cela, il faut que soient déterminés tous les **processus** qui sont nécessaires pour le système de management de la qualité et leurs **interactions**, donc des activités qui transforment un élément d'entrée en un élément de sortie.

« Toute activité qui reçoit un élément d'entrée et le transforme en élément de sortie peut être considérée comme un processus. »

Une matrice de traçabilité sera établie pour suivre les données d'entrée et de sortie de conception. Elle devra être intégrée au dossier technique du produit.

Enfin, la norme requiert d'appliquer une **approche qui soit fondée sur les risques** en ce qui concerne la maîtrise des processus appropriés qui sont nécessaires pour le système de management de la qualité.

Il convient de souligner que les exigences de système de management de la qualité, telles que énoncées par la présente Norme internationale, complètent les exigences techniques, autrement dit celles qui sont relatives aux produits nécessaires pour satisfaire aux demandes des clients et aux exigences réglementaires applicables en matière de sécurité et de performance.

INTERNATIONAL

Pour conquérir les marchés internationaux (hors Europe), il est nécessaire de conformer l'organisation de l'entreprise, de même que notre réponse aux exigences, à la réglementation applicable localement.

CONCLUSION

La procédure de mise sur le marché d'un DM implantable est à la fois complexe et colossale. Par ailleurs, le cadre réglementaire qui est relatif aux DM a été renforcé, particulièrement depuis l'adoption du nouveau règlement européen en avril 2017, dont le but principal est de mieux répondre aux exigences de sécurité des utilisateurs.

Dans le cas du deuxième dispositif, l'étude réglementaire qui concerne l'obtention du marquage CE serait bien plus complexe. Il s'agit d'un biomatériau de nanofibres à base d'un chitosane sulfoné à activité anticoagulante. Ainsi, en raison de son activité thérapeutique, notre dispositif

fait partie des DM de classe III bioactifs. Des études cliniques laborieuses s'imposent par conséquent en vue de prouver la sécurité et l'activité thérapeutique du dispositif.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués en vue d'élaborer des membranes à base de nanofibres à propriétés antithrombotiques ou ostéoinductrices par la technique d'électrospinning. Notre choix s'est porté sur l'utilisation du chitosane en guise de polymère de base pour la fabrication des nanofibres en raison de ses propriétés intrinsèques, notamment son activité hémostatique, sa biocompatibilité et sa biodégradation. De plus, sa forte densité en groupements fonctionnels ; les fonctions hydroxyles et amines, permet d'effectuer des modifications chimiques et obtenir ainsi des dérivés de chitosane qui possèdent des propriétés supplémentaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à la réalisation des supports nanofibreux à base de chitosane à propriétés ostéoinductrices, capables d'induire la biominéralisation. Pour ce faire, une optimisation du procédé electrospinning a été réalisée et a permis de déterminer les paramètres optimaux pour l'obtention de nanofibres uniformes et sans défaut. Ces dernières ont été par la suite stabilisées par un traitement thermique afin de limiter leur dégradation et de conserver leur morphologie fibreuse lors de leur mise en contact ou de leur immersion dans un environnement aqueux.

Une fois l'étape de l'électrofilage du chitosane validée, un traitement de surface, via une méthode biosourcée, a été appliqué sur les supports nanofibreux. Un revêtement de polydopamine a été déposé sur les nanofibres par une simple méthode de « dip-coating » en immergeant les supports dans une solution de chlorhydrate de dopamine à température ambiante et à l'air libre pour permettre une bonne oxygénation du milieu. Le temps d'immersion a une forte influence sur le dépôt de la polydopamine, puisque peu de particules de polydopamine sont présentes lorsque le temps de fonctionnalisation est inférieur ou égal à trois jours. Alors que, au-delà, de nombreuses particules, sous forme d'agrégats, se sont déposées à la surface des nanofibres. Ces résultats ont été en accord avec les deux analyses quantitatives qui ont été effectuées lors de l'étude et qui ont consisté en le dosage des groupements amine par l'utilisation de l'acide orange II d'une part, et le dosage des groupements catéchol avec la méthode micro-BCA d'autre part. Une augmentation de la quantité d'amines et de catéchols a été mise en évidence pour les trois premiers jours d'immersion. Après quoi, une diminution a été remarquée et qui est probablement due à la présence d'agrégats.

En outre, il a été démontré, lors de la caractérisation des supports, que le revêtement de polydopamine a permis de stabiliser et de ralentir la biodégradation des dispositifs, puisqu'une

perte de masse d'environ 10% a été atteinte pour les nanofibres non modifiées. Alors que, après fonctionnalisation, les supports ont montré seulement 6% de perte de masse.

L'évaluation biologique des dispositifs, plus précisément l'étude de la cytocompatibilité par contact direct, a permis de montrer qu'un temps d'immersion dans la solution de chlorhydrate de dopamine prolongé conduit à l'obtention de supports cytotoxiques. Néanmoins, les nanofibres qui ont été fonctionnalisées pendant deux heures ont généré une viabilité cellulaire de 70%. Elles ont de ce fait été sélectionnées pour la suite du projet.

L'activité biologique de ces supports a été évaluée en analysant la capacité du biomatériau à induire la biominéralisation à sa surface. Pour ce faire, les échantillons ont été immergés dans une solution physiologique 1,5xSBF, préalablement préparée et stérilisée, pendant sept jours en renouvelant la solution tous les deux jours dans le but d'éviter toute contamination microbienne. L'observation au microscope électronique à balayage a révélé la présence de cristaux de phosphate de calcium sous forme hémisphérique de diamètre de l'ordre de 7 μm qui ont recouvert la surface du biomatériau. Par contre, les nanofibres non modifiées n'ont montré aucune phase minérale ; ce qui a confirmé l'importance du revêtement de polydopamine pour induire la formation de cristaux de phosphate de calcium. En effet, la polydopamine contient des groupements catéchol qui vont permettre la chélation des ions Ca^{2+} , présents dans la solution 1,5xSBF. Ces derniers vont interagir avec les ions PO_3^- via des interactions électrostatiques, permettant ainsi la formation des cristaux. De plus, une étude cartographique effectuée par une analyse dispersive d'énergie a démontré la présence de deux pics prédominants correspondant au calcium et au phosphore et dont le ratio Ca/P est de l'ordre de 1,76, une valeur très proche de celle de l'HA qui possède un ratio théorique de 1,67. Une étude DRX a montré la présence d'une phase cristalline composée de phosphate de calcium. Toutefois, des caractérisations supplémentaires sont nécessaires, comme l'identification de la structure/ nature des cristaux CaP formés, des essais spécifiques à la régénération osseuse tels que l'activité des phosphatases alcalines ou encore des essais biologiques *in vivo*.

Dans un second temps, nous avons exploré la modification chimique du chitosane, par greffage des groupements sulfonate sur les fonctions amines primaires, via une réaction d'amination réductive afin de bénéficier d'une activité antithrombotique. Le rapport molaire entre les aldéhydes mono- ou di-sulfoniques, utilisés comme réactifs de sulfonation, et les groupements amines présents dans le chitosane, a été contrôlé. Ceci dans le but de trouver le bon compromis entre la quantité des groupements sulfonate et les groupements amine libre pour

bénéficier à la fois des propriétés biologiques du chitosane, dont les groupements amine sont responsables, et des groupements sulfonate.

Les dérivés mono- et di-sulfoniques ainsi obtenus ont été caractérisés par diverses méthodes, notamment par des techniques quantitatives, qualitatives et semi-quantitatives. Le caractère polyampholyte de ces dérivés a été prouvé. En effet, en fonction du degré de substitution et de la présence d'un ou de deux groupements sulfonate, certains polymères ont été solubles à pH fortement basique ou fortement acide. Alors que d'autres ont présenté une solubilité à travers toute la gamme de pH étudiée.

Les études biologiques, notamment l'étude de l'hémocompatibilité, ont prouvé une absence d'hémolyse et une activité antithrombotique qui augmente avec le degré de substitution. Ainsi, les polymères sulfoniques, ayant un degré de substitution le plus élevé, ont été sélectionnés pour la suite du projet. De plus, l'étude de l'activité anticoagulante a confirmé que les dérivés agissaient principalement sur la voie intrinsèque de la cascade de coagulation.

De nombreuses études, publiées par la littérature, ont traité de la synthèse des dérivés sulfoniques du chitosane et leur utilisation en raison de leur activité anticoagulante sous différentes formes, y compris de micelles, de films et de nanoparticules. A notre connaissance, aucune étude n'a investigué l'électrofilage du chitosane sulfoné. Par conséquent, l'innovation de ce projet consiste en la préparation d'une membrane de nanofibres, qui possède des propriétés intrinsèques anticoagulantes, par électrospinning. Suite à une optimisation des paramètres de solution et du procédé, des nanofibres uniformes, contenant très peu voire pas de billes, ont été obtenues. Des caractérisations biologiques sont en cours afin de mettre en évidence l'activité anticoagulantes des nanofibres et vérifier que le procédé d'électrofilage n'a aucun impact sur cette propriété.

Perspectives

Les résultats présentés dans cette étude ont conduit, tout le long de ce travail, à réfléchir au sujet des applications possibles des nanofibres, à base du mélange chitosane/ poly (oxyde d'éthylène), fonctionnalisées avec la polydopamine, et celles qui sont à base de chitosane sulfoné. Les perspectives qui en ont résulté sont présentées dans la *Figure 82* et seront détaillées par la suite.

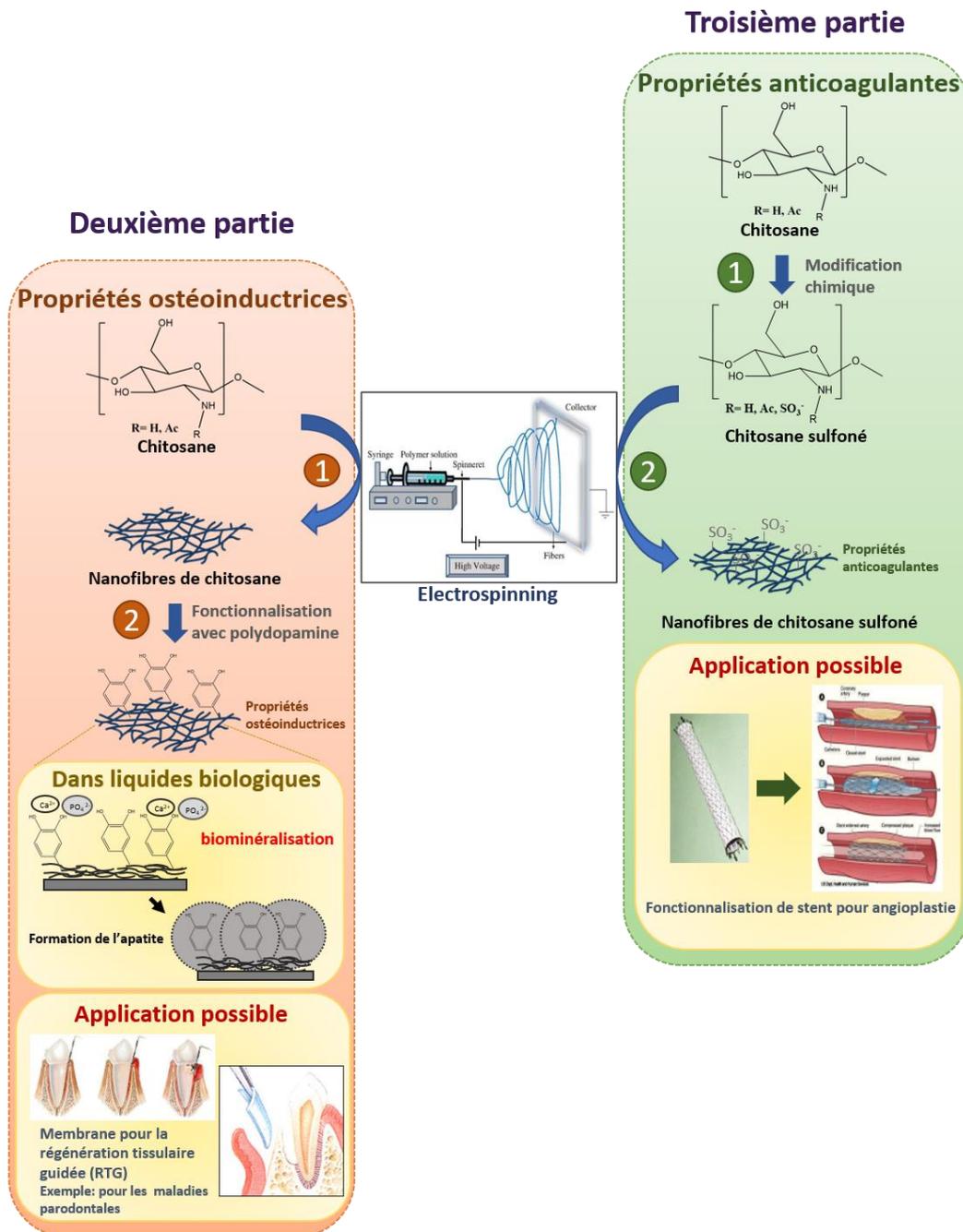


Figure 82. Schéma récapitulatif des deux stratégies développées au cours de cette thèse et les perspectives qui en résultent

Membrane de nanofibres pour la régénération parodontale par la régénération tissulaire guidée

Les parodontites se traduisent par une destruction des tissus de soutien de la dent, à savoir la perte d'attache de la gencive sur la dent, la formation d'une poche parodontale entre la gencive et la dent, la destruction de l'os alvéolaire support de la dent et l'altération du cément qui recouvre la racine dentaire (cf. *Figure 83*).

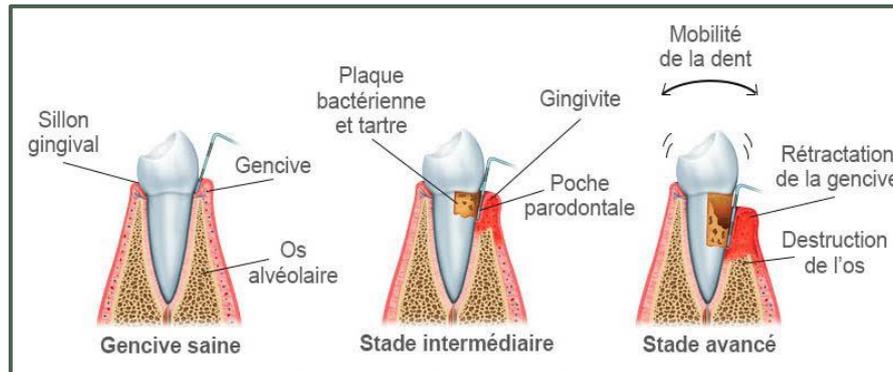


Figure 83. Schéma comparant un parodonte sain à un parodonte en cours de destruction avec formation d'une poche parodontale à un stade intermédiaire et la destruction de l'os à un stade avancé

Lors de la cicatrisation, les tissus parodontaux ont des comportements biologiques différents. En ce sens, la vitesse de cicatrisation épithéliale est plus élevée comparée à celle de réparation osseuse. Elle la précède et donc la gêne ; ce qui entraîne un comblement de l'espace disponible par du tissu épithélial et conjonctif non minéralisé. Le concept de la régénération tissulaire guidée permet de rénover non seulement l'architecture mais aussi la fonction du tissu détruit. Elle consiste en la mise en place d'une membrane, en guide de barrière, dans un site sous-épithélio-conjonctif lors de l'intervention chirurgicale afin d'isoler les deux compartiments et de favoriser la régénération d'un complexe parodontal. D'un côté, nous retrouvons la surface radiculaire, l'os et le desmodonte et de l'autre, l'épithélium et le tissu conjonctif gingival (cf. *Figure 84*).

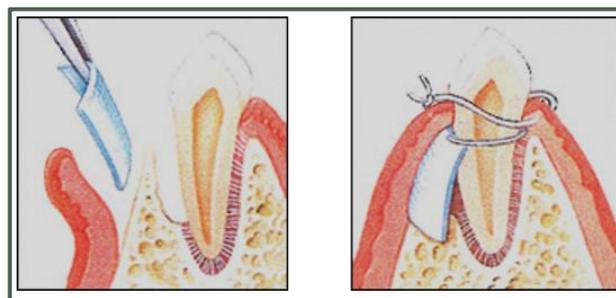


Figure 84. Images d'emplacement de la membrane pour la régénération tissulaire guidée

De ce fait, la membrane doit être conforme à un cahier des charges spécifique, et doit pour cela:

- Présenter une activité anti-infectieuse
- Présenter à la fois une imperméabilité aux cellules et une perméabilité aux fluides
- Épouser la surface de la dent
- Par ailleurs, un espace suffisant doit être ménagé et maintenu, du côté de la surface dentaire, pour permettre ou faciliter la formation d'un caillot sanguin, à partir duquel des facteurs de croissance sont libérés. Ce qui permet aux cellules osseuses et desmodontales de s'exprimer et de recréer les tissus lésés.
- Être biocompatible, anti-irritante
- Être cliniquement maniable ; elle peut être facilement découpée, suturée et en cas de complication être retirée.

Sur cette base, et d'après nos résultats et observations, la membrane de nanofibres fonctionnalisée répond partiellement au cahier des charges précédemment décrit. En effet, la membrane est très facilement maniable et sa souplesse lui permettrait d'épouser la forme de la dent. Notre biomatériau est biocompatible et est capable d'induire la biominéralisation et donc, d'induire normalement l'ostéogenèse. La taille des pores de la matrice peut être elle aussi modulée par optimisation des paramètres du procédé de l'électrospinning. Enfin, et pour répondre à toutes les exigences, des biomolécules spécifiques peuvent être greffées à la surface du dispositif. La présence du revêtement de polydopamine facilite le greffage des facteurs de croissance qui sont nécessaires. En outre, des agents antibactériens peuvent être incorporés dans la solution de polymère avant électrospinning.

1. Revêtement du stent avec des nanofibres à propriété antithrombotique

Les maladies coronariennes, étant la deuxième cause de mortalité en France, se présentent sous forme de troubles cardiaques dus à une réduction de l'approvisionnement en sang du cœur. Ces maladies impliquent dans la plupart des cas l'implantation de stents. Toutefois, leur implantation peut provoquer un phénomène de resténose (30% des cas) et de thrombose (5% des cas). Afin de limiter ce phénomène de resténose, les stents sont dans ce cas généralement recouverts de textile (actuellement tissé). Cette solution n'est pas tout à fait satisfaisante, puisque le problème de thrombose persiste. La recherche s'est donc orientée vers la fonctionnalisation des stents nus avec des agents antithrombotiques, mais le risque de resténose persiste malgré tout.

L'originalité de cette perspective consiste en l'enrobage du stent avec un polymère intrinsèquement antithrombotique. L'idée est d'électrofiler le polymère ayant montré l'activité anticoagulante la plus forte (CHT2S-2) directement sur le stent. De cette manière, on obtient un stent dont la surface externe est recouverte de nanofibres à activité antithrombotique est obtenu (cf. *Figure 85*). Cette perspective fait l'objet d'un projet de thèse qui est en cours de préparation au sein de notre équipe.

