



Université
de Lille

Université de 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

Implants viscéraux fonctionnels élaborés par plasma froid et electrospinning

Présentée et soutenue par

Malo DUFAY

Le 29 mars 2021

Membres du jury

Dr. Céline FALENTIN-DAUDRE	Université Paris 13	Rapporteur
Dr. Anne HEBRAUD	Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Benjamin NOTTELET	Université de Montpellier	Examineur
Pr. Nicolas BLANCHEMAIN	Université de Lille	Examineur
Dr. Stéphanie DEGOUTIN	Université de Lille	Directrice de thèse
Pr. Maude JIMENEZ	Université de Lille	Co-directrice de thèse

*« Ne vis pas pour que ta présence se remarque,
mais pour que ton absence se ressente »*

Bob Marley

Remerciements

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité Matériaux et Transformation (UMET, UMR 8207) dirigée par **Patrice Woisel** de l'université de Lille, et financée par l'**ANR** « Jeunes Chercheurs Jeunes Chercheuses » CAPSPIN (ANR-17-CE09-0003). Ce projet a aussi été soutenu par le pôle de compétitivité **EuraMaterials**. Je tiens donc à remercier tous ces acteurs pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je voudrais sincèrement remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Dr. Céline FALENTIN-DAUDRE, Maître de conférences à l'Université Paris 13, de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et d'être rapporteur de mon travail.

Dr. Anne HEBRAUD, Maître de conférences à l'Université de Strasbourg, je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être rapporteur sur mon travail de thèse et de faire partie de mon jury.

Pr. Benjamin Nottelet, Professeur à l'université de Montpellier, de faire partie de ce jury et de vos encouragements lors de nos rencontres au cours des congrès.

Pr. Nicolas Blanchemain, Professeur à l'université de Lille, d'avoir accepté de juger mon travail ainsi que pour tous les conseils que vous avez pu m'apporter pendant mon travail de thèse et pour tout votre soutien.

Je tiens vraiment à remercier le **Dr. Stéphanie DEGOUTIN**, ma directrice de thèse, d'avoir accepté ma candidature et de m'avoir soutenu pendant cette thèse. Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour avoir été là lorsque j'en avais besoin, d'avoir réussi à m'aider à gérer mon stress pour les différentes communications orales internationales auxquelles tu m'as permis de participer. Je tiens aussi à te remercier pour ta bonne humeur et la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également le **Pr. Maude JIMENEZ**, ma co-directrice de thèse, pour ton soutien, tes conseils et ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin. Tes conseils sur le plasma m'ont beaucoup aidé à avancer dans un sujet qui n'était pas toujours simple. Je te remercie aussi d'avoir accepté ma candidature au début de la thèse et d'avoir cru en mes compétences pour la mener à bien.

Remerciements

De grands remerciements vont au **Pr. Bernard MARTEL** à la fois pour son aide au cours de mes deux années de master amis aussi pour tous ses encouragements, ses conseils et sa bonne humeur au cours de ma thèse. Je tiens sincèrement à te remercier pour m'avoir fait confiance dans de nombreux domaines et pour avoir toujours été là pour moi.

Je voudrais aussi remercier le **Dr. Nicolas TABARY** pour son aide sur le plan professionnel mais quelque part aussi sur le plan personnel. Je te remercie de m'avoir soutenu depuis mon M2 et ce à chaque instant, et même les plus difficiles. Ton soutien m'a été d'une grande aide à un moment difficile dans ma vie et tu n'as jamais arrêté de m'aider avec ta bonne humeur et ton humour qui m'a toujours donné le sourire. Je tiens aussi à te dire merci pour m'avoir aidé dans mes premiers enseignements et m'avoir guidé dans tous ces premiers pas.

Je souhaite exprimer de vives remerciements au **Dr. Feng CHAI** et à **Mr. Mickaël MATON** pour leurs aides dans les évaluations biologiques et microbiologiques, ainsi que pour toutes les connaissances qu'ils m'ont apportées pendant ces travaux.

A **Mr. Jean-Noël STAELENS** pour l'aide qu'il m'a apporté, ainsi qu'à mes stagiaires pour différentes caractérisations physico-chimiques. Mais aussi pour sa bonne humeur et sa présence toujours remarquée dans les labos.

A **Mr. Benoit HUE** pour son aide au niveau de l'électrospinning et qui m'a permis de régler de nombreux problèmes qui se sont érigés devant moi.

Au **Pr. Maryse BACQUET**, qui m'a aidé pendant toute mon année de Master 2 à trouver les meilleures voies pour moi et qui a toujours été prévenante avec moi.

Je remercie aussi tous mes stagiaires, sans qui la progression de ma thèse n'aurait pas été aussi fluide. Je remercie donc **Valentin, Nihad, Maria, Aziz, Amaury, Aurélie, Agathe** et **Sarah** qui m'ont apporté leur aide pendant tout ce projet.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du projet CAPSPIN que je n'aurais pas encore cité et qui m'ont apporté beaucoup d'aide dans les différents domaines de ma thèse : **Dr. Grégory STOCLET, Dr. Séverine BELLAYER** et **Dr. Mathilde CASETTA**.

Je voudrais aussi remercier les différents doctorants, post-doctorants et personnels du labo que j'ai eu la chance de rencontrer. Je pense notamment à **Sami, Cuong, Nathalia, Cédric Z., Cédric R., Florine, Missipssa, Antoine, Sarah, Dyhia, Aurélien, Anna, Guillaume** et **Hussam** pour

Remerciements

avoir été vous-mêmes toutes ces années et pour votre bonne humeur dans nos moments d'interactions même s'ils se sont faits rares sur la fin. Parmi vous, j'aimerais plus particulièrement citer deux personnes qui m'ont beaucoup apporté et aidé pendant ma thèse à savoir **Syrine** et **Max** qui, lorsque vous étiez présents ou non, m'ont apporté beaucoup plus que vous ne pouviez le penser. En effet, les moments qu'on a pu partager m'ont aidé à tenir, m'ont permis de rire à tous moments et m'ont aussi aidé à ne pas sombrer dans différents moments moins faciles de la vie.

Je tiens finalement à remercier la personne qui a partagé tous les moments de ma vie depuis 7 ans aujourd'hui et qui m'a supporté, aidé, soutenu et fait grandir depuis tout ce temps : **Anais Copado**. Je sais que je n'ai pas toujours été le meilleur dans notre vie et que j'ai eu plusieurs moments de faiblesses et notamment un, mais je te remercie d'être encore là aujourd'hui et que notre flamme ne se soit pas éteinte aujourd'hui car je sais que tu t'es beaucoup donné pour ça.

Table des matières

ABREVIATIONS	
INTRODUCTION GENERALE	5
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. HERNIES ABDOMINALES	13
<i>I.a. Différents types de hernies</i>	<i>13</i>
I.a.i. Inguinale	14
I.a.ii. Ombilicale.....	15
I.a.iii. Epigastrique	16
I.a.iv. Incisionnelle.....	16
I.a.v. Fémorale.....	16
I.a.vi. Autres hernies.....	17
<i>I.b. Implants et complications post-opératoires</i>	<i>18</i>
I.b.i. Traitement de la hernie	18
I.b.ii. Adhérences post-opératoires (douleurs et mécanisme).....	21
I.b.iii. Infections	24
<i>I.c. Solutions thérapeutiques des adhérences post-opératoires</i>	<i>25</i>
I.c.i. Etat de l'art des solutions anti-adhérentes	25
I.c.ii. Agents pharmaceutiques	26
I.c.iii. Instillations péritonéales.....	27
I.c.iv. Hydrogels.....	28
I.c.v. Barrières mécaniques	29
<i>I.d. Solutions thérapeutiques des infections</i>	<i>30</i>
I.d.i. Libération d'agents thérapeutiques.....	30
I.d.ii. Greffage de polymères antibactériens.....	32
II. DISPOSITIFS MEDICAUX FONCTIONNELS A BASE DE NANOFIBRES	35
<i>II.a. Electrospinning</i>	<i>36</i>
II.a.i. Généralités.....	36
II.a.ii. Paramètres	39

Table des matières

II.a.ii.1.	Paramètres de système	39
II.a.ii.2.	Paramètres de procédé	41
II.a.ii.3.	Paramètres environnementaux.....	44
II.a.iii.	Applications des nanofibres	47
II.a.iii.1.	Filtration	47
II.a.iii.2.	Cosmétiques	48
II.a.iii.3.	Barrières	48
II.a.iii.4.	Ingénierie tissulaire	49
II.a.iii.5.	Traitement des plaies	49
II.a.iii.6.	Libération médicamenteuse	50
<i>II.b.</i>	<i>Modification de surface de nanofibres.....</i>	<i>50</i>
II.b.i.	Présentation générale des techniques de modification de surfaces des matériaux polymères	50
II.b.ii.	Traitement plasma froid	52
II.b.ii.1.	Généralités.....	52
II.b.ii.2.	Différentes sources.....	53
II.b.ii.3.	Effets du plasma froid.....	59
II.b.ii.4.	Applications	61
<i>II.c.</i>	<i>Traitement plasma froid sur nanofibres obtenues par electrospinning.....</i>	<i>62</i>
II.c.i.	Amélioration de la biocompatibilité	62
II.c.i.1.	Introduction	62
II.c.i.2.	Régénération osseuse et cartilagineuse.....	63
II.c.i.3.	Autres régénérations tissulaires	66
II.c.i.4.	Traitement des plaies	70
II.c.ii.	Adsorption et immobilisation.....	70
II.c.iii.	Greffage et réticulation	72
II.c.iii.1.	Greffage de polymère.....	72
II.c.iii.2.	Greffage moléculaire	76
II.c.iii.3.	Polymérisation induite par plasma	77
II.c.iii.4.	Hydrophobisation.....	79
II.c.iii.5.	Réticulation.....	80

Table des matières

II.c.iv.	Autres effets du traitement plasma.....	81
II.c.iv.1.	Propriétés mécaniques.....	81
II.c.iv.2.	Propriétés thermiques.....	84
II.c.iv.3.	Vieillessement des traitements plasma.....	85
III.	PROJET CAPSPIN (COLD ATMOSPHERIC PLASMA AND ELECTROSPINNING).....	86
III.a.	Voie electrospinning-plasma.....	88
III.b.	Voie electrospinning coaxial.....	91
III.c.	Comparaison des 2 voies.....	92
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS & METHODES.....		93
I.	ELABORATION DE NANOFIBRES FONCTIONNELLES.....	95
I.a.	Matériaux.....	95
I.a.i.	Implant en PP.....	95
I.a.ii.	Polymères biodégradables.....	95
I.a.iii.	Monomères bioactifs.....	96
I.a.iv.	Polymères bioactifs.....	97
I.b.	Procédés.....	97
I.b.i.	Appareil d'électrospinning.....	97
I.b.ii.	Appareil plasma froid.....	99
I.b.iii.	Protocoles de fonctionnalisation.....	100
I.b.iii.1.	Voie 1 : electrospinning-plasma.....	100
I.b.iii.2.	Voie 2 : electrospinning coaxial.....	102
II.	CARACTERISATIONS DES ECHANTILLONS.....	106
II.a.	Caractérisations physico-chimiques.....	106
II.a.i.	Microscopie électronique à balayage (MEB) et analyse dispersive en énergie (EDX).....	106
II.a.ii.	Microscopie électronique à transmission (MET).....	106
II.a.iii.	Angle de contact de l'eau.....	107
II.a.iv.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	107
II.a.v.	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	107
II.a.vi.	Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF-ATR).....	107

II.a.vii.	Dosage colorimétrique des fonctions carboxyliques (TBO)	107
II.b.	<i>Evaluation du comportement biologique</i>	108
II.b.i.	Stérilisation	109
II.b.ii.	Contact indirect.....	109
II.b.iii.	Contact direct.....	110
II.b.iv.	Activité anticoagulante	111
II.b.v.	Hémolyse	112
II.b.vi.	Activité antimicrobienne.....	113
II.b.vii.	Essais <i>in vivo</i>	114
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS		117
VOIE 1 : ELECTROSPINNING - PLASMA		119
I.	ELABORATION ET CARACTERISATION DE NANOFIBRES DE PCL.....	121
II.	FONCTIONNALISATION DES NANOFIBRES PAR PLASMA FROID BASSE PRESSION	127
II.a.	<i>Activation de la surface</i>	127
II.b.	<i>Copolymérisation greffante de l'AA</i>	130
II.c.	<i>Copolymérisation greffante de l'AMPS</i>	135
II.d.	<i>Copolymérisation greffante du TBAEMA</i>	142
III.	CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES MEMBRANES.....	145
IV.	ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES ECHANTILLONS GREFFES	150
IV.a.	<i>Stérilisation</i>	150
IV.b.	<i>Viabilité cellulaire</i>	150
IV.c.	<i>Contact indirect</i>	151
IV.d.	<i>Contact direct</i>	153
IV.e.	<i>Coagulation et hémocompatibilité (échantillons greffés par l'AMPS)</i>	157
IV.f.	<i>Microbiologie (échantillons greffés par le TBAEMA)</i>	158
IV.g.	<i>Essais in vivo</i>	160
V.	CONCLUSION	163

VOIE 2 : ELECTROSPINNING COAXIAL	165
I. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES POLYMERES BIOACTIFS	167
<i>I.a. Synthèse et caractérisation du PAMPS</i>	<i>167</i>
<i>I.b. Synthèse et caractérisation du P(AMPS-co-AA).....</i>	<i>170</i>
<i>I.c. Synthèse et caractérisation du PTBAEMA</i>	<i>173</i>
II. ELABORATION ET CARACTÉRISATION DES NANOFIBRES CŒUR/PEAU	174
<i>II.a. Nanofibres de PAMPS et des P(AMPS-co-AA)</i>	<i>174</i>
II.a.i. Electrospinning du PAMPS et des P(AMPS-co-AA).....	174
II.a.ii. Augmentation de la stabilité des nanofibres de PAMPS en milieu aqueux	176
<i>II.b. Nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS</i>	<i>181</i>
II.b.i. Electrospinning coaxial de PCL/PAMPS.....	181
II.b.ii. Caractérisations physico-chimiques des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS.....	183
II.b.iii. Amélioration de la stabilité des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS en milieu aqueux	186
<i>II.c. Nanofibres de PTBAEMA</i>	<i>188</i>
II.c.i. Electrospinning du PTBAEMA.....	188
<i>II.d. Electrospinning coaxial PCL/PTBAEMA.....</i>	<i>191</i>
III. ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ	192
IV. OPTIMISATION DU TRAITEMENT THERMIQUE DES NANOFIBRES CŒUR/PEAU PCL/PAMPS	193
V. CONCLUSION	196
CONCLUSION GÉNÉRALE	199
PERSPECTIVES	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	211
LISTE DES COMMUNICATIONS.....	241
ANNEXES.....	245

Abréviations

Molécules

AA : Acide acrylique

AFA5,5: Acide formique/acide acétique 5:5

AIBN: Azobisisobutyronitrile

AMPS : Acide-2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique

CA : Acétate de cellulose

CFX : Ciprofloxacine

CH₃COOH : Acide acétique

CHCl₃ : Chloroforme

CMC : carboxymethyl cellulose

CS : Chitosan

DCM : Dichlorométhane

DDSA : Dodécényl succinique

DMAc : N,N-diméthylacétamide

DMAEMA : Méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle

DMF : Diméthylformamide

EDA : Ethylène diamine

EDC : 1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

ePTFE : Poly(tétrafluoroéthylène) expansé

ETO : oxyde d'éthylène

HCOOH: Acide formique

HDMSO : Hexaméthylènedisiloxane

NHS : N-hydroxysuccinimide

MA : Acide malonique

MEK : Méthyléthylcétone

P4VP : Poly(4-vinylpyridine)

PAA : Poly(acide acrylique)

P(AMPS-co-AA) : Poly(acide-2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique-co- acide acrylique)

PBC : Poly(butylène carbonate)

PBS : Polybutylène succinate
PCL : Poly(ϵ -caprolactone)
PDMAMS : Poly(diméthylaminométhyle styrène)
PEG : Poly(éthylène glycol)
PEO : Poly(oxyde d'éthylène)
PES : Poly(éther sulfone)
PET : Poly(éthylène téréphtalate)
PEVA : Poly(éthylène-co-acétate de vinyle)
PGA : Poly(acide glycolique)
PHB : Polyhydroxybutyrate
PLA : (Poly(acide lactique))
PLGA : Poly[(acide-L-lactique)-co-glycolide]
PLLA : Poly(acide-L-lactique)
PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)
PP : Propylène
PPE : Poly(phénylèneéthylène)
PS : Polystyrène
PTFE : Poly(tétrafluoroéthylène) non expansé
PU : Polyuréthane
PVA : Poly(alcool de vinyle)
PVP : Poly(vinylpyrrolidone)
TBAEMA : 2-(*tert*-butylaminoéthyle)
TH : Chlorhydrate de tétracycline
THF : Tétrahydrofurane

Biologie

α MEM : Milieu essentiel minimum de Eagle GIBCO®
AINS : Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
AMPs : Antimicrobial peptides
aPTT : Temps de céphaline activée

BMSCs : cellules souches osseuses mésenchymateuses
CJMSCs : Cellules souches conjonctives mésenchymateuses
HaCaTs : Kératinocytes immortels humains
HUVECs : Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
MSC : Cellules souches mésenchymateuses
NSCs : Cellules souches neuronales
OECs : Cellules Olfactives engainantes
PAIs : Activateurs plasminogènes
PPP : Plasma pauvre en plaquettes
PSCs : Cellules souches pluripotentes
PT : Temps de prothrombine
RC : Ringer cystéiné
SARM : S.Aureus résistante à la Méricilline
SMCs : Cellules musculaires lisses
SVF : Sérum de veau foetal
TCPS : Plaque de puits en polystyrène
tPA : Activateur tissulaire du plasminogène
uPA : Activateur uro-plasminogène

Techniques de caractérisations

AFM : Microscope à force atomique
ATR-FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée
ATG : Analyses thermogravimétriques
DSC : Calorimétrie différentielle à balayage
EDX : Analyse dispersive en énergie
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscope électronique à transmission
RSM : Méthodologie de réponse de surface
WCA : Angle de contact
XPS : Spectroscopie photo-électronique

Divers

AMPS max : Nanofibres de PCL greffées par l'AMPS dans les conditions maximales de plasma

AMPS opt : Nanofibres de PCL greffées par l'AMPS dans les conditions optimales de plasma

ANOVA : Analyse de variance

APPJ : Jets plasma à pression atmosphérique

D_{A-C} : Distance aiguille-collecteur

Dac 5/5: DCM/acétonitrile 5:5

DBD : Décharge à barrière diélectrique

DMFAe 5/5 : DMF/acétate d'éthyle 5:5

FDA : Food and drug administration

GAD : Décharge par arc glissant

GAG : Glycosaminoglycane

HAS : Haute autorité de santé

LP CCP : Plasma basse pression par couplage capacitif

NF : Nanofibres

PIGP : Polymérisation greffante induite par plasma

RFGD : Plasma de décharge luminescente radiofréquence

TBAEMA max : Nanofibres de PCL greffées par le TBAEMA dans les conditions maximales de plasma

TBAEMA opt : Nanofibres de PCL greffées par le TBAEMA dans les conditions optimales de plasma

TBAEMA plus : Nanofibres de PCL greffées par le TBAEMA dans les conditions plus de plasma

T_g : transition vitreuse

TIPS : Séparation de phase induite thermiquement

ULD : Décharge à barrière diélectrique ultraléger

ULS : Spot plasma froid

VIPS : Séparation de phase induite par la vaporisation

VOCs : Composés organiques volatiles

Introduction générale

De nos jours, la prévention des adhérences post-opératoires reste, avec la prévention des infections, un des objectifs principaux de la chirurgie intra-abdominale. Les conséquences de telles affections post-opératoires entraînent des effets négatifs pour le patient (temps de convalescence plus élevé, douleurs) mais aussi des dépenses de santé élevées.

La chirurgie de hernie abdominale représente le deuxième type d'opération la plus fréquente avec plus de 20 millions d'interventions par an dans le monde¹. Cette pathologie est caractérisée par le passage d'une partie des viscères à travers la paroi abdominale suite à l'apparition d'un orifice non-naturel (rupture d'une partie de la paroi abdominale) ou par le relâchement d'un orifice déjà existant. Dans de rares situations, la hernie abdominale ne nécessite pas d'opération mais dans la majorité des cas, il convient d'utiliser une barrière mécanique de manière à éviter les récurrences. Cependant, comme toute opération, cette chirurgie comporte des risques de complications.

Dans plus de la moitié des cas de traitement de la hernie (dépendant du site), des phénomènes d'adhérences ont lieu en raison de la formation anormale de bandes fibrineuses. Les stratégies utilisées à ce jour pour limiter la formation de ces bandes se fait par la mise en place d'une solution thérapeutique antiadhérente en addition à l'implantation du textile de réfection pariétal. Cependant, malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent des inconvénients et notamment celui de nécessiter une étape chirurgicale supplémentaire et tous les problèmes que cela peut induire². Une autre solution de prévention a été envisagée dans la littérature avec le greffage d'enzyme directement sur l'implant de réfection pariétal mais le coût élevé des enzymes sur le marché rend l'industrialisation de ce procédé impossible³. Un autre procédé peut être envisagé en prenant en compte les études faites sur l'amélioration des propriétés biologiques des matériaux par traitement plasma froid basse pression⁴⁻⁶. En effet, en combinant l'utilisation de nanofibres, connues pour leurs propriétés biologiques⁷, et l'utilisation de molécules antiadhérentes greffable par plasma froid⁸, il est possible de donner des propriétés de contacts particulières à ces nanofibres.

Des phénomènes d'infections prennent aussi place au cours des opérations de réfection pariétale. Ces infections peuvent mener à la nécessité de retrait de l'implant, ce qui augmente le risque de récurrence. Pour limiter ce phénomène, un agent prophylactique antibiotique, tel que

l'AluSpray®, est utilisé mais présente des effets secondaires et ne permet pas d'empêcher toutes les infections⁹. De la même manière que pour les adhérences, il est possible de combiner l'utilisation de matériaux nanofibreux avec la mise en place d'un traitement plasma froid pour greffer des molécules à propriétés antibiotiques.

Le nombre de publications traitant du traitement plasma de nanofibres augmente de manière importante depuis le début du 21^e siècle (**Figure 1**). Ce nombre montre l'intérêt grandissant de la combinaison de ces deux procédés dans différents domaines et notamment l'industrie biomédicale.

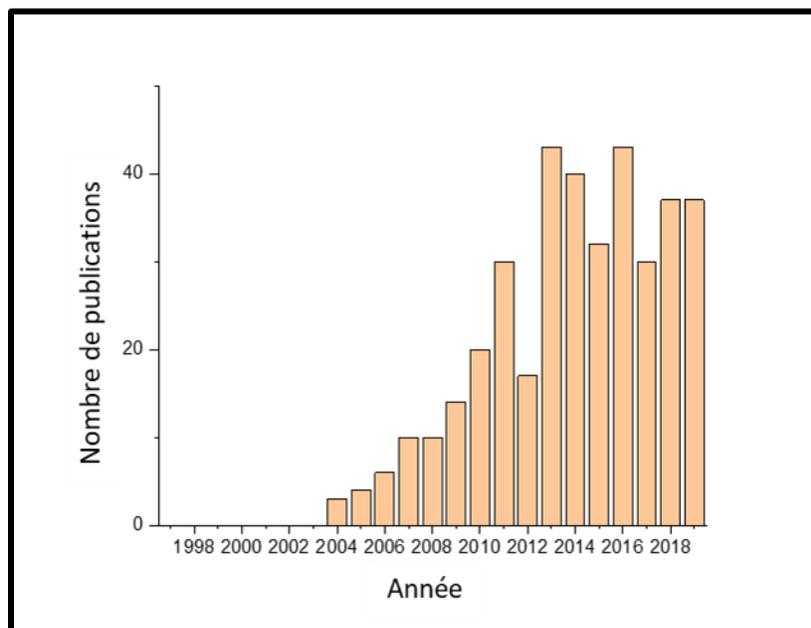
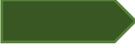


Figure 1: Evolution du nombre de publications à propos du traitement plasma froid de nanofibres électrofilées (source: SciFinder, mots clés: Plasma electrospun, extrait le 07 octobre 2019).

En raison de toutes ces données, le projet CAPSPIN a été focalisé vers l'utilisation de l'électrospinning de polymères suivi d'une fonctionnalisation par plasma froid. A titre de comparaison, une autre voie a été développée avec l'utilisation de la technique d'électrospinning coaxial, afin d'obtenir des nanofibres de type cœur-peau polymère biodégradable/polymères bioactifs (antiadhérent ou anti-infectieux). Deux laboratoires sont impliqués dans ce projet à savoir l'Unité Matériaux Et Transformations (UMET) de l'université de Lille et l'unité INSERM U1008 (Médicaments et Biomatériaux à libération contrôlée).

Ce manuscrit est développé en trois grandes parties. Dans un premier point, une étude bibliographique a été menée et présente l'état de l'art des solutions antiadhérentes et anti-



Introduction générale

infectieuses utilisées dans le traitement de la hernie viscérale. Cette partie traitera aussi de l'état de l'art des matériaux nanofibreux traités par plasma froid et utilisés dans le domaine biomédical. Enfin, les deux voies du projet CAPSPIN seront décrites plus en détail. La seconde partie de ce document traite des matériaux utilisés pour mener à bien ce projet ainsi que des différentes techniques de mise en forme et la caractérisation physico-chimique et biologique des matériaux. Enfin, la troisième partie correspond aux résultats obtenus avec une discussion critique de ces derniers. Un feuillet volant est aussi présent dans ce manuscrit pour aider à la compréhension des différentes voies ainsi que pour suivre plus clairement les résultats obtenus. Le manuscrit se termine par une conclusion générale du projet et présente les différentes perspectives envisagées à court et moyen terme.

Première partie : Etude bibliographique

I. Hernies abdominales

La thématique de ce travail de thèse s'inscrit dans le traitement des hernies et dans l'amélioration de la qualité de vie des patients par la modification des solutions thérapeutiques actuelles pour ce type d'affection. Les différents types de hernies pouvant se produire au niveau abdominal et vont être présentés dans cette partie.

I.a. Différents types de hernies

La cavité abdominale est formée des muscles abdominaux et du péritoine décrit comme possédant deux feuillets différents : le feuillet viscéral en contact avec les viscères et le feuillet pariétal en contact avec les muscles de l'abdomen. Une hernie abdominale (**Figure 2**) se traduit par le passage d'une partie des viscères, entourée du péritoine, à travers un orifice naturel de la paroi abdominale (inguinal ou canal obturateur) ou suite à la formation d'un orifice non acquis (éventration). Les causes de la hernie peuvent être d'origine congénitale chez les nouveaux nés suite à la mauvaise fermeture du canal péritonéo-vaginal, ou bien elle peut se former de façon pathologique suite à un effort important, répété ou encore en cas d'obésité.

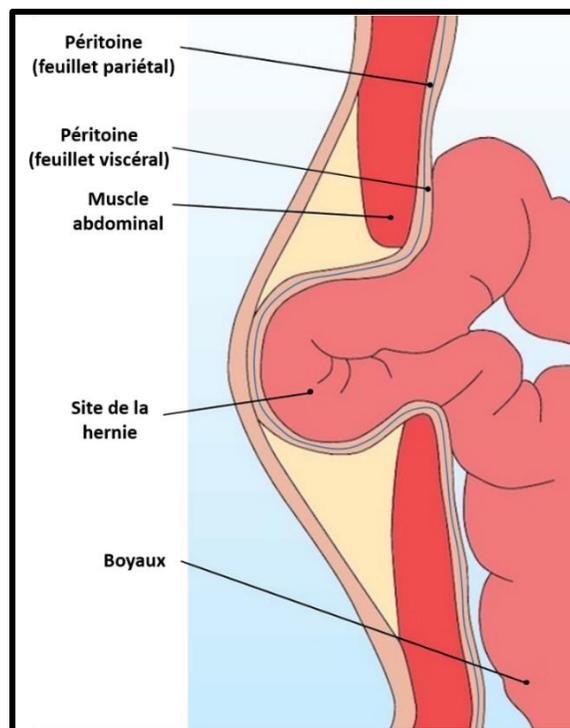


Figure 2: Représentation schématique de la hernie¹⁰

La littérature recense plus de 20 millions de procédures de soin de hernie abdominale par an dans le monde¹¹ avec plus de 700.000 cas aux États-Unis¹² contre 140.000 en France¹³. Ces hernies abdominales peuvent être localisées dans différentes zones de la paroi abdominale (**Figure 3**) et leur fréquence d'occurrence chez les patients dépend de la localisation. Les hernies viscérales, suivant leur localisation, peuvent mener à plusieurs pathologies comme des étranglements, des obstructions intestinales, des cas d'infertilité ou encore des fistules. Le classement des fréquences d'apparition des hernies en fonction de la zone reste très discuté aujourd'hui. Cependant, toutes les études montrent que la hernie inguinale reste la plus fréquente. Une étude de 2011 publiée par Dabbas *et al.* permet d'obtenir le classement des fréquences suivant : inguinale, ombilicale, épigastrique, incisionnelle puis fémorale¹⁴.

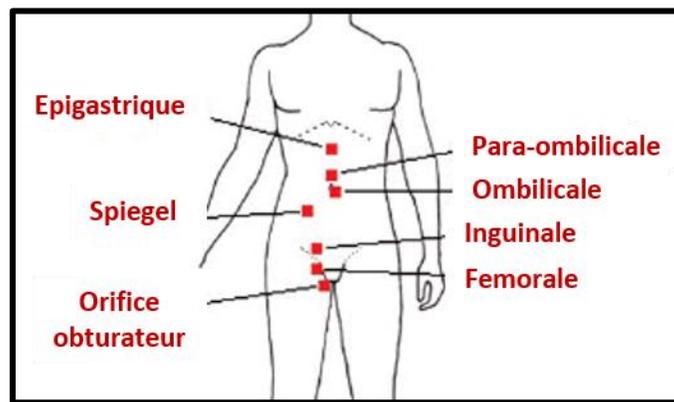


Figure 3: Sites de hernies les plus fréquentes¹⁵

I.a.i. Inguinale

La hernie inguinale est une protubérance qui se forme au niveau de l'aîne entre le muscle de l'abdomen et de la cuisse. Elle représente le passage des intestins à travers l'orifice inguinal ou à travers un orifice apparu par rupture de la paroi abdominale. Elle est la plus répandue, avec plus de 70% des cas de hernies abdominales entre 1985 et 2008¹⁴ et la fréquence d'apparition est plus importante chez les hommes que chez les femmes, avec 27% de risques à long terme chez l'homme contre 3% chez la femme¹¹.