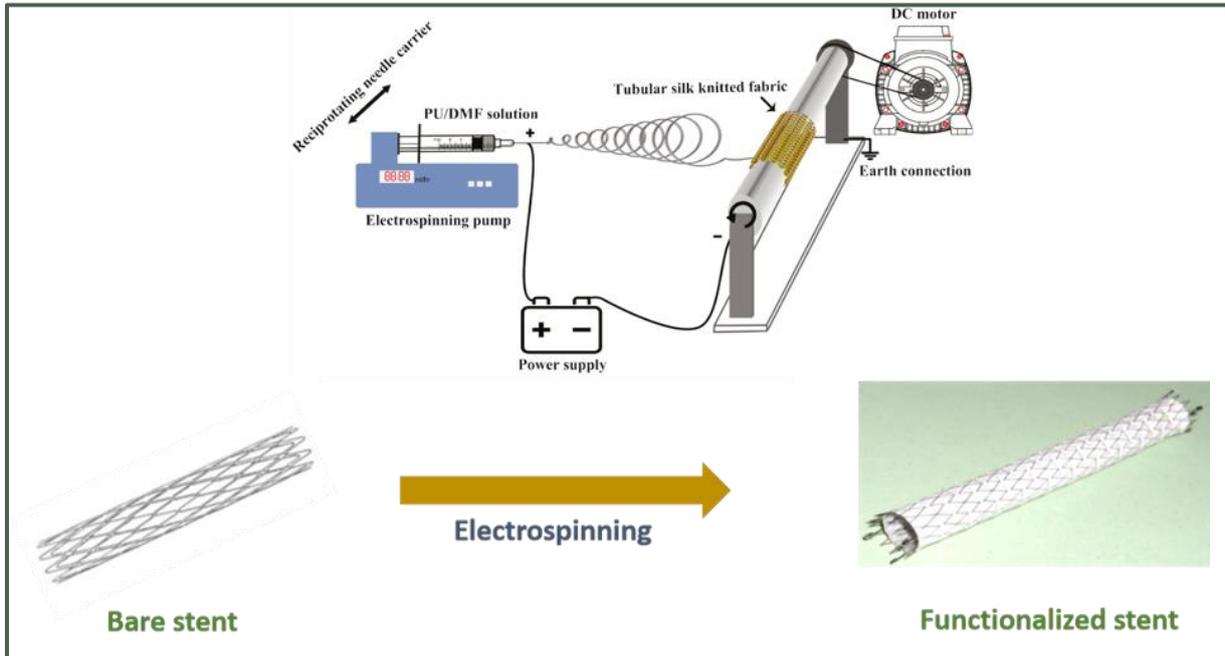


Figure 85. Représentation schématique de la fonctionnalisation d'un stent

Références bibliographiques

- (1) Croissance du marché des textiles techniques: quelques tendances chiffrées. *Mode in Textile*, 2018.
- (2) Ird, R. and M. Biomedical Textiles Market by Fiber Type, Fabric Type, Application, and Region - Global Forecast to 2022 <https://www.researchandmarkets.com/reports/4481363/biomedical-textiles-market-by-fiber-type-fabric> (accessed Apr 19, 2018).
- (3) Rajendran, S.; Anand, S. C. Contribution of Textiles to Medical and Healthcare Products and Developing Innovative Medical Devices. *Indian J. Fibre Text. Res.* **2006**, *31*, 215–229.
- (4) Institut Français De la Mode. Les marchés de la santé: de grands enjeux pour les textiles techniques européens <http://www.ifm-paris.com/fr/observatoire-etudes-mode/ifm/observatoire-economique/item/94347-les-textiles-de-sante.html> (accessed Apr 24, 2018).
- (5) PAYEN, J. Utilisation des matériaux textiles sur le marché de la santé <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharmath15/biomateriaux-et-biomecanique-42606210/utilisation-des-materiaux-textiles-sur-le-marche-de-la-sante-n2570/> (accessed Apr 22, 2018).
- (6) Parveen Banu, K.; Subramaniam, V.; Pradeepa, P. NON IMPLANTABLE MATERIALS IN MEDICAL TEXTILES. *Int. J. Curr. Res.* **2014**, *6*, 6120–6123.
- (7) Joung, Y.-H. Development of Implantable Medical Devices: From an Engineering Perspective. *Int. Neurorol. J.* **2013**, *17* (3), 98–106.
- (8) SafeMask® Premier Masque à boucles-attaches <https://www.medicom.com/fr/products/8/masques/20/safemasksup-sup-premier-masque-a-boucles-attaches> (accessed May 1, 2018).
- (9) Medicom® Couvre-tête <https://www.medicom.com/fr/products/43/vetements/58/medicomsup-sup-couvre-tete> (accessed May 1, 2018).
- (10) Kit Foliodrape®, petites interventions <https://www.praxisdienst.fr/fr/Instrumentation/Fournitures+pour+OP/Champs+st+riles/C+hamps+st+riles+usage+unique/Kit+Foliodrape+petites+interventions.html> (accessed May 1, 2018).
- (11) Tensiomètre avec fonction ECG - BM 95 https://www.beurer.com/web/fr/products/bloodpressure/upper_arm/BM-95 (accessed May 1, 2018).
- (12) Lecteur de glycémie sanguine - GL 50 evo https://www.beurer.com/web/fr/products/glucose/blood_glucose_monitors/GL-50-evo (accessed May 1, 2018).
- (13) Thermomètre sans contact - FT 90 https://www.beurer.com/web/fr/products/body_temperature/body_temperature/FT-90 (accessed May 1, 2018).
- (14) Ortel C3 <http://www2.thuasne.fr/produit/ortel-c3/> (accessed May 1, 2018).
- (15) Bande NylexOcrep, Bandes et filets de maintien. *URGO*.
- (16) Pansements Absorbants Stériles. *URGO*.
- (17) OPTIME® R <https://www.peters-surgical.com/fr/sutures-resorbables/63-optime-r.html> (accessed May 1, 2018).
- (18) Gamme Biofinity® <https://coopervision.fr/lentilles-de-contact/gamme-biofinity> (accessed May 1, 2018).
- (19) 4DMesh®: Implant de renforcement pariétal semi-résorbable - Viscéral <http://www.cousin-biotech.com/fr/les-produits-cousin-biotech/visceral-large-gamme->

- implants-pour-renforcement-paroi/4dmesh-implant-renforcement-parietal-semi-resorbable (accessed May 1, 2018).
- (20) Qin, Y. 2 - An Overview of Medical Textile Products. In *Medical Textile Materials*; Woodhead Publishing Series in Textiles; Woodhead Publishing, 2016; pp 13–22.
- (21) Bose, G. M. *Recherches Sur La Cause et Sur La Véritable Théorie de l'électricité*; Wittenberg, 1745.
- (22) Cooley, J. F. Apparatus for Electrically Dispersing Fluids. US692631A, February 4, 1902.
- (23) Rayleigh, Lord. On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged with Electricity. *Philos. Mag. Ser. 6* **1882**.
- (24) Morton, W. J. Method of Dispersing Fluids. US705691A, February 20, 1900.
- (25) Zeleny, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Phys. Rev.* **1914**, 3 (2), 69–91.
- (26) History of Electrospinning - Timeline <http://electrospintech.com/espinhistory.html#.W2b9uSgzbc> (accessed Aug 5, 2018).
- (27) Thenmozhi, S.; Dharmaraj, N.; Kadirvelu, K.; Kim, H. Y. Electrospun Nanofibers: New Generation Materials for Advanced Applications. *Mater. Sci. Eng. B* **2017**, 217, 36–48.
- (28) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28 (3), 325–347.
- (29) Formhals, A. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. US1975504A, October 2, 1934.
- (30) Formhals, A. Method and Apparatus for Spinning. US2160962A, June 6, 1939.
- (31) Taylor, G. I. Electrically Driven Jets. In *Proc. R. Soc. Lond. A*; 1969; Vol. 313, pp 453–475.
- (32) Mokhena, T. C.; Jacobs, V.; Luyt, A. S. A Review on Electrospun Bio-Based Polymers for Water Treatment. **2015**.
- (33) Thoppey, N. M.; Gorga, R. E.; Bochinski, J. R.; Clarke, L. I. Effect of Solution Parameters on Spontaneous Jet Formation and Throughput in Edge Electrospinning from a Fluid-Filled Bowl. *Macromolecules* **2012**, 45 (16), 6527–6537.
- (34) Reneker, D. H.; Chun, I. Nanometre Diameter Fibres of Polymer, Produced by Electrospinning. *Nanotechnology* **1996**, 7 (3), 216.
- (35) Reneker, D. H.; Yarin, A. L.; Fong, H.; Koombhongse, S. Bending Instability of Electrically Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning. *J. Appl. Phys.* **2000**, 87 (9), 4531–4547.
- (36) Reneker, D. H.; Yarin, A. L.; Zussman, E.; Xu, H. Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts. In *Advances in Applied Mechanics*; Aref, H., van der Giessen, E., Eds.; Elsevier, 2007; Vol. 41, pp 43–346.
- (37) Cipitria, A.; Skelton, A.; Dargaville, T. R.; Dalton, P. D.; Hutmacher, D. W. Design, Fabrication and Characterization of PCL Electrospun Scaffolds—a Review. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (26), 9419–9453.
- (38) Doshi, J.; Reneker, D. H. Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *J. Electrostat.* **1995**, 35 (2), 151–160.
- (39) Persano, L.; Camposeo, A.; Tekmen, C.; Pisignano, D. Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. *Macromol. Mater. Eng.* **2013**, 298 (5), 504–520.
- (40) Reznik, S. N.; Yarin, A. L.; Theron, A.; Zussman, E. Transient and Steady Shapes of Droplets Attached to a Surface in a Strong Electric Field. *J. Fluid Mech.* **2004**, 516, 349–377.
- (41) Shin, Y. M.; Hohman, M. M.; Brenner, M. P.; Rutledge, G. C. Electrospinning: A Whipping Fluid Jet Generates Submicron Polymer Fibers. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78 (8), 1149–1151.

- (42) Agarwal, S.; Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning of Manmade and Biopolymer Nanofibers—Progress in Techniques, Materials, and Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (18), 2863–2879.
- (43) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (30), 5670–5703.
- (44) Electrospinning
<https://www.che.vt.edu/Faculty/Wilkes/GLW/electrospinning/electrospinning.html>
(accessed Jul 3, 2018).
- (45) Angammana, C. J.; Jayaram, S. H. A Theoretical Understanding of the Physical Mechanisms of Electrospinning; 2011.
- (46) Hamzeh, S.; Mirafteb, M.; Yoosefinejad, A. Study of Electrospun Nanofibre Formation Process and Their Electrostatic Analysis. *J. Ind. Text.* **2014**, *44* (1), 147–158.
- (47) 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.*
- (48) Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck Tan, N. C. The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles. *Polymer* **2001**, *42* (1), 261–272.
- (49) Colby, R. H.; Fetters, L. J.; Funk, W. G.; Graessley, W. W. Effects of Concentration and Thermodynamic Interaction on the Viscoelastic Properties of Polymer Solutions. *Macromolecules* **1991**, *24* (13), 3873–3882.
- (50) Liu, H.; Hsieh, Y.-L. Ultrafine Fibrous Cellulose Membranes from Electrospinning of Cellulose Acetate. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2002**, *40* (18), 2119–2129.
- (51) Ryu, Y. J.; Kim, H. Y.; Lee, K. H.; Park, H. C.; Lee, D. R. Transport Properties of Electrospun Nylon 6 Nonwoven Mats. *Eur. Polym. J.* **2003**, *39* (9), 1883–1889.
- (52) Haghi, A. K.; Akbari, M. Trends in Electrospinning of Natural Nanofibers. *Phys. Status Solidi A* **2007**, *204* (6), 1830–1834.
- (53) Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J.; Micklus, M.; Ko, F. Regeneration of Bombyx Mori Silk by Electrospinning—Part 1: Processing Parameters and Geometric Properties. *Polymer* **2003**, *44* (19), 5721–5727.
- (54) Liu, G.; Gu, Z.; Hong, Y.; Cheng, L.; Li, C. Electrospun Starch Nanofibers: Recent Advances, Challenges, and Strategies for Potential Pharmaceutical Applications. *J. Controlled Release* **2017**, *252*, 95–107.
- (55) Tan, S.-H.; Inai, R.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. Systematic Parameter Study for Ultra-Fine Fiber Fabrication via Electrospinning Process. *Polymer* **2005**, *46* (16), 6128–6134.
- (56) Koski, A.; Yim, K.; Shivkumar, S. Effect of Molecular Weight on Fibrous PVA Produced by Electrospinning. *Mater. Lett.* **2004**, *58* (3), 493–497.
- (57) Jacobs, V.; Anandjiwala, R. D.; Maaza, M. The Influence of Electrospinning Parameters on the Structural Morphology and Diameter of Electrospun Nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *115* (5), 3130–3136.
- (58) Zhang, Y.; Ouyang, H.; Chwee, T. L.; Ramakrishna, S.; Huang, Z.-M. Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2005**, *72* (1), 156–165.
- (59) Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G. Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2796–2805.
- (60) Casasola, R.; Thomas, N. L.; Trybala, A.; Georgiadou, S. Electrospun Poly Lactic Acid (PLA) Fibres: Effect of Different Solvent Systems on Fibre Morphology and Diameter. *Polymer* **2014**, *55* (18), 4728–4737.

- (61) Beachley, V.; Wen, X. Effect of Electrospinning Parameters on the Nanofiber Diameter and Length. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29* (3), 663–668.
- (62) Zong, X.; Kim, K.; Fang, D.; Ran, S.; Hsiao, B. S.; Chu, B. Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes. *Polymer* **2002**, *43* (16), 4403–4412.
- (63) Baumgarten, P. K. Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36* (1), 71–79.
- (64) Yördem, O. S.; Papila, M.; Menciloğlu, Y. Z. Effects of Electrospinning Parameters on Polyacrylonitrile Nanofiber Diameter: An Investigation by Response Surface Methodology. *Mater. Des.* **2008**, *29* (1), 34–44.
- (65) Ki, C. S.; Baek, D. H.; Gang, K. D.; Lee, K. H.; Um, I. C.; Park, Y. H. Characterization of Gelatin Nanofiber Prepared from Gelatin–Formic Acid Solution. *Polymer* **2005**, *46* (14), 5094–5102.
- (66) Geng, X.; Kwon, O.-H.; Jang, J. Electrospinning of Chitosan Dissolved in Concentrated Acetic Acid Solution. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5427–5432.
- (67) Heikkilä, P.; Harlin, A. Parameter Study of Electrospinning of Polyamide-6. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44* (10), 3067–3079.
- (68) Silke Megelski, †; Jean S. Stephens, †; D. Bruce Chase, ‡ and; John F. Rabolt*, †. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma020444a> (accessed May 15, 2018).
- (69) Zuo, W.; Zhu, M.; Yang, W.; Yu, H.; Chen, Y.; Zhang, Y. Experimental Study on Relationship between Jet Instability and Formation of Beaded Fibers during Electrospinning. *Polym. Eng. Sci.* **2005**, *45* (5), 704–709.
- (70) Bonino, C. A.; Efimenko, K.; Jeong, S. I.; Krebs, M. D.; Alsberg, E.; Khan, S. A. Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions. *Small* **2012**, *8* (12), 1928–1936.
- (71) Huan, S.; Liu, G.; Han, G.; Cheng, W.; Fu, Z.; Wu, Q.; Wang, Q. Effect of Experimental Parameters on Morphological, Mechanical and Hydrophobic Properties of Electrospun Polystyrene Fibers. *Materials* **2015**, *8* (5), 2718–2734.
- (72) Pelipenko, J.; Kristl, J.; Janković, B.; Baumgartner, S.; Kocbek, P. The Impact of Relative Humidity during Electrospinning on the Morphology and Mechanical Properties of Nanofibers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456* (1), 125–134.
- (73) Putti, M.; Simonet, M.; Solberg, R.; Peters, G. W. M. Electrospinning Poly(ϵ -Caprolactone) under Controlled Environmental Conditions: Influence on Fiber Morphology and Orientation. *Polymer* **2015**, *63* (Supplement C), 189–195.
- (74) Kim, B.; Park, H.; Lee, S.-H.; Sigmund, W. M. Poly(Acrylic Acid) Nanofibers by Electrospinning. *Mater. Lett.* **2005**, *59* (7), 829–832.
- (75) Zhao, Z.; Li, J.; Yuan, X.; Li, X.; Zhang, Y.; Sheng, J. Preparation and Properties of Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *97* (2), 466–474.
- (76) Gupta, P.; Elkins, C.; Long, T. E.; Wilkes, G. L. Electrospinning of Linear Homopolymers of Poly(Methyl Methacrylate): Exploring Relationships between Fiber Formation, Viscosity, Molecular Weight and Concentration in a Good Solvent. *Polymer* **2005**, *46* (13), 4799–4810.
- (77) Sill, T. J.; von Recum, H. A. Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 1989–2006.
- (78) Casper, C. L.; Stephens, J. S.; Tassi, N. G.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* **2004**, *37* (2), 573–578.

- (79) Mit-uppatham, C.; Nithitanakul, M.; Supaphol, P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205* (17), 2327–2338.
- (80) Choi, S.-W.; Katoch, A.; Zhang, J.; Kim, S. S. Electrospun Nanofibers of CuOSnO₂ Nanocomposite as Semiconductor Gas Sensors for H₂S Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *176*, 585–591.
- (81) Bae, J.; Baek, I.; Choi, H. Efficacy of Piezoelectric Electrospun Nanofiber Membrane for Water Treatment. *Chem. Eng. J.* **2017**, *307*, 670–678.
- (82) Sundarrajan, S.; Tan, K. L.; Lim, S. H.; Ramakrishna, S. Electrospun Nanofibers for Air Filtration Applications. *Procedia Eng.* **2014**, *75*, 159–163.
- (83) Lee, H.; Lim, S.; Birajdar, M. S.; Lee, S.-H.; Park, H. Fabrication of FGF-2 Immobilized Electrospun Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 1559–1566.
- (84) Boehler, R. M.; Graham, J. G.; Shea, L. D. Tissue Engineering Tools for Modulation of the Immune Response. *BioTechniques* **2011**, *51* (4), 239-passim.
- (85) Weng, L.; Xie, J. Smart Electrospun Nanofibers for Controlled Drug Release: Recent Advances and New Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21* (15), 1944–1959.
- (86) Verreck, G.; Chun, I.; Rosenblatt, J.; Peeters, J.; Dijck, A. V.; Mensch, J.; Noppe, M.; Brewster, M. E. Incorporation of Drugs in an Amorphous State into Electrospun Nanofibers Composed of a Water-Insoluble, Nonbiodegradable Polymer. *J. Controlled Release* **2003**, *92* (3), 349–360.
- (87) Ghaebi Panah, N.; Alizadeh, P.; Eftekhari Yekta, B.; Motakef-Kazemi, N. Preparation and In-Vitro Characterization of Electrospun Bioactive Glass Nanotubes as Mesoporous Carriers for Ibuprofen. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (9), 10935–10942.
- (88) Lee, C.-H.; Hsieh, M.-J.; Liu, S.-C.; Chen, J.-K.; Liu, S.-J.; Hsieh, I.-C.; Wen, M.-S.; Hung, K.-C. Novel Bifurcation Stents Coated with Bioabsorbable Nanofibers with Extended and Controlled Release of Rosuvastatin and Paclitaxel. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *88*, 61–69.
- (89) Park, C. G.; Kim, M. H.; Park, M.; Lee, J. E.; Lee, S. H.; Park, J.-H.; Yoon, K.-H.; Choy, Y. B. Polymeric Nanofiber Coated Esophageal Stent for Sustained Delivery of an Anticancer Drug. *Macromol. Res.* **2011**, *19* (11), 1210.
- (90) Haute Autorité de Santé - Les pansements : Indications et utilisations recommandées - Fiche BUTS https://www.has-sante.fr/portail/jcms/r_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-buts (accessed Oct 15, 2018).
- (91) Field, F. K.; Kerstein, M. D. Overview of Wound Healing in a Moist Environment. *Am. J. Surg.* **1994**, *167* (1A), 2S-6S.
- (92) Liu, Y.; Zhou, S.; Gao, Y.; Zhai, Y. Electrospun Nanofibers as a Wound Dressing for Treating Diabetic Foot Ulcer. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**.
- (93) Abrigo, M.; McArthur, S. L.; Kingshott, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (6), 772–792.
- (94) Chen, S.; Liu, B.; Carlson, M. A.; Gombart, A. F.; Reilly, D. A.; Xie, J. Recent Advances in Electrospun Nanofibers for Wound Healing. *Nanomed.* **2017**, *12* (11), 1335–1352.
- (95) Nwachukwu, C. C.; Einstein, G. P.; Tulp, O. L. Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Wound Healing. *FASEB J.* **2017**, *31* (1_supplement), 333.2-333.2.
- (96) Lee, S. J.; Heo, D. N.; Moon, J.-H.; Ko, W.-K.; Lee, J. B.; Bae, M. S.; Park, S. W.; Kim, J. E.; Lee, D. H.; Kim, E.-C.; et al. Electrospun Chitosan Nanofibers with Controlled Levels of Silver Nanoparticles. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *111*, 530–537.

- (97) 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.* **2003**, *63* (15), 2223–2253.
- (98) Popryadukhin, P. V.; Popov, G. I.; Dobrovolskaya, I. P.; Yudin, V. E.; Vavilov, V. N.; Yukina, G. Y.; Ivan'kova, E. M.; Lebedeva, I. O. Vascular Prostheses Based on Nanofibers from Aliphatic Copolyamide. *Cardiovasc. Eng. Technol.* **2016**, *7* (1), 78–86.
- (99) Nanofiber coating prevents infections of prosthetic joints <https://www.sciencedaily.com/releases/2016/10/161024162457.htm> (accessed May 20, 2018).
- (100) Ashbaugh, A. G.; Jiang, X.; Zheng, J.; Tsai, A. S.; Kim, W.-S.; Thompson, J. M.; Miller, R. J.; Shahbazian, J. H.; Wang, Y.; Dillen, C. A.; et al. Polymeric Nanofiber Coating with Tunable Combinatorial Antibiotic Delivery Prevents Biofilm-Associated Infection in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (45), E6919–E6928.
- (101) Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications. *Polymer* **2008**, *49* (26), 5603–5621.
- (102) Stevens, M. M.; George, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science* **2005**, *310* (5751), 1135–1138.
- (103) Geetha Bai, R.; Ninan, N.; Muthoosamy, K.; Manickam, S. Graphene: A Versatile Platform for Nanotheranostics and Tissue Engineering. *Prog. Mater. Sci.* **2018**, *91*, 24–69.
- (104) Qin, Y. 3 - A Brief Description of Textile Fibers. In *Medical Textile Materials*; Woodhead Publishing Series in Textiles; Woodhead Publishing, 2016; pp 23–42.
- (105) Khajavi, R.; Abbasipour, M.; Bahador, A. Electrospun Biodegradable Nanofibers Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, *133* (3).
- (106) Christian, P. 2 - Polymer Chemistry. In *Electrospinning for Tissue Regeneration*; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2011; pp 34–50.
- (107) Frenot, A.; Chronakis, I. S. Polymer Nanofibers Assembled by Electrospinning. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8* (1), 64–75.
- (108) Agarwal, S.; Greiner, A.; Wendorff, J. H. Functional Materials by Electrospinning of Polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (6), 963–991.
- (109) Jiang, T.; Carbone, E. J.; Lo, K. W.-H.; Laurencin, C. T. Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *46*, 1–24.
- (110) Parvathi, K.; Krishnan, A. G.; Anitha, A.; Jayakumar, R.; Nair, M. B. Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers Containing Cissus Quadrangularis Induced Osteogenic Differentiation in Vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *110*, 514–521.
- (111) Immich, A. P. S.; Arias, M. L.; Carreras, N.; Boemo, R. L.; Tornero, J. A. Drug Delivery Systems Using Sandwich Configurations of Electrospun Poly(Lactic Acid) Nanofiber Membranes and Ibuprofen. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (7), 4002–4008.
- (112) Huang, C.; Thomas, N. L. Fabricating Porous Poly(Lactic Acid) Fibres via Electrospinning. *Eur. Polym. J.* **2018**, *99*, 464–476.
- (113) Harrane, A.; Leroy, A.; Nouailhas, H.; Garric, X.; Coudane, J.; Nottelet, B. PLA-Based Biodegradable and Tunable Soft Elastomers for Biomedical Applications. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **2011**, *6* (6), 065006.
- (114) Gao, Y.; Shao, W.; Qian, W.; He, J.; Zhou, Y.; Qi, K.; Wang, L.; Cui, S.; Wang, R. Biomaterialized Poly (l-Lactic-Co-Glycolic Acid)-Tussah Silk Fibroin Nanofiber Fabric with Hierarchical Architecture as a Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *84*, 195–207.
- (115) Liu, X.; Nielsen, L. H.; Kłodzińska, S. N.; Nielsen, H. M.; Qu, H.; Christensen, L. P.; Rantanen, J.; Yang, M. Ciprofloxacin-Loaded Sodium Alginate/Poly (Lactic-Co-Glycolic

- Acid) Electrospun Fibrous Mats for Wound Healing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *123*, 42–49.
- (116) Li, M.; Liu, W.; Sun, J.; Xianyu, Y.; Wang, J.; Zhang, W.; Zheng, W.; Huang, D.; Di, S.; Long, Y.-Z.; et al. Culturing Primary Human Osteoblasts on Electrospun Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) and Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)/Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (13), 5921–5926.
- (117) Stachewicz, U.; Qiao, T.; Rawlinson, S. C. F.; Almeida, F. V.; Li, W.-Q.; Cattell, M.; Barber, A. H. 3D Imaging of Cell Interactions with Electrospun PLGA Nanofiber Membranes for Bone Regeneration. *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 88–100.
- (118) Jeong, S. I.; Kim, S. Y.; Cho, S. K.; Chong, M. S.; Kim, K. S.; Kim, H.; Lee, S. B.; Lee, Y. M. Tissue-Engineered Vascular Grafts Composed of Marine Collagen and PLGA Fibers Using Pulsatile Perfusion Bioreactors. *Biomaterials* **2007**, *28* (6), 1115–1122.
- (119) Wan, Y.; Qu, X.; Lu, J.; Zhu, C.; Wan, L.; Yang, J.; Bei, J.; Wang, S. Characterization of Surface Property of Poly(Lactide-Co-Glycolide) after Oxygen Plasma Treatment. *Biomaterials* **2004**, *25* (19), 4777–4783.
- (120) Liu, H.; Slamovich, E. B.; Webster, T. J. Less Harmful Acidic Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Bone Tissue Engineering Scaffolds through Titania Nanoparticle Addition. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1* (4), 541–545.
- (121) Cr, R.; Ps, S.; O, M.; Pp, S.; A, S. Nanochitosan Enriched Poly ϵ -Caprolactone Electrospun Wound Dressing Membranes: A Fine Tuning of Physicochemical Properties, Hemocompatibility and Curcumin Release Profile. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 1261–1272.
- (122) Dos Santos, D. M.; Leite, I. S.; Bukzem, A. de L.; de Oliveira Santos, R. P.; Frollini, E.; Inada, N. M.; Campana-Filho, S. P. Nanostructured Electrospun Nonwovens of Poly(ϵ -Caprolactone)/Quaternized Chitosan for Potential Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *186*, 110–121.
- (123) Barnes, C. P.; Sell, S. A.; Boland, E. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. Nanofiber Technology: Designing the next Generation of Tissue Engineering Scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (14), 1413–1433.
- (124) Wang, S.; Li, Y.; Zhao, R.; Jin, T.; Zhang, L.; Li, X. Chitosan Surface Modified Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Carbon Nanotube Composite Fibers with Enhanced Mechanical, Cell Proliferation and Antibacterial Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104* (Part A), 708–715.
- (125) Li, Z.; Zhou, P.; Zhou, F.; Zhao, Y.; Ren, L.; Yuan, X. Antimicrobial Eugenol-Loaded Electrospun Membranes of Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Incorporated with REDV for Vascular Graft Applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *162*, 335–344.
- (126) Lu, C.; Chiang, S. W.; Du, H.; Li, J.; Gan, L.; Zhang, X.; Chu, X.; Yao, Y.; Li, B.; Kang, F. Thermal Conductivity of Electrospinning Chain-Aligned Polyethylene Oxide (PEO). *Polymer* **2017**, *115*, 52–59.
- (127) Wang, B.; Li, H.; Yao, Q.; Zhang, Y.; Zhu, X.; Xia, T.; Wang, J.; Li, G.; Li, X.; Ni, S. Local in Vitro Delivery of Rapamycin from Electrospun PEO/PDLLA Nanofibers for Glioblastoma Treatment. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1345–1352.
- (128) Dai, R.; Lim, L.-T. Release of Allyl Isothiocyanate from Mustard Seed Meal Powder Entrapped in Electrospun PLA–PEO Nonwovens. *Food Res. Int.* **2015**, *77*, 467–475.
- (129) Pakravan, M.; Heuzey, M.-C.; Ajjji, A. A Fundamental Study of Chitosan/PEO Electrospinning. *Polymer* **2011**, *52* (21), 4813–4824.
- (130) Nista, S. V. G.; Bettini, J.; Mei, L. H. I. Coaxial Nanofibers of Chitosan–Alginate–PEO Polycomplex Obtained by Electrospinning. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 222–228.

- (131) Chen, G.; Guo, J.; Nie, J.; Ma, G. Preparation, Characterization, and Application of PEO/HA Core Shell Nanofibers Based on Electric Field Induced Phase Separation during Electrospinning. *Polymer* **2016**, *83* (Supplement C), 12–19.
- (132) Zhou, J.; Cao, C.; Ma, X.; Lin, J. Electrospinning of Silk Fibroin and Collagen for Vascular Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47* (4), 514–519.
- (133) Nune, S. K.; Rama, K. S.; Dirisala, V. R.; Chavali, M. Y. Chapter 11 - Electrospinning of Collagen Nanofiber Scaffolds for Tissue Repair and Regeneration. In *Nanostructures for Novel Therapy*; Ficai, D., Grumezescu, A. M., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, 2017; pp 281–311.
- (134) Rho, K. S.; Jeong, L.; Lee, G.; Seo, B.-M.; Park, Y. J.; Hong, S.-D.; Roh, S.; Cho, J. J.; Park, W. H.; Min, B.-M. Electrospinning of Collagen Nanofibers: Effects on the Behavior of Normal Human Keratinocytes and Early-Stage Wound Healing. *Biomaterials* **2006**, *27* (8), 1452–1461.
- (135) Aldana, A. A.; Abraham, G. A. Current Advances in Electrospun Gelatin-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Int. J. Pharm.* **2017**, *523* (2), 441–453.
- (136) Topuz, F.; Uyar, T. Electrospinning of Gelatin with Tunable Fiber Morphology from Round to Flat/Ribbon. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *80*, 371–378.
- (137) Dias, J. R.; Baptista-Silva, S.; Oliveira, C. M. T. de; Sousa, A.; Oliveira, A. L.; Bártoło, P. J.; Granja, P. L. In Situ Crosslinked Electrospun Gelatin Nanofibers for Skin Regeneration. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 161–173.
- (138) Tonda-Turo, C.; Cipriani, E.; Gnani, S.; Chiono, V.; Mattu, C.; Gentile, P.; Perroteau, I.; Zanetti, M.; Ciardelli, G. Crosslinked Gelatin Nanofibres: Preparation, Characterisation and in Vitro Studies Using Glial-like Cells. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (5), 2723–2735.
- (139) Lawrence, J. C. Dressings and Wound Infection. *Am. J. Surg.* **1994**, *167* (1, Supplement), S21–S24.
- (140) Frey, M. W. Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives. *Polym. Rev.* **2008**, *48* (2), 378–391.
- (141) Aydogdu, A.; Sumnu, G.; Sahin, S. A Novel Electrospun Hydroxypropyl Methylcellulose/Polyethylene Oxide Blend Nanofibers: Morphology and Physicochemical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *181*, 234–246.
- (142) Frenot, A.; Henriksson, M. W.; Walkenström, P. Electrospinning of Cellulose-Based Nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *103* (3), 1473–1482.
- (143) Son, W. K.; Youk, J. H.; Park, W. H. Preparation of Ultrafine Oxidized Cellulose Mats via Electrospinning. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (1), 197–201.
- (144) Nakajima, M.; Atsumi, K.; Kifune, K.; Miura, K.; Kanamaru, H. Chitin Is an Effective Material for Sutures. *Jpn. J. Surg.* **1986**, *16* (6), 418–424.
- (145) Petrova, V. A.; Panevin, A. A.; Zhuravskii, S. G.; Gasilova, E. R.; Vlasova, E. N.; Romanov, D. P.; Poshina, D. N.; Skorik, Y. A. Preparation of N-Succinyl-Chitin Nanoparticles and Their Applications in Otoneurological Pathology. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 1023–1029.
- (146) Annadurai, G.; Chellapandian, M.; Krishnan, M. R. V. Adsorption of Reactive Dye on Chitin. *Environ. Monit. Assess.* **1999**, *59* (1), 111–119.
- (147) No, H. K.; Cho, Y. I.; Meyers, S. P. Dye Binding Capacity of Commercial Chitin Products. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (7), 1939–1942.
- (148) Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Saldaña-Koppel, D. A.; Quiñones-Olvera, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Res. Int.* **2015**, *Volume 2015* (Article ID 821279), 15 pages.

- (149) Afratis, N.; Gialeli, C.; Nikitovic, D.; Tsegenidis, T.; Karousou, E.; Theocharis, A. D.; Pavão, M. S.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment. *FEBS J.* **2012**, *279* (7), 1177–1197.
- (150) Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (4), 780–792.
- (151) Taghizadeh, S. M.; Davari, G. Preparation, Characterization, and Swelling Behavior of N-Acetylated and Deacetylated Chitosans. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64* (1), 9–15.
- (152) Zhao, Y.; Park, R.-D.; Muzzarelli, R. A. A. Chitin Deacetylases: Properties and Applications. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (1), 24–46.
- (153) Fai, A. E. C.; Stamford, T. C. M.; Stamford-Arnaud, T. M.; Santa-Cruz, P. D.; da Silva, M. C. F.; Campos-Takaki, G. M.; Stamford, T. L. M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor Circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Mol. Basel Switz.* **2011**, *16* (8), 7143–7154.
- (154) Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (3), 1133–1174.
- (155) Ravi Kumar, M. N. V. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46* (1), 1–27.
- (156) Wu, T.; Zivanovic, S.; Draughon, F. A.; Sams, C. E. Chitin and Chitosan--Value-Added Products from Mushroom Waste. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (26), 7905–7910.
- (157) Li, Q.; Dunn, E. T.; Grandmaison, E. W.; Goosen, M. F. A. Applications and Properties of Chitosan. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1992**, *7* (4), 370–397.
- (158) Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (3), 765–772.
- (159) Varum, K. M.; Ottoy, M. H.; Smidsrod, O. Water-Solubility of Partially N-Acetylated Chitosans as a Function of PH: Effect of Chemical Composition and Depolymerisation. *Carbohydr. Polym.* **1994**.
- (160) Osorio-Madrado, A.; David, L.; Trombotto, S.; Lucas, J.-M.; Peniche-Covas, C.; Domard, A. Highly Crystalline Chitosan Produced by Multi-Steps Acid Hydrolysis in the Solid-State. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (4), 1730–1739.
- (161) Osorio-Madrado, A.; David, L.; Trombotto, S.; Lucas, J.-M.; Peniche-Covas, C.; Domard, A. Kinetics Study of the Solid-State Acid Hydrolysis of Chitosan: Evolution of the Crystallinity and Macromolecular Structure. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (5), 1376–1386.
- (162) Zhou, H. Y.; Chen, X. G.; Kong, M.; Liu, C. S.; Cha, D. S.; Kennedy, J. F. Effect of Molecular Weight and Degree of Chitosan Deacetylation on the Preparation and Characteristics of Chitosan Thermosensitive Hydrogel as a Delivery System. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73* (2), 265–273.
- (163) Chattopadhyay, D. P.; Inamdar, M. S. Aqueous Behaviour of Chitosan <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2010/939536/> (accessed Oct 11, 2018).
- (164) Cho, Y. W.; Jang, J.; Park, C. R.; Ko, S. W. Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (4), 609–614.
- (165) Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Heux, L.; Mazeau, K.; Rinaudo, M. Overview on Structural Characterization of Chitosan Molecules in Relation with Their Behavior in Solution. *Macromol. Symp.* **2001**, *168* (1), 1–20.
- (166) Mutalik, S.; Manoj, K.; Reddy, M. S.; Kushtagi, P.; Usha, A. N.; Anju, P.; Ranjith, A. K.; Udupa, N. Chitosan and Enteric Polymer Based Once Daily Sustained Release Tablets of Aceclofenac: In Vitro and in Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9* (2), 651–659.
- (167) Illum, L.; Farraj, N. F.; Davis, S. S. Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs. *Pharm. Res.* **1994**, *11* (8), 1186–1189.

- (168) Skaugrud, O.; Hagen, A.; Borgersen, B.; Dornish, M. Biomedical and Pharmaceutical Applications of Alginate and Chitosan. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1999**, *16*, 23–40.
- (169) Aspden, T. J.; Mason, J. D.; Jones, N. S.; Lowe, J.; Skaugrud, O.; Illum, L. Chitosan as a Nasal Delivery System: The Effect of Chitosan Solutions on in Vitro and in Vivo Mucociliary Transport Rates in Human Turbinates and Volunteers. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (4), 509–513.
- (170) Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. Chitosan-Based Formulations for Delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (1), 12–27.
- (171) Baldrick, P. The Safety of Chitosan as a Pharmaceutical Excipient. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* **2010**, *56* (3), 290–299.
- (172) Cao, L.; Lu, C.; Wang, Q.; Li, F. Biocompatibility and Fabrication of RGO/Chitosan Film for Cartilage Tissue Recovery. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *54*, 199–203.
- (173) Nandi, S. K.; Kundu, B.; Basu, D. Protein Growth Factors Loaded Highly Porous Chitosan Scaffold: A Comparison of Bone Healing Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (3), 1267–1275.
- (174) Beringer, L. T.; Kiechel, M. A.; Komiya, Y.; Donius, A. E.; Habas, R.; Wegst, U. G. K.; Schauer, C. L. Osteoblast Biocompatibility of Novel Chitosan Crosslinker, Hexamethylene-1,6-Diaminocarboxysulfonate. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (9), 3026–3033.
- (175) Lim, C. K.; Yaacob, N. S.; Ismail, Z.; Halim, A. S. In Vitro Biocompatibility of Chitosan Porous Skin Regenerating Templates (PSRTs) Using Primary Human Skin Keratinocytes. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24* (3), 721–727.
- (176) Howling, G. I.; Dettmar, P. W.; Goddard, P. A.; Hampson, F. C.; Dornish, M.; Wood, E. J. The Effect of Chitin and Chitosan on the Proliferation of Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes in Vitro. *Biomaterials* **2001**, *22* (22), 2959–2966.
- (177) Montembault, A.; Tahiri, K.; Korwin-Zmijowska, C.; Chevalier, X.; Corvol, M.-T.; Domard, A. A Material Decoy of Biological Media Based on Chitosan Physical Hydrogels: Application to Cartilage Tissue Engineering. *Biochimie* **2006**, *88* (5), 551–564.
- (178) Denost, Q.; Adam, J.-P.; Pontallier, A.; Montembault, A.; Bareille, R.; Siadous, R.; Delmond, S.; Rullier, E.; David, L.; Bordenave, L. Colorectal Tissue Engineering: A Comparative Study between Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS) and Chitosan Hydrogel Patches. *Surgery* **2015**, *158* (6), 1714–1723.
- (179) Yuan, Y.; Zhang, P.; Yang, Y.; Wang, X.; Gu, X. The Interaction of Schwann Cells with Chitosan Membranes and Fibers in Vitro. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4273–4278.
- (180) Rami, L.; Malaise, S.; Delmond, S.; Fricain, J.-C.; Siadous, R.; Schlaubitz, S.; Laurichesse, E.; Amédée, J.; Montembault, A.; David, L.; et al. Physicochemical Modulation of Chitosan-Based Hydrogels Induces Different Biological Responses: Interest for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102* (10), 3666–3676.
- (181) Lončarević, A.; Ivanković, M.; Rogina, A. Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. *J. Tissue Repair Regen.* **2017**, *1* (1), 12.
- (182) Alonso, M. J.; Sánchez, A. The Potential of Chitosan in Ocular Drug Delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55* (11), 1451–1463.
- (183) Eide, K. B.; Norberg, A. L.; Heggset, E. B.; Lindbom, A. R.; Vårum, K. M.; Eijsink, V. G. H.; Sørli, M. Human Chitotriosidase-Catalyzed Hydrolysis of Chitosan. *Biochemistry* **2012**, *51* (1), 487–495.
- (184) Domard, A.; Domard, M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. **2002**.

- (185) Desorme, M. *Filage Du Chitosane Pour l'élaboration de Textiles Biomédicaux Innovants*; Lyon 1, 2011.
- (186) Costa, E.; Silva, S.; Tavora, F.; Pintado, M. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen *Candida Albicans*. *Pathogens* **2014**, *3* (4), 908–919.
- (187) Alburquenque, C.; Bucarey, S. A.; Neira-Carrillo, A.; Urzúa, B.; Hermosilla, G.; Tapia, C. V. Antifungal Activity of Low Molecular Weight Chitosan against Clinical Isolates of *Candida Spp.* *Med. Mycol.* **2010**, *48* (8), 1018–1023.
- (188) Tsai, G. J.; Su, W. H. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia Coli*. *J. Food Prot.* **1999**, *62* (3), 239–243.
- (189) Li, J.; Wu, Y.; Zhao, L. Antibacterial Activity and Mechanism of Chitosan with Ultra High Molecular Weight. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *148*, 200–205.
- (190) Andres, Y.; Giraud, L.; Gerente, C.; Le Cloirec, P. Antibacterial Effects of Chitosan Powder: Mechanisms of Action. *Environ. Technol.* **2007**, *28* (12), 1357–1363.
- (191) Shanmugam, A.; Kathiresan, K.; Nayak, L. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan and Phosphorylated Chitosan from Cuttlebone of *Sepia Kobiensis* (Hoyle, 1885). *Biotechnol. Rep.* **2016**, *9*, 25–30.
- (192) Asli, A.; Brouillette, E.; Ster, C.; Ghinet, M. G.; Brzezinski, R.; Lacasse, P.; Jacques, M.; Malouin, F. Antibiofilm and Antibacterial Effects of Specific Chitosan Molecules on *Staphylococcus Aureus* Isolates Associated with Bovine Mastitis. *PLoS ONE* **2017**, *12* (5).
- (193) Erdem, B.; Karipta?, E.; Kaya, T.; Tulumo?lu, ?ener; Görgülü, Ö. Factors Influencing Antibacterial Activity of Chitosan against *Aeromonas Hydrophila* and *Staphylococcus Aureus*. *Int. Curr. Pharm. J.* **2016**, *5* (5), 45–48.
- (194) Jahani, S.; Shakiba, A.; Jahani, L. The Antimicrobial Effect of Lactoferrin on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Int. J. Infect.* **2015**, *2* (3).
- (195) Tsai, T.; Chien, H.-F.; Wang, T.-H.; Huang, C.-T.; Ker, Y.-B.; Chen, C.-T. Chitosan Augments Photodynamic Inactivation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (5), 1883–1890.
- (196) Geethapriya, N.; Subbiya, A.; Padmavathy, K.; Mahalakshmi, K.; Vivekanandan, P.; Sukumaran, V. G. Effect of Chitosan-Ethylenediamine Tetraacetic Acid on *Enterococcus Faecalis* Dental Biofilm and Smear Layer Removal. *J. Conserv. Dent. JCD* **2016**, *19* (5), 472–477.
- (197) Jaiswal, N.; Sinha, D.-J.; Singh, U.-P.; Singh, K.; Jandial, U.-A.; Goel, S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium Hypochlorite on *Enterococcus Faecalis* Biofilm : An in Vitro Study. *J. Clin. Exp. Dent.* **2017**, *9* (9), e1066–e1074.
- (198) Yadav, P.; Chaudhary, S.; Saxena, R. K.; Talwar, S.; Yadav, S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal Efficacy of Chitosan as Endodontic Irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm Formed on Tooth Substrate. *J. Clin. Exp. Dent.* **2017**, *9* (3), e361–e367.
- (199) Young, D. H.; Köhle, H.; Kauss, H. Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension-Cultured *Glycine Max* and *Phaseolus Vulgaris* Cells. *Plant Physiol.* **1982**, *70* (5), 1449–1454.
- (200) Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Li, Y.; Wang, M. Cytotoxic Activities of Chitosan Nanoparticles and Copper-Loaded Nanoparticles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (5), 1397–1399.
- (201) Tayel, A. A.; Moussa, S.; Opwis, K.; Knittel, D.; Schollmeyer, E.; Nickisch-Hartfiel, A. Inhibition of Microbial Pathogens by Fungal Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47* (1), 10–14.