Il est possible de classer les hernies inguinales en deux sous-types : les hernies inguinales directes et indirectes. Les hernies inguinales directes sont plus fréquentes chez les personnes âgées ou pour les patients ayant une prise/perte de poids très rapide. Elles représentent un affaiblissement de la paroi abdominale suite à différents efforts (répétés, importants ou toux

intenses). L'extériorisation du sac viscéral se fait à travers la paroi postérieure du canal inguinal par un trajet direct d'avant en arrière (**Figure 4**). Dans le cas des hernies inguinales indirectes, aussi appelées oblique-externes, celles-ci peuvent avoir lieu à tout âge, mais pour des raisons différentes. Pour les jeunes patients, l'apparition de ce type de hernies est liée à l'existence depuis la naissance (ou à la réouverture) d'un canal permettant le lien entre la cavité abdominale et les bourses testiculaires, pour les hommes, et par le canal péritonéo-vaginal, pour les femmes, alors que pour les personnes âgées, l'apparition se fait pour les mêmes raisons que les hernies directes. L'extériorisation se fait par le passage du sac viscéral à travers l'anneau inguinal en suivant le cordon spermatique et ce par un trajet oblique d'arrière en avant et de dehors en dedans (**Figure 4**)¹⁶.

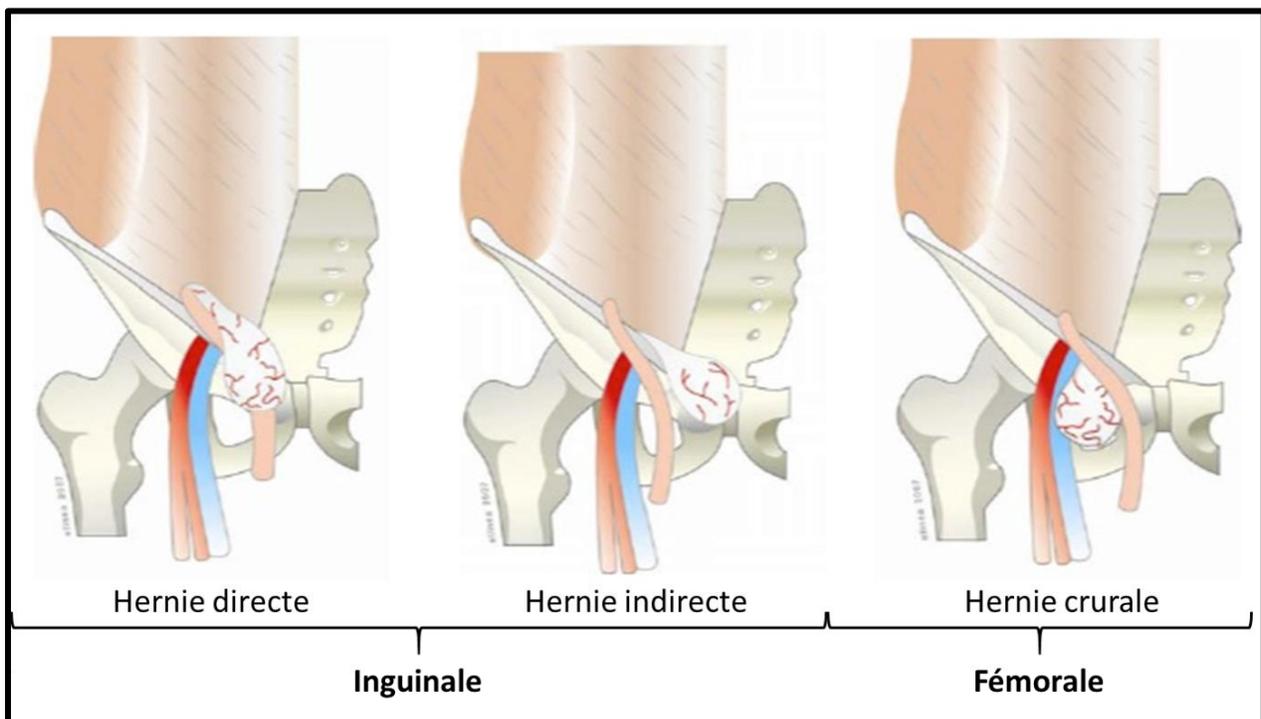


Figure 4: Différents types de hernie suivant la localisation¹⁶

I.a.ii. Ombilicale

La hernie ombilicale est plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte. Dans le cas de l'adulte, elle se traduit par une bosse qui se forme au niveau du nombril de la même façon que chaque type de hernie pour sa propre zone d'affectation. Chez l'enfant, elle est notamment due à un défaut de fermeture de l'orifice ombilical et peut se refermer naturellement au cours des

premières années de vie. Cette hernie est définie dans la littérature comme se situant à moins de 3 cm du nombril et se trouve être la deuxième plus fréquente des hernies abdominales¹⁷. Les hernies ombilicales de petite taille (< 2 cm) ne mènent souvent pas à des symptômes graves (inconfort généralement) contrairement aux hernies de grande taille (> 4 cm) qui mènent notamment à des étranglements¹⁸.

I.a.iii. **Epigastrique**

La hernie épigastrique, aussi appelée hernie de la ligne blanche, est plus rare chez les patients (1,6 à 3,6%) et peut être notamment due à des efforts physiques importants causant une hyperpression abdominale¹⁹. Elle est localisée entre le nombril et le processus xiphoïde (se situant à la partie inférieure du sternum). La plupart des hernies épigastriques sont rencontrées au cours de la vie du patient, même si dans de rares cas, elles peuvent avoir lieu à la naissance et être accentuées par un effort excessif. Ce type de hernie n'est pas plus fréquent chez les hommes que chez les femmes, mais son apparition moyenne diffère un peu suivant les âges (51-70 ans pour les femmes contre 41-50 ans pour les hommes)²⁰.

I.a.iv. **Incisionnelle**

Contrairement aux types de hernies décrites précédemment, la hernie incisionnelle ne peut pas être congénitale ou pathologique. Elle peut avoir lieu suite à une chirurgie ouverte au niveau de l'abdomen, comme la laparotomie, et se comporte comme une récurrence de hernie, ou par accident suite à une blessure à l'arme blanche. Les risques de récurrence de hernie suite à une opération ouverte sont de 15% environ, mais cette proportion peut varier suivant plusieurs facteurs comme l'âge du patient, les autres pathologies et donc les traitements liés ou encore le surpoids²¹.

I.a.v. **Fémorale**

La hernie fémorale, aussi appelée crurale, est plus rare que celles décrites précédemment et se trouve être quatre fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, et plus souvent chez le nourrisson ou les personnes âgées²². Elle se développe au niveau de l'aîne et représente un passage des viscères à travers le canal fémoral suite aux mêmes causes que les autres types de hernies (obésité, grossesse, efforts etc...) (**Figure 4**).

I.a.vi. **Autres hernies**

Il existe d'autres hernies qui se développent beaucoup plus rarement chez les patients. Parmi elles, il est possible de citer la hernie du sillon latéral de l'abdomen, aussi appelée hernie de Spiegel, qui est une rupture de la ligne Spiegel (zone de faiblesse) se situant entre le muscle oblique externe et le muscle grand droit. Le diagnostic de ce type de hernie, notamment pour les petits orifices herniaires, est plus complexe que son traitement étant donné que le symptôme le plus remarquable est la douleur, variable suivant les patients, et qui n'est pas propre à ce type de hernie²³. Un autre type de hernie, rare mais notable, est la hernie obturatrice qui représente moins de 1% de tous les cas de hernies et touche essentiellement les femmes âgées²⁴. Tout comme la hernie inguinale et fémorale, la hernie obturatrice se situe au niveau de l'aîne mais elle représente le passage des intestins à travers l'orifice obturateur, ce qui cause des douleurs par pression sur le nerf obturateur. Enfin, il est aussi intéressant de parler de la hernie diaphragmatique qui a lieu, dans la plupart des cas, avant la naissance au moment du développement embryonnaire. En effet, ce type de hernie est généralement congénital et est caractérisé par une formation incomplète du diaphragme, ce qui entraîne une remontée des organes abdominaux vers la cage thoracique. Ceci aura pour effet de gêner le développement des poumons et est détectable à la deuxième échographie obligatoire. Il existe deux types de hernie diaphragmatique, qui diffèrent par leur zone d'effet et par leur fréquence : la plus fréquente (80% des cas), la hernie de Bochdalek qui se fait au niveau arrière-gauche le plus souvent du diaphragme et qui mène à des malformations de plusieurs types (cardiaques, digestives, neurologiques ...); et la hernie de Morgagni, plus rare, qui se fait en position avant-droite (derrière le sternum), et dont la reconstruction est plus favorable. Ce type de hernie congénitale représente une naissance sur 2000 et est généralement associé à une anomalie chromosomique (40% des cas)²⁵. Dans de plus rares cas, la hernie diaphragmatique peut avoir lieu chez l'adulte à la suite d'un traumatisme brutal.

En raison de leurs nombreuses origines, de leurs fréquences et de leurs conséquences, les hernies doivent être soignées pour éviter toute pathologie supplémentaire aux patients. Malgré leurs origines très variables, le traitement de la hernie, quel que soit le type, suit le même mode

opératoire par pose ou non d'un implant. Ainsi, le traitement de la hernie inguinale sera principalement décrit par la suite.

I.b. Implants et complications post-opératoires

Une hernie inguinale ne nécessite pas obligatoirement une chirurgie. En effet, certaines de ces hernies sont dites réductibles, car l'orifice inguinal formé ne permet pas aux viscères de traverser suffisamment et donc de mener à des obstructions ou des étranglements. Dans ce cas une simple manipulation est nécessaire. Cependant, le traitement de la hernie inguinale non réductible (qui peut mener à des complications) se fait par voie chirurgicale. La réfection de hernie est la chirurgie la plus commune en chirurgie générale et représente 140.000 cas par an en France^{26,27}.

I.b.i. Traitement de la hernie

Il existe deux grands types d'opérations chirurgicales pour traiter la hernie inguinale. La première, la laparotomie, est une technique invasive qui consiste à ouvrir l'abdomen au niveau de la hernie et à placer un implant de réfection pariétale avant de refermer. La deuxième technique, appelée laparoscopie (ou cœlioscopie), est une technique mini-invasive consistant en trois incisions dans l'abdomen dans le but d'insérer la prothèse pariétale. Un des orifices créés durant cette opération sert à insérer une caméra optique (laparoscope), et les deux autres pour des outils chirurgicaux. Cette dernière technique est de plus en plus utilisée, comparée à la laparotomie, pour plusieurs raisons : esthétique (cicatrice moins importante), confort (diminue les douleurs et les effets sur le transit après l'opération) et chirurgicale (réduit les risques d'éventration et le temps d'opération).

Dans tous les cas d'opérations de hernies, la pose d'un implant viscéral est nécessaire pour apporter un renfort mécanique à la paroi abdominale au niveau de l'orifice herniaire. D'après une étude de la Haute Autorité de Santé (HAS), le taux de récurrence des hernies inguinales ou crurales serait de 13% sans la pose d'un implant contre 1,5% si un implant est utilisé. De même, pour les hernies ombilicales, abdominales ou les éventrations, le taux de récurrence de 11 à 63 % sans la pose de l'implant passerait à 0 à 32 % si un implant est appliqué²⁸. Il existe deux types de poses de l'implant de réfection pariétale, à savoir intra- et extra-péritonéale (**Figure 5**). Ces deux techniques possèdent leurs avantages et leurs inconvénients. En effet, la pose de l'implant extra-

péritonéal est facile, mais la fixation doit être solide étant donné que la pression exercée par la paroi abdominale sur cet implant tend à le séparer de son lieu de fixation. Pour cette technique, de nombreux points de sutures sont nécessaires et peuvent causer des gênes pour le patient. Au contraire, l'implant posé en intra-péritonéal a l'avantage d'être maintenu par la pression du péritoine contre la paroi abdominale, mais a l'inconvénient d'être plus difficile à poser²⁹.

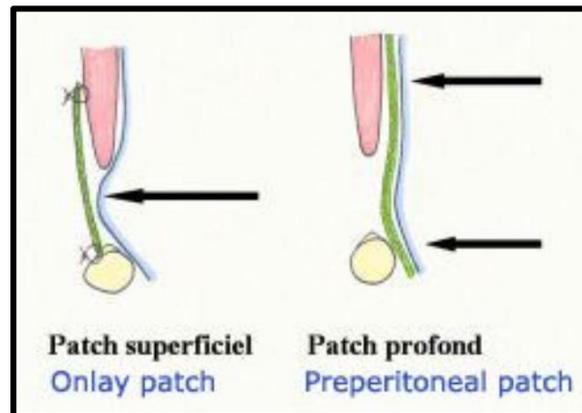


Figure 5: Deux poses différentes de l'implant de réfection pariétal : (à gauche) extra-péritonéale; (à droite) intra-péritonéale. en vert : l'implant; en bleu: le péritoine; les flèches noires représentent la force appliquée par les viscères et le péritoine sur l'implant²⁹.

Dans le cas des poses intra-péritonéales, les implants sont fixés sur les viscères de plusieurs manières : à l'aide de fils, d'agrafes résorbables ou non (**Figure 6**), ou alors par la pulvérisation d'un adhésif chirurgical³⁰. Malgré leur nécessité, toutes ces méthodes de fixation de l'implant présentent des inconvénients étant donné que l'implant doit rester en place (problème dans le cas des fixations résorbables), mais aussi parce que les agrafes peuvent causer des traumatismes et des adhérences secondaires, et parce que les colles posent des problèmes de manipulations (dosages, applications...).

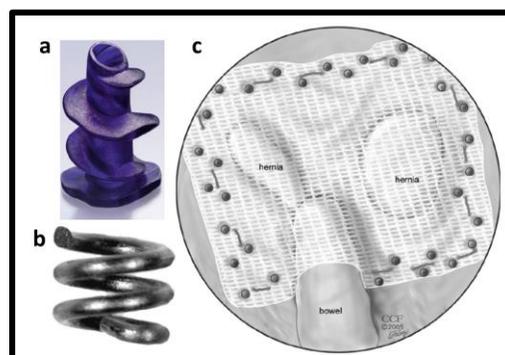


Figure 6: (a) Agrafe résorbable SorbaFix™; (b) Agrafe non-résorbable ProTack™; (c) Représentation schématique de la méthode de fixation de l'implant de hernie par des vis chirurgicales³⁰

La forme de l'implant est variable, et l'HAS classe ces formes en trois différentes catégories : les implants plans, les implants bifaciaux et les implants préformés (**Figure 7**)²⁸. Il est important de noter que les implants préformés peuvent être plans, bifaciaux (**Figure 7d**) ou non (**Figure 7b**), ou en 3 dimensions et la forme est choisie en fonction du type de hernie à soigner. Parmi les implants 3D, il est possible de citer la forme de dôme (**Figure 7c**) pour la hernie diaphragmatique, la forme plane entaillée pour la technique de Lichtenstein (**Figure 7a**) ou les formes anatomiques qui épousent la forme de la zone atteinte par la hernie.

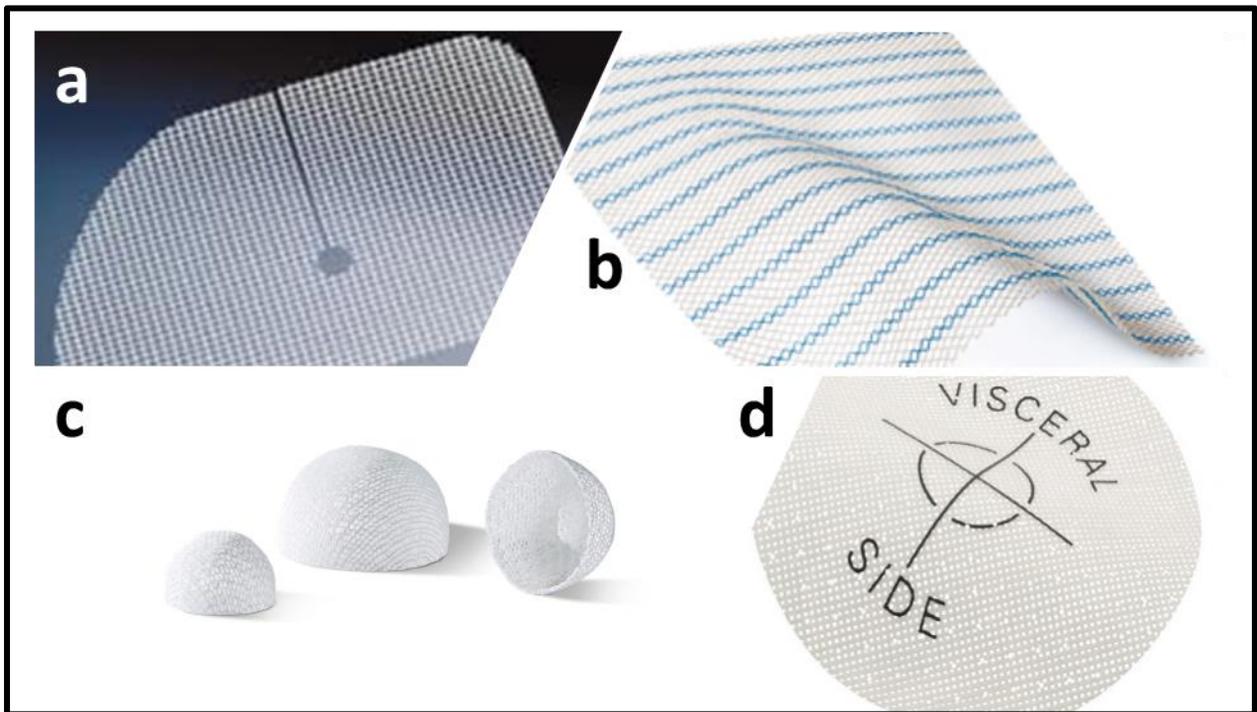


Figure 7: (a) implant pariétal préformé pour la technique de Lichtenstein ; (b) implant pariétal plan ; (c) implant pariétal préformé en dôme pour la hernie diaphragmatique ; (d) implant pariétal bifacial²⁸

Cependant, chacune des catégories citées précédemment peut être subdivisée par la suite en fonction des propriétés de chacune (résistance, maillage, porosité ...). En effet, tous ces implants de réfection pariétale doivent suivre un cahier des charges pour pouvoir être implantés : le matériau utilisé, donc l'implant lui-même, doit être chimiquement inerte, maniable, peu coûteux, cliniquement perceptible et ne pas déclencher de réaction (allergies, inflammations ou carcinogènes). Au-delà de ces caractéristiques essentielles, la texture du matériau est aussi très importante. En effet, il doit posséder un comportement physique acceptable à long terme pour continuer à jouer son rôle de barrière mécanique. La porosité du matériau doit être au minimum

de 75 µm pour permettre à la fois l'infiltration des macrophages et des fibroblastes mais aussi la néovascularisation. Sa résistance doit être supérieure à celle de la paroi abdominale et doit donc dépasser les 180 mmHg. Enfin, sa taille doit être adaptée à l'orifice herniaire (avec un offset de 5 cm dans chaque axe en raison du rétrécissement (« shrinkage ») de l'implant). Par ailleurs, les matériaux utilisés pour ces implants peuvent être résorbables, non-résorbables ou un mélange des deux³¹. Dans le cas des implants totalement résorbables, leur utilisation est plutôt rare notamment en raison du fait que leur action de barrière ne se fera pas à très long terme (reste de la vie du patient). Concernant les matériaux non-résorbables, il s'agit le plus souvent de polypropylène (PP), et plus rarement de poly(éthylène téréphtalate) (PET), de poly(tétrafluoroéthylène) expansé ou non (ePTFE et PTFE). Les matériaux résorbables sont généralement utilisés en combinaison avec les matériaux non-résorbables et sont le plus souvent des polyesters, comme le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(acide lactique) (PLA) ou des copolymères de ces derniers. Il est aussi possible de fonctionnaliser l'implant pour lui apporter des propriétés biologiques supplémentaires pour éviter notamment les risques post-opératoires qui seront décrits ci-après, mais aussi pour éviter l'utilisation de méthodes de fixation, comme c'est le cas par exemple de Glucamesh® qui est couvert d'une colle naturelle (β -D-glucane)³².

Au-delà du renfort mécanique de la paroi abdominale apporté par l'implant de réfection pariétal, il est important de s'intéresser aux risques post-opératoires engendrés par ces derniers. Le risque post-opératoire le plus fréquemment observé chez les patients qui ont subi une opération suivie d'une pose d'implant viscéral est le phénomène d'adhérence post-opératoire. Il existe aussi des risques d'infections, qui sont plus rares mais non négligeables en raison du grand nombre d'opérations pratiquées.

I.b.ii. Adhérences post-opératoires (douleurs et mécanisme)

Les adhérences post-opératoires apparaissent dans 50 à 100% des cas d'opérations intra-abdominales et mènent à de nombreuses pathologies telles que des cas d'infertilité, d'obstruction intestinale, d'étranglement et de douleurs³³. Une étude sur 1000 patients a montré que, à la suite d'une opération intra-abdominale par incision médiane (chirurgie ouverte), 72% des patients ont présenté des adhérences intra-abdominales et 20% des adhérences viscérales.

En comparaison, pour les patients ayant subi une coelioscopie, 19,7% d'entre eux ont présenté des adhérences intra-abdominales et 5,2% des adhérences viscérales. Ceci montre que le type de chirurgie utilisée influence grandement le taux d'adhérences post-opératoires³⁴. Il est aussi intéressant de remarquer que, dans la même étude, il a été prouvé que plus le nombre d'opérations antérieures subies par le patient est élevé, plus le taux d'adhérences l'est aussi. De plus, ces risques post-opératoires mènent à de lourdes dépenses de santé (60 à 600 millions de dollars par an) notamment en raison des cas de réinterventions³⁵.

Le phénomène d'adhérence post-opératoire se traduit par la formation de bandes fibrineuses denses qui peuvent obstruer les viscères de façon partielle ou totale. Ces adhérences peuvent aussi se créer entre les viscères et les organes proches. Notamment, dans le cas de la femme, avec les organes reproducteurs et ainsi déformer ou boucher les trompes de Fallope, ce qui mène en premier lieu à des douleurs mais aussi à des cas d'infertilité.

Suivant la taille de l'obstruction des viscères, une chirurgie n'est pas forcément nécessaire pour soigner les adhérences post-opératoires. En effet, pour de petites obstructions, il est possible de combattre les adhérences, et donc ces obstructions intestinales, par hydratation intraveineuse ou par aspiration gastrique par voie nasale par exemple. Pour les obstructions gastriques de plus grande taille, il est nécessaire de réaliser une chirurgie très coûteuse, notamment en vue du nombre d'opérations, et qui cause une importante morbi-mortalité³⁶.

L'origine de ces adhérences intra-abdominales a longtemps été inconnue et de nombreuses hypothèses ont été avancées. Les premières études ont montré une origine bactériologique de ce phénomène³⁷. Cette théorie a ensuite été abandonnée pour laisser place à diverses origines possibles telles que immunologique, suite à un trauma chirurgical et bien d'autres³⁸. De nos jours, c'est la voie fibrinolytique qui est préférée pour expliquer ce phénomène, et de nombreuses études se focalisent sur la compréhension de ce mécanisme. Le mécanisme décrit à ce jour est assez complexe³⁹, il est décrit de manière simplifiée en **Figure 8**⁴⁰.

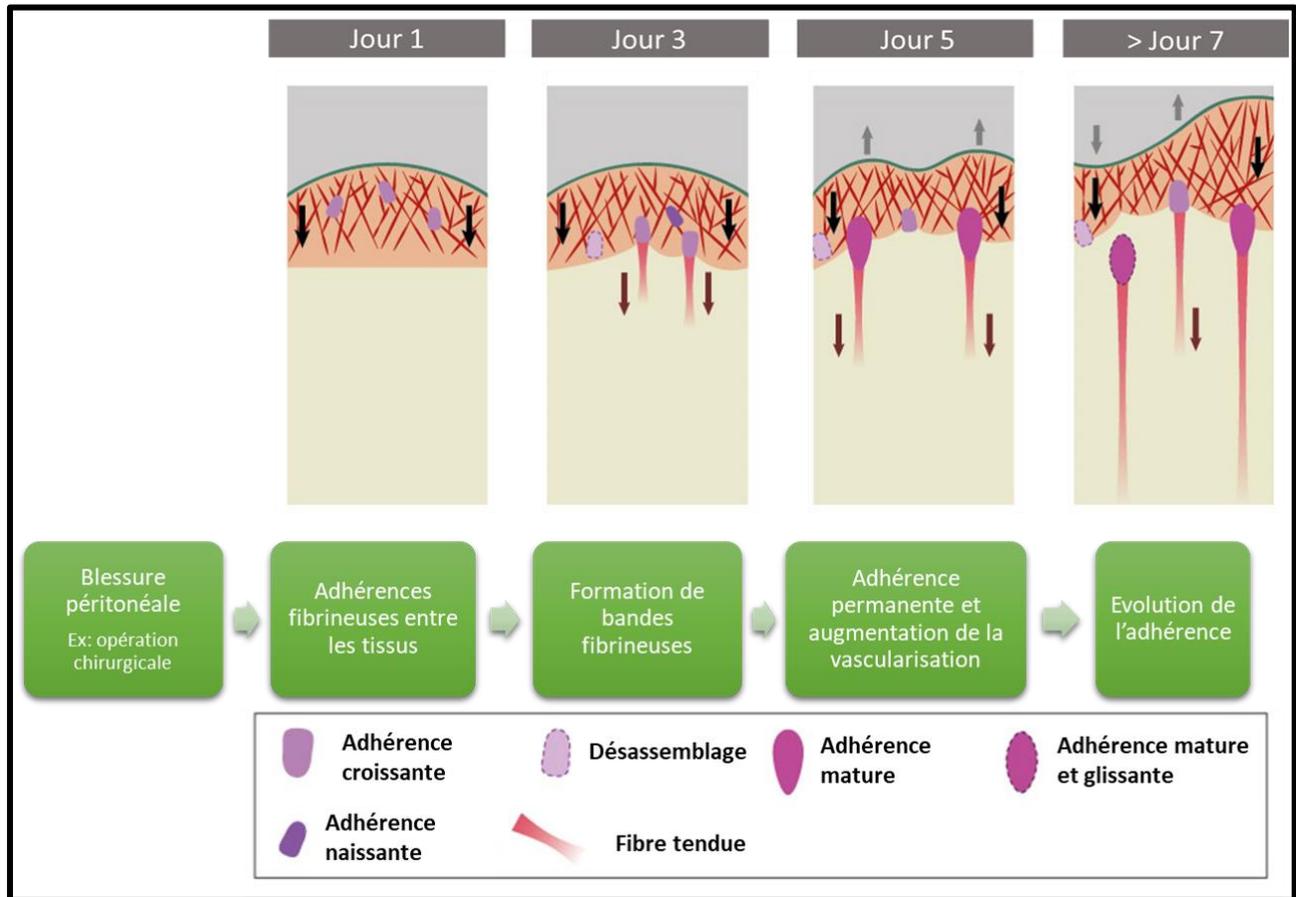


Figure 8: Schéma chronologique simplifié de la formation d'adhérences intra-abdominales⁴⁰

Lorsque le péritoine, constitué de cellules mésothéliales, est blessé, par une incision par exemple lors de l'opération chirurgicale, cela entraîne l'activation et la migration des macrophages du péritoine vers le tissu lymphoïde gastro-intestinal. En parallèle, les fibroblastes, les plaquettes (par la cascade de coagulation) et les chimio-attractants (thrombine et plasmine) sont activés pour le soin et la régénération des tissus. Les macrophages provenant du péritoine, ayant migré, vont permettre l'expression du récepteur P sélectine et se lier au ligand 1 de la glycoprotéine P sélectine. Ce dernier phénomène va entraîner l'attraction et l'activation des macrophages au site de la blessure, puis le recrutement des mastocytes qui vont permettre le relargage d'histamines et de kinines vasoactives. Ces relargages vont causer une augmentation de la perméabilité capillaire et ainsi la formation d'un exsudat de fibrine. Ce dernier couvre la partie extérieure des viscères et va donc former des adhérences avec les organes proches. En parallèle, la blessure des vaisseaux sanguins va activer les cellules endothéliales et causer

l'augmentation de fibrinogènes et de relargage de chimiokines. Cette première grande partie du phénomène a lieu dans les 3 à 4 heures après la blessure. Les protéines présentes vont ensuite servir d'échafaudage pour la migration cellulaire et la formation d'une matrice fibrineuse, qui engendrera le début de la fibrinolyse. Cette dernière a lieu lors de l'interaction de 2 enzymes qui s'expriment au moment de la blessure : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'activateur uro-plasminogène (uPA). Ces dernières sont responsables de la dégradation de la fibrine et empêchent donc les adhérences. Pendant une homéostasie classique, les inhibiteurs 1 et 2 des activateurs plasminogènes (PAIs) contrebalancent la dégradation de la fibrine pour favoriser la réparation du tissu. Ce phénomène se produit dans les 5 à 7 jours après l'opération. Dans le cas contraire, la reconstruction ne se fait pas correctement du fait de la surexpression de ces inhibiteurs, ce qui mène à une organisation de la matrice fibrineuse suivie d'une angiogenèse, un afflux de fibroblastes et la synthèse de collagènes, résultant ainsi dans la formation d'adhérences fibrineuses³⁹. Ce phénomène est résumé en **Figure 9**⁴¹.