- (202) Ahmed, S.; Annu, Sheikh, J.; Ali, A. A Review on Chitosan Centred Scaffolds and Their Applications in Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**.
- (203) Ali, A.; Ahmed, S. A Review on Chitosan and Its Nanocomposites in Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 273–286.
- (204) Ahsan, S. M.; Thomas, M.; Reddy, K. K.; Sooraparaju, S. G.; Asthana, A.; Bhatnagar, I. Chitosan as Biomaterial in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *110*, 97–109.
- (205) Fischer, T. H.; Connolly, R.; Thatte, H. S.; Schwaitzberg, S. S. Comparison of Structural and Hemostatic Properties of the Poly-N-Acetyl Glucosamine Syvek Patch with Products Containing Chitosan. *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *63* (3), 168–174.
- (206) Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (8), 5156–5186.
- (207) ChitoFlex® PRO <https://www.tricolbiomedical.com/product/chitoflex/> (accessed Oct 15, 2018).
- (208) Ohkawa, K.; Cha, D.; Kim, H.; Nishida, A.; Yamamoto, H. Electrospinning of Chitosan. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25* (18), 1600–1605.
- (209) Sangsanoh, P.; Supaphol, P. Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (10), 2710–2714.
- (210) Hasegawa, M.; Isogai, A.; Onabe, F.; Usuda, M.; Atalla, R. H. Characterization of Cellulose–Chitosan Blend Films. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *45* (11), 1873–1879.
- (211) Schiffman, J. D.; Schauer, C. L. Cross-Linking Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (2), 594–601.
- (212) De Vrieze, S.; Westbroek, P.; Van Camp, T.; Van Langenhove, L. Electrospinning of Chitosan Nanofibrous Structures: Feasibility Study. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42* (19), 8029–8034.
- (213) Bhattarai, N.; Edmondson, D.; Veiseh, O.; Matsen, F. A.; Zhang, M. Electrospun Chitosan-Based Nanofibers and Their Cellular Compatibility. *Biomaterials* **2005**, *26* (31), 6176–6184.
- (214) Bhattarai, N. Nanofibrous Structure of Chitosan for Biomedical Applications. *J. Nanomedicine Biotherapeutic Discov.* **2012**, *02* (01).
- (215) Chen, J.-P.; Chang, G.-Y.; Chen, J.-K. Electrospun Collagen/Chitosan Nanofibrous Membrane as Wound Dressing. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *313–314*, 183–188.
- (216) Jiang, H.; Fang, D.; Hsiao, B.; Chu, B.; Chen, W. Preparation and Characterization of Ibuprofen-Loaded Poly(Lactide-Co-Glycolide)/Poly(Ethylene Glycol)-g-Chitosan Electrospun Membranes. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15* (3), 279–296.
- (217) Walsh, J. S. Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation. *Surg. Oxf.* **2015**, *33* (1), 1–6.
- (218) Stevens, M. M. Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Mater. Today* **2008**, *11* (5), 18–25.
- (219) Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **2008**, *3* (Suppl 3), S131–S139.
- (220) Bayliss, L.; Mahoney, D. J.; Monk, P. Normal Bone Physiology, Remodelling and Its Hormonal Regulation. *Surg. Oxf.* **2012**, *30* (2), 47–53.
- (221) Rucci, N.; Teti, A. Bone Cells: Osteoblast/Osteoclast/Osteocyte. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2018.
- (222) Karsenty, G.; Kronenberg, H. M.; Settembre, C. Genetic Control of Bone Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2009**, *25*, 629–648.

- (223) Teitelbaum, S. L. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? *Am. J. Pathol.* **2007**, *170* (2), 427–435.
- (224) Bonewald, L. F. The Amazing Osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26* (2), 229–238.
- (225) Diagrams And Labelling Of Bones Cells Sketch And Label Bone Cell Vocab Test 2 - Biology 252 With Shemer <https://anatomyinnerbody.com> (accessed Jul 17, 2018).
- (226) Everts, V.; Delaissé, J. M.; Korper, W.; Jansen, D. C.; Tigchelaar-Gutter, W.; Saftig, P.; Beertsen, W. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2002**, *17* (1), 77–90.
- (227) Siddiqui, J. A.; Partridge, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* **2016**, *31* (3), 233–245.
- (228) Kapinas, K.; Delany, A. M. MicroRNA Biogenesis and Regulation of Bone Remodeling. *Arthritis Res. Ther.* **2011**, *13* (3), 220.
- (229) Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone Substitutes: An Update. *Injury* **2005**, *36* (3, Supplement), S20–S27.
- (230) Ferri, J.; Dujoncqoy, J.-P.; Carneiro, J. M.; Raoul, G. Maxillary Reconstruction to Enable Implant Insertion: A Retrospective Study of 181 Patients. *Head Face Med.* **2008**, *4*, 31.
- (231) Raoul, G.; Ruhin, B.; Briki, S.; Lauwers, L.; Haurou Patou, G.; Capet, J.-P.; Maes, J.-M.; Ferri, J. Microsurgical Reconstruction of the Jaw with Fibular Grafts and Implants. *J. Craniofac. Surg.* **2009**, *20* (6), 2105–2117.
- (232) Chai, F.; Raoul, G.; Wiss, A.; Ferri, J.; Hildebrand, H. F. Les Biomatériaux de Substitution Osseuse : Classification et Intérêt. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **2011**, *112* (4), 212–221.
- (233) Campana, V.; Milano, G.; Pagano, E.; Barba, M.; Cicione, C.; Salonna, G.; Lattanzi, W.; Logroscino, G. Bone Substitutes in Orthopaedic Surgery: From Basic Science to Clinical Practice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25* (10), 2445–2461.
- (234) O'Keefe, R. J.; Mao, J. Bone Tissue Engineering and Regeneration: From Discovery to the Clinic--an Overview. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2011**, *17* (6), 389–392.
- (235) Costa, J. B.; Pereira, H.; Espregueira-Mendes, J.; Khang, G.; Oliveira, J. M.; Reis, R. L. Tissue Engineering in Orthopaedic Sports Medicine: Current Concepts. *J. ISAKOS Jt. Disord. Orthop. Sports Med.* **2017**, *2* (2), 60–66.
- (236) Mravic, M.; Péault, B.; James, A. W. Current Trends in Bone Tissue Engineering <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/865270/> (accessed May 22, 2018).
- (237) Shrivats, A. R.; McDermott, M. C.; Hollinger, J. O. Bone Tissue Engineering: State of the Union. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (6), 781–786.
- (238) Black, C. R. M.; Goriainov, V.; Gibbs, D.; Kanczler, J.; Tare, R. S.; Oreffo, R. O. C. Bone Tissue Engineering. *Curr. Mol. Biol. Rep.* **2015**, *1* (3), 132–140.
- (239) Myon, L.; Ferri, J.; Chai, F.; Blanchemain, N.; Raoul, G. Ingénierie Du Tissu Osseux Oro-Maxillofacial Par Combinaison de Biomatériaux, Cellules Souches, Thérapie Génique. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **2011**, *112* (4), 201–211.
- (240) Blitterswijk, C. A. van; Moroni, L.; Rouwkema, J.; Siddappa, R.; Sohler, J. Tissue Engineering – an Introduction. In *Tissue Engineering*; Blitterswijk, C. van, Thomsen, P., Lindahl, A., Hubbell, J., Williams, D. F., Cancedda, R., Bruijn, J. D. de, Sohler, J., Eds.; Academic Press: Burlington, 2008; pp xii–xxxvi.
- (241) Albrektsson, T.; Johansson, C. Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration. *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* **2001**, *10 Suppl 2*, S96-101.
- (242) Hung, N. N. Basic Knowledge of Bone Grafting. *Bone Grafting* **2012**.

- (243) Samavedi, S.; Whittington, A. R.; Goldstein, A. S. Calcium Phosphate Ceramics in Bone Tissue Engineering: A Review of Properties and Their Influence on Cell Behavior. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (9), 8037–8045.
- (244) López-Álvarez, M.; Rodríguez-Valencia, C.; Serra, J.; González, P. Bio-Inspired Ceramics: Promising Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Procedia Eng.* **2013**, *59*, 51–58.
- (245) Trombetta, R.; Inzana, J. A.; Schwarz, E. M.; Kates, S. L.; Awad, H. A. 3D Printing of Calcium Phosphate Ceramics for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45* (1), 23–44.
- (246) Sethu, S. N.; Namashivayam, S.; Devendran, S.; Nagarajan, S.; Tsai, W.-B.; Narashiman, S.; Ramachandran, M.; Ambigapathi, M. Nanoceramics on Osteoblast Proliferation and Differentiation in Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *98*, 67–74.
- (247) Choi, W.-Y.; Kim, H.-E.; Moon, Y.-W.; Shin, K.-H.; Koh, Y.-H. Production of Porous Calcium Phosphate (CaP) Ceramics with Aligned Pores Using Ceramic/Camphene-Based Co-Extrusion. *Biomater. Res.* **2015**, *19*, 16.
- (248) Zhang, Y.; Wu, C.; Friis, T.; Xiao, Y. The Osteogenic Properties of CaP/Silk Composite Scaffolds. *Biomaterials* **2010**, *31* (10), 2848–2856.
- (249) Fu, Q.; Saiz, E.; Rahaman, M. N.; Tomsia, A. P. Bioactive Glass Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Perspectives. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2011**, *31* (7), 1245–1256.
- (250) Will, J.; Gerhardt, L.-C.; Boccaccini, A. R. Bioactive Glass-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2012**, *126*, 195–226.
- (251) Rahaman, M. N.; Xiao, W.; Huang, W. 11 - Bioactive Glass Composites for Bone and Musculoskeletal Tissue Engineering. In *Bioactive Glasses (Second Edition)*; Ylänen, H., Ed.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2018; pp 285–336.
- (252) Baino, F. Bioactive Glasses – When Glass Science and Technology Meet Regenerative Medicine. *Ceram. Int.* **2018**, *44* (13), 14953–14966.
- (253) Liu, X.; Ma, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32* (3), 477–486.
- (254) Meskinfam, M. 17 - Polymer Scaffolds for Bone Regeneration. In *Characterization of Polymeric Biomaterials*; Tanzi, M. C., Farè, S., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 441–475.
- (255) Ning, C.; Zhou, Z.; Tan, G.; Zhu, Y.; Mao, C. Electroactive Polymers for Tissue Regeneration: Developments and Perspectives. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *81*, 144–162.
- (256) Balagangadharan, K.; Dhivya, S.; Selvamurugan, N. Chitosan Based Nanofibers in Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1372–1382.
- (257) Titorencu, I.; Albu, M. G.; Nemezc, M.; Jinga, V. V. Natural Polymer-Cell Bioconstructs for Bone Tissue Engineering. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *12* (2), 165–174.
- (258) Sell, S. A.; Wolfe, P. S.; Garg, K.; McCool, J. M.; Rodriguez, I. A.; Bowlin, G. L.; Sell, S. A.; Wolfe, P. S.; Garg, K.; McCool, J. M.; et al. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers* **2010**, *2* (4), 522–553.
- (259) Gunatillake, P. A.; Adhikari, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *Eur. Cell. Mater.* **2003**, *5*, 1–16; discussion 16.
- (260) BaoLin, G.; MA, P. X. Synthetic Biodegradable Functional Polymers for Tissue Engineering: A Brief Review. *Sci. China Chem.* **2014**, *57* (4), 490–500.

- (261) Palmero, P. 15 - Ceramic–Polymer Nanocomposites for Bone-Tissue Regeneration. In *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*; Liu, H., Ed.; Woodhead Publishing: Oxford, 2016; pp 331–367.
- (262) Iannazzo, D.; Pistone, A.; Salamò, M.; Galvagno, S. 6 - Hybrid Ceramic/Polymer Composites for Bone Tissue Regeneration. In *Hybrid Polymer Composite Materials*; Thakur, V. K., Thakur, M. K., Gupta, R. K., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 125–155.
- (263) He, B.; Zhao, J.; Ou, Y.; Jiang, D. Biofunctionalized Peptide Nanofiber-Based Composite Scaffolds for Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *90*, 728–738.
- (264) Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D Bioactive Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3* (3), 278–314.
- (265) El-Rashidy, A. A.; Roether, J. A.; Harhaus, L.; Kneser, U.; Boccaccini, A. R. Regenerating Bone with Bioactive Glass Scaffolds: A Review of in Vivo Studies in Bone Defect Models. *Acta Biomater.* **2017**, *62*, 1–28.
- (266) Yunus Basha, R.; T.s., S. K.; Doble, M. Design of Biocomposite Materials for Bone Tissue Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 452–463.
- (267) Muzzarelli, R. A. A. Chitosan Composites with Inorganics, Morphogenetic Proteins and Stem Cells, for Bone Regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (4), 1433–1445.
- (268) Ren, B.; Chen, X.; Du, S.; Ma, Y.; Chen, H.; Yuan, G.; Li, J.; Xiong, D.; Tan, H.; Ling, Z.; et al. Injectable Polysaccharide Hydrogel Embedded with Hydroxyapatite and Calcium Carbonate for Drug Delivery and Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 1257–1266.
- (269) Moreira, C. D. F.; Carvalho, S. M.; Sousa, R. G.; Mansur, H. S.; Pereira, M. M. Nanostructured Chitosan/Gelatin/Bioactive Glass in Situ Forming Hydrogel Composites as a Potential Injectable Matrix for Bone Tissue Engineering. *Mater. Chem. Phys.* **2018**, *218*, 304–316.
- (270) Bai, X.; Lü, S.; Liu, H.; Cao, Z.; Ning, P.; Wang, Z.; Gao, C.; Ni, B.; Ma, D.; Liu, M. Polysaccharides Based Injectable Hydrogel Compositing Bio-Glass for Cranial Bone Repair. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *175*, 557–564.
- (271) Kim, M. H.; Kim, B. S.; Park, H.; Lee, J.; Park, W. H. Injectable Methylcellulose Hydrogel Containing Calcium Phosphate Nanoparticles for Bone Regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 57–64.
- (272) Liu, M.; Zeng, X.; Ma, C.; Yi, H.; Ali, Z.; Mou, X.; Li, S.; Deng, Y.; He, N. Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Bone Res.* **2017**, *5*, 17014.
- (273) Ber, S.; Torun Köse, G.; Hasırcı, V. Bone Tissue Engineering on Patterned Collagen Films: An in Vitro Study. *Biomaterials* **2005**, *26* (14), 1977–1986.
- (274) Mozafari, M.; Salahinejad, E.; Shabafrooz, V.; Yazdimamaghani, M.; Vashae, D.; Tayebi, L. Multilayer Bioactive Glass/Zirconium Titanate Thin Films in Bone Tissue Engineering and Regenerative Dentistry. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 1665–1672.
- (275) Bakare, R.; Wells, L.; McLennon, N.; Singh, M.; Gugssa, A.; Stubbs, J.; Zewde, B.; Raghavan, D. Formulation of Silver Chloride/Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) (AgCl/PHBV) Films for Potential Use in Bone Tissue Engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (31), 45162.
- (276) Aragón, J.; Salerno, S.; De Bartolo, L.; Irusta, S.; Mendoza, G. Polymeric Electrospun Scaffolds for Bone Morphogenetic Protein 2 Delivery in Bone Tissue Engineering. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *531*, 126–137.
- (277) Liverani, L.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. 12 - Nanofiber Composites in Bone Tissue Engineering. In *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*; Ramalingam, M., Ramakrishna, S., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 301–323.

- (278) Chan, B. P.; Hui, T. Y.; Wong, M. Y.; Yip, K. H. K.; Chan, G. C. F. Mesenchymal Stem Cell-Encapsulated Collagen Microspheres for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* **2010**, *16* (2), 225–235.
- (279) Cholas, R.; Kunjalukkal Padmanabhan, S.; Gervaso, F.; Udayan, G.; Monaco, G.; Sannino, A.; Licciulli, A. Scaffolds for Bone Regeneration Made of Hydroxyapatite Microspheres in a Collagen Matrix. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *63*, 499–505.
- (280) Hu, Z.; Ma, C.; Rong, X.; Zou, S.; Liu, X. Immunomodulatory ECM-like Microspheres for Accelerated Bone Regeneration in Diabetes Mellitus. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (3), 2377–2390.
- (281) Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R. L.; Neves, N. M. Nanoparticle-Based Bioactive Agent Release Systems for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Regen. Ther.* **2015**, *1*, 109–118.
- (282) Wang, H.; Leeuwenburgh, S. C. G.; Li, Y.; Jansen, J. A. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2012**, *18* (1), 24–39.
- (283) Wang, X.; Li, W. Biodegradable Mesoporous Bioactive Glass Nanospheres for Drug Delivery and Bone Tissue Regeneration. *Nanotechnology* **2016**, *27* (22), 225102.
- (284) Granito, R. N.; Custódio, M. R.; Rennó, A. C. M. Natural Marine Sponges for Bone Tissue Engineering: The State of Art and Future Perspectives. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2017**, *105* (6), 1717–1727.
- (285) Pallela, R.; Venkatesan, J.; Rao, J.; Kim, S.-J. Biophysicochemical Evaluation of Chitosan-Hydroxyapatite-Marine Sponge Collagen Composite for Bone Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100A*.
- (286) Chaochai, T.; Miyaji, H.; Yoshida, T.; Nishida, E.; Furuike, T.; Tamura, H. Preparation of Chitosan-Gelatin Based Sponge Cross-Linked with GlcNAc for Bone Tissue Engineering
<https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jcc/2016/00000004/00000001/art00001>
(accessed Sep 12, 2018).
- (287) Seol, Y.-J.; Lee, J.-Y.; Park, Y.-J.; Lee, Y.-M.; -Ku, Y.; Rhyu, I.-C.; Lee, S.-J.; Han, S.-B.; Chung, C.-P. Chitosan Sponges as Tissue Engineering Scaffolds for Bone Formation. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26* (13), 1037–1041.
- (288) Epstein, N. E. Pros, Cons, and Costs of INFUSE in Spinal Surgery. *Surg. Neurol. Int.* **2011**, *2*, 10.
- (289) Cerasorb M: next generation osteobiologic for dental bone grafting.
<https://curasaninc.com/product/cerasorb/> (accessed Sep 12, 2018).
- (290) Ciapetti, G.; Granchi, D.; Devescovi, V.; Baglio, S. R.; Leonardi, E.; Martini, D.; Jurado, M. J.; Olalde, B.; Armentano, I.; Kenny, J. M.; et al. Enhancing Osteoconduction of PLLA-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Regeneration Using Different Biomimetic Signals to MSCs. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (2), 2439–2458.
- (291) Wei, G.; Ma, P. X. Structure and Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2004**, *25* (19), 4749–4757.
- (292) Nie, W.; Peng, C.; Zhou, X.; Chen, L.; Wang, W.; Zhang, Y.; Ma, P. X.; He, C. Three-Dimensional Porous Scaffold by Self-Assembly of Reduced Graphene Oxide and Nano-Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Engineering. *Carbon* **2017**, *116*, 325–337.
- (293) Pan, P.; Chen, X.; Metavarayuth, K.; Su, J.; Wang, Q. Self-Assembled Supramolecular Systems for Bone Engineering Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *35*, 104–111.

- (294) Chong, L. H.; Zarith, N. Z.; Sultana, N. Poly(Caprolactone)/Chitosan-Based Scaffold Using Freeze Drying Technique for Bone Tissue Engineering Application. In *2015 10th Asian Control Conference (ASCC)*; 2015; pp 1–4.
- (295) Flores, C.; Degoutin, S.; Chai, F.; Raoul, G.; Hornez, J.-C.; Martel, B.; Siepmann, J.; Ferri, J.; Blanchemain, N. Gentamicin-Loaded Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microparticles for the Prevention of Maxillofacial and Orthopedic Implant Infections. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *64*, 108–116.
- (296) Shahbazarab, Z.; Teimouri, A.; Chermahini, A. N.; Azadi, M. Fabrication and Characterization of Nanobiocomposite Scaffold of Zein/Chitosan/Nanohydroxyapatite Prepared by Freeze-Drying Method for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 1017–1027.
- (297) Murugan, R.; Ramakrishna, S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. *Tissue Eng.* **2007**, *13* (8), 1845–1866.
- (298) Dalby, M. J.; Gadegaard, N.; Tare, R.; Andar, A.; Riehle, M. O.; Herzyk, P.; Wilkinson, C. D. W.; Oreffo, R. O. C. The Control of Human Mesenchymal Cell Differentiation Using Nanoscale Symmetry and Disorder. *Nat. Mater.* **2007**, *6* (12), 997–1003.
- (299) Zhu, H.; Yu, D.; Zhou, Y.; Wang, C.; Gao, M.; Jiang, H.; Wang, H. Biological Activity of a Nanofibrous Barrier Membrane Containing Bone Morphogenetic Protein Formed by Core-Shell Electrospinning as a Sustained Delivery Vehicle. *J. Biomed. Mater. Res. Part B-Appl. Biomater.* **2013**, *101B* (4), 541–552.
- (300) Patlolla, A.; Arinzeh, T. L. Evaluating Apatite Formation and Osteogenic Activity of Electrospun Composites for Bone Tissue Engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (5), 1000–1017.
- (301) Suganya, S.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S.; Lakshmi, B. S.; Dev, V. R. G. Herbally Derived Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131* (3), 39835.
- (302) Dan, H.; Vaquette, C.; Fisher, A. G.; Hamlet, S. M.; Xiao, Y.; Hutmacher, D. W.; Ivanovski, S. The Influence of Cellular Source on Periodontal Regeneration Using Calcium Phosphate Coated Polycaprolactone Scaffold Supported Cell Sheets. *Biomaterials* **2014**, *35* (1), 113–122.
- (303) Lee, J. H.; Park, J.-H.; El-Fiqi, A.; Kim, J.-H.; Yun, Y.-R.; Jang, J.-H.; Han, C.-M.; Lee, E.-J.; Kim, H.-W. Biointerface Control of Electrospun Fiber Scaffolds for Bone Regeneration: Engineered Protein Link to Mineralized Surface. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (6), 2750–2761.
- (304) Peng, F.; Yu, X.; Wei, M. In Vitro Cell Performance on Hydroxyapatite Particles/Poly(L-Lactic Acid) Nanofibrous Scaffolds with an Excellent Particle along Nanofiber Orientation. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (6), 2585–2592.
- (305) Shim, I. K.; Jung, M. R.; Kim, K. H.; Seol, Y. J.; Park, Y. J.; Park, W. H.; Lee, S. J. Novel Three-Dimensional Scaffolds of Poly((L)-Lactic Acid) Microfibers Using Electrospinning and Mechanical Expansion: Fabrication and Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B-Appl. Biomater.* **2010**, *95B* (1), 150–160.
- (306) Samavedi, S.; Vaidya, P.; Gaddam, P.; Whittington, A. R.; Goldstein, A. S. Electrospun Meshes Possessing Region-Wise Differences in Fiber Orientation, Diameter, Chemistry and Mechanical Properties for Engineering Bone-Ligament-Bone Tissues. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (12), 2549–2559.
- (307) Ramier, J.; Boudierlique, T.; Stoilova, O.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Langlois, V.; Renard, E.; Albanese, P.; Grande, D. Biocomposite Scaffolds Based on Electrospun Poly(3-Hydroxybutyrate) Nanofibers and Electrosprayed Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *38* (1), 161–169.

- (308) Wang, Y.; Gao, R.; Wang, P.-P.; Jian, J.; Jiang, X.-L.; Yan, C.; Lin, X.; Wu, L.; Chen, G.-Q.; Wu, Q. The Differential Effects of Aligned Electrospun PHBHHx Fibers on Adipogenic and Osteogenic Potential of MSCs through the Regulation of PPAR γ Signaling. *Biomaterials* **2012**, *33* (2), 485–493.
- (309) Yoshimoto, H.; Shin, Y. M.; Terai, H.; Vacanti, J. P. A Biodegradable Nanofiber Scaffold by Electrospinning and Its Potential for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2003**, *24* (12), 2077–2082.
- (310) Jiang, L.; Sun, H.; Yuan, A.; Zhang, K.; Li, D.; Li, C.; Shi, C.; Li, X.; Gao, K.; Zheng, C.; et al. Enhancement of Osteoinduction by Continual Simvastatin Release from Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Hydroxyapatite-Simvastatin Nano-Fibrous Scaffold. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9* (11), 1921–1928.
- (311) Gentile, P.; McColgan-Bannon, K.; Gianone, N. C.; Sefat, F.; Dalgarno, K.; Ferreira, A. M. Biosynthetic PCL-Graft-Collagen Bulk Material for Tissue Engineering Applications. *Mater. Basel Switz.* **2017**, *10* (7).
- (312) Zhang, S.; Chen, L.; Jiang, Y.; Cai, Y.; Xu, G.; Tong, T.; Zhang, W.; Wang, L.; Ji, J.; Shi, P.; et al. Bi-Layer Collagen/Microporous Electrospun Nanofiber Scaffold Improves the Osteochondral Regeneration. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (7), 7236–7247.
- (313) Baylan, N.; Bhat, S.; Ditto, M.; Lawrence, J. G.; Lecka-Czernik, B.; Yildirim-Ayan, E. Polycaprolactone Nanofiber Interspersed Collagen Type-I Scaffold for Bone Regeneration: A Unique Injectable Osteogenic Scaffold. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **2013**, *8* (4), 045011.
- (314) Goncalves, F.; Bentini, R.; Burrows, M. C.; Carreira, A. C. O.; Kossugue, P. M.; Sogayar, M. C.; Catalani, L. H. Hybrid Membranes of PLLA/Collagen for Bone Tissue Engineering: A Comparative Study of Scaffold Production Techniques for Optimal Mechanical Properties and Osteoinduction Ability. *Materials* **2015**, *8* (2), 408–423.
- (315) Ma, K.; Chan, C. K.; Liao, S.; Hwang, W. Y. K.; Feng, Q.; Ramakrishna, S. Electrospun Nanofiber Scaffolds for Rapid and Rich Capture of Bone Marrow-Derived Hematopoietic Stem Cells. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 2096–2103.
- (316) Venugopal, J.; Low, S.; Choon, A. T.; Sampath Kumar, T. S.; Ramakrishna, S. Mineralization of Osteoblasts with Electrospun Collagen/Hydroxyapatite Nanofibers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (5), 2039–2046.
- (317) Thomas, V.; Dean, D. R.; Jose, M. V.; Mathew, B.; Chowdhury, S.; Vohra, Y. K. Nanostructured Biocomposite Scaffolds Based on Collagen Coelectrospun with Nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (2), 631–637.
- (318) Song, J.-H.; Kim, H.-E.; Kim, H.-W. Electrospun Fibrous Web of Collagen-Apatite Precipitated Nanocomposite for Bone Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19* (8), 2925–2932.
- (319) Yeo, M.; Lee, H.; Kim, G. Three-Dimensional Hierarchical Composite Scaffolds Consisting of Polycaprolactone, β -Tricalcium Phosphate, and Collagen Nanofibers: Fabrication, Physical Properties, and in Vitro Cell Activity for Bone Tissue Regeneration. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (2), 502–510.
- (320) Kim, Y. B.; Kim, G. Rapid-Prototyped Collagen Scaffolds Reinforced with PCL/Beta-TCP Nanofibres to Obtain High Cell Seeding Efficiency and Enhanced Mechanical Properties for Bone Tissue Regeneration. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (33), 16880–16889.
- (321) Liu, S.; Wu, J.; Liu, X.; Chen, D.; Bowlin, G. L.; Cao, L.; Lu, J.; Li, F.; Mo, X.; Fan, C. Osteochondral Regeneration Using an Oriented Nanofiber Yarn-Collagen Type I/Hyaluronate Hybrid/TCP Biphasic Scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (2), 581–592.

- (322) Jin, H.-J.; Chen, J.; Karageorgiou, V.; Altman, G. H.; Kaplan, D. L. Human Bone Marrow Stromal Cell Responses on Electrospun Silk Fibroin Mats. *Biomaterials* **2004**, *25* (6), 1039–1047.
- (323) Yu, C.-C.; Chang, J.-J.; Lee, Y.-H.; Lin, Y.-C.; Wu, M.-H.; Yang, M.-C.; Chien, C.-T. Electrospun Scaffolds Composing of Alginate, Chitosan, Collagen and Hydroxyapatite for Applying in Bone Tissue Engineering. *Mater. Lett.* **2013**, *93*, 133–136.
- (324) Peter, M.; Ganesh, N.; Selvamurugan, N.; Nair, S. V.; Furuike, T.; Tamura, H.; Jayakumar, R. Preparation and Characterization of Chitosan–Gelatin/Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80* (3), 687–694.
- (325) Hsiao, S.-W.; Thien, D. V. H.; Ho, M.-H.; Hsieh, H.-J.; Li, C.-H.; Chang-Hsiang Hung; Li, H.-H. Interactions between Chitosan and Cells Measured by AFM. *Biomed. Mater.* **2010**, *5* (5), 054117.
- (326) Sainitya, R.; Sriram, M.; Kalyanaraman, V.; Dhivya, S.; Saravanan, S.; Vairamani, M.; Sastry, T. P.; Selvamurugan, N. Scaffolds Containing Chitosan/Carboxymethyl Cellulose/Mesoporous Wollastonite for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *80*, 481–488.
- (327) Dhivya, S.; Saravanan, S.; Sastry, T. P.; Selvamurugan, N. Nanohydroxyapatite-Reinforced Chitosan Composite Hydrogel for Bone Tissue Repair in Vitro and in Vivo. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13* (1), 40.
- (328) LogithKumar, R.; KeshavNarayan, A.; Dhivya, S.; Chawla, A.; Saravanan, S.; Selvamurugan, N. A Review of Chitosan and Its Derivatives in Bone Tissue Engineering. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 172–188.
- (329) Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (1), 1–21.
- (330) Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent Advances in Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (10), 546–554.
- (331) Ozkan, H. T. S. and O. Advances in Electrospinning of Nanofibers and Their Biomedical Applications. *Curr. Tissue Eng.* **2013**, *2* (2), 91–108.
- (332) Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B. Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2007**, *58* (3), 77–116.
- (333) Frohbergh, M. E.; Katsman, A.; Botta, G. P.; Lazarovici, P.; Schauer, C. L.; Wegst, U. G. K.; Lelkes, P. I. Electrospun Hydroxyapatite-Containing Chitosan Nanofibers Crosslinked with Genipin for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2012**, *33* (36), 9167–9178.
- (334) Costa-Pinto, A. R.; Martins, A. M.; Castelhana-Carlos, M. J.; Correlo, V. M.; Sol, P. C.; Longatto-Filho, A.; Battacharya, M.; Reis, R. L.; Neves, N. M. In Vitro Degradation and in Vivo Biocompatibility of Chitosan–Poly(Butylene Succinate) Fiber Mesh Scaffolds. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2014**, *29* (2), 137–151.
- (335) Hutmacher, D. W.; Goh, J. C.; Teoh, S. H. An Introduction to Biodegradable Materials for Tissue Engineering Applications. *Ann. Acad. Med. Singapore* **2001**, *30* (2), 183–191.
- (336) Norowski, P. A.; Fujiwara, T.; Clem, W. C.; Adatrow, P. C.; Eckstein, E. C.; Haggard, W. O.; Bumgardner, J. D. Novel Naturally Crosslinked Electrospun Nanofibrous Chitosan Mats for Guided Bone Regeneration Membranes: Material Characterization and Cytocompatibility. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9* (5), 577–583.
- (337) Porto, I. C. C. de M. Polymer Biocompatibility. *Polymerization* **2012**.
- (338) Di Martino, A.; Sittinger, M.; Risbud, M. V. Chitosan: A Versatile Biopolymer for Orthopaedic Tissue-Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5983–5990.

- (339) Jang, J.-H.; Castano, O.; Kim, H.-W. Electrospun Materials as Potential Platforms for Bone Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (12), 1065–1083.
- (340) Jiang, T.; Deng, M.; James, R.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Micro- and Nanofabrication of Chitosan Structures for Regenerative Engineering. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (4), 1632–1645.
- (341) Anitha, A.; Sowmya, S.; Kumar, P. T. S.; Deepthi, S.; Chennazhi, K. P.; Ehrlich, H.; Tsurkan, M.; Jayakumar, R. Chitin and Chitosan in Selected Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39* (9), 1644–1667.
- (342) Levengood, S. L.; Zhang, M. Chitosan-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **2014**, *2* (21), 3161–3184.
- (343) Yang, X.; Chen, X.; Wang, H. Acceleration of Osteogenic Differentiation of Preosteoblastic Cells by Chitosan Containing Nanofibrous Scaffolds. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2772–2778.
- (344) Thien, D. V. H.; Hsiao, S. W.; Ho, M. H.; Li, C. H.; Shih, J. L. Electrospun Chitosan/Hydroxyapatite Nanofibers for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Sci.* **2013**, *48* (4), 1640–1645.
- (345) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Based Nanomaterials—A Short Review. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (2), 227–232.
- (346) Biazar, E.; Zaeifi, D.; Keshel, S. H.; Ojani, S.; Hajiaghaee, A.; Safarpour, R.; Sheikholeslami, M.; Heidari, B.; Sadeghpour, S. Design of Electrospun Poly Vinyl Alcohol/Chitosan Scaffold and Its Cellular Study. *J. Paramed. Sci.* **2015**, *6* (3).
- (347) Shalumon, K. T.; Sowmya, S.; Sathish, D.; Chennazhi, K. P.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. Effect of Incorporation of Nanoscale Bioactive Glass and Hydroxyapatite in PCL/Chitosan Nanofibers for Bone and Periodontal Tissue Engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2013**, *9* (3), 430–440.
- (348) Park, J. K.; Shim, J.-H.; Kang, K. S.; Yeom, J.; Jung, H. S.; Kim, J. Y.; Lee, K. H.; Kim, T.-H.; Kim, S.-Y.; Cho, D.-W.; et al. Solid Free-Form Fabrication of Tissue-Engineering Scaffolds with a Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Grafted Hyaluronic Acid Conjugate Encapsulating an Intact Bone Morphogenetic Protein-2/Poly(Ethylene Glycol) Complex. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21* (15), 2906–2912.
- (349) Custódio, C. A.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Engineering Biomolecular Microenvironments for Cell Instructive Biomaterials. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3* (6), 797–810.
- (350) Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Rohanizadeh, R. A Review of Chemical Surface Modification of Bioceramics: Effects on Protein Adsorption and Cellular Response. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *122*, 823–834.
- (351) Li, C.; Vepari, C.; Jin, H.-J.; Kim, H. J.; Kaplan, D. L. Electrospun Silk-BMP-2 Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, *27* (16), 3115–3124.
- (352) Rim, N. G.; Kim, S. J.; Shin, Y. M.; Jun, I.; Lim, D. W.; Park, J. H.; Shin, H. Mussel-Inspired Surface Modification of Poly(L-Lactide) Electrospun Fibers for Modulation of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *91*, 189–197.
- (353) Filion, T. M.; Kutikov, A.; Song, J. Chemically Modified Cellulose Fibrous Meshes for Use as Tissue Engineering Scaffolds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (17), 5067–5070.
- (354) Fu, Y.-C.; Nie, H.; Ho, M.-L.; Wang, C.-K.; Wang, C.-H. Optimized Bone Regeneration Based on Sustained Release from Three-Dimensional Fibrous PLGA/HAp Composite Scaffolds Loaded with BMP-2. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99* (4), 996–1006.
- (355) Schuessel, A.; Mayr, H.; Tessmar, J.; Goepferich, A. Enhanced Bone Morphogenetic Protein-2 Performance on Hydroxyapatite Ceramic Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *90* (4), 959–971.

- (356) Chai, F.; Hornez, J.-C.; Blanchemain, N.; Neut, C.; Descamps, M.; Hildebrand, H. F. Antibacterial Activation of Hydroxyapatite (HA) with Controlled Porosity by Different Antibiotics. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (5), 510–514.
- (357) Jiao, Y.-P.; Cui, F.-Z. Surface Modification of Polyester Biomaterials for Tissue Engineering. *Biomed. Mater.* **2007**, *2* (4), R24.
- (358) Dallari, D.; Savarino, L.; Albisinni, U.; Fornasari, P.; Ferruzzi, A.; Baldini, N.; Giannini, S. A Prospective, Randomised, Controlled Trial Using a Mg-Hydroxyapatite - Demineralized Bone Matrix Nanocomposite in Tibial Osteotomy. *Biomaterials* **2012**, *33* (1), 72–79.
- (359) Serre, C. M.; Papillard, M.; Chavassieux, P.; Voegel, J. C.; Boivin, G. Influence of Magnesium Substitution on a Collagen–Apatite Biomaterial on the Production of a Calcifying Matrix by Human Osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42* (4), 626–633.
- (360) Rude, R. K.; Gruber, H. E.; Wei, L. Y.; Frausto, A.; Mills, B. G. Magnesium Deficiency: Effect on Bone and Mineral Metabolism in the Mouse. *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *72* (1), 32–41.
- (361) Kanzaki, N.; Onuma, K.; Treboux, G.; Tsutsumi, S.; Ito, A. Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (17), 4189–4194.
- (362) Ran, J.; Jiang, P.; Sun, G.; Ma, Z.; Hu, J.; Shen, X.; Tong, H. Comparisons among Mg, Zn, Sr, and Si Doped Nano-Hydroxyapatite/Chitosan Composites for Load-Bearing Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1* (5), 900–910.
- (363) Shahrezaee, M.; Raz, M.; Shishehbor, S.; Moztafzadeh, F.; Baghbani, F.; Sadeghi, A.; Bajelani, K.; Tondnevis, F. Synthesis of Magnesium Doped Amorphous Calcium Phosphate as a Bioceramic for Biomedical Application: In Vitro Study. *Silicon* **2018**, *10* (3), 1171–1179.
- (364) Kulanthaivel, S.; Roy, B.; Agarwal, T.; Giri, S.; Pramanik, K.; Pal, K.; Ray, S. S.; Maiti, T. K.; Banerjee, I. Cobalt Doped Proangiogenic Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering Application. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *58*, 648–658.
- (365) Bose, S.; Tarafder, S.; Bandyopadhyay, A. Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45* (1), 261–272.
- (366) Fuierer, T. A.; LoRe, M.; Puckett, S. A.; Nancollas, G. H. A Mineralization Adsorption and Mobility Study of Hydroxyapatite Surfaces in the Presence of Zinc and Magnesium Ions. *Langmuir* **1994**, *10* (12), 4721–4725.
- (367) Webster, T. J.; Massa-Schlueter, E. A.; Smith, J. L.; Slamovich, E. B. Osteoblast Response to Hydroxyapatite Doped with Divalent and Trivalent Cations. *Biomaterials* **2004**, *25* (11), 2111–2121.
- (368) Cabrejos-Azama, J.; Alkhraisat, M. H.; Rueda, C.; Torres, J.; Blanco, L.; López-Cabarcos, E. Magnesium Substitution in Brushite Cements for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *43*, 403–410.
- (369) Cai, Y.; Zhang, S.; Zeng, X.; Wang, Y.; Qian, M.; Weng, W. Improvement of Bioactivity with Magnesium and Fluorine Ions Incorporated Hydroxyapatite Coatings via Sol–Gel Deposition on Ti6Al4V Alloys. *Thin Solid Films* **2009**, *517* (17), 5347–5351.
- (370) Wang, J.; de Boer, J.; de Groot, K. Preparation and Characterization of Electrodeposited Calcium Phosphate/Chitosan Coating on Ti6Al4V Plates. *J. Dent. Res.* **2004**, *83* (4), 296–301.
- (371) Sankar, D.; Shalumon, K. T.; Chennazhi, K. P.; Menon, D.; Jayakumar, R. Surface Plasma Treatment of Poly(Caprolactone) Micro, Nano, and Multiscale Fibrous Scaffolds for Enhanced Osteoconductivity. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20* (11–12), 1689–1702.

- (372) Venugopal, J.; Low, S.; Choon, A. T.; Kumar, A. B.; Ramakrishna, S. Electrospun-Modified Nanofibrous Scaffolds for the Mineralization of Osteoblast Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *85* (2), 408–417.
- (373) Kučera, F.; Jančář, J. Homogeneous and Heterogeneous Sulfonation of Polymers: A Review. *Polym. Eng. Sci.* **1998**, *38* (5), 783–792.
- (374) Leonor, I. B.; Kim, H.-M.; Balas, F.; Kawashita, M.; Reis, R. L.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Functionalization of Different Polymers with Sulfonic Groups as a Way to Coat Them with a Biomimetic Apatite Layer. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18* (10), 1923–1930.
- (375) Sailaja, G. S.; Sreenivasan, K.; Yokogawa, Y.; Kumary, T. V.; Varma, H. K. Bioinspired Mineralization and Cell Adhesion on Surface Functionalized Poly(Vinyl Alcohol) Films. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (5), 1647–1655.
- (376) Varma, H. K.; Yokogawa, Y.; Espinosa, F. F.; Kawamoto, Y.; Nishizawa, K.; Nagata, F.; Kameyama, T. Porous Calcium Phosphate Coating over Phosphorylated Chitosan Film by a Biomimetic Method. *Biomaterials* **1999**, *20* (9), 879–884.
- (377) Murphy, W. L.; Mooney, D. J. Bioinspired Growth of Crystalline Carbonate Apatite on Biodegradable Polymer Substrata. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (9), 1910–1917.
- (378) Tanahashi, M.; Yao, T.; Kokubo, T.; Minoda, M.; Miyamoto, T.; Nakamura, T.; Yamamuro, T. Apatite Coated on Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by NaOH Treatment. *J. Appl. Biomater. Off. J. Soc. Biomater.* **1994**, *5* (4), 339–347.
- (379) Góes, J. C.; Figueiró, S. D.; Oliveira, A. M.; Macedo, A. a. M.; Silva, C. C.; Ricardo, N. M. P. S.; Sombra, A. S. B. Apatite Coating on Anionic and Native Collagen Films by an Alternate Soaking Process. *Acta Biomater.* **2007**, *3* (5), 773–778.
- (380) Chen, J.; Chu, B.; Hsiao, B. S. Mineralization of Hydroxyapatite in Electrospun Nanofibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79* (2), 307–317.
- (381) Weiner, S. Separation of Acidic Proteins from Mineralized Tissues by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1982**, *245* (1), 148–154.
- (382) Yamauchi, K.; Goda, T.; Takeuchi, N.; Einaga, H.; Tanabe, T. Preparation of Collagen/Calcium Phosphate Multilayer Sheet Using Enzymatic Mineralization. *Biomaterials* **2004**, *25* (24), 5481–5489.
- (383) Wallace, A. F.; DeYoreo, J. J.; Dove, P. M. Kinetics of Silica Nucleation on Carboxyl- and Amine-Terminated Surfaces: Insights for Biomineralization. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5244–5250.
- (384) Liu, G. J.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Takadama, H.; Nakamura, T.; Murakami, A. Apatite-Organic Polymer Composites Prepared by a Biomimetic Process: Improvement in Adhesion of the Apatite Layer to the Substrate by Ultraviolet Irradiation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1998**, *9* (5), 285–290.
- (385) Tanahashi, M.; Matsuda, T. Surface Functional Group Dependence on Apatite Formation on Self-Assembled Monolayers in a Simulated Body Fluid. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *34* (3), 305–315.
- (386) Liao, S.; Murugan, R.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S. Processing Nanoengineered Scaffolds through Electrospinning and Mineralization Suitable for Biomimetic Bone Tissue Engineering. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2008**, *1* (3), 252–260.
- (387) Bigi, A.; Boanini, E. Functionalized Biomimetic Calcium Phosphates for Bone Tissue Repair. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2017**, *15* (4), e313–e325.
- (388) Hartgerink, J. D.; Beniash, E.; Stupp, S. I. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. *Science* **2001**, *294* (5547), 1684–1688.