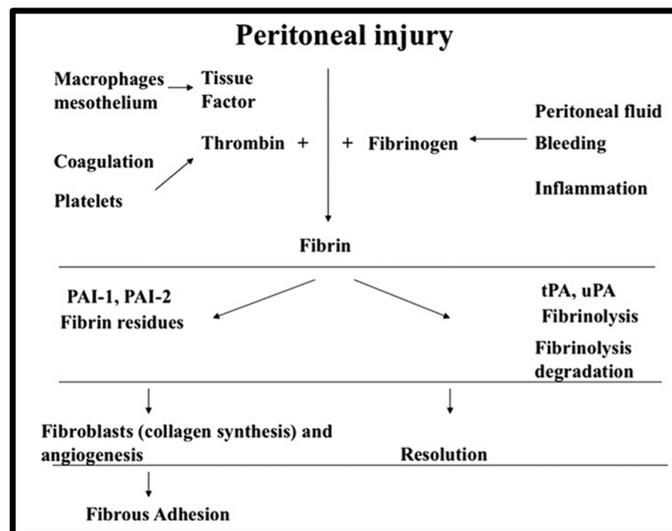


Figure 9: Schéma du phénomène de formation de fibrine⁴¹

I.b.iii. Infections

Les infections nosocomiales affectent 7 à 8% des patients opérés d'une hernie par chirurgie ouverte et 1 à 2% des patients opérés par laparoscopie⁴². Ces infections se traduisent par une réponse inflammatoire du corps sous la forme de signes locaux (chaleur, douleur ...) et/ou généraux (fièvre, chute de pression sanguine ...). Il existe deux origines possibles à l'infection. Une

origine endogène qui implique que la bactérie provient du patient (de sa peau notamment) et qui peut être évitée par une bonne asepsie. La deuxième origine est exogène, qui provient de l'extérieur du corps. Cette infection peut se faire par contact (peau ...), par gouttelettes (lors de toux ou de paroles) ou par aérosols (suspension des bactéries dans l'air)⁴³.

Concernant la hernie viscérale et son traitement, l'utilisation de filets a permis de réduire considérablement les récurrences⁴⁴ et les infections de la plaie faites lors de l'opération⁴⁵, mais démontre encore dans certains cas une réaction inflammatoire du corps après leur mise en place, liée à la présence d'un corps étranger. Plusieurs études montrent que cette réaction est due à une infection au niveau viscéral⁴⁶. En ce sens, Ioannis *et al.* ont montré qu'un filet de hernie viscérale en PP présente toujours une vulnérabilité à une inoculation bactérienne, dans leur cas *E. coli*, et ce même après un an de pose de l'implant. Cette vulnérabilité est beaucoup plus faible dans le cas où aucun implant n'est utilisé. Il est intéressant de noter que, quelle que soit la zone de mise en place de l'implant, intra- ou extra-péritonéale, la vulnérabilité est similaire⁴⁷.

Le taux d'infections dû à l'implantation du filet de hernie dépend de 2 facteurs principaux : le type d'implant et la localisation de la hernie. En effet, Leber *et al.* ont montré que, dans le cas d'une hernie incisionnelle, l'utilisation d'un filet de polyester multi-filamentaire (Mersilene®) mène à un taux d'infections de l'ordre de 16% des patients contre 6% pour un PP mono-filamentaire (Marlex®) et aucune infection pour un PP double-filamentaire (Prolene®) ou un ePTFE (Gore-Tex®)⁴⁸. Ils ont aussi démontré que le temps médian d'apparition des infections après une pose de filet est de 6 mois. Par ailleurs, Kingsnorth *et al.* ont observé que suivant le type de hernie soignée (abdominale, étranglée ou non etc...), le taux d'infections pouvait varier de 0 à 6%, ce qui démontre la nécessité de trouver des solutions visant à limiter ce type de risques post-opératoires¹¹.

I.c. Solutions thérapeutiques des adhérences post-opératoires

I.c.i. Etat de l'art des solutions anti-adhérentes

Concernant le traitement de la hernie inguinale, il est important de limiter les effets post-opératoires qui peuvent survenir afin d'améliorer la qualité de vie des patients d'une part, mais aussi afin de limiter les dépenses de santé que cela génère. A ce jour, deux grandes familles de

solutions thérapeutiques sont envisagées pour la prévention des adhérences post-opératoires : les agents pharmacologiques et les dispositifs barrières (barrières mécaniques, instillations péritonéales et hydrogels) (**Figure 10**).

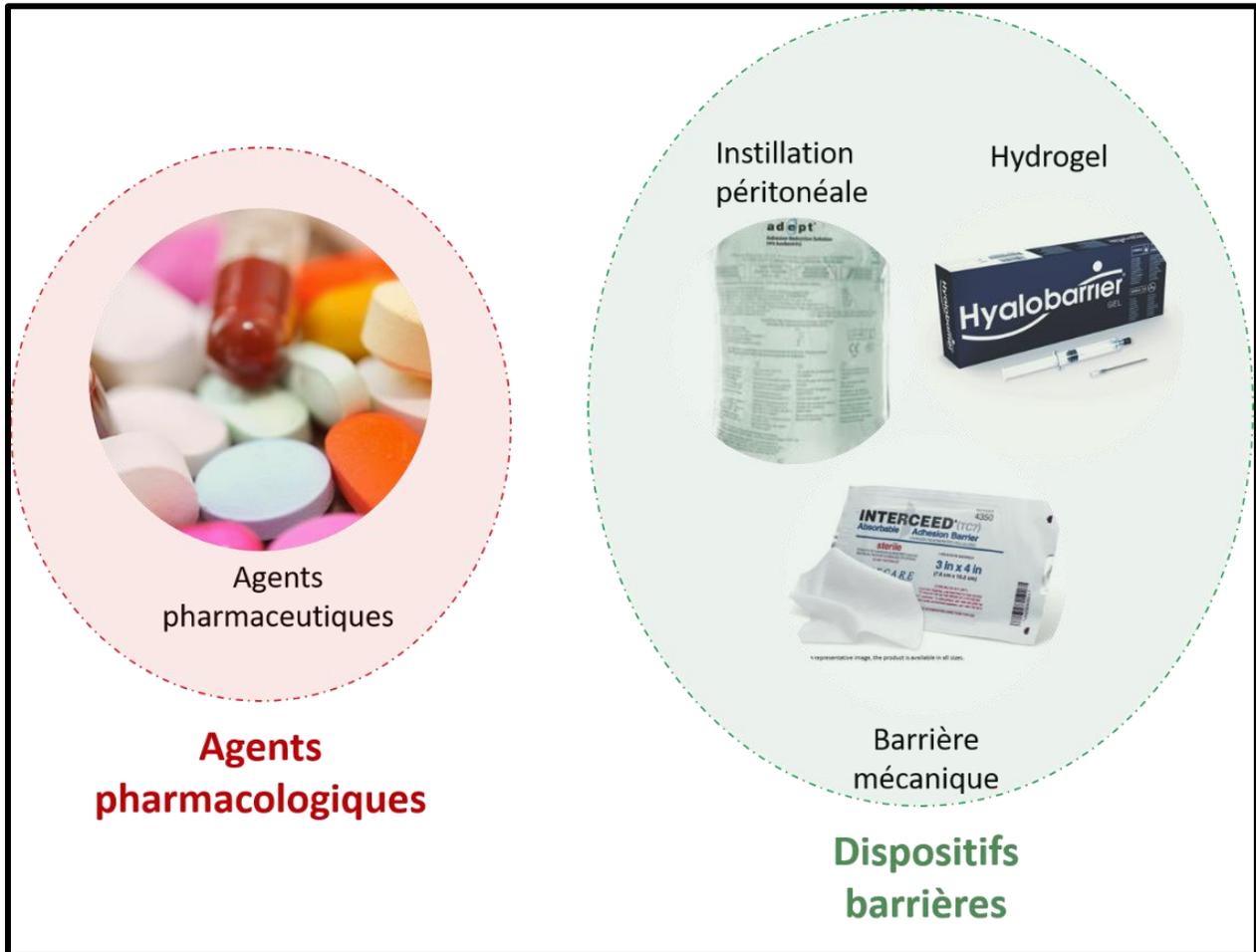


Figure 10: Les 2 grandes familles de solutions antiadhérentes

I.c.ii. Agents pharmacologiques

De nos jours, plusieurs familles d'agents pharmacologiques ont été étudiées pour la prévention des adhérences post-opératoires. On peut citer les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), les corticoïdes, les anticoagulants, les agents fibrinolytiques et les antihistaminiques². Chacune de ces familles de molécules vise à agir sur une des étapes du processus de formation des adhérences décrit précédemment. Cependant, les processus de formation des adhérences sont aussi responsables de la cicatrisation, et donc de la réparation de la zone traumatique (inflammation et dépôt de fibrine). De plus, un autre problème se pose, à

savoir la disponibilité du principe actif dans la zone du trauma. En effet, lors d'une opération, il y a formation d'aires ischémiques au niveau de la blessure, dans lesquelles le flux sanguin est limité. Ainsi, l'acheminement d'une quantité suffisante de principe actif au niveau local peut s'avérer difficile. Une analyse de la littérature réalisée par Davey *et al.* permet une vision globale de l'effet de ces différentes familles de molécules sur ces événements post-opératoires⁴⁹. En premier lieu, les AINS inhibent la production de certains facteurs pré-inflammatoires ce qui a démontré de bons résultats durant les tests *in vivo*, mais aucun effet notable sur les adhérences dans le cas des essais cliniques. Concernant les corticoïdes, ils ont montré une efficacité dans la prévention des adhérences mais réduisent aussi la réponse immunitaire, ce qui augmente les risques d'infections. Enfin, les anticoagulants, comme l'héparine, ou les agents fibrinolytiques, comme la streptokinase, ont démontré une bonne capacité anti-adhérentes chez les rats avec une limitation de la coagulation et donc du dépôt de fibrines. Cependant, des risques importants d'hémorragie, et donc de ralentissement de cicatrisation, ont été observés lors des essais chez l'homme. De nombreuses études sont encore à réaliser pour permettre l'utilisation d'agents pharmaceutiques pour la prévention des adhérences, comme c'est le cas aussi pour les antihistaminiques. De plus, il est nécessaire de prendre en compte, dans ces études, à la fois le rapport bénéfices/risques, mais aussi le rapport coûts/bénéfices. Parallèlement, une revue systématique, par Gaity *et al.*, parue en 2014, a montré que les agents pharmacologiques ne présentent aucun effet anti-adhérent dans le cas de chirurgie pelvienne chez la femme⁵⁰.

I.c.iii. Instillations péritonéales

L'instillation péritonéale permet de créer une barrière liquide entre les tissus lésés, pour éviter le dépôt de fibrine au cours du processus de cicatrisation, par instillation d'une grande quantité de liquide (environ 1 litre) dans la cavité péritonéale, après la pose de l'implant et avant la fermeture de la paroi abdominale. Cette technique est aussi appelée hydroflotation. L'avantage prédominant de cette technique est qu'elle permet de couvrir une zone large autour du site traumatique et donc d'empêcher les adhérences locales et proches. De nombreuses solutions ont été utilisées dans ce but, comme le sérum physiologique par exemple, mais sont absorbées en moins de 24 h par l'organisme². Or, le processus d'adhérence a lieu dans les 3 à 5 jours après l'opération, ce qui fait de ces solutions d'instillat de mauvais candidats pour la prévention des

adhérences post-opératoires. D'autres agents liquides ont été développés par la suite. Malgré le manque d'efficacité ou de tolérance de certains de ces agents, comme les phospholipides, les solutions de polysaccharides (Hyskon®) ou les dérivés d'acides hyaluroniques (Intergel®, Sepracoat®), d'autres ont montré de bons résultats⁵¹. En effet, Adept® (Baxter BioSurgery, USA), une solution d'icodextrines à 4%, a montré une réduction significative du taux d'adhérences pour les patients 4 à 8 semaines après une laparoscopie comparée à une solution d'instillation classique⁵². Aujourd'hui, elle reste la seule solution intra-péritonéale autorisée en France pour la prévention des adhérences.

I.c.iv. Hydrogels

Les hydrogels, ou gels barrières, sont déposés directement sur l'implant de réfection pariétal avant fermeture de la paroi abdominale afin de permettre de créer une barrière entre les tissus de la zone de trauma. Ils sont spécifiques au site d'implantation, c'est-à-dire qu'ils permettent d'éviter l'adhérence aux tissus proches. Dans ce sens, cela permet de parer au problème des agents thérapeutiques dont l'effet n'est pas localisé. Cependant, un inconvénient important de ces gels est que les adhérences n'ont pas lieu seulement au niveau des tissus lésés mais aussi sur les tissus voisins, problème qui n'est pas rencontré dans le cas des instillations péritonéales. Plusieurs gels ont été développés comme Spray Gel® (Confluent Surgical, USA), Coseal® (Baxter BioSurgery, USA) et Hyalobarrier® (Nordic Pharma, France) parmi d'autres². Spray Gel® est constitué de poly(oxyde d'éthylène) (PEO), et est administré par vaporisation sur la zone à traiter. Peu d'études ont été faites sur cet hydrogel, mais les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont prometteurs pour une application de réduction des adhérences post-opératoires, avec des réductions du taux d'adhérences jusqu'à 3,6 fois plus importantes que dans le cas de patients seulement opérés sans utilisation de solutions antiadhérentielles^{53,54}. Coseal®, quant à lui, possède une structure proche de Spray Gel® mais avec une structure isomérique du PEO différente. Ce gel est déjà prescrit pour la prévention des adhérences cardiaques⁵⁵. Enfin, dans le cas de Hyalobarrier®, qui est un film hydrogel constitué d'acide hyaluronique réticulé résorbable en quelques jours, la littérature montre une réduction de la sévérité des adhérences chez les patients mais pas de la fréquence de ces dernières pour des laparoscopies

gynécologiques⁵⁶. En dehors des problèmes de localisation de l'effet anti-adhérent des gels, il est important de noter que la maniabilité de ces derniers est aussi assez complexe pour la plupart.

I.c.v. Barrières mécaniques

Les barrières mécaniques utilisées pour la prévention des adhérences sont, pour la plupart, biorésorbables, spécifiques au site, et sont, comme les hydrogels, à implanter en même temps que le filet de traitement de hernie. Parmi ces barrières, il est intéressant de citer Seprafilm® (Genzyme, USA) qui est un film d'acide hyaluronique et de carboxyméthyle cellulose (CMC) et qui, en contact avec le fluide corporel se transforme en gel en 24h. Son élimination se fait en moins de 30 jours par l'organisme. Cependant, cette membrane est très difficile à manipuler par le chirurgien, car aucun contact avec des tissus hors de la zone de trauma ne doit être fait. En effet, dès que la membrane est en contact avec un tissu, elle se loge dessus, et il faut donc un seul contact avec la zone dans laquelle les adhérences peuvent avoir lieu⁵⁷. Une autre barrière mécanique a été développée à base de cellulose régénérée, Interceed® (Johnson & Johnson, USA). Elle se présente sous la forme d'un tissu qui se transforme, lui aussi, en gel après un contact avec le fluide corporel, et se résorbe en moins d'un mois. Cependant, l'hémostase doit être parfaitement maîtrisée pendant l'opération car la présence de sang dans le matériau entraîne une diminution de l'efficacité, qui se traduit par une diffusion des fibroblastes à travers la membrane et donc une augmentation du taux d'adhérence⁵⁸. De la même manière que pour les hydrogels, et malgré leurs avantages, ces barrières mécaniques présentent le défaut d'avoir un effet anti-adhérent local et d'être difficiles à manipuler.

Au-delà des avantages et des inconvénients cités précédemment des solutions thérapeutiques des adhérences post-opératoires existantes à ce jour, un inconvénient majeur est commun à toutes. En effet, quelle que soit la solution thérapeutique envisagée aujourd'hui, elle nécessite forcément une étape chirurgicale supplémentaire, ce qui a pour effet d'allonger le temps d'opération mais aussi de multiplier les risques liés à cette opération (infections, mauvaise pose de l'agent anti-adhérent etc...).

I.d. Solutions thérapeutiques des infections

En dehors des adhérences, les risques d'infections post-opératoires restent très importants. Même si une étude a montré que l'utilisation d'antibiotiques comme traitement prophylactique pouvait être préconisée pour des patients dits « à risque », la prise d'antibiotiques reste un sujet controversé de nos jours⁵⁹.

Les infections les plus fréquentes dans le cas des réfections pariétales sont dues à *Staphylococcus spp.* (notamment *S. aureus*), *Streptococcus spp.*, aux bactéries à Gram négatif (notamment *Enterobacteriaceae*) et aux bactéries anaérobies (*Peptostreptococcus spp.*)⁶⁰.

Ces infections peuvent mener à de lourdes conséquences, à savoir le rejet de l'implant, des dommages aux organes environnants (abcès, péritonites, fistules ...), ou à des récurrences de hernies. Malgré la plus faible fréquence de ces infections face aux adhérences post-opératoires, la prévention de ces infections reste un enjeu majeur dans le développement d'implants de réfection pariétale. Il existe deux grandes stratégies pour conférer des propriétés antibactériennes à des biomatériaux à ce jour : le dépôt d'agents antibactériens en surface ou la fonctionnalisation de surface par des polymères intrinsèquement antibactériens. Ces stratégies diffèrent notamment par leur mode d'action, qui se fait par libération et diffusion du principe actif antibactérien dans le premier cas et par contact dans le deuxième cas.

I.d.i. Libération d'agents thérapeutiques

De nombreuses études ont été réalisées sur l'incorporation de principe actifs antibactériens ou antibiotiques (**Figure 11**) sur des implants de réfection pariétale⁶¹.

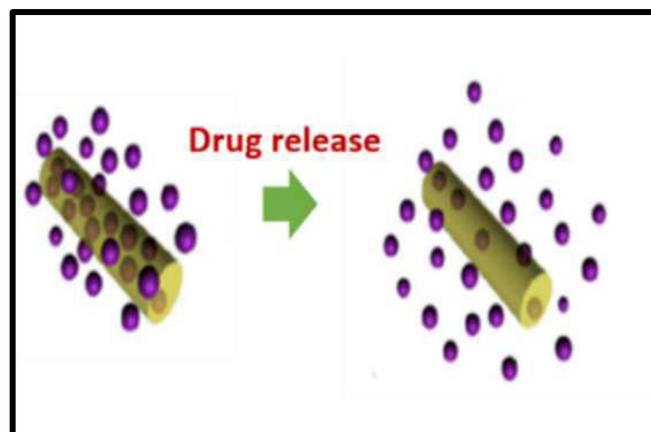


Figure 11: Schéma de la libération médicamenteuse

Parmi ces implants, il est possible de citer la membrane en PE greffée avec de la gélatine, puis imprégnée de trois antibiotiques différents, développée par Goeau-Brissonniere *et al.*⁶². Ils ont montré que, dans les trois cas, une éradication complète de *S. aureus* a été observée. La gentamicine a aussi fait ses preuves après imprégnation sur des membranes de PVDF, greffées par du poly(acide acrylique) (PAA), avec une réduction de 99,9% de l'activité bactérienne de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* après 24 h dans un modèle *in vitro* et *in vivo*⁶³. Martel *et al.* ont aussi démontré que l'imprégnation, puis la libération, de la ciprofloxacine (CFX), *via* la cyclodextrine greffée sur PP, permettait une inhibition bactérienne significative après 12 à 24 h sur *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli*⁶⁴. Dans le cas des implants de hernies, G. Vermet *et al.* ont montré que l'imprégnation de CFX dans des implants en poly(acide-L-lactique) (PLLA) revêtus de polymères de cyclodextrine engendrait une action antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* pendant 6 et 24 h respectivement⁶⁵.

Des études ont aussi porté sur l'effet synergique de ces antibiotiques face à différentes bactéries. C'est le cas notamment d'un implant en PP revêtu de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et PLA contenant de l'ofloxacine et de la rifampicine et qui a montré une large zone d'inhibition bactérienne dans des tests *in vitro* contre *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* et *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM), ainsi qu'une diminution très importante de la formation du biofilm⁶⁶.

Dans certaines études, des implants chargés avec des particules métalliques démontrent une activité antibactérienne intéressante. C'est le cas des particules d'or et d'or/palladium déposées par plasma sur un implant en PP et qui ont montré, en étude *in vitro* et *in vivo*, une diminution de l'activité bactérienne après 6 à 72 h d'incubation de *S. epidermidis*⁶⁷. Une autre étude a porté sur l'immersion de nanofibres (NF) de polyuréthane (PU) dans une solution de nanoparticules d'argent pour leur effet antibactérien. Les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* et *E. coli*⁶⁸. Enfin, l'argent est capable de se lier et de détruire les protéines des bactéries, ce qui va entraîner la perte de leurs fonctions biologiques⁶⁹.

Dans de plus rares cas, des agents antiseptiques sont chargés sur des implants en PP. Perez-Kohler *et al.* ont montré que la chlorhexidine, couplée à l'allicine chargées sur des implants

en PP révèle une forte activité antibactérienne contre *S. aureus* dans les tests *in vitro* et *in vivo* chez le lapin⁷⁰.

Il est aussi possible de couvrir les implants par des peptides antimicrobiens comme des enzymes⁷¹ ou des anticorps polyclonaux⁷². Cependant, les résultats obtenus à l'échelle *in vitro* ou *in vivo* ne montrent pas encore une efficacité suffisante, ou alors démontrent une spécificité trop importante pour une bactérie en particulier par rapport aux autres. De plus, l'industrialisation et la mise à grande échelle de ce type de membrane représenterait aujourd'hui un coût extrêmement élevé.

En termes de commercialisation, il est important de parler de Dual Mesh® (WL Gore & associates, Inc., USA) et notamment de Dual Mesh Plus® qui présente une forte activité antibactérienne et qui est déjà très utilisé dans le traitement de la hernie. Ce biomatériau est une membrane en ePTFE couverte de deux agents antimicrobiens : l'argent (sous forme carbonate d'argent) et la chlorhexidine. Leurs actions sont synergiques et mécaniques, ce qui implique qu'ils n'attaquent pas un site spécifique des bactéries, et donc qu'ils peuvent agir sur un large spectre de bactéries (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, SARM, *A. streptococcus*, *A. baumannie*, *E. coli...*)⁶⁹. La chlorhexidine s'infiltré dans la membrane bactérienne, ce qui entraîne l'écoulement du contenu de la cellule bactérienne. Une étude de Harell *et al.* compare l'efficacité de plusieurs implants de réfection pariétale commerciaux et montre que Dual Mesh Plus® permet de réduire considérablement l'adhérence bactérienne, et même empêche l'adhérence des SARM. En effet, l'adhérence bactérienne sur Dual Mesh Plus® est proche de 0% pour SARM contre environ 45% pour Dual Mesh® (ePTFE standard) et environ 95% pour Vypro™ (implant en PP)⁷³.

I.d.ii. Greffage de polymères antibactériens

En dehors des applications en réfection pariétale, plusieurs études ont montré que certains polymères possèdent une activité antibactérienne intrinsèque en raison de certains groupements qu'ils possèdent (**Figure 12**).

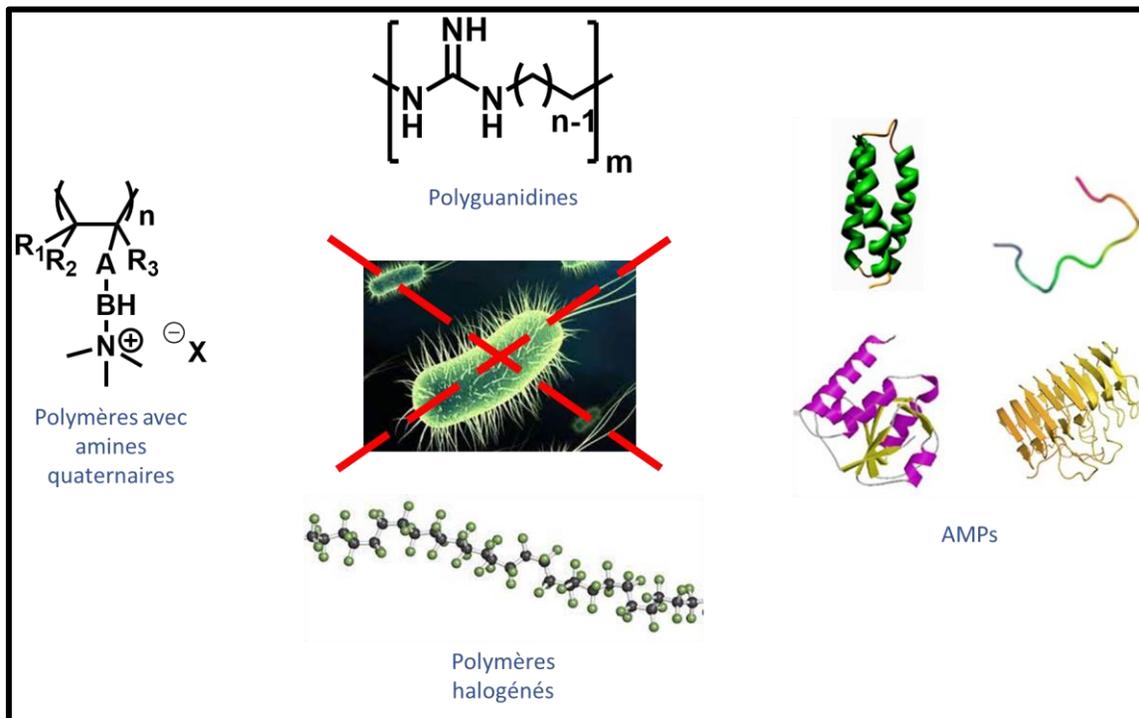


Figure 12: Différentes familles de polymères possédants des propriétés antibactériennes

Dans ce sens, Fernández-García *et al.* ont répertorié tous les types de polymères présentant une activité antimicrobienne en mettant en avant les groupements responsables de cet effet⁷⁴. Parmi eux, il est possible de citer les polymères possédant une amine quaternaire, ceux possédant des groupements halogénés, les polymères mimant la structure des peptides naturels, et ceux contenant des unités guanidine.

Les **polymères possédant des amines quaternaires** représentent le plus grand groupe de polymères à activité antibactérienne étudié à ce jour. Pour en comprendre le mécanisme, il est important de prendre en compte la structure de la paroi bactérienne. En effet, cette paroi est constituée, en majorité, de phosphatidyléthanolamines, ce qui confère des charges négatives majoritaires à cette paroi. Or, les amines quaternaires sont chargées positivement, ce qui facilite l'interaction entre ces deux éléments. L'effet bactéricide des amines quaternaires est décrit suivant trois étapes majeures (comprenant quelques sous-étapes). La première étape est l'adsorption de ces amines sur la paroi bactérienne, suivie de la liaison à la membrane cytoplasmique puis du relargage du contenu cytoplasmique menant à la mort cellulaire de la bactérie⁷⁵. Il est intéressant de noter que, en raison de leur encombrement, les polymères possédant des amines quaternaires montrent une action plus prononcée sur les bactéries à Gram

positif, comparé aux Gram négatif. En effet, la membrane des bactéries Gram positif possède une surface relativement ouverte en raison de leurs plus faibles agglomérations de peptidoglycanes, ce qui les différencie des Gram négatif. Ainsi, la membrane cytoplasmique est moins bien protégée chez les Gram positif. Parmi les polymères porteurs d'amines quaternaires, il est possible de citer les polymères à structures aromatiques, comme le poly(diméthylaminométhyle styrène) (PDMAMS)⁷⁶ ou la poly(4-vinylpyridine) (P4VP)⁷⁷, qui présentent des effets antibactériens notables contre les bactéries Gram positif et négatif, mais qui ont l'inconvénient d'être difficiles à synthétiser. Un autre groupe de polymères porteurs d'amines quaternaires est le groupe des polymères méthacryliques, comme les polymères dérivés du méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle (DMAEMA)^{78,79}, qui présentent aussi des activités antimicrobiennes prononcées contre les Gram positif et négatif, mais qui ont le défaut d'être des membranes qui s'encrassent facilement (« Fouling »), à cause de l'ammonium quaternaire permanent, ce qui peut entraîner des réactions inflammatoires. Pour pallier ce problème, des dérivés méthacryliques ont aussi été développés avec des ammonium quaternarisables. C'est le cas des polymères dérivés du méthacrylate de 2-(*tert*-butylaminoéthyle) (TBAEMA). En effet, ces polymères contiennent des chaînes pendantes comportant l'amine quaternarisable ce qui la rend à la fois plus disponible pour interagir avec la paroi bactérienne, et ainsi augmenter l'activité antimicrobienne, mais sans être une amine quaternaire permanente⁸⁰. Une autre famille de polymères à amines quaternaires moins décrite fait partie de la famille des polyélectrolytes, comme les polyélectrolytes cationiques conjugués à base de poly(phénylèneéthylène) (PPE) de Whitten *et al.* Ceux-ci sont capables d'inhiber la croissance de bactéries Gram positif ou négatif mais sont également difficiles à préparer⁸¹. Plus rarement, d'autres groupes de polymères ont aussi été décrits comme les polysiloxanes⁸² ou les polymères hyperbranchés⁸³ comprenant des amines quaternaires, qui présentent l'avantage d'être, respectivement, amphiphiles et hautement hydrophobes, ce qui leur confère de nombreux avantages pour interagir avec les bactéries.

Les **polymères possédant des groupements halogénés**, comme les polymères fluorés qui apportent une propriété antisalissure et une grande bioactivité aux polymères⁸⁴, ou encore les polymères chlorés⁸⁵, ont montré de très bonnes activités antibactériennes liées au taux d'halogènes dans la chaîne de polymères.

Il est aussi possible de synthétiser des **polymères mimant la structure des peptides antimicrobiens naturels (AntiMicrobial Peptides « AMPs »)**. Même si ces AMPs peuvent être utilisés comme médicaments, et présentent de très bonnes activités antibactériennes, ils restent très coûteux et leur pharmacocinétique est encore peu connue à ce jour⁸⁶. Ainsi, certaines recherches se sont tournées vers la synthèse de ces polymères mimant la structure des AMPs. Ce sont des poly(acides-aminés) synthétiques à base de leucine, lysine ou histidine par exemple^{87,88}. Ils présentent des activités antimicrobiennes contre un large spectre de bactéries Gram positif et négatif qui diffère suivant les acides-aminés utilisés.

Enfin, en termes de polymères antibactériens, il est possible de citer les **polymères à base de guanidine**, comme les polyguanidines, qui possèdent l'avantage d'être très actifs contre un large spectre de bactéries Gram positif et négatif, non-toxiques et solubles dans l'eau⁸⁹. Il a été montré qu'une masse molaire minimale de ces polyguanidines est nécessaire (800 Da) pour assurer une activité antimicrobienne. Cependant, même si leur solubilité dans l'eau est un avantage, elle présente aussi un inconvénient majeur dans les matériaux notamment en termes de lavage et de mise en contact avec le corps humain.