- (389) Pawelec, K. M.; Kluijtmans, S. G. J. M. Biomineralization of Recombinant Peptide Scaffolds: Interplay among Chemistry, Architecture, and Mechanics. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (6), 1100–1108.
- (390) Song, J.; Malathong, V.; Bertozzi, C. R. Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds: A Bottom-Up Approach for the Development of Artificial Bone. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (10), 3366–3372.
- (391) Rautaray, D.; Mandal, S.; Sastry, M. Synthesis of Hydroxyapatite Crystals Using Amino Acid-Capped Gold Nanoparticles as a Scaffold. *Langmuir* **2005**, *21* (11), 5185–5191.
- (392) Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Chrzanowski, W.; Rohanizadeh, R. Osteoblast Response to the Surface of Amino Acid-Functionalized Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (6), 2150–2160.
- (393) Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Zavgorodniy, A. V.; Rohanizadeh, R. High Protein Adsorptive Capacity of Amino Acid-Functionalized Hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101* (3), 873–883.
- (394) Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Van, K. L.; Zavgorodniy, A. V.; Rohanizadeh, R. Modulating Protein Adsorption onto Hydroxyapatite Particles Using Different Amino Acid Treatments. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (70), 918–927.
- (395) Farrell, K. B.; Karpeisky, A.; Thamm, D. H.; Zinnen, S. Bisphosphonate Conjugation for Bone Specific Drug Targeting. *Bone Rep.* **2018**, *9*, 47–60.
- (396) Ossipov, D. A. Bisphosphonate-Modified Biomaterials for Drug Delivery and Bone Tissue Engineering. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12* (9), 1443–1458.
- (397) Cole, L. E.; Vargo-Gogola, T.; Roeder, R. K. Targeted Delivery to Bone and Mineral Deposits Using Bisphosphonate Ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99* (Pt A), 12–27.
- (398) Yang, X.; Akhtar, S.; Rubino, S.; Leifer, K.; Hilborn, J.; Ossipov, D. Direct “Click” Synthesis of Hybrid Bisphosphonate–Hyaluronic Acid Hydrogel in Aqueous Solution for Biomineralization. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (9), 1690–1697.
- (399) Brown, J. P.; Morin, S.; Leslie, W.; Papaioannou, A.; Cheung, A. M.; Davison, K. S.; Goltzman, D.; Hanley, D. A.; Hodsman, A.; Josse, R.; et al. Les Bisphosphonates Dans Le Traitement de l’ostéoporose. *Can. Fam. Physician* **2014**, *60* (4), e197–e207.
- (400) Waite, J. H.; Tanzer, M. L. Polyphenolic Substance of *Mytilus Edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. *Science* **1981**, *212* (4498), 1038–1040.
- (401) Yu, M.; Hwang, J.; Deming, T. J. Role of 1-3,4-Dihydroxyphenylalanine in Mussel Adhesive Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (24), 5825–5826.
- (402) Deming, T. J. Mussel Byssus and Biomolecular Materials. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3* (1), 100–105.
- (403) Kang, S. M.; You, I.; Cho, W. K.; Shon, H. K.; Lee, T. G.; Choi, I. S.; Karp, J. M.; Lee, H. One-Step Modification of Superhydrophobic Surfaces by a Mussel-Inspired Polymer Coating. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49* (49), 9401–9404.
- (404) Laure, W. Dopamine : Une Molécule de Choix Pour l’immobilisation de Polymères Sur Des Substrats à Base de Titane : Application à l’élaboration de Surfaces “Intelligentes” et à La Fonctionnalisation de Stents Métalliques. thesis, Lille 1, 2014.
- (405) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318* (5849), 426–430.
- (406) Ball, V.; Frari, D. D.; Toniazio, V.; Ruch, D. Kinetics of Polydopamine Film Deposition as a Function of PH and Dopamine Concentration: Insights in the Polydopamine Deposition Mechanism. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *386* (1), 366–372.
- (407) Jiang, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Zhu, B.; Xu, Y. Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2011**, *27* (23), 14180–14187.

- (408) Bernsmann, F.; Ball, V.; Addiego, F.; Ponche, A.; Michel, M.; Gracio, J. J. de A.; Toniazzo, V.; Ruch, D. Dopamine–Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution. *Langmuir* **2011**, *27* (6), 2819–2825.
- (409) Ryu, J. H.; Messersmith, P. B.; Lee, H. Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (9), 7523–7540.
- (410) Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B. Single-Molecule Mechanics of Mussel Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (35), 12999–13003.
- (411) Burzio, L. A.; Waite, J. H. Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides. *Biochemistry* **2000**, *39* (36), 11147–11153.
- (412) Faure, E.; Lecomte, P.; Lenoir, S.; Vreuls, C.; Weerd, C. V. D.; Archambeau, C.; Martial, J.; Jérôme, C.; Duwez, A.-S.; Detrembleur, C. Sustainable and Bio-Inspired Chemistry for Robust Antibacterial Activity of Stainless Steel. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (22), 7901–7904.
- (413) Herlinger, E.; Jameson, R. F.; Linert, W. Spontaneous Autoxidation of Dopamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, *0* (2), 259–263.
- (414) Faure, E.; Falentin-Daudré, C.; Jérôme, C.; Lyskawa, J.; Fournier, D.; Woisel, P.; Detrembleur, C. Catechols as Versatile Platforms in Polymer Chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (1), 236–270.
- (415) Pan, F.; Jia, H.; Qiao, S.; Jiang, Z.; Wang, J.; Wang, B.; Zhong, Y. Bioinspired Fabrication of High Performance Composite Membranes with Ultrathin Defect-Free Skin Layer. *J. Membr. Sci.* **2009**, *341* (1), 279–285.
- (416) Ryou, M.-H.; Lee, Y. M.; Park, J.-K.; Choi, J. W. Mussel-Inspired Polydopamine-Treated Polyethylene Separators for High-Power Li-Ion Batteries. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (27), 3066–3070.
- (417) Yang, L.; Phua, S. L.; Teo, J. K. H.; Toh, C. L.; Lau, S. K.; Ma, J.; Lu, X. A Biomimetic Approach to Enhancing Interfacial Interactions: Polydopamine-Coated Clay as Reinforcement for Epoxy Resin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3* (8), 3026–3032.
- (418) Yu, B.; Liu, J.; Liu, S.; Zhou, F. Pdop Layer Exhibiting Zwitterionicity: A Simple Electrochemical Interface for Governing Ion Permeability. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (32), 5900–5902.
- (419) Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. Elucidating the Structure of Poly(Dopamine). *Langmuir* **2012**, *28* (15), 6428–6435.
- (420) Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (22), 4711–4717.
- (421) Ho, C.-C.; Ding, S.-J. Structure, Properties and Applications of Mussel-Inspired Polydopamine. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10* (10), 3063–3084.
- (422) Lee, S. J.; Lee, D.; Yoon, T. R.; Kim, H. K.; Jo, H. H.; Park, J. S.; Lee, J. H.; Kim, W. D.; Kwon, I. K.; Park, S. A. Surface Modification of 3D-Printed Porous Scaffolds via Mussel-Inspired Polydopamine and Effective Immobilization of RhBMP-2 to Promote Osteogenic Differentiation for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2016**, *40*, 182–191.
- (423) Huang, S.; Liang, N.; Hu, Y.; Zhou, X.; Abidi, N. Polydopamine-Assisted Surface Modification for Bone Biosubstitutes. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, e2389895.
- (424) Tsai, W.-B.; Chen, W.-T.; Chien, H.-W.; Kuo, W.-H.; Wang, M.-J. Poly(Dopamine) Coating to Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28* (6), 837–848.
- (425) Lynge, M. E.; Westen, R. van der; Postma, A.; Städler, B. Polydopamine—a Nature-Inspired Polymer Coating for Biomedical Science. *Nanoscale* **2011**, *3* (12), 4916–4928.

- (426) Liu, X.; Cao, J.; Li, H.; Li, J.; Jin, Q.; Ren, K.; Ji, J. Mussel-Inspired Polydopamine: A Biocompatible and Ultrastable Coating for Nanoparticles in Vivo. *ACS Nano* **2013**, *7* (10), 9384–9395.
- (427) Hong, S.; Kim, K. Y.; Wook, H. J.; Park, S. Y.; Lee, K. D.; Lee, D. Y.; Lee, H. Attenuation of the in Vivo Toxicity of Biomaterials by Polydopamine Surface Modification. *Nanomed.* **2011**, *6* (5), 793–801.
- (428) Liu, J.; Xu, H.; Tang, X.; Xu, J.; Jin, Z.; Li, H.; Wang, S.; Gou, J.; Jin, X. Simple and Tunable Surface Coatings via Polydopamine for Modulating Pharmacokinetics, Cell Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *RSC Adv.* **2017**, *7* (26), 15864–15876.
- (429) Ku, S. H.; Park, C. B. Human Endothelial Cell Growth on Mussel-Inspired Nanofiber Scaffold for Vascular Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31* (36), 9431–9437.
- (430) Yin, M.; Yuan, Y.; Liu, C.; Wang, J. Development of Mussel Adhesive Polypeptide Mimics Coating for In-Situ Inducing Re-Endothelialization of Intravascular Stent Devices. *Biomaterials* **2009**, *30* (14), 2764–2773.
- (431) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (4), 431–434.
- (432) Ko, E.; Yang, K.; Shin, J.; Cho, S.-W. Polydopamine-Assisted Osteoinductive Peptide Immobilization of Polymer Scaffolds for Enhanced Bone Regeneration by Human Adipose-Derived Stem Cells. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (9), 3202–3213.
- (433) Cho, H.; Madhurakkat Perikamana, S. K.; Lee, J.; Lee, J.; Lee, K.-M.; Shin, C. S.; Shin, H. Effective Immobilization of BMP-2 Mediated by Polydopamine Coating on Biodegradable Nanofibers for Enhanced in Vivo Bone Formation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (14), 11225–11235.
- (434) Nijhuis, A. W. G.; van den Beucken, J. J. J. P.; Boerman, O. C.; Jansen, J. A.; Leeuwenburgh, S. C. G. 1-Step versus 2-Step Immobilization of Alkaline Phosphatase and Bone Morphogenetic Protein-2 onto Implant Surfaces Using Polydopamine. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19* (8), 610–619.
- (435) Vanderleyden, E.; Van Bael, S.; Chai, Y. C.; Kruth, J.-P.; Schrooten, J.; Dubruel, P. Gelatin Functionalised Porous Titanium Alloy Implants for Orthopaedic Applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *42*, 396–404.
- (436) Wu, C.; Han, P.; Liu, X.; Xu, M.; Tian, T.; Chang, J.; Xiao, Y. Mussel-Inspired Bioceramics with Self-Assembled Ca-P/Polydopamine Composite Nanolayer: Preparation, Formation Mechanism, Improved Cellular Bioactivity and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (1), 428–438.
- (437) Sun, K.; Xie, Y.; Ye, D.; Zhao, Y.; Cui, Y.; Long, F.; Zhang, W.; Jiang, X. Mussel-Inspired Anchoring for Patterning Cells Using Polydopamine. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2012**, *28* (4), 2131–2136.
- (438) Lee, J.; Lee, Y. J.; Cho, H.; Shin, H. Guidance of in Vitro Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and in Vivo Guided Bone Regeneration Using Aligned Electrospun Fibers. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20* (15–16), 2031–2042.
- (439) Hu, Y.; Zhu, Y.; Zhou, X.; Ruan, C.; Pan, H.; Catchmark, J. M. Bioabsorbable Cellulose Composites Prepared by an Improved Mineral-Binding Process for Bone Defect Repair. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (7), 1235–1246.
- (440) Ryu, J.; Ku, S. H.; Lee, H.; Park, C. B. Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Universal Route to Hydroxyapatite Crystallization. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (13), 2132–2139.
- (441) Kokubo, T. Bioactive Glass Ceramics: Properties and Applications. *Biomaterials* **1991**, *12* (2), 155–163.

- (442) Chen, X.; Nouri, A.; Li, Y.; Lin, J.; Hodgson, P. D.; Wen, C. Effect of Surface Roughness of Ti, Zr, and TiZr on Apatite Precipitation from Simulated Body Fluid. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101* (2), 378–387.
- (443) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915.
- (444) Liu, Z.; Qu, S.; Zheng, X.; Xiong, X.; Fu, R.; Tang, K.; Zhong, Z.; Weng, J. Effect of Polydopamine on the Biomimetic Mineralization of Mussel-Inspired Calcium Phosphate Cement in Vitro. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 44–51.
- (445) Xie, J.; Zhong, S.; Ma, B.; Shuler, F. D.; Lim, C. T. Controlled Biomineralization of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Fibers to Enhance Their Mechanical Properties. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (3), 5698–5707.
- (446) Dhivya, S.; Saravanan, S.; Sastry, T. P.; Selvamurugan, N. Nanohydroxyapatite-Reinforced Chitosan Composite Hydrogel for Bone Tissue Repair in Vitro and in Vivo. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13* (1), 40.
- (447) Kumar, J. P.; Lakshmi, L.; Jyothsna, V.; Balaji, D. R. P.; Saravanan, S.; Moorthi, A.; Selvamurugan, N. Synthesis and Characterization of Diopside Particles and Their Suitability along with Chitosan Matrix for Bone Tissue Engineering in Vitro and in Vivo. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10* (6), 970–981.
- (448) Jayakumar, R.; Nair, S. V.; Prabakaran, M.; Selvamurugan, N.; Tamura, H.; Tokura, S. Novel Carboxymethyl Derivatives of Chitin and Chitosan Materials and Their Biomedical Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2010**.
- (449) Tan, S. C.; Khor, E.; Tan, T. K.; Wong, S. M. The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-Spectrophotometry Method of Determination. *Talanta* **1998**, *45* (4), 713–719.
- (450) Kasaai, M. R. A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N-Acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71* (4), 497–508.
- (451) Kasaai, M. R. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (5), 1667–1676.
- (452) Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan: The Influence of Analytical Methods. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **2002**, *5* (3), 205–212.
- (453) Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P. L. Characterization of Chitosan. Influence of Ionic Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15* (5), 281–285.
- (454) Elsabee, M. Z.; Naguib, H. F.; Morsi, R. E. Chitosan Based Nanofibers, Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (7), 1711–1726.
- (455) Slocum, T. L.; Deupree, J. D. Interference of Biogenic Amines with the Measurement of Proteins Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1991**, *195* (1), 14–17.
- (456) Lih, E.; Choi, S. G.; Ahn, D. J.; Joung, Y. K.; Han, D. K. Optimal Conjugation of Catechol Group onto Hyaluronic Acid in Coronary Stent Substrate Coating for the Prevention of Restenosis. *J. Tissue Eng.* **2016**, *7*.
- (457) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions Able to Reproduce in Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24* (6), 721–734.
- (458) Ouerghemmi, S. *Electrospinning Du Chitosan Pour l'élaboration de Réseaux de Nanofibres à Activités Antibactérienne et Antithrombotique*; Lille 1, 2016.
- (459) Li, Q.; Wang, X.; Lou, X.; Yuan, H.; Tu, H.; Li, B.; Zhang, Y. Genipin-Crosslinked Electrospun Chitosan Nanofibers: Determination of Crosslinking Conditions and Evaluation of Cytocompatibility. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *130*, 166–174.

- (460) Cao, J.; Li, D.; Liang, W.; Wang, Y.; Wul, D. Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Nanofibers: Preparation, Characterization and Application in Adsorption of Cu (II). *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16* (3), 2922–2928.
- (461) Shin, Y. M.; Jun, I.; Lim, Y.-M.; Rhim, T.; Shin, H. Bio-Inspired Immobilization of Cell-Adhesive Ligands on Electrospun Nanofibrous Patches for Cell Delivery. *Macromol. Mater. Eng.* **2013**, *298* (5), 555–564.
- (462) Xi, Z.-Y.; Xu, Y.-Y.; Zhu, L.-P.; Wang, Y.; Zhu, B.-K. A Facile Method of Surface Modification for Hydrophobic Polymer Membranes Based on the Adhesive Behavior of Poly(DOPA) and Poly(Dopamine). *J. Membr. Sci.* **2009**, *327* (1), 244–253.
- (463) Jiang, J.-H.; Zhu, L.-P.; Li, X.-L.; Xu, Y.-Y.; Zhu, B.-K. Surface Modification of PE Porous Membranes Based on the Strong Adhesion of Polydopamine and Covalent Immobilization of Heparin. *J. Membr. Sci.* **2010**, *364* (1), 194–202.
- (464) Zangmeister, R. A.; Morris, T. A.; Tarlov, M. J. Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8619–8628.
- (465) Kang, J.; Sakuragi, M.; Shibata, A.; Abe, H.; Kitajima, T.; Tada, S.; Mizutani, M.; Ohmori, H.; Ayame, H.; Son, T. I.; et al. Immobilization of Epidermal Growth Factor on Titanium and Stainless Steel Surfaces via Dopamine Treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32* (8), 2552–2561.
- (466) Graham, D. G.; Tiffany, S. M.; Bell, W. R.; Gutknecht, W. F. Autoxidation versus Covalent Binding of Quinones as the Mechanism of Toxicity of Dopamine, 6-Hydroxydopamine, and Related Compounds toward C1300 Neuroblastoma Cells in Vitro. *Mol. Pharmacol.* **1978**, *14* (4), 644–653.
- (467) Sobocinski, J.; Laure, W.; Taha, M.; Courcot, E.; Chai, F.; Simon, N.; Addad, A.; Martel, B.; Haulon, S.; Woisel, P.; et al. Mussel Inspired Coating of a Biocompatible Cyclodextrin Based Polymer onto CoCr Vascular Stents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (5), 3575–3586.
- (468) 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.* **2015**.
- (469) Wei, K.; Kim, B.-S.; Kim, I.-S. Fabrication and Biocompatibility of Electrospun Silk Biocomposites. *Membranes* **2011**, *1* (4), 275–298.
- (470) Mozaffarian, D.; Benjamin, E. J.; Go, A. S.; Arnett, D. K.; Blaha, M. J.; Cushman, M.; Das, S. R.; Ferranti, S. de; Després, J.-P.; Fullerton, H. J.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2016**, *132*, e1–e323.
- (471) Popkin, B. M.; Gordon-Larsen, P. The Nutrition Transition: Worldwide Obesity Dynamics and Their Determinants. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2004**, *28 Suppl 3*, S2-9.
- (472) Williams, D. F. On the Nature of Biomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 5897–5909.
- (473) Kalathottukaren, M. T.; Kizhakkedathu, J. N. 2 - Mechanisms of Blood Coagulation in Response to Biomaterials: Extrinsic Factors. In *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*; Siedlecki, C. A., Ed.; Woodhead Publishing, 2018; pp 29–49.
- (474) Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. Foreign Body Reaction to Biomaterials. *Semin. Immunol.* **2008**, *20* (2), 86–100.
- (475) Tang, L.; Hu, W. Molecular Determinants of Biocompatibility. *Expert Rev. Med. Devices* **2005**, *2* (4), 493–500.
- (476) Mackman, N. Triggers, Targets and Treatments for Thrombosis. *Nature* **2008**, *451* (7181), 914–918.

- (477) Mulinti, P.; Brooks, J. E.; Lervick, B.; Pullan, J. E.; Brooks, A. E. 10 - Strategies to Improve the Hemocompatibility of Biodegradable Biomaterials. In *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*; Siedlecki, C. A., Ed.; Woodhead Publishing, 2018; pp 253–278.
- (478) Gu, H.; Chen, X.; Liu, X.; Zhan, W.; Lyu, Z.; Yu, Q.; Wu, Z.; Chen, H. A Hemocompatible Polyurethane Surface Having Dual Fibrinolytic and Nitric Oxide Generating Functions. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (5), 980–987.
- (479) Kapadia, M. R.; Popowich, D. A.; Kibbe, M. R. Modified Prosthetic Vascular Conduits. *Circulation* **2008**, *117* (14), 1873–1882.
- (480) Frost, M. C.; Reynolds, M. M.; Meyerhoff, M. E. Polymers Incorporating Nitric Oxide Releasing/Generating Substances for Improved Biocompatibility of Blood-Contacting Medical Devices. *Biomaterials* **2005**, *26* (14), 1685–1693.
- (481) A hemocompatible polyurethane surface having dual fibrinolytic and nitric oxide generating functions - Journal of Materials Chemistry B (RSC Publishing) <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2017/TB/C6TB02735K#!divAbstract> (accessed Sep 22, 2018).
- (482) Influence of chirality on catalytic generation of nitric oxide and platelet behavior on selenocystine immobilized TiO₂ films. - PubMed - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153116> (accessed Sep 22, 2018).
- (483) Yang, Z.; Yang, Y.; Xiong, K.; Li, X.; Qi, P.; Tu, Q.; Jing, F.; Weng, Y.; Wang, J.; Huang, N. Nitric Oxide Producing Coating Mimicking Endothelium Function for Multifunctional Vascular Stents. *Biomaterials* **2015**, *63*, 80–92.
- (484) Qi, P.; Li, X.; Yang, Y.; Shen, R.; Wang, J.; Yang, Z.; Tu, Q.; Huang, N. Constructing Biomimic Catalytic Coating with Controlled Nitric Oxide Release Properties by Immobilizing 3,3-Diselenodipropionic Acid on Plasma Polymerized Allylamine Film. *Plasma Process. Polym.* **2014**, *11* (10), 952–960.
- (485) Kidane, A. G.; Salacinski, H.; Tiwari, A.; Bruckdorfer, K. R.; Seifalian, A. M. Anticoagulant and Antiplatelet Agents: Their Clinical and Device Application(s) Together with Usages to Engineer Surfaces. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 798–813.
- (486) Lever, R.; Page, C. P. Novel Drug Development Opportunities for Heparin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (2), 140–148.
- (487) Phaneuf, M. D.; Berceci, S. A.; Bide, M. J.; Quist, W. C.; LoGerfo, F. W. Covalent Linkage of Recombinant Hirudin to Poly(Ethylene Terephthalate) (Dacron): Creation of a Novel Antithrombin Surface. *Biomaterials* **1997**, *18* (10), 755–765.
- (488) Phaneuf, M. D.; Szycher, M.; Berceci, S. A.; Dempsey, D. J.; Quist, W. C.; LoGerfo, F. W. Covalent Linkage of Recombinant Hirudin to a Novel Ionic Poly(Carbonate) Urethane Polymer with Protein Binding Sites: Determination of Surface Antithrombin Activity. *Artif. Organs* **1998**, *22* (8), 657–665.
- (489) Richey, T.; Iwata, H.; Oowaki, H.; Uchida, E.; Matsuda, S.; Ikada, Y. Surface Modification of Polyethylene Balloon Catheters for Local Drug Delivery. *Biomaterials* **2000**, *21* (10), 1057–1065.
- (490) Gouzy, M.-F.; Sperling, C.; Salchert, K.; Pompe, T.; Streller, U.; Uhlmann, P.; Rauwolf, C.; Simon, F.; Böhme, F.; Voit, B.; et al. In Vitro Blood Compatibility of Polymeric Biomaterials through Covalent Immobilization of an Amidine Derivative. *Biomaterials* **2004**, *25* (17), 3493–3501.
- (491) Gouzy, M.-F.; Sperling, C.; Salchert, K.; Pompe, T.; Rauwolf, C.; Werner, C. Benzamidine-Based Coatings: Implication of Inhibitor Structure on the Inhibition of Coagulation Enzymes in Solution and in Vitro Hemocompatibility Assessment. *Biointerphases* **2006**, *1* (4), 146–155.

- (492) SPERLING, C.; KONIG, U.; HERMEL, G.; WERNER, C.; MULLER, M.; SIMON, F.; GRUNDKE, K.; JACOBASCH, H. J.; VASILETS, V. N.; IKADA, Y. Immobilization of Human Thrombomodulin onto PTFE. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8* (12), 789–791.
- (493) Tseng, P.-Y.; Rele, S. S.; Sun, X.-L.; Chaikof, E. L. Membrane-Mimetic Films Containing Thrombomodulin and Heparin Inhibit Tissue Factor-Induced Thrombin Generation in a Flow Model. *Biomaterials* **2006**, *27* (12), 2637–2650.
- (494) Aldenhoff, Y. B. J.; Veen, F. H. van der; Woorst, J. ter; Habets, J.; Poole-Warren, L. A.; Koole, L. H. Performance of a Polyurethane Vascular Prosthesis Carrying a Dipyridamole (Persantin®) Coating on Its Luminal Surface. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54* (2), 224–233.
- (495) Aldenhoff, Y. B. J.; Blezer, R.; Lindhout, T.; Koole, L. H. Photo-Immobilization of Dipyridamole (Persantin®) at the Surface of Polyurethane Biomaterials: Reduction Of In Vitro Thrombogenicity. *Biomaterials* **1997**, *18* (2), 167–172.
- (496) Chandy, T.; Das, G. S.; Wilson, R. F.; Rao, G. H. R. Use of Plasma Glow for Surface-Engineering Biomolecules to Enhance Bloodcompatibility of Dacron and PTFE Vascular Prosthesis. *Biomaterials* **2000**, *21* (7), 699–712.
- (497) Nilsson, P. H.; Engberg, A. E.; Bäck, J.; Faxälv, L.; Lindahl, T. L.; Nilsson, B.; Ekdahl, K. N. The Creation of an Antithrombotic Surface by Apyrase Immobilization. *Biomaterials* **2010**, *31* (16), 4484–4491.
- (498) Fontaine, A. B.; Borsa, J. J.; Passos, S. D.; Hoffer, E. K.; Bloch, R. D.; Starr, F.; So, C. Evaluation of Local Abciximab Delivery from the Surface of a Polymer-Coated Covered Stent: In Vivo Canine Studies. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **2001**, *12* (4), 487–492.
- (499) Fischer, M.; Maitz, M. F.; Werner, C. 7 - Coatings for Biomaterials to Improve Hemocompatibility. In *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*; Siedlecki, C. A., Ed.; Woodhead Publishing, 2018; pp 163–190.
- (500) Heise, M.; Schmidmaier, G.; Husmann, I.; Heidenhain, C.; Schmidt, J.; Neuhaus, P.; Settmacher, U. PEG-Hirudin/Iloprost Coating of Small Diameter EPTFE Grafts Effectively Prevents Pseudointima and Intimal Hyperplasia Development. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2006**, *32* (4), 418–424.
- (501) Brockmann, M. A.; Gutensohn, K.; Bau, J.; Kuehnl, P.; Meinertz, T.; Nienaber, C.; Beythien, C. Influence of Heparin Coating of Coronary Stents and Ex Vivo Efficacy of Different Doses of Acetylsalicylic Acid and Ticlopidine in a Pulsed Floating Model of Recirculating Human Plasma. *Platelets* **2002**, *13* (8), 443–449.
- (502) Li, D.; Chen, H.; Brash, J. L. Mimicking the Fibrinolytic System on Material Surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *86* (1), 1–6.
- (503) Senatore, F.; Bernath, F.; Meisner, K. Clinical Study of Urokinase-Bound Fibrocollagenous Tubes. *J. Biomed. Mater. Res.* **1986**, *20* (2), 177–188.
- (504) Wu, Z.; Chen, H.; Li, D.; Brash, J. L. Tissue Plasminogen Activator-Containing Polyurethane Surfaces for Fibrinolytic Activity. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (5), 1993–1998.
- (505) Tabasum, S.; Noreen, A.; Kanwal, A.; Zuber, M.; Anjum, M. N.; Zia, K. M. Glycoproteins Functionalized Natural and Synthetic Polymers for Prospective Biomedical Applications: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *98*, 748–776.
- (506) Biran, R.; Pond, D. Heparin Coatings for Improving Blood Compatibility of Medical Devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *112*, 12–23.
- (507) Gore, S.; Andersson, J.; Biran, R.; Underwood, C.; Riesenfeld, J. Heparin Surfaces: Impact of Immobilization Chemistry on Hemocompatibility and Protein Adsorption. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2014**, *102* (8), 1817–1824.
- (508) Bosiers, M.; Deloose, K.; Verbist, J.; Schroë, H.; Lauwers, G.; Lansink, W.; Peeters, P. Heparin-Bonded Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Graft for Femoropopliteal and Femorocrural Bypass Grafting: 1-Year Results. *J. Vasc. Surg.* **2006**, *43* (2), 313–318.

- (509) Bickel, C.; Rupprecht, H. J.; Darius, H.; Binz, C.; Hauröder, B.; Krummenauer, F.; Meyer, J. Substantial Reduction of Platelet Adhesion by Heparin-Coated Stents. *J. Intervent. Cardiol.* **2001**, *14* (4), 407–413.
- (510) Jansen, P.; van Oeveren, W.; Capel, A.; Carpentier, A. In Vitro Haemocompatibility of a Novel Bioprosthetic Total Artificial Heart. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2012**, *41* (6), e166–e172.
- (511) Zamani, M.; Khafaji, M.; Naji, M.; Vossoughi, M.; Alemzadeh, I.; Haghighipour, N. A Biomimetic Heparinized Composite Silk-Based Vascular Scaffold with Sustained Antithrombogenicity. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 4455.
- (512) Jordan, S. W.; Chaikof, E. L. Novel Thromboresistant Materials. *J. Vasc. Surg.* **2007**, *45 Suppl A*, A104-115.
- (513) Keuren, J. F. W.; Wielders, S. J. H.; Driessen, A.; Verhoeven, M.; Hendriks, M.; Lindhout, T. Covalently-Bound Heparin Makes Collagen Thromboresistant. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24* (3), 613–617.
- (514) Luong-Van, E.; Grøndahl, L.; Chua, K. N.; Leong, K. W.; Nurcombe, V.; Cool, S. M. Controlled Release of Heparin from Poly(Epsilon-Caprolactone) Electrospun Fibers. *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 2042–2050.
- (515) Murugesan, S.; Xie, J.; Linhardt, R. J. Immobilization of Heparin: Approaches and Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8* (2), 80–100.
- (516) Chen, H.; Yuan, L.; Song, W.; Wu, Z.; Li, D. Biocompatible Polymer Materials: Role of Protein–Surface Interactions. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33* (11), 1059–1087.
- (517) Hårdhammar, P. A.; van Beusekom, H. M.; Emanuelsson, H. U.; Hofma, S. H.; Albertsson, P. A.; Verdouw, P. D.; Boersma, E.; Serruys, P. W.; van der Giessen, W. J. Reduction in Thrombotic Events with Heparin-Coated Palmaz-Schatz Stents in Normal Porcine Coronary Arteries. *Circulation* **1996**, *93* (3), 423–430.
- (518) Chuang, T.-W.; Lin, D.-T.; Lin, F.-H. Immobilization of NaIO₄-Treated Heparin on PEG-Modified 316L SS Surface for High Anti-Thrombin-III Binding. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *86A* (3), 648–661.
- (519) Byun, Y.; Jacobs, H. A.; Kim, S. W. Heparin Surface Immobilization through Hydrophilic Spacers: Thrombin and Antithrombin III Binding Kinetics. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1994**, *6* (1), 1–13.
- (520) Medtronic. Trillium Biosurface for CPB Procedures /us-en/healthcare-professionals/products/cardiovascular/cardiopulmonary/trillium-biosurface.html (accessed Sep 24, 2018).
- (521) Freedman, M. D. Pharmacodynamics, Clinical Indications, and Adverse Effects of Heparin. *J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *32* (7), 584–596.
- (522) Christman, K. L.; Vázquez-Dorbatt, V.; Schopf, E.; Kolodziej, C. M.; Li, R. C.; Broyer, R. M.; Chen, Y.; Maynard, H. D. Nanoscale Growth Factor Patterns by Immobilization on a Heparin-Mimicking Polymer. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (49), 16585–16591.
- (523) Nguyen, T. H.; Kim, S.-H.; Decker, C. G.; Wong, D. Y.; Loo, J. A.; Maynard, H. D. A Heparin-Mimicking Polymer Conjugate Stabilizes Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF). *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 221–227.
- (524) Sangaj, N.; Kyriakakis, P.; Yang, D.; Chang, C.-W.; Arya, G.; Varghese, S. Heparin Mimicking Polymer Promotes Myogenic Differentiation of Muscle Progenitor Cells. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (12), 3294–3300.
- (525) Mammadov, R.; Mammadov, B.; Toksoz, S.; Aydin, B.; Yagci, R.; Tekinay, A. B.; Guler, M. O. Heparin Mimetic Peptide Nanofibers Promote Angiogenesis. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3508–3519.
- (526) Mammadov, R.; Mammadov, B.; Guler, M. O.; Tekinay, A. B. Growth Factor Binding on Heparin Mimetic Peptide Nanofibers. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (10), 3311–3319.

- (527) Nahain, A. A.; Ignjatovic, V.; Monagle, P.; Tsanaktsidis, J.; Ferro, V. Heparin Mimetics with Anticoagulant Activity. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38* (5), 1582–1613.
- (528) Huang, Y.; Shaw, M. A.; Mullins, E. S.; Kirley, T. L.; Ayres, N. Synthesis and Anticoagulant Activity of Polyureas Containing Sulfated Carbohydrates. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (12), 4455–4466.
- (529) Fougnot, C.; Jozefonvicz, J.; Samama, M.; Bara, L. New Heparin-like Insoluble Materials: Part I. *Ann. Biomed. Eng.* **1979**, *7* (5), 429–439.
- (530) Fougnot, C.; Jozefowicz, M.; Samama, M.; Bara, L. New Heparin-like Insoluble Materials: Part II. *Ann. Biomed. Eng.* **1979**, *7* (5), 441–450.
- (531) Tang, M.; Xue, J.; Yan, K.; Xiang, T.; Sun, S.; Zhao, C. Heparin-like Surface Modification of Polyethersulfone Membrane and Its Biocompatibility. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *386* (1), 428–440.
- (532) Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Pinto, M. M. M. Emerging Sulfated Flavonoids and Other Polyphenols as Drugs: Nature as an Inspiration. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34* (2), 223–279.
- (533) Guglielmone, H. A.; Agnese, A. M.; Núñez Montoya, S. C.; Cabrera, J. L. Anticoagulant Effect and Action Mechanism of Sulphated Flavonoids from *Flaveria Bidentis*. *Thromb. Res.* **2002**, *105* (2), 183–188.
- (534) Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F.; Carvalho, F.; Cunha-Ribeiro, L. M.; Pinto, M. M. M. Flavonoids with an Oligopolysulfated Moiety: A New Class of Anticoagulant Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (1), 95–106.
- (535) Ricketts, C. R. Dextran Sulphate—a Synthetic Analogue of Heparin. *Biochem. J.* **1952**, *51* (1), 129–133.
- (536) Walton, K. W. The Biological Behaviour of a New Synthetic Anticoagulant (Dextran Sulphate) Possessing Heparin-like Properties. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1952**, *7* (3), 370–391.
- (537) Ricketts, C. R. The Blood Anticoagulant Effect of Short Chain-Length Dextran Sulphates. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1954**, *9* (2), 224–228.
- (538) de Raucourt, E.; Mauray, S.; Chaubet, F.; Maiga-Revel, O.; Jozefowicz, M.; Fischer, A. M. Anticoagulant Activity of Dextran Derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41* (1), 49–57.
- (539) Mestechkina, N. M.; Shcherbukhin, V. D.; Bannikova, G. E.; Varlamov, V. P.; Drozd, N. N.; Tolstenkov, A. S.; Makarov, V. A.; Tikhonov, V. E. [Anticoagulant activity of low-molecular-weight sulfated derivatives of galactomannan from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) seeds]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2008**, *44* (1), 111–116.
- (540) Muschin, T.; Budragchaa, D.; Kanamoto, T.; Nakashima, H.; Ichiyama, K.; Yamamoto, N.; Shuqin, H.; Yoshida, T. Chemically Sulfated Natural Galactomannans with Specific Antiviral and Anticoagulant Activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 415–420.
- (541) Dimassi, S.; Tabary, N.; Chai, F.; Blanchemain, N.; Martel, B. Sulfonated and Sulfated Chitosan Derivatives for Biomedical Applications: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *202*, 382–396.
- (542) Martel, B.; Weltrowski, M.; Morcellet, M.; Scheubel, G. Chitosan-N-Benzyl Sulfonate Filters for Sorption of Heavy Metals in Acidic Solutions. In *European Chitin Society: Advances in Chitin Science*; Jacques Andre Publisher: Brest, 1995; pp 291–296.
- (543) Crini, G.; Martel, B.; Torri, G. Adsorption of C.I. Basic Blue 9 on Chitosan-Based Materials. *Int. J. Environ. Pollut.* **2008**, *34* (1–4), 451–465.
- (544) Crini, G.; Gimbert, F.; Robert, C.; Martel, B.; Adam, O.; Morin-Crini, N.; De Giorgi, F.; Badot, P.-M. The Removal of Basic Blue 3 from Aqueous Solutions by Chitosan-Based Adsorbent: Batch Studies. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *153* (1–2), 96–106.

- (545) Crini, G.; Torri, G.; Guerrini, M.; Morcellet, M.; Weltrowski, M.; Martel, B. NMR Characterization of N-Benzyl Sulfonated Derivatives of Chitosan. *ResearchGate* **1997**, *33* (2), 145–151.
- (546) 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.* **1997**, *16* (4–5), 681–689.
- (547) 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.* **1996**, *59* (4), 647–654.
- (548) Yeh, H.-Y.; Lin, J.-C. Surface Characterization and in Vitro Platelet Compatibility Study of Surface Sulfonated Chitosan Membrane with Amino Group Protection–Deprotection Strategy. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19* (3), 291–310.
- (549) Farhatnia, Y.; Tan, A.; Motiwala, A.; Cousins, B. G.; Seifalian, A. M. Evolution of Covered Stents in the Contemporary Era: Clinical Application, Materials and Manufacturing Strategies Using Nanotechnology. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (5), 524–542.
- (550) Oh, B.; Lee, C. H. Advanced Cardiovascular Stent Coated with Nanofiber. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (12), 4432–4442.
- (551) Lee, C.-H.; Lin, Y.-H.; Chang, S.-H.; Tai, C.-D.; Liu, S.-J.; Chu, Y.; Wang, C.-J.; Hsu, M.-Y.; Chang, H.; Chang, G.-J.; et al. Local Sustained Delivery of Acetylsalicylic Acid via Hybrid Stent with Biodegradable Nanofibers Reduces Adhesion of Blood Cells and Promotes Reendothelialization of the Denuded Artery. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 311–326.
- (552) Rampersad, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* **2012**, *12* (9), 12347–12360.
- (553) Zhou, X.; Zhang, X.; Zhou, J.; Li, L. An Investigation of Chitosan and Its Derivatives on Red Blood Cell Agglutination. *RSC Adv.* **2017**, *7* (20), 12247–12254.
- (554) Yang, J.; Luo, K.; Li, D.; Yu, S.; Cai, J.; Chen, L.; Du, Y. Preparation, Characterization and in Vitro Anticoagulant Activity of Highly Sulfated Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *52*, 25–31.
- (555) Huynh, R.; Chaubet, F.; Jozefonvicz, J. Anticoagulant Properties of Dextranmethylcarboxylate Benzylamide Sulfate (DMCBSu); a New Generation of Bioactive Functionalized Dextran. *Carbohydr. Res.* **2001**, *332* (1), 75–83.
- (556) Lima, P. H. L.; Pereira, S. V. A.; Rabello, R. B.; Rodriguez-Castellón, E.; Beppu, M. M.; Chevallier, P.; Mantovani, D.; Vieira, R. S. Blood Protein Adsorption on Sulfonated Chitosan and κ -Carrageenan Films. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *111*, 719–725.
- (557) Wang, T.; Zhou, Y.; Xie, W.; Chen, L.; Zheng, H.; Fan, L. Preparation and Anticoagulant Activity of N-Succinyl Chitosan Sulfates. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51* (5), 808–814.
- (558) Huang, R.; Du, Y.; Yang, J.; Fan, L. Influence of Functional Groups on the in Vitro Anticoagulant Activity of Chitosan Sulfate. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338* (6), 483–489.
- (559) Mrabat, H.; Garg, H. G.; Hales, C. A. Growth Inhibition of Bovine Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Following Long Term Heparin Treatment. *J. Cell. Physiol.* **2009**, *221* (3), 603–608.
- (560) Haroun-Bouhedja, F.; Ellouali, M.; Siquin, C.; Boisson-Vidal, C. Relationship between Sulfate Groups and Biological Activities of Fucans. *Thromb. Res.* **2000**, *100* (5), 453–459.
- (561) Kolsi, R. B. A.; Gargouri, B.; Sassi, S.; Frikha, D.; Lassoued, S.; Belghith, K. In Vitro Biological Properties and Health Benefits of a Novel Sulfated Polysaccharide Isolated from *Cymodocea Nodosa*. *Lipids Health Dis.* **2017**, *16*.

- (562) Czechowska-Biskup, R.; Jarosinska, D.; Rokita, B.; Ulanski, P.; Rosiak, J. M. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.* **2012**, *XVII*, 1–20.

Liste des publications et des communications

Publications

Safa Ouerghemmi¹, Syrine Dimassi¹, Nicolas Tabary, Laurent Leclercq, Stéphanie Degoutin, Feng Chai, Christel Pierlot, Frédéric Cazaux, Alexandre Ung, Jean-Noël Staelens, Nicolas Blanchemain, Bernard Martel. Synthesis and characterization of polyampholytic aryl-sulfonated chitosans and their *in vitro* anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*. **2018**, 196, 8–17.

Syrine Dimassi, Nicolas Tabary, Feng Chai, Nicolas Blanchemain and Bernard Martel. Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: a review. *Carbohydrate Polymers*. **2018**, 202, 382-396.

Communications

➤ **Communications à des colloques/ congrès nationaux avec actes**

S. Dimassi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, B. Hue, F. Chai, N. Blanchemain and B. Martel, *Membranes à base de chitosane sulfoné élaborées par electrospinning pour des applications thérapeutiques vasculaires*, 45^{èmes} Journées d'Etudes des Polymères, Gravelines, France, Octobre 2017 (**communication orale**)

S. Dimassi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, F. Chai, J. Lyskawa, J-C. Hornez, N. Blanchemain and B. Martel, *Surface functionalization and biomineralization of chitosan-based electrospun nanofibers for bone tissue engineering*, 2nd BIOMAT Congress, Ambleteuse, France, Juin 2017 (**Communication orale**)

S. Dimassi, S. Ouerghemmi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, F. Chai, N. Blanchemain and B. Martel, *Biomaterials based on sulfonated chitosan nanofibers for bone tissue engineering*, 2^{ème} Workshop de médecine régénérative, Bordeaux, France, Octobre 2016 (**Communication par affiche**)

➤ **Communication à des colloques/ congrès internationaux avec actes**

S. Dimassi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, F. Chai, J. Lyskawa, J-C. Hornez, N. Blanchemain and B. Martel, *Surface functionalization and biomineralization of chitosan-based electrospun nanofibres for bone tissue engineering*, European Society for Biomaterials,

Athènes, Grèce, Septembre 2017 (**Flash communication orale + Communication par affiche**)

S. Dimassi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, F. Chai, N. Blanchemain and B. Martel, *Electrospun nanofibres of a sulfonated chitosan as an artificial glycosaminoglycan for tissue engineering*, European Society for Biomaterials, Athènes, Grèce, Septembre 2017 (**Communication avec affiche**)

S. Dimassi, S. Ouerghemmi, N. Tabary, S. Degoutin, F. Cazaux, L. Janus, F. Chai, N. Blanchemain and B. Martel, *Electrospun nanofibers of a sulfonated chitosan as an artificial glycosaminoglycan for tissue engineering*, 7th International Conference of Applied Research on textile, Hammamet, Tunisie, Novembre 2016 (**Communication orale**)

Annexes

Annexes 1

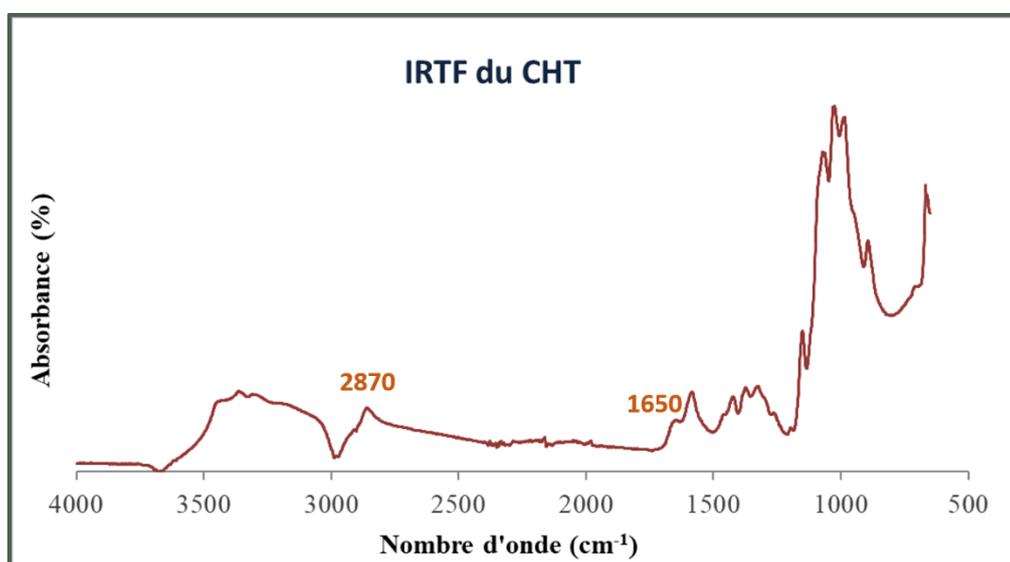
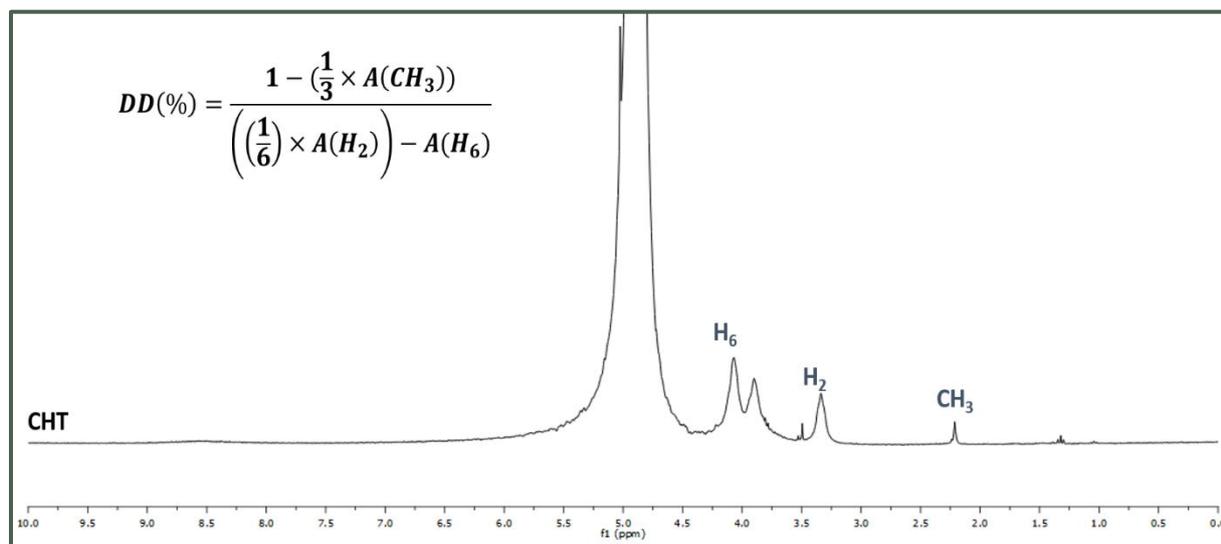
Détermination du degré de désacétylation (DD) du chitosane

1. Par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La littérature présente les différentes bandes obtenues par IR qui peuvent être utilisées pour la détermination du DD du CHT^{450,562}. Pour cette étude, l'équation fournie par Czechowska-Biskup *et al.* qui correspond aux bandes d'absorbance à 1650 cm⁻¹ et 2870 cm⁻¹ a été utilisée :

$$DA = \frac{A_{1650}}{A_{2870}} \times \frac{100}{1,33} ; \text{ Avec DA = degré d'acétylation}$$

Puis, le DD est déterminé à partir du DA via $DD(\%) = 100 - DA(\%)$.