A ce jour, il existe de nombreux autres polymères décrits comme possédant une activité antibactérienne comme les polymères contenant des groupements phosphores, sulfures, phénols ou acide benzoïque ainsi que les polymères organométalliques, et de nombreuses études sont encore en cours pour développer ces polymères dans différents domaines⁷⁴.

II. Dispositifs médicaux fonctionnels à base de nanofibres

Actuellement, le traitement des adhérences post-opératoires lors des opérations intraabdominales par des implants pariétaux présente des inconvénients majeurs qui ont été cités précédemment, notamment d'un point de vue chirurgical. En effet, que ce soit lors de la pose de l'implant nécessitant une étape supplémentaire ou alors les besoins de ré-interventions afin de limiter les douleurs des patients, ces techniques ne sont aujourd'hui pas optimales. De nombreuses études sont donc tournées vers la découverte de solutions thérapeutiques permettant de parer à ces inconvénients. Parmi ces solutions, les nanofibres de polymères connaissent un essor important dans le domaine biomédical ces dernières années en raison de

leur structure proche de celle de la matrice extracellulaire⁹⁰. De nos jours, la technique la plus utilisée pour former des nanofibres de polymères est l'électrofilage (ou « electrospinning »). De plus, une étude de Plencner *et al.* a montré qu'il était possible de déposer des nanofibres par electrospinning directement sur un implant de réfection pariétale en polypropylène⁹¹. Ainsi cette technique semble adaptée à l'amélioration des propriétés des implants de hernie.

II.a. Electrospinning

II.a.i. Généralités

L'origine de l'electrospinning vient de l'electrospraying. En effet, dans ce procédé, des particules fines sont créées par application d'un haut voltage sur une solution contenant de petites molécules. La formation de nanoparticules est due à l'instabilité du jet. Dans le cas de l'electrospinning, un polymère remplace les petites molécules ce qui induit la formation de nanofibres, due au haut poids moléculaire des polymères et à leur enchevêtrement⁹². Cette méthode de mise en forme consiste à appliquer une force électrostatique sur une goutte de solution de polymères. Cette force va entraîner la déformation de la goutte en filament. En première approximation, il est possible de diviser l'appareil d'electrospinning en trois parties distinctes : une seringue, un générateur haute tension et un collecteur (**Figure 13**).

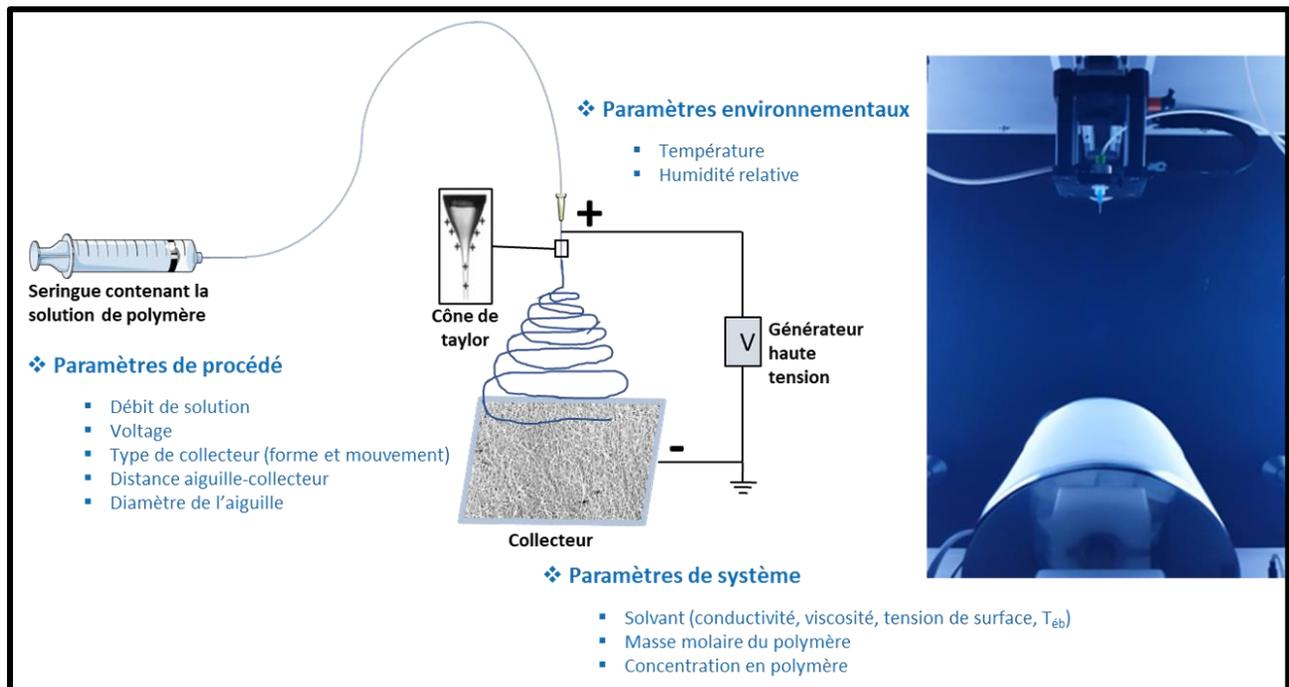


Figure 13: Représentation schématique du procédé d'electrospinning

Dans ce modèle, la solution de polymères est injectée à débit constant, *via* une seringue, à travers une aiguille. Ensuite, une haute tension est appliquée à l'aiguille ce qui permet de charger la solution de polymères. Cette force s'oppose à la tension de surface de la solution de polymères, ce qui induit une déformation de la goutte en cône de Taylor (**Figure 13**). Ce dernier est observable lorsque la force, induite par la différence de potentiel, est suffisamment importante pour rompre la tension de surface de la goutte. Ce phénomène peut aussi être décrit comme une élongation de la goutte sous forme de filament. Ce dernier s'affine progressivement du fait de l'élongation mais aussi avec l'évaporation du solvant dans l'air. Cependant, le jet n'est pas linéaire. En effet, dans certaines études, ce jet est décrit comme un court segment suivi d'une spirale en forme de cône, composé lui-même de plusieurs spirales plus petites à cause de l'instabilité du jet (**Figure 14**)⁹³. Les nanofibres sont ensuite récupérées sur un collecteur métallique connecté au générateur haute fréquence.

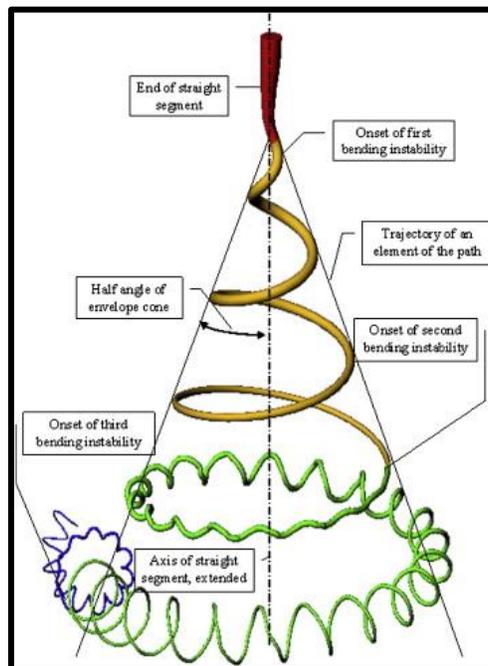


Figure 14: Schéma de l'instabilité du jet lors du procédé d'electrospinning⁹³

Plusieurs types d'electrospinning ont été développés par la suite, notamment avec l'utilisation de **plusieurs aiguilles** de façon à élaborer des membranes de très grandes tailles pour des applications industrielles. Parallèlement, l'**electrospinning coaxial** (**Figure 15**) a été développé de manière à élaborer des nanofibres avec une structure cœur-peau, dont la partie interne de la nanofibre est constituée d'un polymère, et la structure externe d'un autre. Ce type

de structure cœur-peau peut même être multipliée en plusieurs étapes pour avoir des structures multicouches fonctionnelles.

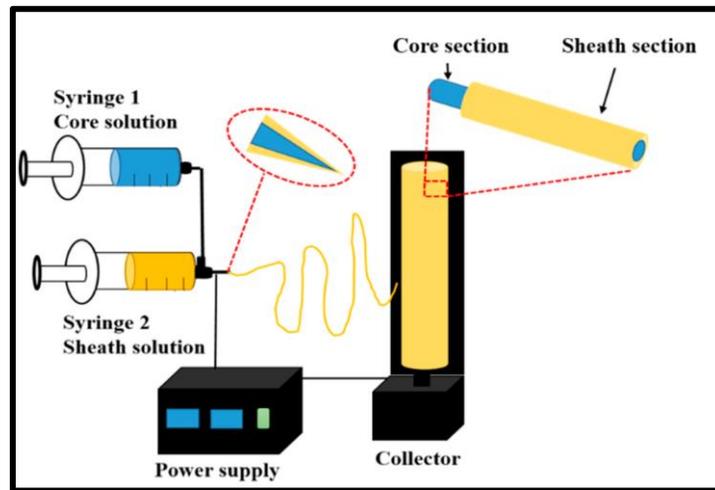


Figure 15: Schéma du dispositif d'électrospinning coaxial⁹⁴

Cette technique est utilisée aujourd'hui notamment pour des applications de libération médicamenteuse⁹⁴. En effet, l'électrospinning coaxial possède de nombreux avantages dans ce domaine, notamment basés sur le fait que les nanofibres cœur-peau permettent de prolonger la libération de principes actifs en les incorporant dans les différentes couches de la fibre, ce qui permet de contrôler leur libération, par dégradation des différentes couches, mais aussi de les protéger des milieux biologiques. Un autre intérêt de cette technique est qu'elle permet de procéder à l'électrospinning de solutions normalement non-électrofilables, la solution de cœur ou de peau servant de polymère de liaison (« blend-polymer »). Enfin, l'**électrospinning sans solvant** a été développé de façon à obtenir des nanofibres de polymères qui ne pourraient pas être mis en solution, mais aussi en vue de limiter l'utilisation de solvants nocifs ou dangereux pour l'environnement. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'une extrudeuse qui prend la place de la seringue dans le système classique d'électrospinning. Différentes méthodes ont été étudiées pour obtenir ces nanofibres à partir de stimuli thermiques, UV ou anionique et ont été largement décrites dans la littérature⁹⁵.

La structure des nanofibres obtenues est influencée par de nombreux paramètres qui peuvent être divisés en trois catégories : paramètres de système, paramètres de procédé et paramètres environnementaux. Tous ces paramètres ont largement été décrits dans la littérature ces dernières années⁹⁶⁻⁹⁸.

II.a.ii. Paramètres

II.a.ii.1. Paramètres de système

Un des paramètres de système les plus importants concerne le solvant utilisé pour la solubilisation du polymère. Plus précisément, il s'agit de la **conductivité**, de la **tension de surface** et de la **viscosité** de la solution obtenue après solubilisation du polymère dans ce solvant. Avant de décrire l'influence de tous ces paramètres, il est important de noter que l'électrospinning est basé sur l'enchevêtrement du polymère en solution. En effet, lors de l'application du potentiel électrique entre l'aiguille et le collecteur, des charges électrostatiques vont se former autour de la goutte et entraîner les chaînes de polymères les unes après les autres. Il est donc important que ces chaînes soient en contact pour pouvoir s'entraîner mutuellement. Ainsi, le solvant utilisé doit favoriser les interactions inter-chaînes plutôt que les interactions intra-chaînes (pelote statistique) pour que cela soit possible.

L'influence des caractéristiques des solvants sur la structure des nanofibres électrofilées a souvent été décrite dans la littérature. Par exemple, Huan *et al.* ont décrit l'électrospinning du polystyrène (PS) dans différents mélanges de tétrahydrofurane (THF)/N-diméthylformamide (DMF)⁹⁹. Dans cette étude, il a été reporté que l'utilisation d'un solvant avec une faible viscosité, un haut point d'ébullition et une grande tension de surface (DMF) augmente la formation de défauts (perles ou « beads ») (**Figure 16a**). Ce phénomène est dû à une résistance insuffisante de la solution face aux forces électriques induites. Au contraire, un solvant avec des caractéristiques opposées (THF) mène à des nanofibres sans beads. De plus, il est décrit que la tension de surface du solvant utilisé joue un rôle important dans l'électrospinning. En effet, pour le DMF, qui possède une grande tension de surface, il y a formation de beads au cours du procédé, alors que pour le THF, qui possède une faible tension de surface, des structures de types rubans sont plutôt observées (**Figure 16e**), avec une large gamme de diamètres (3,86 à 19,46 μm). Un mélange de ces deux solvants en proportions adéquates (THF/DMF 25/75) mène à des nanofibres de diamètres proches de 0,64 μm .

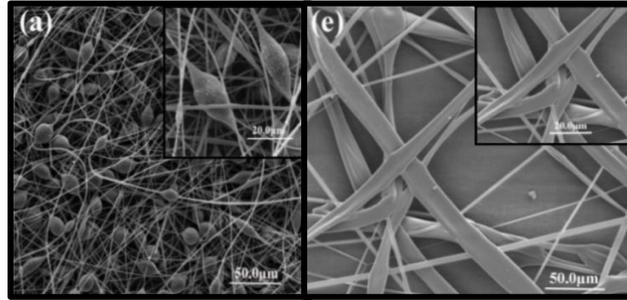


Figure 16: Images MEB de nanofibres de polystyrène obtenues par electrospinning sur une feuille d'aluminium, attachée sur un mandrin rotatif (80 rpm), d'une solution de 23% (w/v) avec un voltage de 15 kV avec différentes combinaisons de solvants (a) DMF/THF = 100/0 ; (e) DMF/THF = 0/100⁹⁹.

Dans une autre étude, Huang *et al.* ont démontré les effets de la **conductivité** de la solution utilisée sur la structure des nanofibres¹⁰⁰. Une augmentation de cette conductivité permet la formation de fibres fines et limite la formation de beads pendant le procédé. De plus, ils ont montré que l'ajout de sels ioniques ou d'acides organiques en combinaison avec des bases organiques augmente la conductivité et permet de moduler la taille et la forme des fibres.

Ajouté à ces paramètres de solution, de nombreuses études discutent de l'effet du **point d'ébullition** du solvant. Parmi elle, il est possible de mentionner Wannatong *et al.* qui ont notamment travaillé sur l'electrospinning du PS en utilisant quatre solvants différents : le m-crésol, le DMF, le THF et le toluène et sur leur effet sur la morphologie des nanofibres obtenues¹⁰¹. Le principal résultat est que l'augmentation de la température d'ébullition du solvant mène à l'obtention d'une membrane humide. En effet, pour le m-crésol ou le DMF (point d'ébullition de 203°C et 152°C respectivement) la membrane obtenue est humide, alors que pour le THF ou le toluène (point d'ébullition de 65°C et 111°C respectivement) la membrane obtenue est sèche. Ce phénomène peut être expliqué par une évaporation complète du solvant pendant la trajectoire du jet dans le cas des solvants à bas point d'ébullition, alors que pour les solvants à haut point d'ébullition, les fibres déposées contiennent encore du solvant résiduel. Dans une seconde partie, les auteurs ont aussi rapporté que le point d'ébullition des solvants a un effet sur le diamètre des fibres obtenues. Ce dernier augmente avec la diminution du point d'ébullition du solvant. Par exemple, pour les solutions de PS dans le DMF, les fibres obtenues ont un diamètre moyen de 0,43 µm alors que pour les solutions à base de THF, cette moyenne est comprise entre 1,6 et 4,5 µm. Ce phénomène se produit au cours de l'élongation de la goutte, et donc au moment de

l'évaporation du solvant, durant lesquels les forces viscoélastiques du jet sont modifiées. Lorsque ces forces excèdent la force de Coulomb de l'élongation, un étirement supplémentaire n'est pas possible et donc le diamètre des fibres est fixé à cet instant.

Le troisième paramètre de système important est la **viscosité**, qui influence la structure des fibres électrofilées. Il a été observé que, lorsque la viscosité augmente, le diamètre des nanofibres augmente aussi, et la formation de beads est réduite (**Figure 17**)¹⁰². En effet, la viscosité est directement liée à la masse molaire et à la concentration du polymère utilisé. Ainsi, une augmentation de la masse molaire du polymère permet de réduire la formation de beads mais aussi d'augmenter le diamètre des nanofibres (**Figure 17A-C**), et le même résultat a été obtenu en augmentant la concentration en polymères (**Figure 17D-E**)¹⁰²⁻¹⁰⁵.

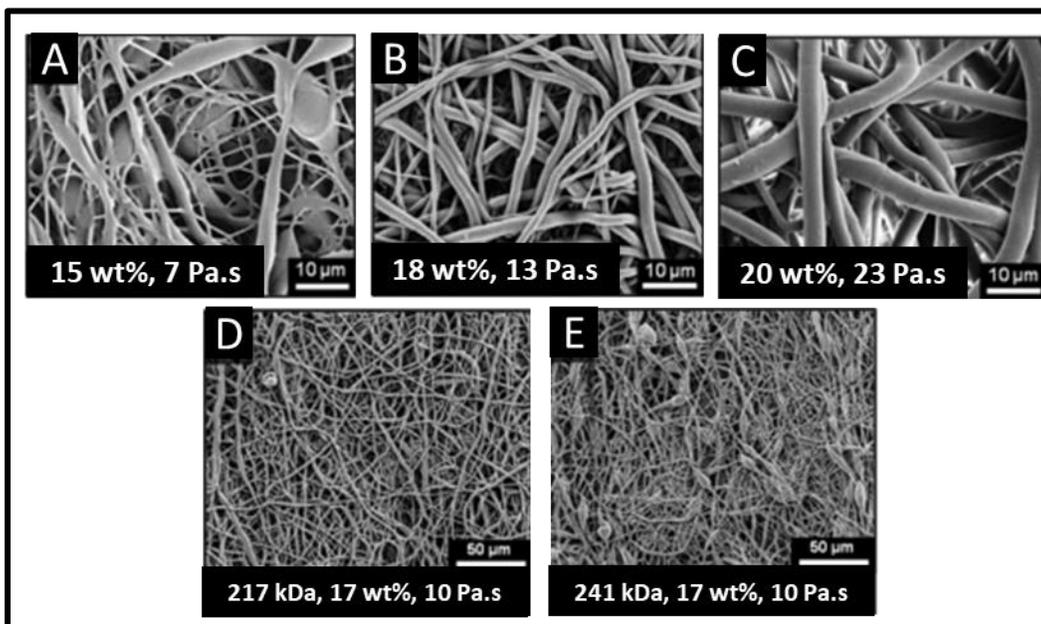


Figure 17: Images MEB de nanofibres de poly(carbonate uréthane) (PCU) électrofilées avec différents paramètres de système (masse molaire, concentration et viscosité): (A) 217 kDa, 15 wt%, 7 Pa.s, (B) 217 kDa, 18 wt%, 13 Pa.s, (C) 217 kDa, 20 wt%, 23 Pa.s, (D) 241 kDa, 17 wt%, 10 Pa.s, (E) 217 kDa, 17 wt%, 8 Pa.s¹⁰²

II.a.ii.2. Paramètres de procédé

Un des plus importants paramètres de procédé d'électrospinning est le **voltage** qui régit la formation du jet. En effet, plusieurs études démontrent que le voltage appliqué sur la solution d'électrospinning a une influence sur le diamètre des nanofibres mais aussi sur la morphologie des nanofibres^{106,107}. Dans ce sens, Matabola *et al.* ont décrit l'électrospinning du poly(fluorure

de vinylidène) à une concentration de 22%wt dans le N,N-diméthylacétamide (DMAc) à différents voltages¹⁰⁷. Cette étude a montré que, pour un faible voltage (12 kV), des fibres de faibles diamètres avec des beads sont obtenues à cause d'une différence de potentiels trop basse pour produire un jet stable. Une augmentation du voltage mène à un jet stable, et donc, à une réduction de la formation de beads et une augmentation du diamètre des fibres. Cependant, il a aussi été observé que, si le voltage appliqué est trop élevé (environ 18 kV), le cône de Taylor est amorcé à l'intérieur de l'aiguille et de multiples jets sont créés, et donc, le diamètre des fibres diminue drastiquement et la dispersité des diamètres augmente de façon importante. Malgré ces observations, l'influence du voltage appliqué sur la morphologie des fibres est largement discutée. En effet, dans leur étude, Deitzel *et al.* ont étudié l'influence du voltage sur la structure de nanofibres de PEO¹⁰⁸. Ils ont observé que, pour de faibles voltages (5,5 kV), des nanofibres sans défaut sont obtenues alors que des beads sont observées pour de plus hauts voltages (7 à 9 kV). De plus, pour de faibles voltages, la goutte, formée au bout de l'aiguille, reste suspendue pendant l'électrospinning. Cependant, lorsque le voltage augmente, le volume de cette goutte diminue et devient nul pour de hauts voltages (environ 9 kV).

Le deuxième paramètre de procédé qu'il est important de décrire est le **débit** auquel la solution est électrofilée. Ce paramètre ainsi que son influence sur l'électrospinning, en particulier sur le cône de Taylor, ont largement été décrits dans la littérature. Cela a notamment été démontré par Zargham *et al.* sur des nanofibres de nylon-6¹⁰⁹. Ils ont prouvé que, lorsque le débit est trop important, le voltage n'est pas capable d'apporter une quantité suffisante d'ions chargés dans la goutte, et ainsi, des gouttes non allongées sont créées. A de faibles débits (0,5ml/h), le cône de Taylor maintient sa stabilité, ce qui induit une bonne évaporation du solvant et la production de fibres uniformes. En raison des forces gravitationnelles élevées à de hauts voltages, le champ électrique n'est pas capable d'étirer toute la solution de polymères au niveau de la goutte, et ainsi, cause une évaporation incomplète du solvant. Ces caractéristiques mènent à un plus faible diamètre des nanofibres, à une distribution plus étroite de ces diamètres et à des structures sans défaut lors de l'utilisation de faibles voltages et inversement. He *et al.* ont aussi démontré que, dans le cas de l'électrospinning du polybutylène succinate (PBS) dans différents solvants, le débit n'affecte pas le nombre et la taille des beads, et ce phénomène apparaît être le

même pour tout type de polymères¹¹⁰. L'interprétation proposée par les auteurs est que les effets du débit sur la morphologie des nanofibres peuvent être neutralisés par de hauts voltages. Concernant l'électrospinning coaxial, le débit est un des paramètres cruciaux. En effet, cette technique nécessite plusieurs pousse-seringues de façon à filer les solutions utilisées à des débits différents. Généralement, il a été observé que le débit de la solution la plus au cœur devait être plus faible que le débit de la solution de la couche pour que la solution de cœur soit entraînée par la peau⁹⁴. Cependant, il est aussi important de noter que le débit de la solution interne ne doit pas être trop faible de manière à éviter la formation de fibres non homogènes. En effet, si le débit de la solution de cœur est trop faible, l'élongation de cette dernière sera trop faible et donc non homogène sur la fibre, au risque de créer des fibres avec des zones en cœur-peau et des zones ne présentant que le polymère de peau.

D'un autre côté, un des effets des paramètres de processus dont l'influence varie le plus suivant les études est le **diamètre de l'aiguille** et son effet sur le diamètre des nanofibres. Dans ce sens, Macossay *et al.* ont démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le diamètre de l'aiguille et le diamètre moyen des nanofibres obtenues pour du poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) mais qu'il y a un lien avec la dispersité du diamètre de ces fibres¹¹¹. Ils ont démontré qu'une augmentation du diamètre de l'aiguille cause une diminution de la dispersité de la taille des fibres. Au contraire, Tan *et al.* ont prouvé qu'une aiguille de diamètre interne de 0,21 mm mène à l'obtention de fibres ultrafines avec un diamètre moyen de l'ordre de 19 ± 6 nm¹¹². D'un point de vue matériel, il a aussi été démontré que la **structure du collecteur** joue un rôle crucial dans le procédé d'électrospinning. En effet, la littérature traite beaucoup de l'influence de la forme du collecteur sur la structure finale des membranes obtenues (structure alignée ou non). Plusieurs types de collecteurs peuvent être utilisés comme des plaques conductrices avec des formes différentes¹¹³, des mandrins rotatifs¹¹⁴, des électrodes parallèles¹¹⁴, des collecteurs annulaires¹¹⁵, un bain de liquide¹¹⁶, des électrodes rotatives¹¹⁷, des disques rotatifs¹¹⁸, des grilles¹¹⁹ et bien d'autres (**Figure 18**). L'utilisation de différents collecteurs permet la formation de membranes de nanofibres typiques avec des fibres alignées^{113,114,117,118}, ou des enchevêtrements avec une structure contrôlée (structure poreuse, pyramidale etc.)¹¹⁹.

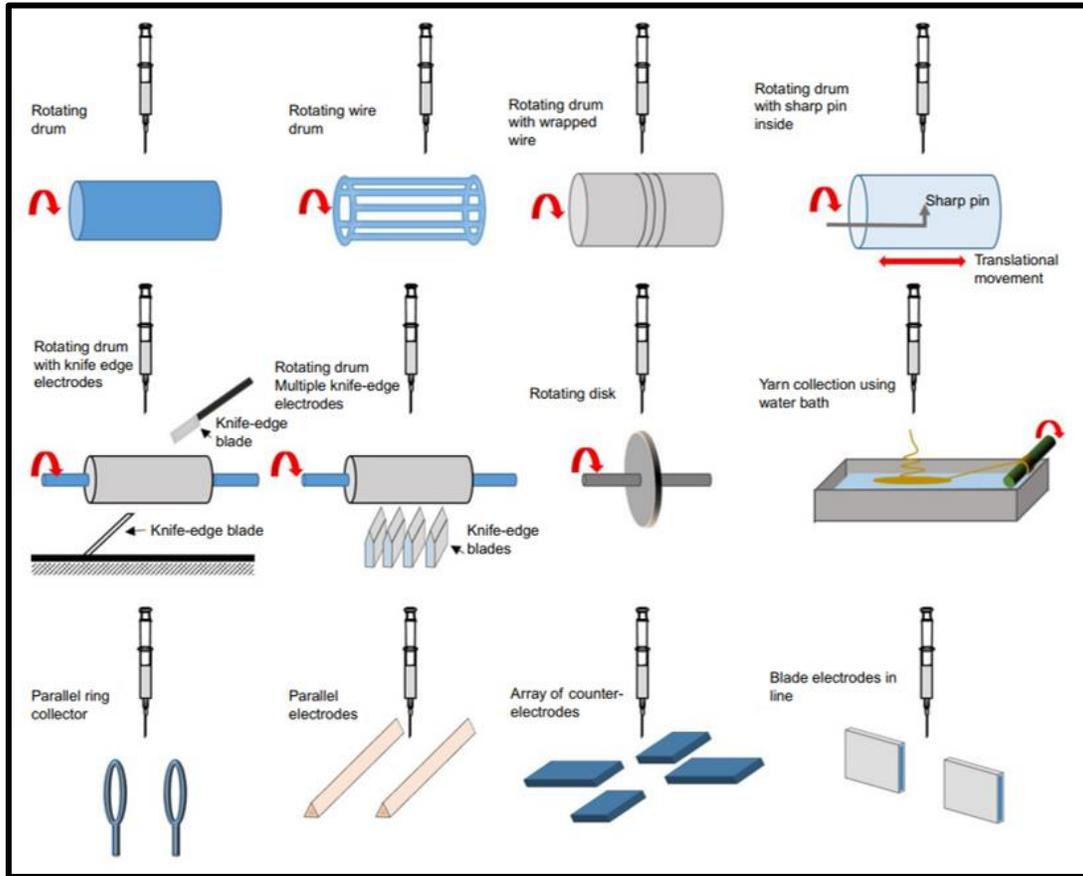


Figure 18: Différentes formes de collecteurs pour electrospinning décrits dans la littérature¹²⁰

Dans la plupart des cas, la **distance aiguille-collecteur** est constante, cependant, il a été prouvé dans certaines études que ce paramètre affecte les membranes électrofilées. Dans ce sens, Yuan *et al.* ont décrit l'influence des différents paramètres d'electrospinning sur la morphologie des nanofibres de polysulfones¹²¹. Ils ont observé que, pour une distance de 15 cm entre l'aiguille et le collecteur, le diamètre moyen des nanofibres obtenues est de 368 ± 59 nm, et de 438 ± 73 pour une distance de 10 cm. La raison de ces observations est que, plus la distance entre l'aiguille et le collecteur est grande, plus le temps d'élongation de la goutte est important, qui permet donc un meilleur étirement des fibres.

II.a.ii.3. Paramètres environnementaux

Les paramètres environnementaux, en particulier la **température** et l'**humidité relative**, sont les paramètres les plus difficiles à contrôler dans le procédé d'electrospinning et ont une influence notable sur la structure des nanofibres. Pour décrire cela, Peters *et al.* ont évalué l'effet

de la température ainsi que de l'humidité ambiante sur la structure de nanofibres de PCL dans le chloroforme (CHCl_3)/THF avec différents ratios¹²². Ils ont montré que les nanofibres de PCL dans le chloroforme pur présentent une surface poreuse lorsque l'humidité augmente. Au contraire, une augmentation de la température conduit à la formation de nanofibres lisses même pour de hautes humidités. Un autre point concerne l'électrospinning des solutions à faibles ratios CHCl_3 /THF à 20°C, pour lesquels des rides sont observées à la surface des nanofibres pour une humidité de 50%, et des cratères apparaissent pour des humidités de l'ordre de 90%. Pour expliquer ce phénomène, deux hypothèses sont avancées, basées sur la séparation de phases entre une phase riche en polymères et une plus riche en solvant. La première est que, lors de l'utilisation de solvant non-aqueux, tel que le chloroforme, une séparation de phase induite thermiquement (TIPS) est observée à cause de l'évaporation rapide du solvant. La seconde explication fait référence à l'utilisation de solvant partiellement miscible à l'eau, comme le THF. Dans ce cas, une séparation de phase induite par la vaporisation (VIPS) est observée, en raison de l'introduction de vapeur d'eau comme troisième composant de la solution pendant l'électrospinning. D'un autre côté, De Vrieze *et al.* ont étudié l'influence de la température et de l'humidité sur le diamètre moyen de nanofibres de différentes compositions chimiques¹²³. Dans cette étude, deux polymères ont été comparés : un polymère non hydrosoluble, l'acétate de cellulose (CA), et un polymère hydrosoluble, la poly(vinylpyrrolidone) (PVP). Les effets de la température sur la structure de ces deux polymères sont comparables étant donné que dans les deux cas, une augmentation de la température mène d'abord à une augmentation du diamètre moyen des nanofibres puis à une diminution de ce dernier. Une explication pour ce phénomène est que, pour les faibles températures (de 283 K à 293 K), l'évaporation rapide du solvant empêche l'étirement du polymère. Au contraire, pour de hautes températures (de 293 K à 303 K), la viscosité diminue et ainsi, les chaînes de polymères peuvent bouger plus librement, et donc produire plus d'étirements. Parallèlement, il a été prouvé dans la même étude que l'effet de l'humidité relative dépend de la solubilité du polymère utilisé dans l'eau. Pour la PVP, une augmentation de l'humidité mène à une diminution du diamètre moyen des nanofibres, alors qu'elle mène à une augmentation de ce diamètre moyen pour l'acétate de cellulose. Une interprétation possible de ce phénomène apportée par les auteurs est que la PVP a une forte

affinité avec la vapeur d'eau, et donc, la solidification est plus lente dans ce cas. Alors que pour l'acétate de cellulose, la présence d'eau cause une précipitation du polymère dans le jet, et interfère avec l'élongation.

Un bilan de l'effet de chaque paramètre sur la morphologie des nanofibres est décrit dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Influence des paramètres de l'électrospinning classique sur la morphologie des nanofibres.

	Paramètres	Effet sur les nanofibres	Références
Paramètres de solution	↗Viscosité	↘défauts, ↗diamètres des nanofibres	99,102–105
	↗Point d'ébullition	↗défauts, ↘diamètres des nanofibres Membrane humide (solvant)	99,101 101
	↗Tension de surface	↗défauts, ↘diamètres des nanofibres	99
	↗Conductivité	↘défauts, ↘diamètres des nanofibres	100
Paramètres de procédé	↗Voltage	↘défauts, ↗diamètres des nanofibres Si trop élevé : ↘diamètres des nanofibres, ↗dispersité des diamètres	106,107 108
	↗Débit	↗dispersité des diamètres	109
		Pas d'effets sur la formation de défauts	110
	↗Diamètre aiguille	↘dispersité des diamètres, mais pas d'effets sur le diamètre des nanofibres	111
		Formation de fibres ultrafines possible	112
	↗Distance aiguille-collecteur	↘diamètres des nanofibres	121
	Structure du collecteur	Nanofibres alignées	113,114,117,118
Structure en 3D		119	
Paramètres environnementaux	↗Humidité	Formation de nanofibres poreuses ou formation de rides puis de cratères	122
		↘diamètres des nanofibres pour les polymères insolubles dans l'eau ↗diamètres des nanofibres pour les polymères solubles dans l'eau	123
	↗Température	↗diamètres des nanofibres puis ↘	123
		Empêche la formation de nanofibres poreuses	122

De nos jours, les non-tissés élaborés par electrospinning ont de nombreuses applications dans différents domaines allant des systèmes de filtration aux dispositifs biomédicaux (**Figure 19**), dont une vue d'ensemble est détaillée dans le paragraphe suivant.

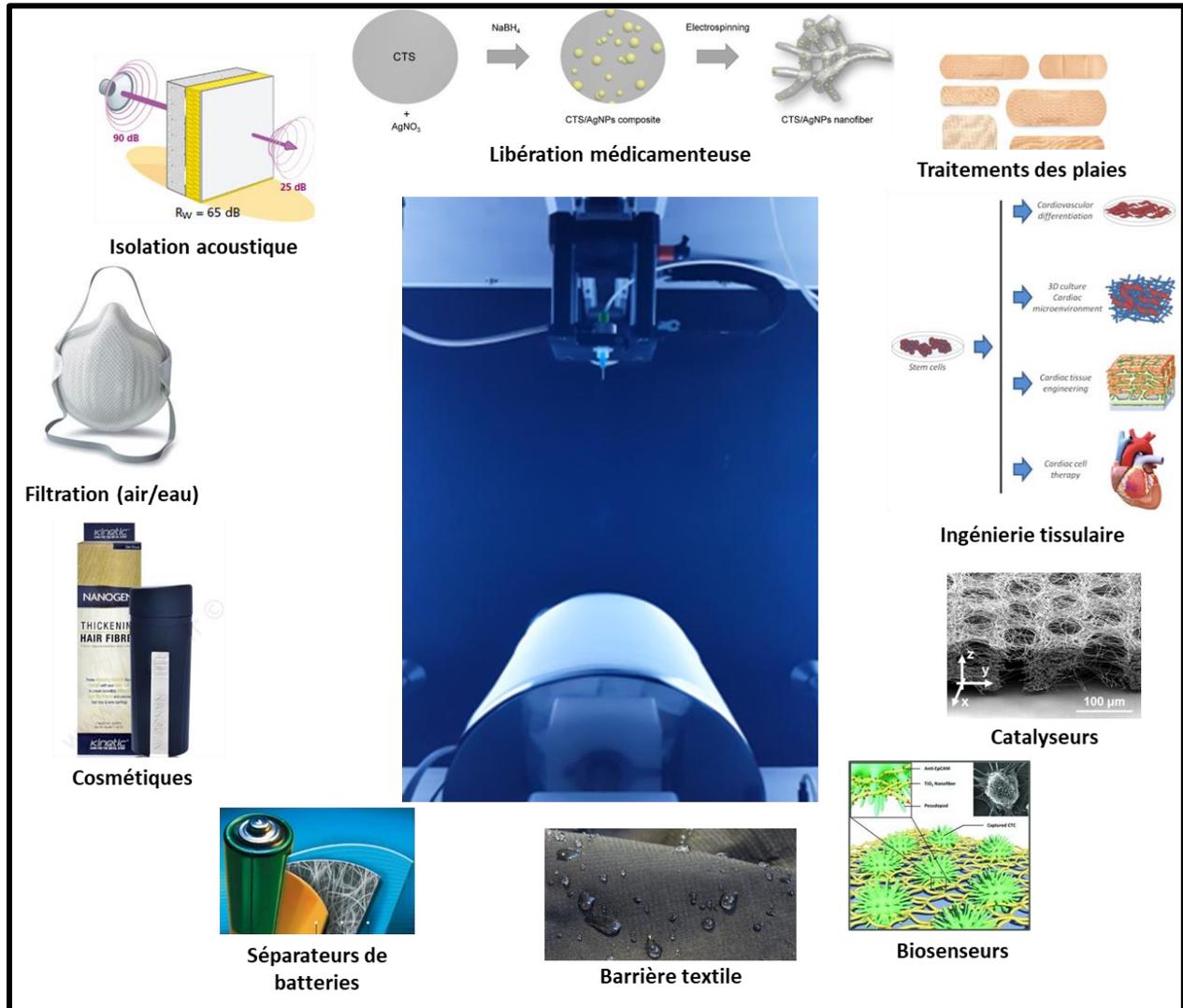


Figure 19: Différentes applications de l'electrospinning

II.a.iii. Applications des nanofibres

II.a.iii.1. Filtration

La nanostructure des matériaux nanofibreux permet la conception de systèmes de filtration d'eau ou d'air efficaces. En effet, en raison de la haute porosité de ces matériaux, de nombreux systèmes de filtration ont été développés ces dernières années^{124,125}. Dans ce sens, Gopal *et al.* ont développé une membrane nanofibreuse en polysulfones pour la conception de

préfiltres, qui peuvent être utilisés pour l'élimination de microparticules dans les eaux usées¹²⁶. Cette membrane contient de très petits pores, entre 2 et 4 μm de diamètre, et permet la séparation de particules de diamètre allant de 0,1 à 10 μm . Toutes les particules ayant un diamètre inférieur à 2 μm sont retenues par la formation d'une couche « cake-layer » formée à la surface des nanofibres. Dans une autre étude, Schloten *et al.* ont décrit l'utilisation de membrane nanofibreuse spécifique en polyuréthane pour la filtration de l'air¹²⁷. Ce type de membrane révèle de grandes capacités d'adsorption pour les composés organiques volatiles (VOCs) comme le chloroforme, l'hexane ou le toluène, ainsi qu'une régénération en condition ambiante, contrairement aux filtres VOC classiques qui sont régénérés par des traitements thermiques agressifs.

II.a.iii.2. Cosmétiques

De nos jours, l'intérêt des matériaux électrofilés dans le domaine de la cosmétique grandit rapidement¹²⁸. En effet, Fan *et al.*, par exemple, ont développé un nouveau produit de protection de la peau basé sur une membrane de nanofibres de fibrines de soie chargée avec de la vitamine C, rendue insoluble par un traitement à base de vapeurs de méthanol¹²⁹. L'intérêt de cette étude est principalement de délivrer la vitamine C directement dans la peau pour sa capacité à améliorer l'adsorption et la conservation de l'eau dans les tissus, en addition à la grande surface spécifique et la porosité du matériau nanofibreux qui pourront améliorer les interactions vitamine C / tissus.

II.a.iii.3. Barrières

Les membranes électrofilées peuvent être utilisées comme barrière contre le son¹³⁰, les particules¹²⁶, les gaz¹²⁷, mais aussi comme barrière textile technique dans certains cas¹³¹. Par exemple, Bagherzadeh *et al.* ont élaboré une barrière textile respirante basée sur une couche de nanofibres de polyacrylonitrile entre deux couches de tissu¹³². Dans ce sens, ils ont élaboré un textile barrière au vent et déperlant et ont comparé ces caractéristiques au Goretex™ (tissu multicouche en PTFE). Ce nouveau matériau multicouche contenant des nanofibres présente de bonnes propriétés de barrière au vent et à l'eau, mais aussi augmente la perméabilité de la vapeur d'eau et le confort qui n'est pas apporté par le Goretex™. Ce type de matériau peut être utilisé dans différentes applications de vêtements sportifs.

II.a.iii.4. Ingénierie tissulaire

Les matériaux nanofibreux apportent de grandes propriétés de prolifération cellulaire grâce à leur surface spécifique élevée et à leur porosité qui leur permettent de mimer la matrice extracellulaire. Ces propriétés mènent à de nombreuses applications dans les dispositifs médicaux et plus particulièrement dans le domaine de la régénération tissulaire¹³³. Par exemple, Yin *et al.* ont décrit l'élaboration d'une membrane électrofilée en chitosan(CS)/poly(acide lactique-co-ε-caprolactone)/collagène pour l'ingénierie tissulaire des vaisseaux sanguins¹³⁴. Différentes compositions ont été testées, et il a été montré qu'une augmentation de l'hydrophilie des échantillons permet d'augmenter la prolifération et l'adhérence des cellules endothéliales. Il a aussi été observé que, pour un rapport de polymère optimal, les propriétés mécaniques de la veine cave saphène peuvent être atteintes. De nombreuses autres propriétés (attachement cellulaire, propriétés mécaniques d'autres vaisseaux ...) peuvent être obtenues de manière à utiliser les matériaux nanofibreux dans d'autres applications de l'ingénierie tissulaire comme pour le cœur, les nerfs, le cartilage ou la peau. La morphologie des nanofibres influence de manière importante le comportement des cellules¹³⁵. Par exemple, dans le cas de la régénération neurale, Yang *et al.* ont démontré que les nanofibres de PLLA orientées aléatoirement présentent une bonne adhérence, prolifération et différenciation de cellules souches neurales (NSC) en raison de leur grande surface spécifique mais aussi de leur rugosité¹³⁶. De plus, un alignement de ces nanofibres permet d'augmenter la vitesse de différenciation des NSC. De même pour la régénération tissulaire de vaisseaux sanguins, Xu *et al.* ont montré une meilleure adhérence et prolifération de cellules musculaires lisses (SMC) lorsque les nanofibres de PLLA sont orientées par rapport à un arrangement aléatoire¹³⁷. Cependant, il est important de noter que dans la majorité des cas, les nanofibres alignées présentent un manque de résistance mécanique étant donné l'anisotropie de ces propriétés¹³⁸.

II.a.iii.5. Traitement des plaies

En dehors du fait que les propriétés physiques des nanofibres présentent des avantages considérables dans le domaine des dispositifs médicaux, ces membranes électrofilées apportent des propriétés de flexibilité et d'absorption aux dispositifs. Toutes ces caractéristiques font des nanofibres des candidats idéaux pour le traitement des plaies et sont abondamment décrites dans

la littérature¹³⁹. Par exemple, Hassiba *et al.* ont fabriqué une membrane bicouche électrofilée pour des applications en traitement des plaies¹⁴⁰. Dans cette membrane, la couche supérieure est faite de PVA et de CS chargés par des nanoparticules d'argent pour la protection contre les germes, et la couche inférieure à base de PEO ou de PVP chargés avec un antiseptique (chlorhexidine), pour éviter l'infection des plaies. Dans cette étude, il a été démontré que cette membrane bicouche présente une bonne activité antibactérienne (Gram + et -) et antifongique grâce à la couche interne qui libère la substance active, ainsi que de bonnes propriétés barrières contre l'environnement extérieur grâce à la couche externe.

II.a.iii.6. Libération médicamenteuse

Les dispositifs biomédicaux contiennent souvent un ou plusieurs principes actifs libérables dans le temps, que ce soit pour des applications en traitement des plaies ou en ingénierie tissulaire¹⁴⁰⁻¹⁴³. Kenawy *et al.* ont comparé la libération du chlorhydrate de tétracycline (TH), contenue dans une membrane électrofilée composée de PLA et de poly(éthylène-co-acétate de vinyle) (PEVA), à un système de libération de principe actif commercial : Actisite® (filament de copolymère éthylène/acétate de vinyle)¹⁴⁴. Les résultats ont démontré une libération de TH quatre fois plus lente dans le cas du matériau électrofilé comparé à l'Actisite® en 5 jours. Ceci est dû à la surface spécifique des fibres électrofilées (diamètre moyen des nanofibres de 5 µm) qui est environ 100 fois plus élevée que celle de l'Actisite® (diamètre moyen de 0,5 mm). Les matériaux nanofibreux permettent ainsi une libération relativement ralentie des principes actifs en quelques jours.

II.b. Modification de surface de nanofibres

Dans la majorité des applications des nanofibres de polymères, il est nécessaire de traiter la surface de ces dernières de manière à modifier et améliorer les propriétés physiques et chimiques.

II.b.i. Présentation générale des techniques de modification de surfaces des matériaux polymères

De nombreuses techniques sont utilisées à ce jour pour modifier les propriétés de surface des matériaux polymères. Ces modifications sont apportées pour de nombreuses raisons comme

l'augmentation de la mouillabilité, l'adsorption de molécules ou l'élimination de contaminants de surface par exemple, et ce pour de multiples applications que ce soit dans le milieu industriel ou dans la vie quotidienne¹⁴⁵. En matière de modifications de surface, on distingue la modification chimique au cours de laquelle la surface est placée dans un milieu contenant une espèce réactive (gaz ou liquide) et la modification physique pendant laquelle le matériau est soumis à une énergie importante par irradiations.

Les modifications chimiques se font généralement par oxydation chimique, en utilisant des réactifs puissants tels que l'acide chromique ou nitrique¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, ou *via* des réactions de chimie organique classiques afin de fonctionnaliser la surface du matériau et lui apporter de nouvelles propriétés physico-chimiques (modifications de l'hydrophilie, des propriétés adhésives ...) ^{146,149,150}. Ces deux méthodes permettent également de fonctionnaliser la surface par des polymères, soit par copolymérisation greffante (« grafting-from »), soit par réaction entre la surface et un polymère (« grafting onto »)¹⁵¹.

Concernant la modification physique des surfaces, différentes énergies de radiations peuvent être utilisées suivant l'effet désiré. En effet, la modification par rayonnement ionisant se fait à haute énergie (plus d'une dizaine de keV suivant les surfaces) alors que la modification par traitement UV ou par lumière visible, qui sont des rayonnements non-ionisants, se fait à basse énergie (50 eV environ). Dans le cas des rayonnements non-ionisants, la fonctionnalisation se fait par simple excitation des atomes de surface par exposition à la lumière (UV ou visible). Pour ce qui est des rayonnements ionisants, comme leur nom l'indique, ils entraînent la formation d'ions en surface du matériau¹⁵².

Ces différents types de modifications de surface possèdent chacun leurs avantages mais aussi leurs inconvénients. En effet, le traitement chimique permet un traitement rapide et très efficace mais nécessite l'utilisation de solvants souvent nocifs pour l'environnement, et entraîne aussi la présence de solvant résiduel en fin de traitement et a donc des conséquences au niveau des propriétés finales du matériau. De plus, dans certains cas, les traitements chimiques sont relativement agressifs, ce qui peut entraîner des modifications indésirables en surface (changements de la rugosité ou de la porosité, création de défauts, contaminations, gonflements...). Concernant les traitements physiques, ils possèdent l'avantage de ne pas

nécessiter de solvant et de ne pas libérer de produits toxiques. Cependant, ces traitements ne sont pas homogènes car difficilement contrôlables, ce qui entraîne donc des problèmes de reproductibilité notamment¹⁵³.

Un grand nombre de ces traitements de surface sont applicables sur des nanofibres de polymères^{154,155}, mais le traitement plasma, à la lisière entre les traitements physiques et les traitements chimiques, connaît un essor très important depuis quelques années. Parmi tous ses avantages, le traitement plasma permet de modifier une surface de façon moins agressive et plus contrôlée que la plupart des autres traitements de surface.

II.b.ii. Traitement plasma froid

II.b.ii.1. Généralités

Le plasma est décrit comme le 4^e état de la matière. Il est composé d'électrons, de radicaux, de photons et d'ions chargés positivement et négativement. Cette dénomination est due au besoin d'absorption d'énergie par un gaz pour obtenir un plasma. En effet, la transition entre l'état solide et l'état liquide ou gaz nécessite de l'énergie tout comme pour le plasma¹⁵⁶. Dans ce sens, l'énergie appliquée à un gaz résulte dans la production d'espèces excitées, ce qui crée le plasma. Cependant, le plasma demeure électriquement neutre en raison de l'équilibre entre les charges négatives et positives de chaque espèce le composant. Le plasma peut être divisé en deux groupes importants : le plasma thermique (à l'équilibre thermodynamique) et le plasma non-thermique ou froid (hors équilibre thermodynamique). Dans le premier cas, la température des électrons atteint des températures de l'ordre de 10^4 K ou plus, et un transfert de chaleur à tous les autres constituants du gaz ionisé peut avoir lieu. Dans ce sens, toutes les espèces présentes dans le plasma atteignent une température d'équilibre thermodynamique, et le degré d'ionisation du gaz est de 100%. Dans le cas contraire, pour le plasma froid, les électrons peuvent aussi atteindre des températures de 10^4 K mais aucun transfert de chaleur n'a lieu (la température des ions et des neutrons avoisine la température ambiante), et ainsi, le degré d'ionisation du gaz est inférieur à 0,1%. Les plasmas peuvent aussi être décrits par leur température d'électrons et leur densité électronique (électrons/m³). Cette classification est décrite en **Figure 20**¹⁵⁷.

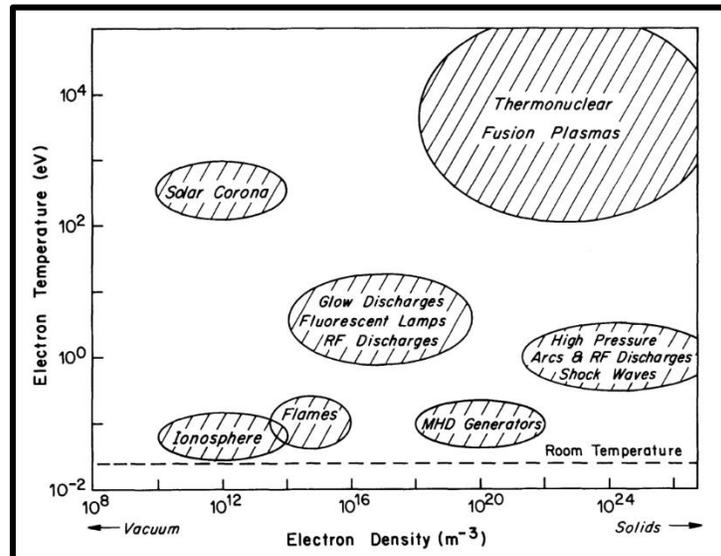


Figure 20: Classification des plasmas¹⁵⁷

En comparaison avec le traitement plasma thermique, le plasma froid permet le traitement de matériaux sensibles à la température, en particulier en raison de la faible pression et puissance de traitement des sources plasma froid. Du fait de leur faible température, les sources plasma froid sont de bons candidats potentiels pour la modification de surface de nanofibres de polymères.

II.b.ii.2. Différentes sources

De nos jours, de nombreuses sources plasma froid, largement décrites dans la littérature^{156,158-161}, sont utilisées de façon à créer différents plasmas avec un grand spectre de caractéristiques. Tout d'abord, il est important de noter qu'un plasma peut être créé à basse pression ou à pression atmosphérique.

Deux familles principales de source **plasma basse pression** peuvent être distinguées : (i) la décharge lumineuse et (ii) les décharges radiofréquences ou micro-ondes. De manière générale, l'effet de la décharge lumineuse dépend du voltage et du courant appliqué¹⁶² : la décharge de Townsend a lieu à de faibles courants, et les décharges corona, subnormale ou normale ont lieu lorsque le voltage diminue et que le courant augmente. Enfin, la décharge lumineuse anormale a lieu après une importante augmentation de courant et mène à la formation d'un arc électrique après une transition lumière-arc, caractérisée par une

augmentation puis une diminution rapide du voltage. La deuxième façon de créer un plasma basse pression est en induisant la décharge par radiofréquence ou par micro-ondes. Dans ce cas, la décharge est créée par l'utilisation d'un magnétron alimenté par une fréquence de quelques centaines de GHz ou MHz dans une chambre fermée. Le gaz à l'intérieur de la chambre absorbe l'irradiation et l'ionisation a lieu après des collisions inélastiques¹⁵⁹.

En termes de **pression atmosphérique**, cinq sources principales de plasma froid peuvent être identifiées : décharge corona, décharge de barrière diélectrique (DBD), arc de décharge lumineuse, spot plasma froid (ULS) et plasma de décharge micro-ondes. La décharge corona est créée entre deux électrodes asymétriques séparées par un fluide neutre (habituellement de l'air). Généralement, une électrode possède une forme d'aiguille et la deuxième possède une forme totalement différente¹⁶³. Ainsi, le champ électrique entre ces deux électrodes n'est pas uniforme, et le plasma est activé uniquement autour de l'aiguille mais sans formation d'un arc plasma en raison des paramètres appliqués (tension, distance entre les électrodes et rayon de courbure). Il est possible d'observer l'effet corona avec la création de nombreux micro-arcs autour de l'aiguille. Plus précisément, la création de la décharge corona a lieu dans les situations suivantes : un atome d'une molécule est ionisé et un électron est accéléré par un champ électrique. Ensuite, cet électron rentre en collision inélastique avec un autre atome (ou molécule) et déclenche une avalanche de collisions inélastiques. Après cela, un courant est établi entre les deux électrodes (dépression) et la décharge est maintenue. Il est intéressant de noter que la décharge corona peut être positive ou négative et la géométrie des électrodes varie (**Figure 21**).

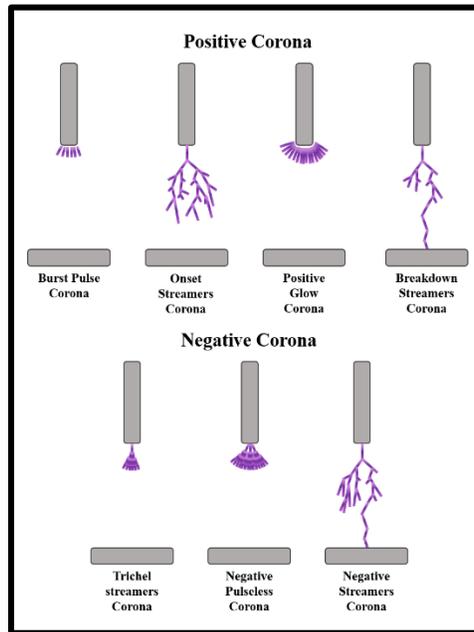


Figure 21: Représentation schématique de différentes décharges corona, adapté de ¹⁵⁷.

Lors d'un plasma atmosphérique, un arc électrique peut se former par établissement d'un courant entre les électrodes, par l'intermédiaire des chocs inélastiques qui se produisent entre les électrons et les espèces lourdes de l'environnement. Ce phénomène est dû au fait que, à pression atmosphérique, le libre parcours moyen des particules (distance couverte par une particule entre deux impacts successifs) est significativement plus faible que pour le plasma basse pression. Dans ce sens, le plasma est à un niveau très localisé, et tend vers un équilibre thermodynamique qui est proche de créer un arc plasma avec une température atteignant les 11000K au minimum¹⁶⁴. Comme il a été décrit précédemment, la décharge corona permet la formation de plasma sans déclencher d'arc. Cependant, d'autres techniques ont aussi été développées dans ce sens. En particulier, il est possible de citer la décharge à barrière diélectrique (DBD). Cette technique consiste en l'utilisation de matériau diélectrique (plastique, quartz ou céramique) de façon à prévenir la formation de l'arc électrique. Dans ce cas, il y a au moins une barrière diélectrique entre les deux électrodes. Ce matériau isolant peut directement être fixé sur une ou sur les deux électrodes, mais le matériau à traiter peut aussi être lui-même une électrode comme schématisé en **Figure 22**¹⁶⁵.

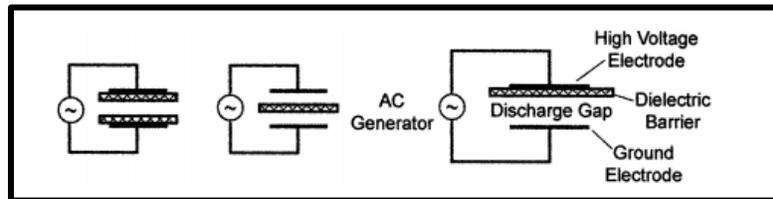


Figure 22: Représentation schématique des configurations classiques de plasma de décharge à barrière diélectrique¹⁶⁵

Par exemple, le plasma de décharge à barrière diélectrique ultraléger (ULD) est une technologie spécifique développée par AcXys Technology basée sur la création d'un rideau plasma, qui permet la modification de surfaces sensibles à la température en raison de la faible température du plasma en sortie (environ 120°C). Un générateur de courant alternatif crée un champ électrique suffisamment intense pour induire la décharge à l'intérieur du gaz sans formation de courant grâce au matériau diélectrique. Cependant, l'électrode positive est chargée avec des électrons libres du plasma et la décharge n'est pas maintenue. De façon à garder la décharge constante, une haute fréquence est appliquée (du kHz au MHz). Il est intéressant de noter que la décharge est très bien organisée au niveau de la surface du matériau diélectrique, ainsi, la dépression électrique (« breakdown ») est produite à de nombreux points et non pas à un seul comme c'est le cas pour l'arc électrique.

Dans d'autres cas, la production d'un arc électrique au cours du procédé peut être contournée. Par exemple, il est possible de citer la décharge par arc glissant (GAD) dans laquelle la production d'un arc démarre lors du quasi-équilibre, et cet arc se déplace et s'allonge en suivant deux électrodes asymétriques jusqu'à une phase de réaction hors-équilibre comme décrit sur la **Figure 23**¹⁶⁶. Ce mouvement de l'arc est dû à la présence d'un gaz vecteur injecté entre les deux électrodes et, lorsque l'arc atteint le bout des deux électrodes, il s'éteint et un nouveau cycle démarre. Dans ce sens, il est possible d'appeler ce plasma un plasma « froid » en raison de l'utilisation de la phase hors-équilibre pour traiter le matériau.

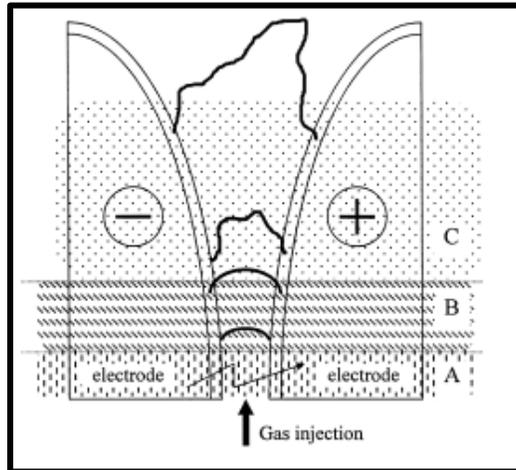


Figure 23: Evolution du glissement de l'arc : (A) phase de dépression électrique, (B) phase de chauffage en quasi-équilibre, (C) phase hors équilibre¹⁶⁶

Un autre type de source plasma atmosphérique est le plasma de post-décharge, aussi appelé plasma indirect, avec un concept similaire au GAD. Le principe de cette technique est basé sur la formation d'un arc électrique dans un gaz vecteur entre deux électrodes coaxiales. Le plasma est ensuite soufflé en dehors de la zone de décharge. En général, ce type de plasma atteint des températures de l'ordre de 5000K en zone de post-décharge et est appelé torche plasma^{167,168}. Cependant, l'utilisation de courant alternatif pour la formation du plasma permet la diminution de cette température à 150°C ou moins avec une puissance appliquée de 700 à 1100 Watts, ce qui en fait un bon candidat pour le traitement de polymères et lui confère aussi la qualification de source plasma froid¹⁶⁹. Ces sources sont nommées torches plasma froid ou aussi ULS comme schématisé sur la **Figure 24**.

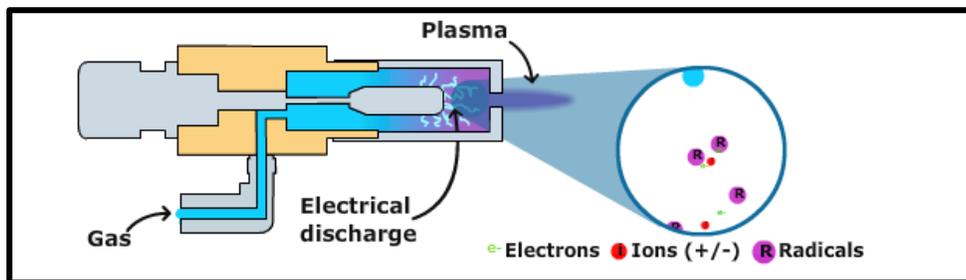


Figure 24: Représentation schématique de la technologie ULS développée par AcXys Technology¹⁶⁹

Finalement, la dernière catégorie de source plasma froid, décharge micro-ondes et jets plasma à pression atmosphérique (APPJ), est décrite dans de nombreuses publications et

synthétisée dans quelques revues^{170,171}. Pour ce type de source plasma, des champs hautes fréquences (du GHz à 10^3 MHz) sont appliqués aux molécules du gaz de façon à former des jets plasma. Comme pour les autres sources plasma, différentes configurations de l'appareil sont possibles et sont décrites en **Figure 25**¹⁷⁰.