2. Par ¹H-RMN

Annexes 2

Détermination de la masse molaire du CHT par viscosimétrie capillaire

Des mesures de viscosité ont été effectuées grâce à l'appareil SCHOTT AVS 360 afin de déterminer la masse viscosimétrique du CHT utilisé au cours de ce projet. Les conditions opératoires et les paramètres de calcul suivis ont été déterminés par Rinaudo *et al.*⁴⁵³. Le diamètre du capillaire utilisé était de 53 μm et tous les essais ont été effectués à une température de 20°C.

Tout d'abord, une solution mère de CHT, de concentration massique C_0 de 1% a été préparée en solubilisant le CHT dans un solvant composé d'acide acétique et d'acétate de sodium (0,3 M et 0,2 M respectivement). Par dilution successive de cette solution mère, des solutions de concentrations $C_1=C_0/2$; $C_2=2C_0/5$; $C_3=C_0/3$ et $C_4=2C_0/7$ ont été préparées. Pour chaque solution fille, quatre points de mesure du temps d'écoulement sont effectués.

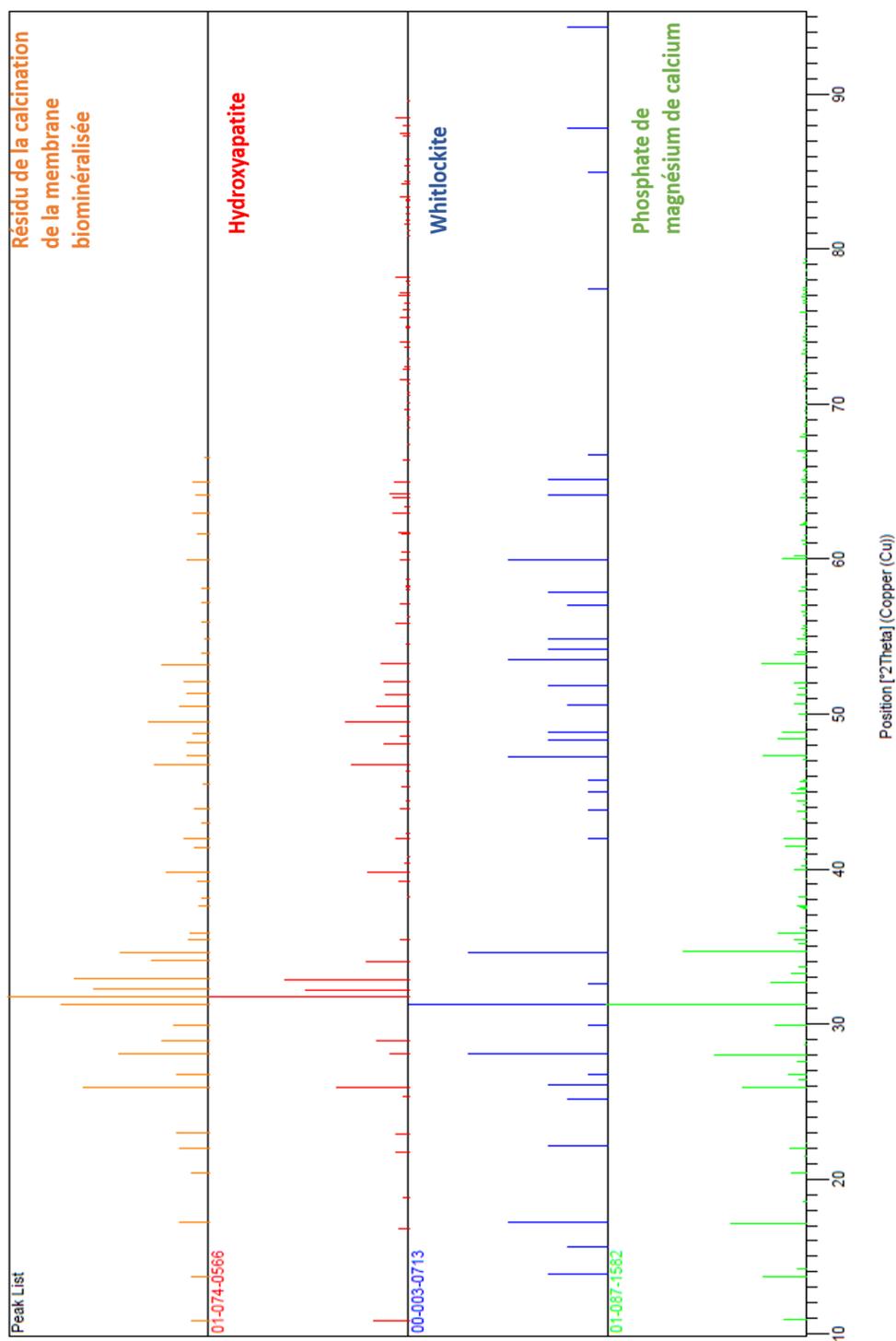
Les courbes d'équations $\frac{t-t_1}{t_1 \times C_i}$ et $\frac{1}{C_i} \cdot \ln\left(\frac{t_i}{t_0}\right)$ sont ensuite tracées. On obtient alors deux droites linéaires d'équations $y_1 = a \cdot x_1 + b$ et $y_2 = c \cdot x_2 + d$.

La viscosité, exprimée en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, est alors obtenue par l'équation $[\eta] = \frac{y_1 + y_2}{2}$. Puis, la masse viscosimétrique du polymère est donnée par la relation de Mark-Houwink suivant l'équation : $M_v = \alpha \sqrt{\frac{[\eta]}{K}}$ où α et K sont les paramètres prédéterminés par Rinaudo *et al.* pour un CHT de DA 2% et dans les conditions opératoires précédemment décrites ($\alpha=0,76$ et $K=82 \cdot 10^5 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$).

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.

Annexes 3

Spectres modélisés des nanofibres modifiées avec la pDA, biominéralisées pendant 7 jours puis calcinées à 1000°C, de l'hydroxyapatite pure et d'autres formes de cristaux de phosphate de calcium par Diffractométrie des rayons X

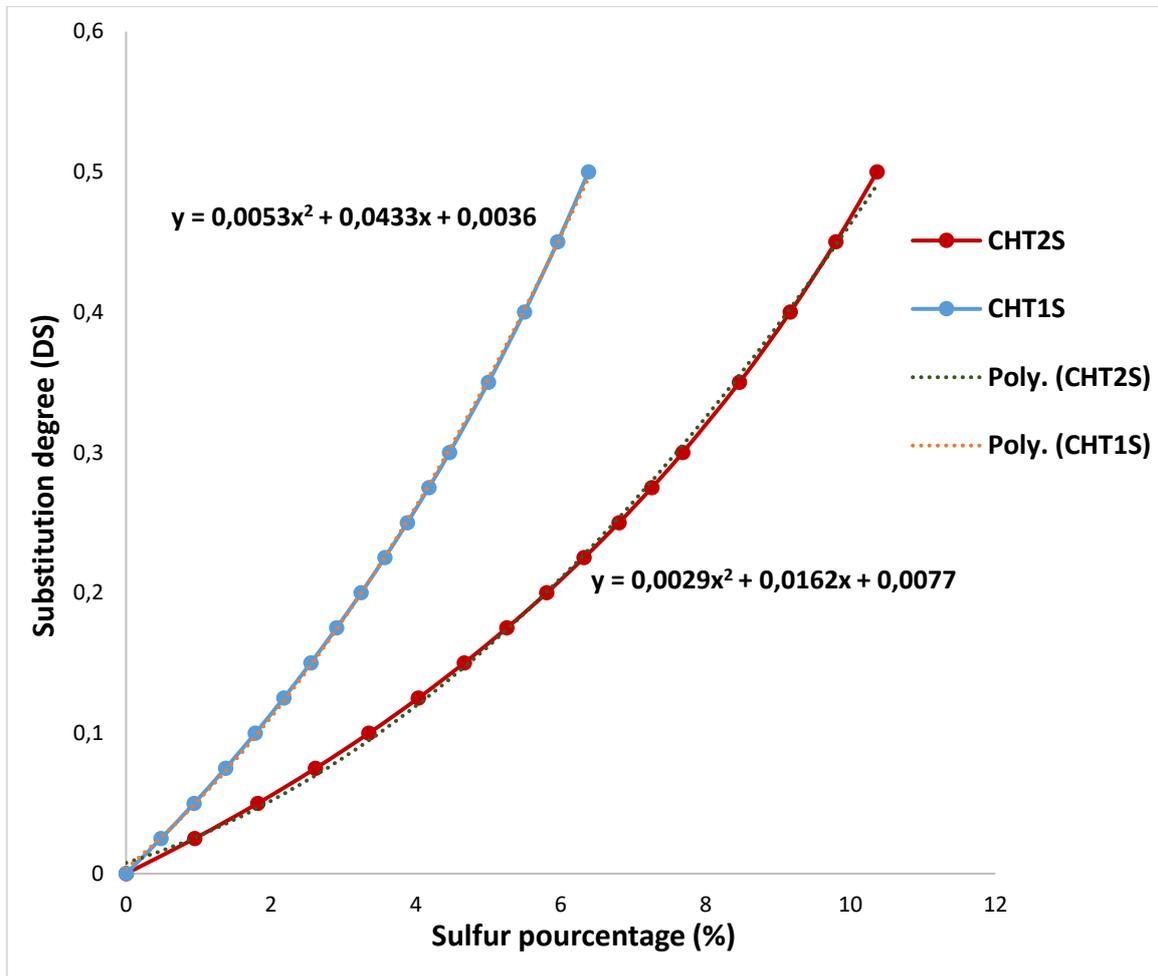


Annexes 4**Valeurs des masses des réactifs de sulfonation utilisés**

R	CHT (g)	BZ1S (g)	BZ2S (g)	NaBH₃CN
0,25	5	1,58	2,36	3
0,5	5	3,16	4,71	3
0,75	5	4,74	7,07	3
1	5	6,32	9,42	3
1,5	5	9,48	14,13	3
2	5	12,64	18,85	3

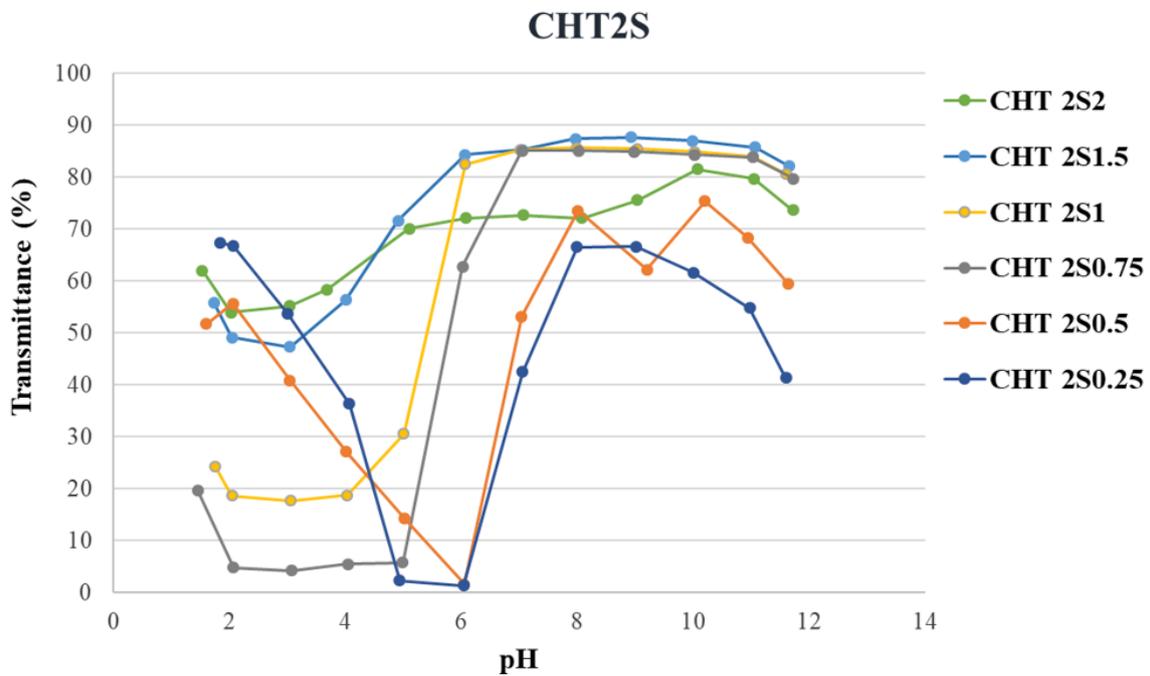
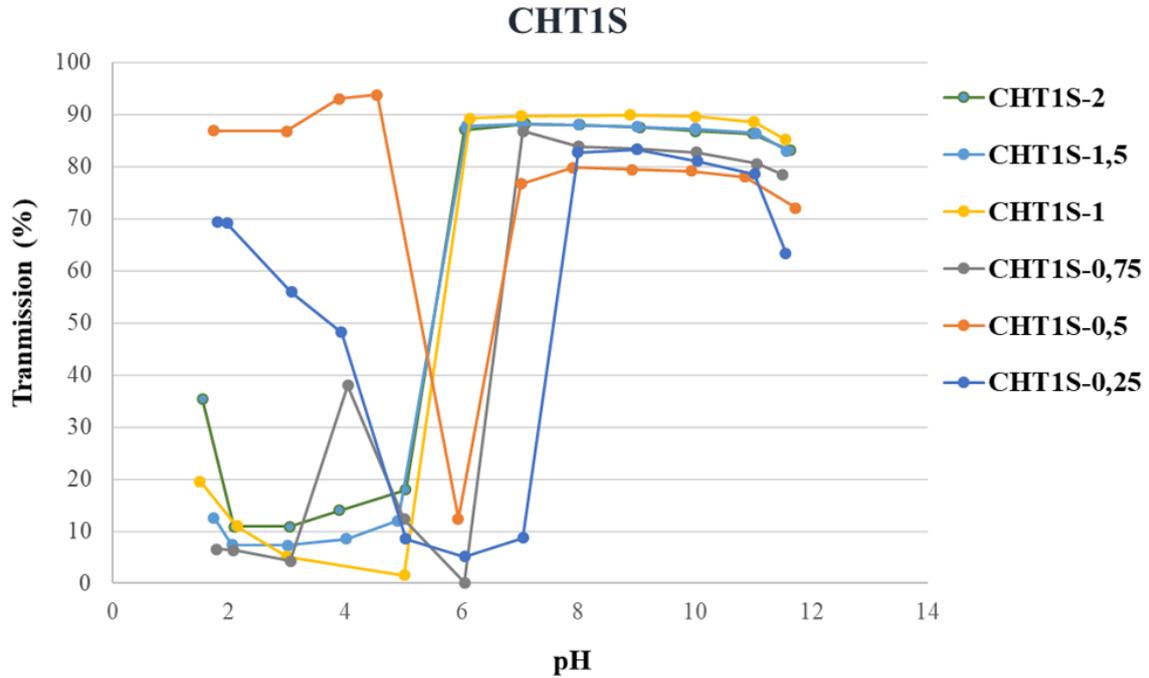
Annexes 5

Courbes théoriques de l'analyse élémentaire



Annexes 6

Etude de solubilité des dérivés par mesure de transmittance en fonction du pH



Résumé

Les textiles sont largement utilisés dans le domaine biomédical, notamment pour le soin des plaies ou pour la conception de prothèses de substitution ou de régénération d'organes endommagés par la maladie ou par cause accidentelle. Le cahier des charges des textiles médicaux évolue vers l'élaboration de biomatériaux « intelligents », biorésorbables et bioactifs capables d'interagir spécifiquement avec les tissus vivants en fonction de leur nature (os, vaisseau, etc.). Dans ce contexte, le projet de recherche consiste à concevoir, par électrospinning, deux types de membranes nanofibreuses biomimétiques et bioactives à base de chitosane. Dans une première approche, des nanofibres de chitosane ont été fonctionnalisées par la polydopamine qui contient des groupements catéchols capables d'induire la biominéralisation *in vitro* du biomatériau dans un milieu riche en ions calcium et phosphate. De plus, il a été observé que la polydopamine permet de stabiliser les nanofibres et de ralentir leur dégradation. Ainsi, ces membranes nanofibreuses à propriétés ostéoinductrices pourraient être utilisées comme « scaffolds » pour la régénération tissulaire guidée en parodontologie par exemple. Dans une deuxième approche, l'élaboration de nanofibres à propriétés anticoagulantes à base de chitosane a été menée. Le chitosane a été dans premier temps chimiquement modifié par des groupements sulfonates. Les paramètres de synthèse ont permis de contrôler le degré de sulfonation du chitosane et ses nouvelles propriétés caractéristiques d'un polyampholyte ont été observées. Les différents essais biologiques effectués ont montré que ces dérivés sulfoniques sont non hémolytiques et bénéficient de propriétés anticoagulantes dépendantes de leur degré de substitution. Dans un second temps, des nanofibres de chitosane sulfoné ont été obtenues par électrospinning, conduisant à des membranes à propriétés antithrombotiques. Ces matériaux sont donc des candidats de choix pour la fonctionnalisation de stents vasculaires afin de prévenir les thromboses.

Mots-clés : *Electrospinning, nanofibres, chitosane, polydopamine, propriétés ostéoinductrices, chitosane sulfoné, activité antithrombotique*

Abstract

Textiles are widely used in the biomedical field, in particular for the care of wounds or the design of prostheses for strengthening or regenerating organs damaged by the disease or by accidental cause. The specifications for medical textile are evolving towards the development of “intelligent”, bioresorbable and bioactive biomaterials that are capable of interacting specifically with living tissues according to their nature (bone, vessel, etc.). In this context, the research project consists of generating, by electrospinning, two types of biomimetic and bioactive nanofibrous membranes based on chitosan. In a first approach, nanofibres of chitosan have been functionalized by polydopamine that contains catechol groups capable of inducing the *in vitro* biomineralization of the biomaterial in a medium rich in calcium and phosphate ions. In addition, it has been observed that polydopamine stabilizes nanofibers and slow their degradation. Thus, these nanofibrous membranes with osteoinductive properties could be used for example as scaffolds for guided tissue engineering in periodontology. In a second approach, the development of chitosan-based nanofibers with anticoagulant properties was conducted. Chitosan was initially chemically modified by sulfonate groups. The synthesis parameters allowed to control the degree of sulfonation of chitosan and its new polyampholyte specific character was observed. The different biological assays carried out have shown that these sulfonic derivatives are non-hemolytic and benefit from anticoagulant properties that are dependent on their degree of substitution. Then, sulfonated chitosan-based nanofibres were obtained by electrospinning, leading to membranes with antithrombotic properties. These materials are therefore suitable candidates for the functionalization of vascular stents to prevent thrombosis.

Keywords : *Electrospinning, nanofibres, chitosan, polydopamine, osteoinductive properties, sulfonated chitosan, antithrombotic activity*