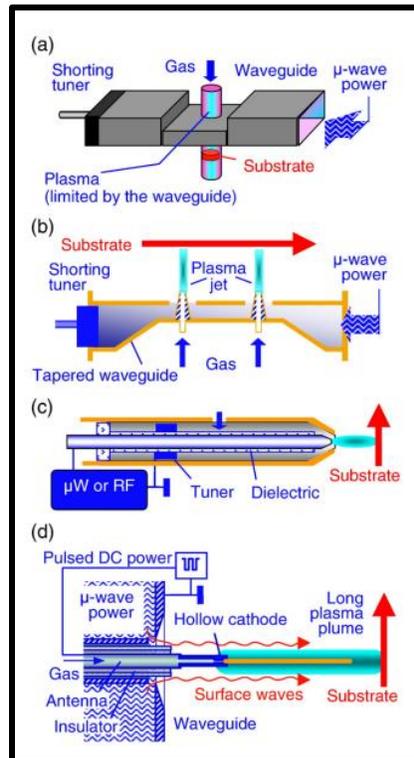


Figure 25: Différentes sources plasma radiofréquence ou micro-ondes. Le substrat à traiter est présenté en rouge, et son mouvement avec une flèche rouge dans les cas (b), (c) et (d)¹⁷⁰.

Les traitements plasma basse-pression ou atmosphérique présentent de nombreux avantages mais aussi des limites qui sont généralement opposables. Le plasma atmosphérique est un procédé de courte durée qui peut être intégré dans une ligne de production sans besoin d'une technologie de vide complexe. Cependant, dans de nombreux cas, le traitement n'est pas homogène, et peut avoir un faible potentiel d'activation, pour le traitement corona particulièrement. Cette technique a aussi besoin d'un grand nombre de buses de traitement pour les objets de grande taille, et la température de plasma est généralement supérieure à 100°C , ce qui rend impossible le traitement de certains polymères. Au contraire, le plasma basse-pression rend possible le traitement homogène, plus précis, particulièrement pour le traitement de surfaces poreuses (la modification peut se faire aussi à l'intérieur des pores), et permet aussi le

nettoyage de matériaux sensibles à l'oxydation. Cependant, cette technique est spatialement limitée, en particulier à cause du besoin de chambre basse-pression ; la basse-pression étant obtenue à l'aide de pompes haute puissance très coûteuses qui sont, pour certains matériaux, trop peu puissantes (même pour les matériaux silicones). Enfin, les chambres basse-pression sont difficiles à intégrer à une ligne de production¹⁷². Ainsi, l'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques dépend du matériau à traiter (taille, nature, spécificité, etc...), de l'effet du traitement souhaité ainsi que de l'échelle de production.

II.b.ii.3. Effets du plasma froid

Les effets du traitement plasma froid peuvent être divisés en quatre catégories qui dépendent de certains paramètres et de la modification de surface requise : nettoyage, fonctionnalisation, greffage et modification interstitielle. Au cours des dernières années, de nombreuses revues sur le traitement plasma ont été publiées et discutent des différents effets du plasma^{162,173}.

Le nettoyage par plasma est obtenu avec des paramètres relativement faibles (puissance et consommation de gaz) de façon à éliminer les polluants se trouvant à la surface des matériaux par un procédé d'ablation. En général, les polluants de surface sont des huiles ou des polymères, et les gaz utilisés pour le procédé de gravure (« etching ») sont inertes (He, Ar ou H₂), même si O₂ est parfois utilisé pour éliminer des contaminants après oxydation. Le procédé d'ablation consiste en la création d'espèces volatiles, par scission de chaînes par exemple, de façon à éliminer les polluants traités grâce au vide appliqué. Le mécanisme de nettoyage a été décrit par Belkind *et al.* comme combinant trois phénomènes : pulvérisation (ions), chauffage (électrons) et gravure (radicaux)¹⁷⁴.

Dans le cas de la fonctionnalisation, aussi appelée activation, le procédé démarre avec l'intégration de fragments de molécules de gaz sur la surface des matériaux. Les gaz utilisés généralement à cet effet sont NH₃, O₂, CO₂, N₂, H₂, Ar ou He de manière à créer des fonctions -COOH, -NH₂, OH, C=O, -OOH ou -NO₃, à la surface. Ce phénomène conduit à l'augmentation de l'hydrophilie de surface du matériau et améliore ses propriétés qu'elles soit physico-chimiques ou biologiques¹⁷⁵. Il est aussi possible d'augmenter l'hydrophobie des matériaux en utilisant des gaz hydrophobisants (comme CF₄) pendant le procédé plasma.

Le greffage de polymères à la surface des matériaux peut aussi être obtenu par plasma. En effet, le traitement plasma d'un matériau par un gaz inerte mène à la formation de radicaux à la surface. Lorsque l'on introduit un monomère capable de réagir avec ces radicaux dans la chambre, il se produit une copolymérisation greffante de ce monomère directement à la surface¹⁷⁶. Une autre possibilité de polymérisation greffante par plasma est de réaliser un premier traitement plasma suivi d'un contact de la surface traité avec l'atmosphère ou des gaz spécifiques, comme O₂, de façon à créer des fonctions réactives en surface de l'échantillon (ex : peroxydes), et ensuite, de tremper le matériau dans une solution de monomères pour les polymériser en surface à l'aide d'un second traitement plasma¹⁷⁷. Cette méthode est appelée polymérisation greffante induite par plasma (PIGP).

Enfin, un autre effet du plasma est la modification interstitielle de la surface (*i.e.* réticulation). Cet effet concerne, en particulier, l'augmentation de la cohésion de surface des objets traités. En effet, les espèces réactives créées au cours du procédé plasma (ions, radicaux, UV et autres) peuvent couper les liaisons C-H et la recombinaison de ces radicaux permet la réticulation de surface du matériau, mais peut aussi créer des liaisons entre 2 couches différentes de matériaux et ainsi augmenter leurs propriétés d'adhésion¹⁷⁸. La **Figure 26** synthétise la profondeur de pénétration relative à chaque espèce active du plasma et explique comment le plasma peut interagir et modifier la structure de surface des matériaux¹⁷⁹.

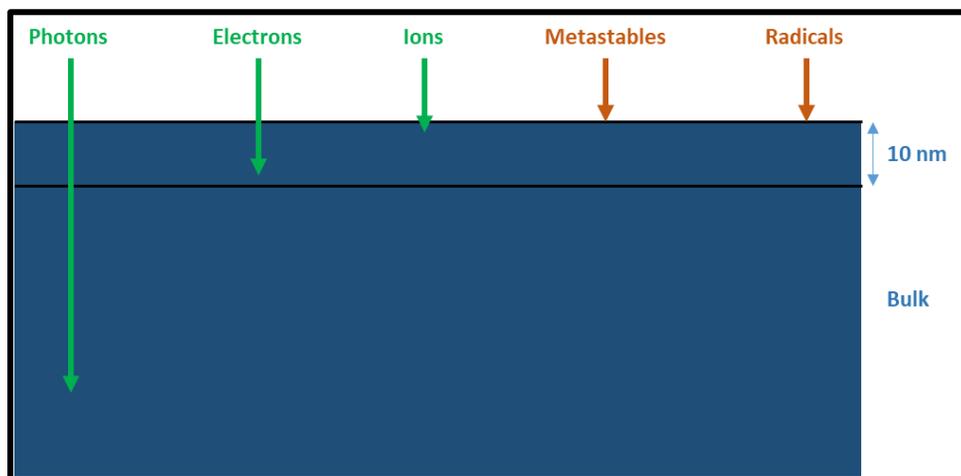


Figure 26: Profondeur de pénétration relative des espèces actives du plasma. Les espèces chargées sont représentées en vert et les neutres en orange. Les espèces neutres interagissent uniquement avec la surface intime.

II.b.ii.4. Applications

Le plasma froid permet de nombreux traitements de puissances différentes qui peuvent être appliqués dans un large spectre d'applications comme le médical¹⁸⁰⁻¹⁸⁵, la décontamination^{156,186-188}, la synthèse de gaz¹⁸⁹ ou encore la biotechnologie¹⁹⁰. En termes d'applications médicales, le traitement plasma permet, en premier lieu, la stérilisation du matériel biomédical grâce à son effet de nettoyage de surface¹⁸⁰. De plus, la stérilisation par plasma est plus efficace que d'autres techniques de stérilisation classique et pourrait être utilisée dans la désinfection des mains dans le futur. En effet, une revue de la littérature publiée par Sakudo *et al.* démontre tous les effets positifs du plasma en stérilisation et notamment l'activité de ces traitements contre la paroi des bactéries ainsi que contre les prions. De plus, ce type de traitement permet de stériliser des échantillons sensibles à la température ou alors qui ne seraient pas compatibles avec les méthodes de stérilisations classiques (oxyde d'éthylène, irradiation gamma, autoclave ...) ¹⁹¹. Ajouté à cela, le traitement plasma froid peut améliorer les propriétés d'adhésion et de mouillabilité de certains matériaux comme les polymères de manière à augmenter leur biocompatibilité en particulier¹⁸¹. Des études récentes ont démontré un effet important du plasma sur la réduction de tumeurs dans la thérapie cancéreuse. En effet, Keidar *et al.* ont montré que le traitement par plasma froid atmosphérique de cellules tumorales permet leur réduction grâce à l'utilisation des espèces générées réactives à l'oxygène, ce qui mène à l'apoptose (mort cellulaire programmée) et n'affecte pas les autres cellules¹⁸². Dans un autre domaine, le traitement plasma froid peut aussi être utilisé pour soigner des pathologies dermatologiques grâce à la création d'espèces réactives qui peuvent directement réagir avec les blessures de la peau^{183,184}. Plus précisément, Isbary *et al.* ont démontré que le plasma froid atmosphérique peut être utile dans le traitement de la maladie de Hailey-Hailey. Le mécanisme d'action n'a pas encore été révélé, mais quelques hypothèses ont été émises sur l'effet antifongique et bactéricide des espèces générées par plasma¹⁸⁵. Dans d'autres champs d'applications, le traitement plasma froid peut être utilisé pour la décontamination de surface, en particulier dans la transformation des aliments ou dans l'épuration des gaz. Dans l'industrie alimentaire, le traitement plasma froid est utilisé en particulier pour l'élimination des bactéries, ou pour améliorer la conservation des aliments dans certains contenants^{186,187}. L'effet du plasma

dans le cas de l'épuration des gaz est basé sur la purification de l'atmosphère par destruction de VOCs ou de fines particules parmi d'autres polluants. Finalement, le greffage de certains polymères ou molécules à la surface de certains matériaux apporte un large champ d'applications au traitement plasma froid, avec le greffage de polymères bioactifs à la surface d'implants biomédicaux¹⁹² ou encore le greffage de polymères conducteurs pour des applications en photoélectrique¹⁹³, pour en citer quelques-uns.

II.c. Traitement plasma froid sur nanofibres obtenues par electrospinning

Dans le cas de nanofibres de polymères, le principal avantage du traitement plasma, hormis la modification des propriétés chimiques et physiques, est que ce traitement ne cause pas la perte de la structure nanofibreuse, car seule l'extrême surface est affectée.

II.c.i. Amélioration de la biocompatibilité

II.c.i.1. Introduction

Le traitement plasma froid de nanofibres de polymères a souvent été décrit comme une technique propre et respectueuse de l'environnement pour améliorer la biocompatibilité de ces nanofibres en vue de les utiliser dans le domaine biomédical et dans l'ingénierie tissulaire¹⁹⁴⁻¹⁹⁹. L'importance de la chimie de surface sur la biocompatibilité et le comportement cellulaire a largement été décrite dans la littérature. Dans ce sens, Thevenot *et al.* ont répertorié les effets des fonctions chimiques classiques greffées à la surface des biomatériaux sur leurs propriétés biologiques²⁰⁰. En effet la présence de certaines fonctions chimiques, comme -COOH, -OH, -NH₂ ou -CH₃, mène à des comportements cellulaires intéressants, comme l'augmentation de l'adhérence, la croissance, la différenciation et la propagation cellulaire. Cependant, ces fonctions chimiques peuvent aussi générer des réponses inflammatoires et causer la formation de capsules fibreuses menant à une cytotoxicité substantielle. Néanmoins, un effet synergique apportant de nouvelles propriétés a été observé lorsque ces fonctions sont présentes en différents rapports²⁰⁰. En dehors des effets chimiques sur les propriétés biologiques et la réponse cellulaire, les biomatériaux doivent être hydrophiles et donc présenter une forte mouillabilité pour leur utilisation dans le domaine biomédical. Cependant, de nombreux polymères utilisés en

electrospinning, comme la PCL, le PLA ou d'autres, sont hydrophobes. Pour pallier cet inconvénient, le traitement plasma froid a été utilisé pour apporter des fonctions hydrophiles à la surface des matériaux nanofibreux et ainsi, conduire à une augmentation de la mouillabilité. Comme il a été décrit dans de nombreuses études, apporter des fonctions polaires, comme des fonctions riches en oxygène ou en azote, à l'aide du plasma ne permet pas seulement d'augmenter l'hydrophilie mais également de modifier la topologie de surface des matériaux nanofibreux, ce qui induit une augmentation de la prolifération, de l'adhérence et de la viabilité cellulaire de ces membranes²⁰¹⁻²⁰⁹, ainsi qu'une augmentation des interactions entre protéines²¹⁰. Dans ces études, différents types de lignées cellulaires ont été testées telles que les ostéoblastes, les myoblastes, les fibroblastes, les cellules de Schwann mais aussi les cellules souches. Dans toutes ces études, les membranes nanofibreuses traitées par plasma ont montré une nette amélioration de la biocompatibilité et il a également été prouvé que les méthodes de stérilisation n'affectent aucune caractéristique des membranes traitées par plasma²⁰⁷.

II.c.i.2. Régénération osseuse et cartilagineuse

De nos jours, le domaine de l'ingénierie tissulaire utilisant le plasma froid, le plus décrit dans la littérature, est l'ingénierie tissulaire osseuse pour la régénération des os blessés ou fracturés²¹¹⁻²²¹.

Différentes études ont montré que les cellules souches osseuses sont capables de croître et de se propager et possèdent une bonne viabilité sur des nanofibres traitées par plasma froid. Ces propriétés osseuses peuvent être accrues grâce à une libération médicamenteuse²²². En termes de comportement cellulaire, Ardeshiryajimi *et al.* ont décrit les essais *in vitro* et *in vivo* de nanofibres de poly(éther sulfone) (PES) traitées ou non par plasma froid sur lesquelles des cellules souches pluripotentes (PSC) ont été cultivées²¹². Ils ont d'abord montré que les membranes de PES présentaient une meilleure biocompatibilité après le traitement plasma en raison de l'augmentation de l'hydrophilie. Un autre point important est le fait que les membranes, traitées ou non, permettent une différenciation ostéogénique (changement d'un type cellulaire vers un autre type plus spécifique) des PSC mais pas de même ampleur. Dans un registre similaire, Liu *et al.* ont démontré que le traitement plasma de nanofibres de PLA permet une amélioration du comportement cellulaire, notamment en termes de prolifération et propagation de cellules

souches osseuses mésenchymateuses (BMSC)²¹¹ sans corrélation avec le temps de traitement plasma comme présenté en **Figure 27**. En effet, pour une puissance de 18 W, les vitesses de prolifération et de propagation des BMSCs sont plus élevées pour des temps de plasma de 5 minutes en comparaison de 1 et 10 minutes. Cependant, il a été démontré que l'adhérence, la propagation et la prolifération cellulaire sont corrélées à l'adsorption de protéines, elle-même améliorée par la présence d'une couche aqueuse sur les surfaces hydrophiles²¹⁷. Ainsi, une hypothèse est que, pour 5 minutes de traitement plasma, la modification de surface est complète pour la surface externe de la membrane, donc en contact direct avec les cellules. Au contraire, pour un traitement de 10 minutes, la partie interne de la surface est aussi modifiée, et ainsi, les protéines s'accumulent dans cette section, et non dans la zone de contact cellulaire. Par ailleurs, il est aussi possible d'immobiliser des particules de céramique, comme l'hardystonite, sur des membranes nanofibreuses grâce à un traitement plasma pour améliorer la régénération osseuse²²³.

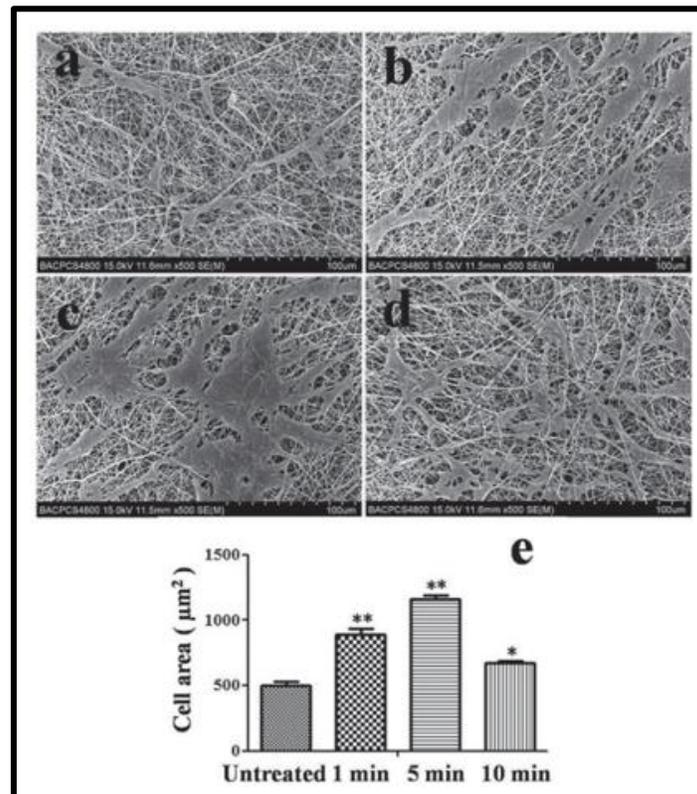


Figure 27: Images MEB de membranes nanofibreuses après un jour de culture de cellules souches osseuses mésenchymateuses (BMSC). (a) non traitées, (b) 1 minute de traitement, (c) 5 minutes de traitement, (d) 10 minutes de traitement. (e) aire de propagation cellulaire mesurée pour chaque échantillon (n=20). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ ²¹¹

De plus, ce type de membrane peut être utilisé dans l'ingénierie tissulaire cartilagineuse avec le même comportement vis-à-vis des cellules chondrogéniques^{215,216,218,219,224,225}. Zhu *et al.* ont étudié la différenciation chondrogénique de MSC sur des nanofibres de PCL, contenant des microsphères de facteurs bioactifs, traitées par plasma atmosphérique^{218,219}. En accord avec les résultats de la littérature, une prolifération et une infiltration cellulaire améliorées ont été observées pour chaque échantillon incorporé de microsphères traitées par plasma (échantillons micro-CAP) et pour chaque échantillon traité par plasma (échantillons CAP), mais pas pour les échantillons de référence (non-traités) comme présenté en **Figure 28**. De plus, la différenciation chondrogénique est observée par une sécrétion de glycosaminoglycane (GAG) pour tous les échantillons de référence, micro-CAP ou CAP. Cependant, après deux semaines de différenciation, différents résultats ont été observés : pour la référence, la quantité de GAG sécrétée est de 60 µg par échantillon (disque de diamètre 5 mm) ; alors que les quantités sécrétées par les échantillons CAP et micro-CAP sont respectivement de 80 et 100 µg par échantillon. Cette augmentation montre une influence du traitement plasma atmosphérique sur la différenciation chondrogénique des BMSCs, même sans présence de facteurs bioactifs. Ajouté à cela, un effet synergique entre les microsphères et le traitement plasma a été observé pour la première fois sur la croissance et la différenciation de MSC en chondrogène²¹⁸.

Enfin, les protéines fibronectines et vitronectines jouent un rôle important dans l'adhérence des cellules sur les membranes. Alors que l'augmentation de la quantité de charges négatives entraînée par le traitement plasma cause une diminution de l'interaction entre la fibronectine et la surface des membranes, cette augmentation mène aussi à une meilleure interaction entre la surface et la vitronectine (proche de la fibronectine) et ainsi mène à une adhérence cellulaire robuste.

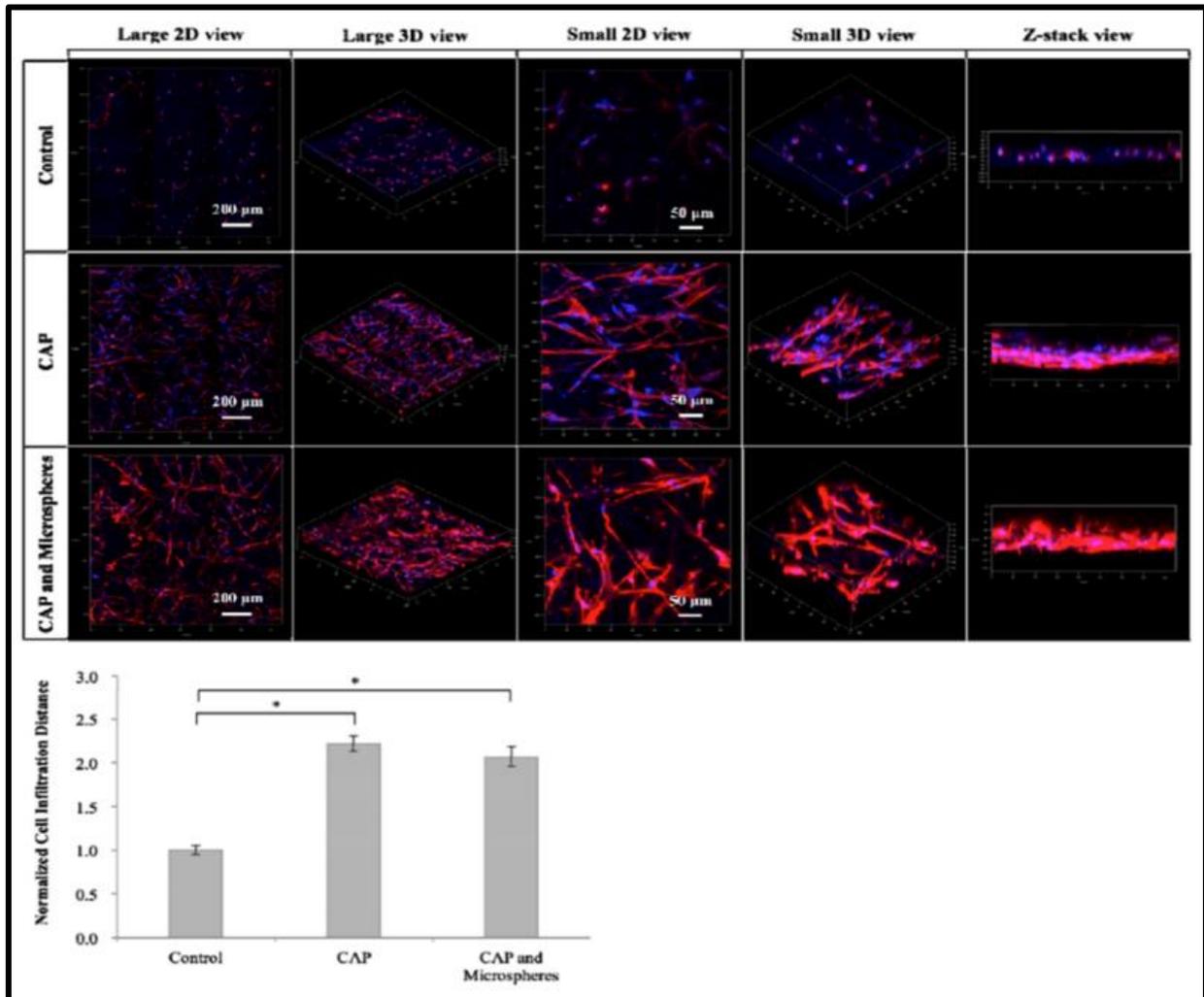


Figure 28: Micrographes confocaux des nanofibres de PCL après un jour de culture de cellules souches mésenchymateuses (MSC). La quantification ainsi que la profondeur d'infiltration ont été mesurées par ImageJ (n=9). Bleu = coloration du noyau cellulaire par DAPI, rouge = cytosquelette coloré par Rhodamine-Phalloïdin. * $p < 0,05^{207}$.

II.c.i.3. Autres régénérations tissulaires

Dans d'autres études, les nanofibres traitées par plasma ont aussi été étudiées, de façon plus rare, dans des applications de régénération nerveuse²²⁶⁻²²⁹, de la cornée²³⁰, de la peau^{231,232} ou encore vasculaire²³³.

Dans le cas de la **régénération nerveuse**, Techaikool *et al.* ont étudié les effets de différents paramètres de plasma sur la biocompatibilité de nanofibres de PLCL et de poly[(acide L-lactique)-co-glycolide] (PLGA) pour des applications en reconstruction olfactive^{228,229}. Ces résultats montrent une plus grande proportion de cellules olfactives engainantes (OECs) sur les nanofibres de PLCL (26%) ou de PLGA (32%) traitées par plasma que sur les membranes non

traitées. Plus précisément, ils ont montré que le *traitement plasma basse pression* mène à une augmentation de la population cellulaire relative dans chaque phase du cycle cellulaire, une réduction de la population cellulaire nécrotique (*via* les indices apoptotiques), une amélioration de l'activité mitochondriale ainsi qu'une réduction des fuites membranaires.

Concernant l'**application cornéenne**, Soleimanifar *et al.* ont décrit le *traitement plasma basse pression* de membranes à base de nanofibres de polyuréthane et de soie ainsi que leur potentiel dans la différenciation de cellules souches conjonctives mésenchymateuses (CJMSC)²³⁰. Dans ce cas, les membranes traitées par plasma démontrent une surexpression des marqueurs tardifs de différenciation épithéliale des CJMSC (marqueurs CK3, CK8 et CK12), alors que les membranes non-traitées montrent plutôt une surexpression des marqueurs précoces de différenciation (marqueurs DSG1 et DSC1). Ces résultats montrent un bon potentiel de différenciation de ces membranes au niveau génétique grâce au traitement plasma.

Par ailleurs, ces nanofibres traitées par plasma présentent un haut potentiel de **régénération cutanée**. En premier lieu, Bacakova *et al.* ont abordé le sujet du comportement cellulaire de kératinocytes immortels humains (HaCaT) sur des nanofibres de PLA traitées par plasma²³¹. Comme cela est souligné dans d'autres études, l'adhérence des kératinocytes sur ce type de membrane est améliorée grâce à l'*augmentation de l'hydrophilie* mais aussi à la *rigidité du matériau*, ainsi que la nouvelle nanostructure formée par le *traitement plasma* (apparition d'une rugosité de surface). La même équipe avait aussi prouvé que la *nanostructure des matériaux* ainsi que leur *mouillabilité* influencent de façon positive la prolifération et la croissance cellulaire^{234,235}. Cependant, ils ont aussi démontré un effet négatif de la densité des fibres, en accord avec Soliman *et al.*²³⁶, combiné avec le traitement plasma, sur l'adhérence et la prolifération des kératinocytes. En effet, l'aire de l'amas cellulaire est 3,5 à 4 fois plus importante pour les nanofibres traitées par plasma de densités respectives 5 et 9 g/m² par rapport aux nanofibres non-traitées de densité 30 g/m². En comparaison, l'aire de l'amas cellulaire est la même dans le cas des nanofibres non traitées quelle que soit la densité des fibres. Ces résultats sont attribués à la modification des propriétés mécaniques des fibres, particulièrement pour ce qui est de la densité des nanofibres. En effet, le *traitement plasma* induit un *espace plus faible entre les fibres* (porosité plus faible), une *diminution de l'élasticité* mais aussi une *augmentation*

de la fragilité et de la rigidité (matériau fragile). Parallèlement, cette équipe a étudié l'effet du plasma sur la morphologie et sur le comportement cellulaire de ces membranes nanofibreuses de PLA. Pour des *conditions moyennes de plasma* (puissance inférieure à 50 W et temps inférieur à 30 s), aucune modification significative de la morphologie des nanofibres ou de l'adhérence, la prolifération ou l'aire des amas cellulaires n'a été observée entre les membranes traitées ou non par plasma. Cependant, en accord avec Wan *et al.*, une *augmentation du temps de plasma* mène à une modification plus profonde alors qu'une *augmentation de la puissance* entraîne la dégradation des nanofibres. En parallèle, les auteurs ont observé un *effet positif du temps de plasma* sur la modification morphologique des nanofibres²³⁷. Pour ce qui est du comportement cellulaire, des *conditions plus élevées de plasma* permettent une meilleure adhérence, prolifération et propagation cellulaire. Cependant, la *modulation de ces paramètres* ne cause aucune modification supplémentaire. Ceci est dû au fait que, au-delà de conditions limites particulières, aucune augmentation de la quantité de groupes fonctionnels polaires n'est observée mais aussi qu'il n'y a aucune modification supplémentaire du comportement cellulaire. Enfin, les auteurs, en accord avec une étude de Wan *et al.*²³⁸, ont abordé le fait que les *paramètres du traitement plasma* peuvent avoir un impact plus important sur le comportement cellulaire dans le cas de *culture cellulaire dynamique* (les cellules sont mises en culture sur l'échantillon et un flux de milieu de culture est pompé à travers cette membrane). Cette information est particulièrement intéressante et prouve que le comportement des cellules sur les nanofibres traitées par plasma peut être meilleur que celui décrit dans les études *in vitro*. Par ailleurs, Atyabi *et al.* ont étudié l'effet du gaz plasmagène utilisé sur le comportement des fibroblastes L929 sur des nanofibres de PCL traitées²³². Deux types de plasma ont été utilisés, (i) un plasma d'O₂ froid **basse pression**, et (ii) un plasma froid **atmosphérique** avec un mélange de gaz He/O₂. Les mesures d'angles de contact (WCA) ont montré que le *plasma basse pression* mène à une plus faible augmentation de l'hydrophilie que le *traitement plasma atmosphérique* en raison de la formation de groupements -CH à la surface des nanofibres dans le cas du plasma He/O₂. Ceci mène donc à une meilleure adhérence des fibroblastes dans le cas des nanofibres traitées par le plasma atmosphérique. Grâce à cette adhérence, une meilleure croissance et prolifération des fibroblastes a été observée après 48 et 72h de contact avec les échantillons traités par plasma

atmosphérique (présenté en **Figure 29**). Cependant, il est important de noter que le traitement *plasma froid basse pression* mène à une meilleure croissance et prolifération cellulaire sur les nanofibres que les échantillons non traités. En dehors de ces différences entre ces deux types de traitement plasma, il aurait été intéressant de comparer le plasma atmosphérique et le plasma basse-pression en utilisant les mêmes gaz de façon à évaluer les caractéristiques propres de la modification des nanofibres après ces deux traitements.

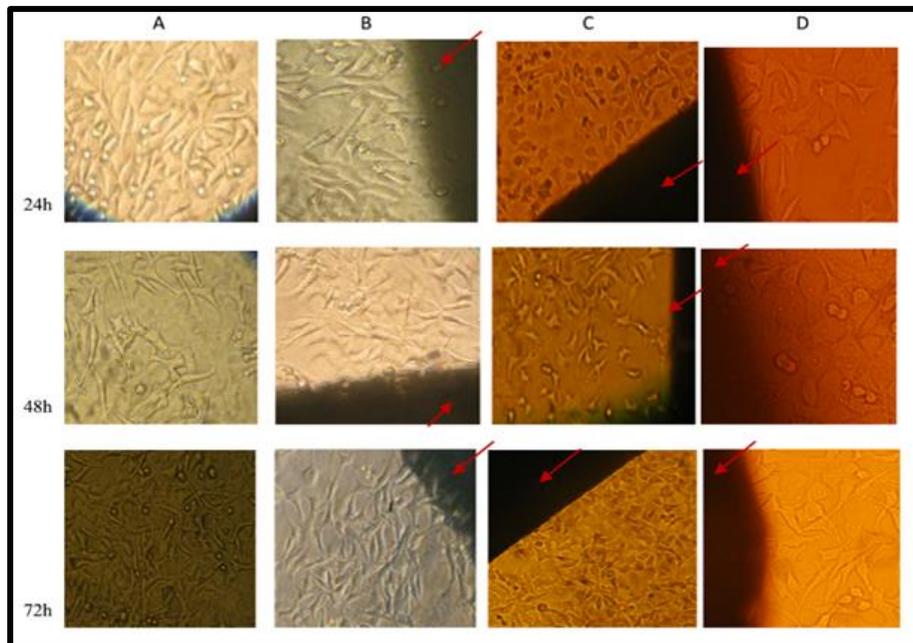


Figure 29: Images de microscopie inversée de la prolifération cellulaire sur des membranes après 1, 2 et 3 jours de culture. Les flèches indiquent la membrane. (a) contrôle sans membrane, (b) membrane traitée par plasma froid basse pression, (c) membrane non-traitée, (d) membrane traitée par plasma froid atmosphérique (barre d'échelle = 100 µm) ²³².

En termes d'**applications vasculaires**, Savoji *et al.* ont décrit que la gravure plasma ou le revêtement plasma (polymérisation de surface ou réticulation) de nanofibres de PET permettaient d'obtenir une membrane acceptable pour le greffage vasculaire en termes de propriétés structurales, mécaniques et surfaciques²³³. En effet, ils ont montré que les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (« Human Umbilical Vein Endothelial Cells », HUVEC) adhèrent et prolifèrent plus facilement sur les nanofibres traitées par plasma froid que ce soit dans le cas de la formation d'un revêtement plasma riche en amine, ou alors dans le cas du plasma de gravure. Cette amélioration des propriétés biologiques est observable après 7 jours de contact des cellules avec les membranes. Les raisons de ces améliorations des propriétés biologiques sont tout d'abord *l'augmentation de l'hydrophilie* de surface après le traitement

plasma mais aussi *l'augmentation de la rugosité* de surface. Ces deux caractéristiques mènent à une *augmentation de l'adsorption des protéines* du milieu de culture et donc à *l'augmentation de l'adhérence* et la *prolifération des cellules*.

II.c.i.4. Traitement des plaies

En lien avec l'ingénierie tissulaire, la littérature rapporte de nombreuses études concernant l'effet du traitement plasma de nanofibres sur la cytocompatibilité et la prévention d'adhérence bactérienne pour des applications de traitements des plaies^{231,239,240}. Par exemple, Das *et al.* ont étudié l'effet des traitements plasma froid d'O₂ et d'Ar sur la cytocompatibilité de nanofibres de poly(alcool de vinyle) (PVA)/CS²³⁹. La rugosité induite par le traitement est plus importante pour les membranes traitées par le plasma d'O₂ que pour le plasma d'Ar. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature comme étant dû à la présence d'espèces extrêmement réactives à l'oxygène bien plus importante dans le cas des traitements plasma froid d'O₂²⁴¹. Ces espèces jouent un rôle clé dans la gravure de surface et dans l'amélioration de l'hydrophilie. De plus, Arik *et al.* ont montré, dans le cas de traitement plasma de nanofibres de PVA/PAA, une prévention de l'adhérence et de la croissance bactérienne due à l'amélioration de l'hydrophilie après traitement²⁴⁰. En effet, l'accumulation des espèces réactives à l'oxygène et à l'azote sur la surface des nanofibres mène à des interactions électrostatiques entre le matériau et les bactéries, ce qui cause la perméabilisation de la membrane bactérienne et ainsi leur possible inactivation²⁴².

II.c.ii. Adsorption et immobilisation

En dehors de la modification de surface, le traitement plasma froid permet l'immobilisation de molécules, comme les protéines ou les enzymes, directement à la surface des nanofibres.

Le traitement plasma peut être utilisé pour immobiliser des protéines ou des enzymes à la surface des nanofibres pour cibler des applications biologiques, en traitement de l'eau ou encore en agroalimentaire. Plus précisément, l'immobilisation d'enzyme après le traitement plasma froid permet de cibler l'utilisation des membranes nanofibreuses comme biocapteurs²⁴³⁻

²⁴⁹. L'effet des paramètres du plasma basse pression d'oxygène sur l'efficacité d'immobilisation a été décrit par Wang *et al.* Ils ont montré que le temps de traitement possède un impact plus important que la puissance du plasma sur l'immobilisation de la laccase sur des nanofibres de PMMA²⁴⁴. En effet, sans traitement plasma, l'efficacité d'immobilisation est d'environ 3% mais, après un traitement de 60 s et 60 W, cette efficacité est multipliée par deux. De plus, lorsque le temps de plasma atteint 90 puis 120 s, cette efficacité est améliorée de 20 et 37% respectivement. Cependant, une augmentation de la puissance du plasma entraîne une fusion des nanofibres et ainsi la perte de la structure nanofibreuse. Dans une autre étude de Afshari *et al.*, l'effet du traitement plasma sur la morphologie des nanofibres a été étudié avant et après immobilisation d'enzymes : ils ont évalué l'impact du gaz utilisé lors d'un traitement plasma froid basse-pression de nanofibres de PVA/acide malonique (MA) pour l'immobilisation en surface de l'enzyme glucose oxydase²⁴⁵. Ils ont observé que l'effet du gaz utilisé sur la morphologie des nanofibres est notable seulement après l'immobilisation des enzymes. En effet, comme il est présenté en

Figure 30, seules les membranes traitées par CO₂ ou par l'air ont conservé leur structure nanofibreuse et une plus grande quantité de glucose oxydase a été immobilisée en comparaison aux membranes non traitées et celles traitées par plasma d'azote ou d'argon. De plus, Hamidi-Esfahani *et al.* ont démontré que, dans le cas du traitement plasma atmosphérique de nanofibres de CS-co-PEO, le temps de plasma apporte d'abord un effet positif sur le taux d'immobilisation d'enzymes mais ensuite un effet négatif sur la déformation structurelle des nanofibres²⁴⁶.

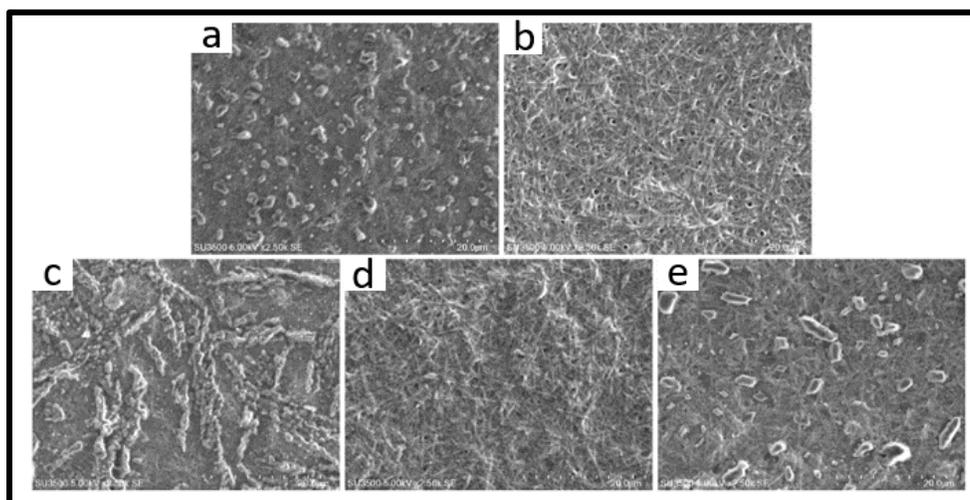


Figure 30: Images MEB de membranes nanofibreuses à base de PVA/MA après immobilisation d'enzymes. (a) Sans traitement plasma, (b) traitée au plasma d'air, (c) traitée au plasma d'azote, (d) traitée au plasma de CO₂, (e) traitée au plasma d'argon²⁴⁵.

Ils ont aussi montré que, pour des conditions optimales d'immobilisation (membranes nanofibreuses immergées pendant 5 h et 20 min dans une solution pH 5,63 de phospholipase A₁ à 654,31 UI), l'efficacité d'immobilisation pour les échantillons traités par plasma était de 78,5% contre 60% pour les échantillons non-traités. Ceci est dû à la formation de nombreuses fonctions à la surface des échantillons après le traitement plasma. De même, une augmentation du nombre de fonctions de surface permet une meilleure adsorption de protéines comme il a été décrit dans la section II.c.i.2^{218,219}. Ils ont observé que, dans le cas de nanofibres de PCL traitées par plasma atmosphérique, l'adsorption de la vitronectine (protéine naturellement présente à la surface des cellules souches mésenchymateuses (MSC)) est améliorée grâce à l'augmentation de l'hydrophilie des nanofibres de PCL. Ces résultats montrent l'importance des paramètres de plasma mais aussi l'importance du gaz utilisé (inerte ou réactif). En effet, les gaz réactifs mènent à la formation de fonctions hydrophiles plus nombreuses, permettant ainsi une meilleure adsorption des enzymes.

II.c.iii. Greffage et réticulation

Le greffage covalent de molécules ou de polymères sur la surface de nanofibres traitées par plasma et la réticulation de nanofibres par plasma utilisés pour améliorer la bioactivité ont largement été décrits dans la littérature²⁵⁰⁻²⁶⁷.

II.c.iii.1. Greffage de polymère

Les polymères naturels les plus greffés sur la surface de nanofibres par plasma sont l'héparine²⁵¹⁻²⁵³ et le collagène²⁵⁴⁻²⁵⁶. La procédure la plus commune est le greffage par **couplage direct** (« grafting onto »). Le mécanisme associé est décrit en **Figure 31a**.

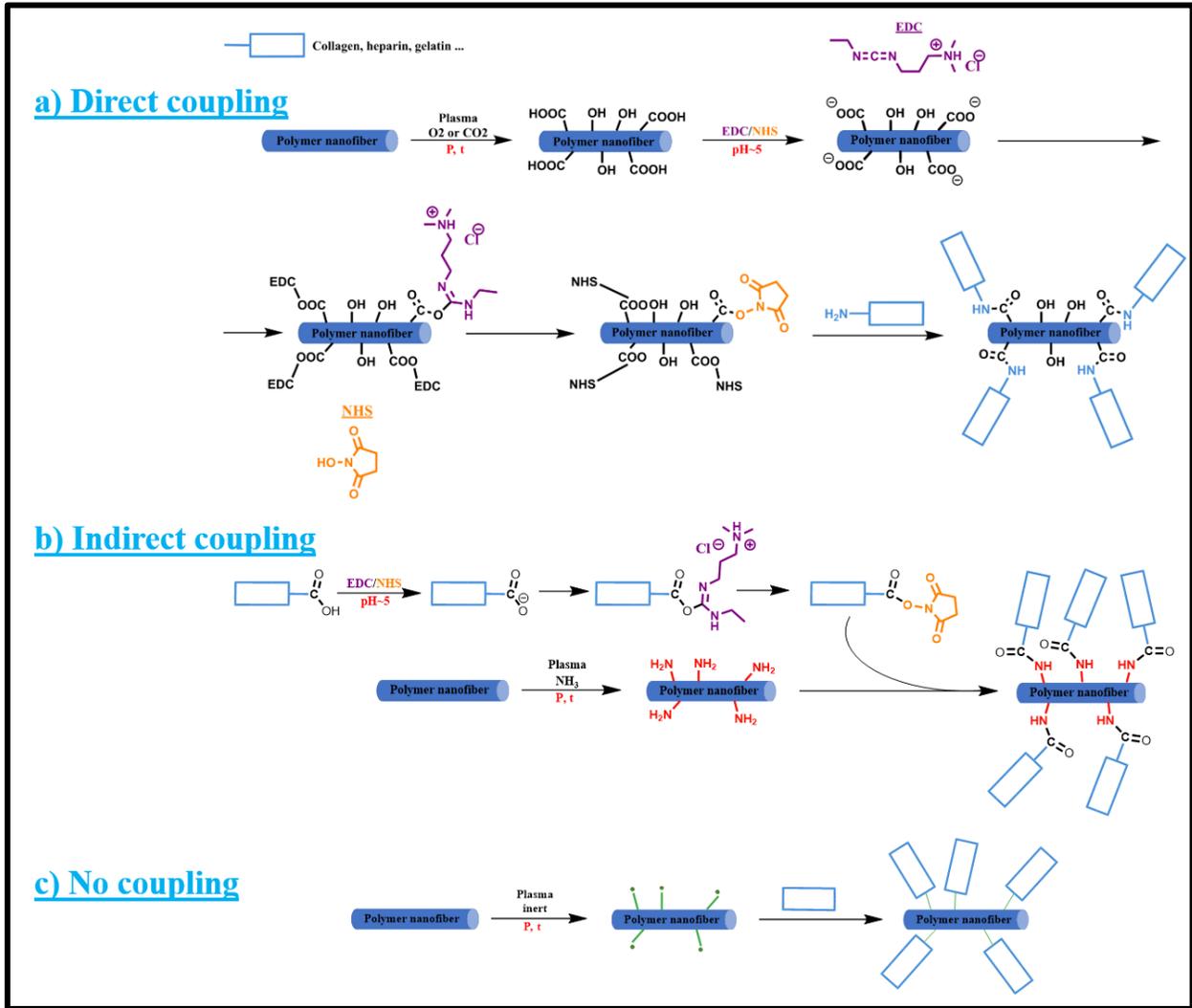


Figure 31: Mécanismes de greffage plasma par techniques “grafting onto” sur la surface des nanofibres. Les voies a et b nécessitent des agents de couplage en plus du traitement plasma à la différence de la voie c.

Dans un premier temps, un traitement plasma est réalisé de façon à créer des groupements acides carboxyliques à la surface des nanofibres. Ensuite, l'échantillon est immergé dans une solution à $\text{pH} \sim 5$ d'agents de couplage comme le 1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS). L'EDC permet la formation d'espèces O-acylisoucarbamide instables qui vont directement réagir avec NHS pour former une espèce réactive aux amines NHS-ester semi-stable. Ces échantillons sont enfin immergés dans une solution de peptides, dans laquelle les groupements amines des peptides vont réagir avec l'ester semi-stable précédemment formé pour obtenir une liaison amide stable^{268–270}. D'autre part, il est intéressant de noter qu'il est possible de procéder à cette

fonctionnalisation par traitement plasma avec un **couplage indirect**. En effet, les polymères contenant des acides carboxyliques, comme l'héparine, réagissent avec le couple EDC/NHS et ensuite, les nanofibres traitées par plasma sont immergées dans cette solution contenant EDC/NHS/ acide carboxylique (**Figure 31b**)²⁵¹.

Il existe une autre voie pour greffer des peptides à la surface des nanofibres par plasma **sans agent de couplage** en accord avec un mécanisme présumé détaillé en **Figure 31c**^{253,259}. Il est important de noter que le gaz utilisé pour le traitement plasma influence de façon importante le procédé. En effet, pour le couplage direct, O₂ et CO₂ sont préférés pour créer des fonctions acides carboxyliques. Pour le couplage indirect, les gaz NH₃ sont utilisés pour obtenir des fonctions amines à la surface des nanofibres. Dans le cas où aucun agent de couplage n'est utilisé, un gaz inerte, comme l'argon, est nécessaire pour former des radicaux de surface. Par exemple, Wang *et al.* ont étudié le greffage plasma de l'héparine sur des nanofibres de fibroïne de soie sans agent de couplage pour des applications en ingénierie tissulaire²⁵³. Ils ont montré que, lors d'un traitement plasma de 1 minute à 90 W, l'efficacité de greffage était trois fois plus élevée que pour les nanofibres non traitées et que cette efficacité augmentait avec le temps de plasma jusqu'à plus de 5 minutes. Cependant, l'efficacité de greffage diminue pour 7 minutes de traitement. Les auteurs avancent le fait que le traitement plasma crée un équilibre entre la formation et la consommation d'espèces réactives. En effet, pour 5 minutes de traitement, la quantité d'espèces réactives atteint une valeur maximale ; au-delà ou en deçà de ce temps de traitement, la quantité de ces espèces diminue. Dans une autre étude, pour des applications vasculaires, Ghorbani *et al.* ont comparé un système bicouche de nanofibres de PU et gélatine/héparine avec des nanofibres de PU traitées par plasma puis greffées avec de l'héparine et de la gélatine et ont étudié l'effet de ces deux méthodes sur le relargage d'héparine²⁵². Ils ont démontré que, grâce au traitement plasma, la vitesse de biodégradation des nanofibres est plus élevée que celle du matériau bicouche à base de nanofibres de polyuréthane/gélatine-héparine. Ainsi, la libération d'héparine est mieux contrôlée que pour les matériaux bicouches.

Concernant le greffage de collagène sur des matériaux nanofibreux, de nombreuses équipes ont observé une augmentation de la biocompatibilité, de la prolifération et de l'adhérence cellulaire sur ces matériaux²⁶⁰⁻²⁶². Une autre caractéristique apportée par le greffage

de collagène est la modification de l'hydrophilie des membranes nanofibreuses. En effet, il a été décrit dans la littérature que le traitement plasma entraîne une modification de l'hydrophilie pendant une période spécifique, suivie d'un réarrangement des groupements polaires présents en surface²⁷¹. Cependant, après un greffage de collagène, l'angle de contact de l'eau est plus élevé que dans le cas de nanofibres seulement traitées par plasma, mais reste deux fois plus faible que dans le cas de nanofibres non traitées, et cette valeur a la particularité de rester constante avec le temps. Il est intéressant de noter que Heidari-Keshel *et al.* ont mis en lumière la création de la liaison amine qui a lieu pendant le greffage par couplage direct²⁶². En effet, lors de l'analyse du spectre infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) de nanofibres de polyhydroxybutyrate (PHB) traitées par plasma, l'apparition d'une bande d'élongation à 3324 cm^{-1} , correspondant aux acides carboxyliques ainsi qu'aux groupements hydroxyles, a été mise en évidence. Après le greffage de collagène, cette bande disparaît et une autre bande, relative aux amides II, apparaît à 1570 cm^{-1} . Ces résultats prouvent la consommation des groupements acides carboxyliques en faveur de la création de groupements amides, ce qui correspond au mécanisme de greffage par couplage direct. La même équipe a également prouvé que l'augmentation de la biocompatibilité, de la prolifération et de l'adhérence cellulaire de ces matériaux greffés par du collagène est due à la présence d'amas de peptides qui jouent le rôle de ligand du récepteur intégrine et promeuvent l'adhérence cellulaire.

Enfin, Shao *et al.* ont étudié le traitement plasma basse pression d'hélium de nanofibres de poly(butylène carbonate) (PBC) de façon à greffer de la gélatine, à travers un mécanisme de greffage sans couplage²⁵⁹. Ils ont montré que, pour une puissance de plasma comprise entre 20 et 80 W, l'angle de contact de l'eau diminue rapidement et la vitesse d'absorption de la goutte augmente rapidement. Cependant, pour une puissance de plasma supérieure à 100 W, ces vitesses caractéristiques commencent à diminuer. En effet, le traitement plasma entraîne trois modifications différentes à la surface des matériaux traités : la gravure plasma (modification physique), la réticulation de surface et la modification chimique. Cependant, seules les deux dernières modifications entraînent une augmentation de l'hydrophilie et, pour une puissance de plasma élevée, la gravure plasma peut devenir la modification prédominante aux dépens des

deux autres, ce qui peut ainsi causer une diminution de la mouillabilité. Il est intéressant de noter que les mêmes observations ont été faites avec une augmentation du temps de plasma.

A notre connaissance, aucune étude comparative n'a été rapportée sur ces trois méthodes de couplage par traitement plasma de nanofibres ni sur leurs effets sur les propriétés de ces nanofibres. Cependant, la voie n'utilisant pas d'agent de couplage semble être la meilleure en raison de l'absence de produit secondaire (l'extraction des agents de couplage n'est pas nécessaire).

II.c.iii.2. Greffage moléculaire

En termes de plasmas froids, les plasmas atmosphériques et basse-pression présentent des caractéristiques différentes, en particulier en raison de la différence de températures de traitement. De ce fait, Kedroňová *et al.* ont comparé les effets d'un traitement plasma atmosphérique multi-jet avec celui d'un plasma basse pression par couplage capacitif (LP CCP) d'argon sur le greffage d'hexaméthylènedisiloxane (HMDSO) sur des nanofibres de PVA et de PA-6 pour différentes applications comme la filtration ou les biomatériaux²⁵⁸. Ils ont d'abord observé que la puissance du plasma atmosphérique ne peut pas être significativement modulée à cause de la chaleur localisée en sortie des jets, ce qui dégrade de façon importante les nanofibres. Cependant, une grande puissance, causant une dégradation importante du HMDSO (plus d'énergie est dispersée dans ce précurseur), ainsi qu'une bonne affinité du silicium et de l'oxygène, mènent à la création d'espèces volatiles constituées des groupements méthyles de l'HMDSO pendant le traitement plasma, et donc au greffage de motifs -O-Si-O- sur les nanofibres. De plus, pour les matériaux traités par plasma basse-pression, la structure finale est homogène et lisse, alors que pour les échantillons traités par plasma atmosphérique, la structure finale est dendritique et présente des films stratifiés en surface (**Figure 32**). Ceci est dû à la présence d'une plus grande quantité de précurseurs dans le cas du traitement plasma atmosphérique comparé au traitement basse-pression. Ainsi, le contact entre les nanofibres et le précurseur a plus de chance de se produire dans le premier cas et mène à la formation de ces films.

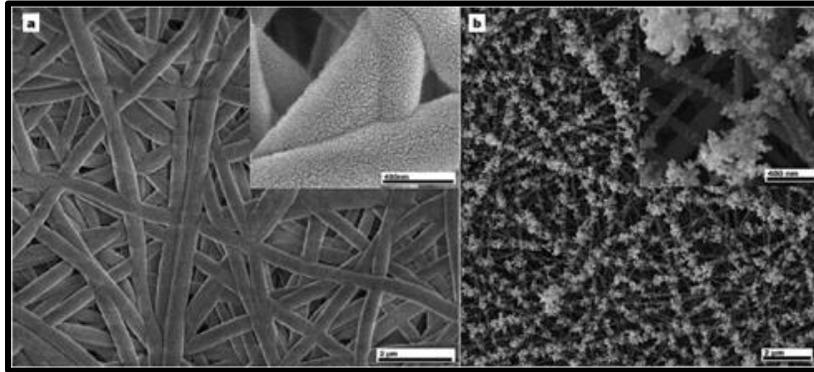


Figure 32: Images MEB de nanofibres de PVA ou de PA-6 couvertes par un film d'organosilicone par (a) plasma LP CCP ($p = 20$ Pa, $P = 100$ W) et (b) plasma atmosphérique multi-jet ($P = 10$ W/tête, $Q_{HDMSO} = 1.5$ sccm/tête)²⁵⁸.

II.c.iii.3. Polymérisation induite par plasma

En dehors du greffage par plasma²⁷², certains monomères peuvent être directement polymérisés à la surface des nanofibres (« grafting from »). Ce traitement, appelé PIGP (« Plasma Induced Graft-Polymerization »), combine l'utilisation d'un traitement plasma froid avec des monomères sous forme gazeuse ou liquide²⁷³⁻²⁷⁵. Par exemple, Manakhov *et al.* ont étudié les effets d'un recouvrement de nanofibres de PCL par un revêtement obtenu par plasma de carboxyle-anhydride, d'acétylène et d'amine sur la bioactivité du matériau final^{250,276}. Ils ont découvert que la formation de fonctions carboxyles à la surface des nanofibres permet d'améliorer la viabilité et l'adhérence des myoblastes comparé aux fonctions amines grâce à la présence de charges négatives. Cependant, dans une autre étude, Lee *et al.* ont montré que, pour la fonctionnalisation chimique par voie humide, la formation de fonctions amines mène à une meilleure adhérence des myoblastes et des fibroblastes que les fonctions carboxyles, en raison des interactions entre les charges positives des amines et les protéines ou les peptides RGD^{277,278}. Une hypothèse suggérée par Manakhov *et al.* est que, pour la chimie par voie humide, chaque couche fonctionnalisée est organisée et définie (en fonction du précurseur utilisé), alors que, pour le traitement plasma froid, la structure chimique des couches fonctionnalisées est plus complexe et contient une grande variété de groupes comme les amines, carboxyles ou anhydrides mais aussi imines, nitriles, hydroxyles par exemple. Ceci peut conduire à différentes interactions entre les couches traitées par plasma et les peptides RGD ainsi que les protéines. De plus, Permyakova *et al.* ont polymérisé l'anhydride maléique et l'éthylène (C_2H_4) à la surface de nanofibres de PCL de manière à immobiliser la gentamicine²⁶³. Grâce à ce « polymère-plasma », une grande quantité

de groupements acides carboxyliques réactifs ont été formés à la surface des nanofibres de PCL et ont permis un couplage direct pour greffer la gentamicine, utilisée pour ses propriétés antibactériennes. Dans une autre étude, Karahaliloglu *et al.* ont décrit le traitement plasma basse-pression d'argon de nanofibres de PHB et la formation d'un « plasma-polymère » contenant du polyéthylèneglycol (PEG) et de l'éthylènediamine (EDA) en surface de ces nanofibres²⁶⁴. Dans ce but, la chambre plasma était remplie d'argon et de monomères (EDA et éthylèneglycol). Des analyses de spectroscopie photo-électronique par rayons-X (XPS) ont montré une formation de liaisons C-N relative à la présence d'EDA, et une augmentation de la teneur en oxygène du matériau, ce qui démontre la présence de PEG. Ce « polymère-plasma » permet une bonne biocompatibilité et une bonne adhérence cellulaire grâce à la présence des fonctions amines de l'EDA qui interagissent avec les séquences peptidiques RGD des cellules. Le comportement cellulaire de certains « polymère-plasma » déposés à la surface de membranes nanofibreuses a aussi été étudié par Savoji *et al.*, qui ont traité des nanofibres de PET par différents plasmas pour la fabrication de prothèses vasculaires²³³. L'effet de deux plasmas a surtout été étudié sur le comportement cellulaire des HUVECs : (i) un plasma basse-pression (P = 10 W, t = 15 min, 80 Pa) avec des gaz éthylène (C₂H₄) et ammoniac (NH₃) pour obtenir des polymères plasmas riches en amines (traitement L-PPE:N), (ii) un plasma basse-pression (P = 200 W, t = 1 à 5 min, 133,3 Pa), généralement utilisé pour éliminer de la matière organique, avec deux types de gaz (O₂ pur ou CF₄ (20%)/O₂)(appelé traitement « Asher »). En ce qui concerne la prolifération et l'adhérence cellulaire, après 24h de culture, les membranes traitées par le plasma Asher (O₂, 5 min) montrent les mêmes résultats que les échantillons sans traitement. Cependant, après 7 jours de culture, les résultats sont améliorés pour les échantillons traités par plasma par rapport aux échantillons non traités, comme il était attendu du fait des propriétés de surface qui influencent le comportement cellulaire (hydrophilie, fonctions oxygénées, rugosité de surface). En comparaison, les membranes traitées par le plasma L-PPE:N démontrent de plus grandes adhérence et prolifération cellulaires dès le premier jour comparativement aux échantillons non-traités, contrairement aux membranes traitées par plasma Asher. Les revêtements plasmas permettent une meilleure culture cellulaire en raison de l'activité de surface, mais aussi grâce à la présence de fonctions amines primaires qui interagissent avec les cellules. La résistance des cellules au

cisaillement laminaire a ensuite été étudiée sur les échantillons traitées par plasma L-PPE:N et recouverts de cellules, de façon à mimer le passage du sang à travers les vaisseaux. Les résultats ont montré une plus grande résistance au stress laminaire des échantillons traités comparés aux échantillons de contrôle avec une quantité de cellules viables de $70 \pm 4\%$ pour les échantillons traités contre $30 \pm 10\%$ pour les non traités. Ces résultats démontrent, une fois de plus, non seulement l'importance de la fonctionnalisation des nanofibres avec des fonctions hydrophiles de façon à améliorer le comportement cellulaire, mais également la nécessité de trouver un équilibre entre vitesse de fonctionnalisation et biocompatibilité à travers l'optimisation des paramètres du plasma.

II.c.iii.4. Hydrophobisation

Dans la majorité des cas décrits précédemment, le traitement plasma froid des nanofibres est utilisé pour augmenter l'hydrophilie des matériaux. Cependant, pour certaines applications biomédicales, il est au contraire intéressant d'augmenter leur hydrophobie. En effet, les surfaces hydrophobes empêchent la prolifération et l'adhérence cellulaire. De plus, en particulier pour le traitement des affections osseuses, il est important de combattre l'invasion de tissus mous de manière à permettre le développement de cellules ostéogéniques et ainsi retrouver une structure osseuse convenable^{279,280}. Kwon *et al.* ont développé une membrane nanofibreuse de fibroïne de soie traitée par plasma froid hydrophobisant sur une face, en utilisant CF_4 comme gaz, de façon à guider la régénération osseuse comme illustré en **Figure 33**^{265,266}.

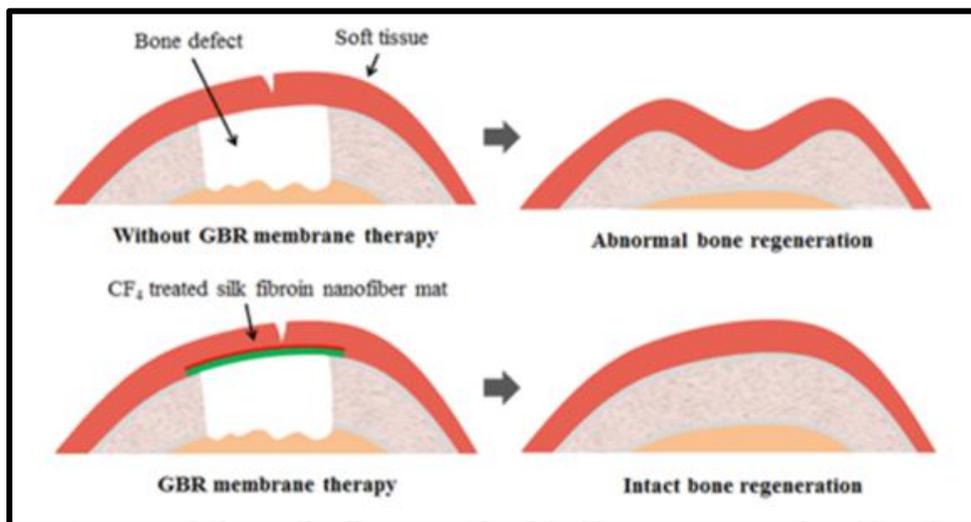


Figure 33: Représentation schématique de la thérapie guidée de régénération cellulaire²⁵⁵.

Ils ont d'abord observé qu'une augmentation de la puissance de plasma mène à une augmentation de l'hydrophobie. En effet, pour un plasma CF_4 de 100 s, l'angle de contact de l'eau était de $116 \pm 3^\circ$ pour une puissance de 10 W et de $137 \pm 5^\circ$ pour 50 W, comparé à $100 \pm 2^\circ$ sans traitement plasma. Cependant, les mêmes résultats n'ont pas été obtenus lorsque le temps de plasma a été augmenté. Pour une puissance constante de 50 W, une augmentation de 5° de l'angle de contact a été observée de 100 à 600 s de traitement. Comme attendu, les nanofibres traitées par un plasma de gaz CF_4 empêchent l'adhérence et la prolifération des fibroblastes au cours des tests *in vitro*. Des essais *in vivo* ont aussi été réalisés et les nanofibres de fibroïne de soie traitées par plasma CF_4 ont montré une activité barrière à l'invasion de tissus mous dans la zone de défaut osseuse, et ce sans empêcher la régénération des tissus osseux. Les résultats ont démontré une régénération osseuse de $9.4 \pm 4.2\%$ pour les échantillons de référence contre $16.9 \pm 3.1\%$ pour les membranes traitées par plasma après 4 jours d'implantation dans des crânes de lapin. Une régénération de $11.8 \pm 9.3\%$ a également été observée pour les échantillons non traités contre $19.4 \pm 1.0\%$ pour les membranes traitées par plasma après 8 jours d'implantation. Ces résultats montrent une reconstruction rapide (deux fois plus rapide après quatre semaines) et une distribution homogène (réduction substantielle de l'écart-type) grâce au traitement plasma.

II.c.iii.5. Réticulation

Le traitement plasma froid peut aussi être utilisé pour engendrer une réticulation à la surface des nanofibres. Par exemple, Liguori *et al.* ont décrit la réticulation de nanofibres de gélatine par traitement plasma froid atmosphérique en utilisant ou non un agent de réticulation (génipine) de manière à améliorer leur stabilité²⁵⁷. En effet, sans agent de réticulation, un traitement plasma de 20 minutes mène à une conservation de la structure nanofibreuse après immersion dans une solution aqueuse, ce qui n'est pas observé après 5 minutes (dissolution de la membrane) ou après 10 minutes (formation d'un film) de traitement. En parallèle, lorsque la génipine est utilisée comme agent de réticulation, la membrane conserve sa structure nanofibreuse après seulement 10 minutes de traitement plasma. Etant donné que la réticulation de la gélatine a lieu à 55°C ¹⁷⁵, elle ne peut pas être attribuée à la température dans le cas du traitement plasma froid étant donné qu'elle varie seulement de 23 ± 1 à $31 \pm 2^\circ\text{C}$. Les auteurs ont mentionné l'idée que les composés actifs provenant du plasma (électrons, ions, radicaux,

radiation UV) peuvent favoriser la réticulation. En effet, il a été décrit dans plusieurs études que les radiations UV mènent à la réticulation de la gélatine et peuvent aussi générer des radicaux sur les noyaux aromatiques de certains acide-aminés de la gélatine et du collagène^{281,282}. Les électrons peuvent aussi créer des radicaux directement sur les chaînes de polymères et amorcer la réticulation. De plus, la comparaison des spectres ATR-FTIR des échantillons traités ou non par plasma démontre l'apparition, après traitement plasma, d'une bande entre 1300 et 1180 cm^{-1} relative aux amides III (élongation C-N et déformation N-H). Ces résultats montrent que la quantité de liaisons hydrogène augmente avec le traitement plasma, ce qui explique partiellement l'augmentation de la stabilité. Dans une autre étude, Padil *et al.* ont effectué une réticulation par traitement plasma basse-pression oxygéné de nanofibres à base de PVA/anhydride dodécénylsuccinique (DDSA)/gomme de Kondagogu pour une activité antibactérienne²⁶⁷. En accord avec la littérature, ils ont d'abord observé un effet contradictoire du traitement plasma sur les propriétés antibactériennes de ces nanofibres. Premièrement, l'augmentation de l'hydrophilie après traitement mène à une diminution de l'adhérence bactérienne, en raison de leur affinité pour les surfaces hydrophobes^{283,284}. Cependant, l'augmentation de la rugosité de surface due au traitement plasma favorise l'adhérence bactérienne²⁸⁴. Néanmoins, les auteurs ont observé des effets antibactériens plus importants (contre *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*) pour les échantillons réticulés par plasma comparé aux membranes non traitées, grâce au DDSA et à la gomme de Kondagogu.

II.c.iv. Autres effets du traitement plasma

II.c.iv.1. Propriétés mécaniques

L'impact des traitements plasmas sur les propriétés mécaniques des matériaux nanofibreux utilisés dans le domaine biomédical est un point important à considérer. Il est intéressant de noter que le type de plasma appliqué (atmosphérique, basse-pression, radiofréquence, micro-ondes etc...) affecte de façon particulière les propriétés mécaniques finales des membranes en nanofibres. Cinq propriétés mécaniques importantes sont essentiellement étudiées dans la littérature, à savoir la résistance à la traction, l'élongation à la rupture, le module d'Young, l'effort à la traction et le module de compression. Les paramètres mécaniques des nanofibres sont plus ou moins influencés par les traitements plasmas froids,

particulièrement en fonction de la nature du polymère étudié. Le paramètre mécanique le plus décrit est **le module d'Young**. Certaines études ont démontré que le traitement plasma atmosphérique n'affecte pas significativement ce paramètre, en particulier dans le cas de traitements plasmas d'O₂, d'Ar ou d'He de nanofibres de PCL ou de gélatine^{202,227,257}. Cependant, l'étude de Das *et al.* concernant le traitement plasma atmosphérique d'Ar ou d'O₂ de membranes nanofibreuses de PVA/CS, révèle une augmentation significative du module d'Young²³⁹. Ce phénomène est expliqué dans la littérature par la formation, à la suite du traitement plasma, de matrices hautement réticulées, grâce à l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène formées entre les espèces actives du plasma et les molécules²⁸⁵. Il est intéressant de noter que le type de gaz utilisé dans cette étude affecte l'augmentation du module d'Young. En effet, cette augmentation est supérieure de 34% pour le traitement d'argon et de 37% pour le traitement d'O₂ comparativement aux membranes non traitées. Ceci est dû à une plus grande formation d'espèces oxygénées sur les nanofibres traitées avec O₂, menant à une augmentation de la formation de liaisons hydrogènes. En parallèle, l'effet du traitement plasma dans des conditions basse-pression mène à une réponse totalement différente sur le module d'Young avec, là aussi, un effet important du gaz utilisé. En effet, dans le cas général, le traitement plasma froid basse-pression d'O₂ de nanofibres de polymères mène à une diminution du module d'Young^{204,215,233,286}, alors que des conditions similaires de plasma utilisant N₂ comme gaz mène à une augmentation de ce paramètre^{202,233}. Des résultats similaires ont été observés dans le cas de la polymérisation de surface de nanofibres par plasma²³³. En effet, Yan *et al.* ont étudié l'effet du gaz utilisé lors d'un traitement plasma basse-pression de nanofibres de PCL sur leurs propriétés mécaniques²⁰². Dans cette étude, le module d'Young des nanofibres de PCL a augmenté de 8.9 ± 2.2 MPa à 11.2 ± 0.9 MPa après 8 minutes de traitement plasma N₂+H₂. Cependant, aucune augmentation du module d'Young n'a été observée pour un plasma NH₃+O₂ de 8 minutes (9.3 ± 1.1 MPa) ou Ar+O₂ pendant 2 minutes (9.4 ± 2.2 MPa). Néanmoins, la modification de ces propriétés mécaniques n'est pas significative pour ces familles de paramètres plasma. Dans une autre étude, Latag *et al.* ont étudié l'impact de traitements plasmas Ar et O₂ sur les propriétés mécaniques de nanofibres de CS/PVA²⁸⁶. Les résultats ont montré que le module d'Young est significativement plus influencé par le traitement plasma d'O₂ que par le plasma d'Ar. En effet, la diminution du module d'Young

est 2,1 fois plus grande après un traitement plasma d'O₂ qu'après un plasma d'Ar. Les auteurs ont expliqué que cette diminution des propriétés est due à l'augmentation de la friabilité des matériaux en réponse au traitement plasma. Enfin, la présence d'un « polymère-plasma » sur la surface de nanofibres affecte également le module d'Young. Dans le but de le démontrer, Savoji *et al.* ont étudié trois types de plasma basse-pression (plasma de décharge lumineuse radiofréquence (RFGD) avec des gaz NH₃ et C₂H₄ ou Ar/O₂ ; un plasma Asher microondes avec un mélange O₂/CF₄) pour traiter des membranes de nanofibres de PET²³³. Ils ont montré que la formation du « polymère-plasma » sur la surface des nanofibres (RFGD avec NH₃ et C₂H₄) mène à une augmentation du module d'Young (34 ± 7 MPa) par rapport aux membranes non traitées (20 ± 6 MPa). En comparaison, la gravure plasma (RFGD avec Ar/O₂) et le plasma Asher (O₂/CF₄) mènent à une diminution du module d'Young.

Pour ce qui est de l'**élongation à la rupture**, le traitement plasma de nanofibres de polymères tend à faire diminuer ce paramètre, ce qui implique une augmentation de la rigidité. Ceci est valable pour tous les cas de modification de surface par plasma que ce soit la formation d'un « polymère-plasma »²³³, la réticulation^{239,257}, ou la gravure de surface^{202,203,214,233,286}. Par exemple, comme pour le module d'Young, la diminution de l'élongation à la rupture de nanofibres de CS/PVA traitées par plasma basse-pression est 1,6 fois plus importante pour un plasma d'O₂ que pour un plasma d'Ar²⁸⁶. Ceci est de nouveau expliqué par une augmentation de la friabilité du matériau. Cependant, une seule étude a démontré une augmentation non-significative de ce paramètre mécanique pour le traitement plasma atmosphérique d'He de nanofibres de PCL, en opposition à la littérature concernant d'autres polymères²²⁷.

Les deux propriétés de traction (effort et résistance) des nanofibres semblent être affectées de la même manière par le plasma de gravure. En effet, dans chaque cas, la gravure plasma mène à une diminution de l'**effort à la traction**^{202,215,233,286} et de la **résistance à la traction**^{203,214,215,233,286,287}. Il est aussi important de noter que, comme pour le module d'Young et l'élongation à la rupture, la diminution des propriétés de tension est plus importante après un plasma d'O₂ qu'après un plasma d'Ar (1,8 et 2,7 fois pour la résistance à la traction et l'effort à la traction respectivement). Latag *et al.* ont émis l'hypothèse que le plasma d'O₂ mène à de plus faibles propriétés de tension en raison des espèces créées par le plasma oxygéné qui sont plus

érosives que celles créées par l'argon, et ainsi plus de ruptures fibrillaires sont attendues²⁸⁶. Il est intéressant de noter que la formation d'un « polymère-plasma »²³³ ou la réticulation par plasma²⁵² entraînent une augmentation de la résistance à la traction. Ceci est probablement dû à la dégradation des nanofibres après le traitement plasma, ce qui entraîne une faiblesse des nanofibres. Cependant, dans ces cas, les nanofibres sont renforcées par la création de nouvelles liaisons. Néanmoins, aucune étude n'a été effectuée sur l'effet de la formation du « polymère-plasma » ou de la réticulation par plasma sur l'effort à la traction, mais, avec toutes ces observations, les résultats sont supposés être similaires à ceux obtenus pour la résistance à la traction.

Enfin, le dernier paramètre mécanique étudié dans la littérature est le **module de compression**, qui est toujours décrit comme diminuant après un traitement plasma de nanofibres^{218,219}.

A notre connaissance, il n'y a cependant aucune étude de la littérature qui traite de l'impact des modifications combinées du temps de plasma, de la puissance de plasma ou du gaz utilisé sur les propriétés mécaniques des nanofibres.

II.c.iv.2. Propriétés thermiques

En parallèle des propriétés mécaniques des nanofibres traitées par plasma, il est intéressant d'étudier les modifications des propriétés thermiques entraînées par le traitement plasma sur les membranes nanofibreuses. Pour illustrer cela, Latag *et al.* ont étudié l'effet d'un plasma basse-pression d'Ar ou d'O₂ sur les propriétés thermiques de nanofibres de PVA/CS²⁸⁶. Les analyses thermogravimétriques (ATG) montrent une augmentation de la température de dégradation que ce soit pour les échantillons traités par plasma d'O₂ ou par plasma d'Ar. Une étape supplémentaire a été observée seulement pour les échantillons traités par plasma d'O₂ à 352°C (perte de masse de l'ordre de 56%) qui correspond à la dégradation de polyènes, en raison de l'action érosive des espèces oxygénées qui entraîne l'oxydation des chaînes polymériques. Ces résultats démontrent que les traitements plasma (O₂ ou Ar) augmentent la température de dégradation des nanofibres de PVA/CS du fait de la gravure et de la réticulation induites par le traitement plasma. La température de transition vitreuse (T_g) observée par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) diminue de 68°C pour les échantillons non traités à 67°C pour ceux

traités par plasma d'Ar et à 65°C pour ceux traités par plasma d'O₂. Ce résultat est discutable quant à la faible diminution de la température de transition vitreuse, mais il a déjà été montré dans d'autres études que le traitement plasma mène à une réduction du réarrangement des chaînes, ce qui affecte directement la Tg²⁸⁸. Ils ont aussi observé une augmentation du point de fusion des nanofibres, de 208°C pour les non traitées à 214°C pour les membranes traitées (par Ar ou O₂). Ces observations sont expliquées par la réticulation des chaînes de polymères et par la création de fonctions oxygénées après le traitement plasma, ce qui décale la transition de phases vers les plus hautes températures. Enfin, ils ont observé que le taux de cristallinité décroît de 39% pour les membranes non traitées à 34% et 32% pour les échantillons traités par plasma d'Ar ou d'O₂ respectivement, et ce en raison de la capacité de gravure et d'ablation du plasma, ce qui engendre une matrice discontinue. De ce fait, le traitement plasma de nanofibres de polymères mène essentiellement à la modification de chaînes de polymères par leur dégradation, leur réticulation et leur réarrangement.

II.c.iv.3. Vieillessement des traitements plasma

Les traitements plasmas apportent de nombreuses propriétés intéressantes aux membranes nanofibreuses, cependant, il a aussi été reporté que les matériaux traités par plasma souffrent d'un manque de stabilité après un certain temps aussi décrit comme « un effet de vieillissement » dans la littérature^{214,227,257}. Ceci est par exemple décrit par Liguori *et al.* dans leur étude sur le devenir de nanofibres de gélatine traitées par plasma atmosphérique après 15 jours de conservation, suivi d'une immersion dans une solution de tampon phosphate (pH 7,4)²⁵⁷. Pour les membranes non traitées, la structure nanofibreuse est conservée après immersion. Cependant, pour les échantillons traités par plasma, une solubilisation partielle et une perte de la structure nanofibreuse sont observées après 15 jours de conservation suivie de l'immersion. L'immersion immédiate après le traitement plasma est recommandée pour éviter la perte de la structure nanofibreuse. En effet, après le temps de conservation, les radicaux générés par plasma et les sites actifs présents à la surface des nanofibres se recombinaient et entraînent cette perte de structure, alors que l'immersion immédiate dans la solution tampon permet de stabiliser les interactions entre ces espèces et empêche leur recombinaison. Dans une autre étude, Tucker *et*

al. ont observé l'effet de vieillissement d'un plasma APPJ sur des nanofibres de PCL²²⁷. Après le traitement plasma, la quantité de N, C et O sur la surface des nanofibres a augmenté, ce qui est confirmé par analyses XPS. Cependant, après une semaine de stockage, le pic correspondant à l'azote disparaît en raison de la recombinaison des fonctions créées par plasma à la surface des nanofibres (recombinaison des radicaux, peroxydes, réorientation des espèces fonctionnelles etc.). D'après Kim *et al.*, ces phénomènes de réorientation et de recombinaison restent encore peu clairs²⁸⁹. Dans certains cas, ces propriétés de vieillissement peuvent être avantageuses, en particulier pour les dispositifs biomédicaux pour lesquels il est généralement nécessaire d'obtenir une biodégradation des matériaux lorsque l'objectif de l'implant est atteint²¹³. Ceci est décrit par Asadian *et al.* dans leur étude sur le traitement plasma DBD de nanofibres de CS/PEO et l'effet du vieillissement dû au plasma et des gaz utilisés²⁹⁰. En effet, ils ont prouvé que le traitement plasma d'Ar mène à un plus faible effet de vieillissement comparé aux traitements He/NH₃ ou N₂, et ce en raison des conditions plus douces de traitement liées à l'utilisation de l'argon. Il est intéressant de noter que le traitement plasma N₂ entraîne une libération plus faible de PEO, du fait de la réticulation de la membrane, comparativement aux autres traitements.

III. Projet CAPSPIN (Cold Atmospheric Plasma and electroSPINning)

La recherche sur les implants de réfection pariétale est aujourd'hui tournée vers la fabrication de matériaux à propriétés biologiques pour éviter ou réduire les risques post-opératoires notamment les infections et adhérences. Ce type d'implant a pour vocation de rester implanté chez le patient pour le reste de sa vie, ce qui implique donc que les implants doivent être non ou partiellement biodégradables pour conserver des propriétés notamment mécaniques suffisantes pour remplir leur rôle sur le long terme.

Le projet CAPSPIN, financé par l'Agence Nationale de la Recherche sur un projet Jeune Chercheur Jeune Chercheuse (ANR JCJC), et soutenu par le pôle de compétitivité EuraMaterials, vise à développer un implant de réfection pariétale limitant au mieux les risques post-opératoires en utilisant les techniques de plasma et/ou d'electrospinning sur un implant déjà utilisé dans le traitement des hernies viscérales.

Les nanofibres de polymères biodégradables tels que le PLA et la PCL sont de plus en plus étudiées dans le domaine biomédical, notamment dans le cas de la fabrication d'implants résorbables ou partiellement résorbables. Malgré leur hydrophobie de surface notable, qui peut affecter négativement leur biocompatibilité, ils présentent de nombreux avantages en termes de contrôle de dégradation, et sont facilement modifiables par de nombreux traitements de surfaces.

Afin de réduire les risques d'adhérence et d'infections, deux types de monomères sont polymérisés dans ce projet, à savoir le polymère d'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique (AMPS) pour ses propriétés anticoagulantes²⁹¹ et le polymère de TBAEMA pour ses propriétés antibactériennes²⁹². En effet comme il a été décrit précédemment, le phénomène d'adhérence post-opératoire se produit à la suite d'une chaîne de réactions du corps et notamment pendant le phénomène de coagulation du sang. En effet, la transformation du fibrinogène en fibrine a lieu lors de la cascade de coagulations (**Figure 34**) dans la voie commune. Par ailleurs, l'AMPS et son polymère ont démontré un effet anti-coagulant proche de celui de l'héparine, molécule couramment utilisée aujourd'hui pour ses propriétés antithrombotiques^{293,294}. L'action du PAMPS sur la cascade de coagulation du sang n'est pas encore complètement élucidée, mais une étude de Paneva *et al.* a montré que ce polymère agit d'une part sur le temps de prothrombine (PT) qui est un témoin de la voie extrinsèque, mais aussi sur le temps de céphaline activée (« activated partial thromboplastin time » : aPTT) qui représente une action sur la voie extrinsèque²⁹⁴. Concernant le PTBAEMA, plusieurs études ont montré ses propriétés antibactériennes dues à la présence d'une fonction amine quaternarisable, mais, à notre connaissance, aucune étude sur son efficacité anti-infectieuse dans le cas du traitement de la hernie viscérale n'a été réalisée⁸⁰.

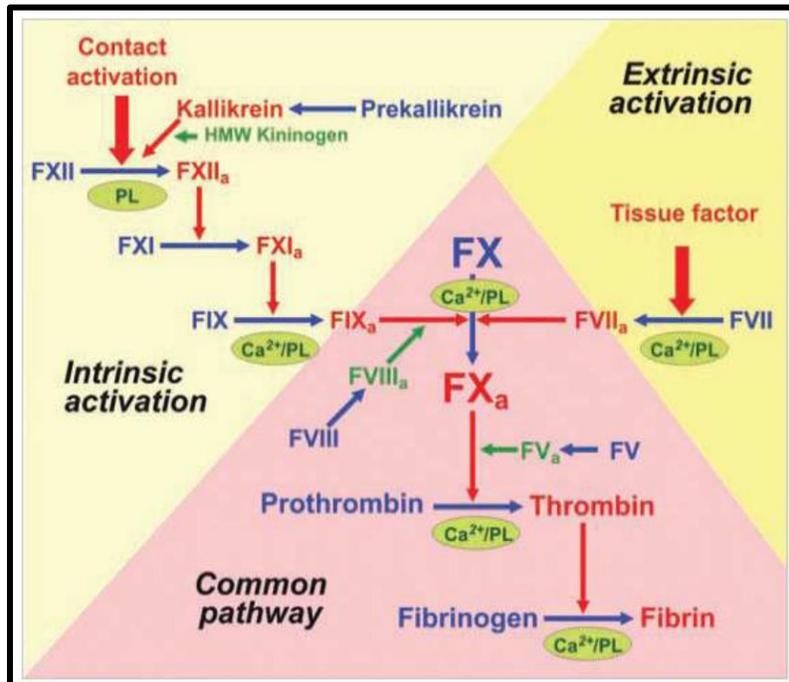


Figure 34: Schéma de la cascade de coagulation²⁹⁵

Deux voies ont été envisagées au cours de ces travaux. Elles diffèrent par leur méthode de fonctionnalisation : une voie en deux étapes basée sur l'électrospinning de polymères biodégradables post-fonctionnalisés par plasma froid pour conférer des propriétés bioactives (**voie electrospinning-plasma**); et une voie en une étape qui consiste en l'électrospinning coaxial de nanofibres bioactives avec un cœur en polymère biodégradable (**voie electrospinning coaxial**).

L'originalité de cette étude réside dans la limitation du nombre d'étapes chirurgicales et l'absence de réintervention par simple ajout de propriétés de contact à l'implant initial, en vue de limiter les risques d'adhérences et d'infections post-opératoires, ainsi que dans la combinaison des procédés plasma froid et electrospinning.

III.a. Voie electrospinning-plasma

La première étape de ce procédé (**Figure 35**) qui réside dans l'électrospinning de la PCL, sera optimisée en termes de paramètres procédés, solutions et environnementaux et les résultats seront évalués notamment par analyse de la morphologie des fibres obtenues. Ces nanofibres

seront ensuite traitées par plasma froid basse pression en vue d'activer leur surface (plasma d'activation), puis immergées dans une solution de monomères bioactifs et enfin traitées une seconde fois par plasma dans le but d'obtenir une copolymérisation greffante du monomère sur la surface des fibres (plasma de fonctionnalisation), ce qui constitue la deuxième étape du procédé. Le procédé plasma-immersion-plasma sera optimisé par un plan d'expérience. Après une étude de faisabilité avec l'acide acrylique (AA) comme monomère modèle, les deux monomères bioactifs, à savoir l'AMPS pour ses propriétés anticoagulantes et le TBAEMA pour ses propriétés antibactériennes, seront greffés et polymérisés. Différentes analyses physico-chimiques et structurales seront réalisées dans le but de caractériser ces membranes ainsi que l'efficacité du greffage. Les tests biologiques *in vitro* permettront d'étudier la cytocompatibilité des membranes nanofibreuses ainsi que leur bioactivité respective, à savoir l'activité anticoagulante pour les échantillons greffés par l'AMPS et l'activité antibactérienne pour ceux greffés par le TBAEMA. Enfin, des essais *in vivo* seront effectués pour les échantillons greffés par l'AMPS pour évaluer l'activité anti-adhérente de ces échantillons.

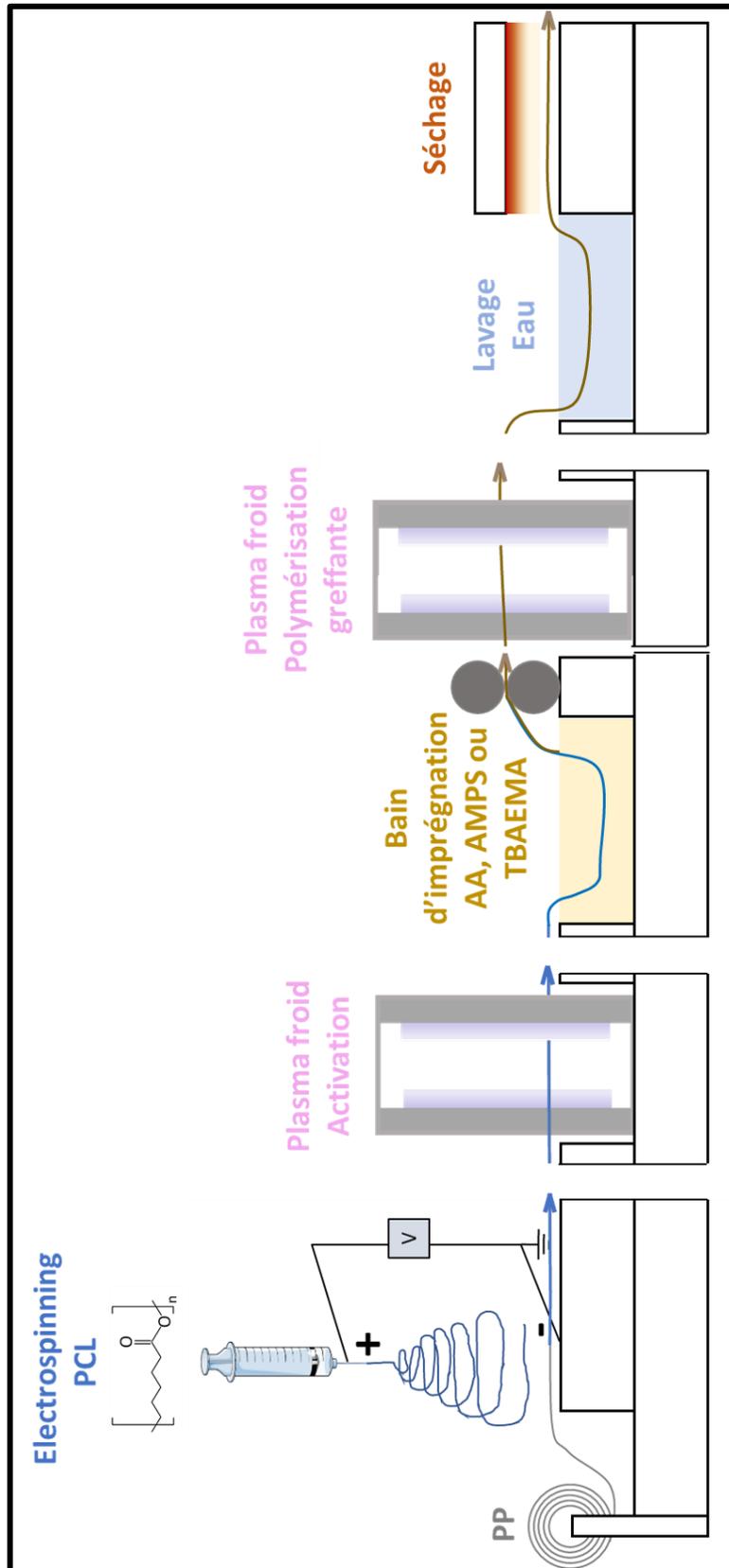


Figure 35: Schéma récapitulatif de la voie electrospinning-plasma

III.b. Voie electrospinning coaxial

Dans cette voie, le but est d'élaborer des nanofibres coaxiales avec un cœur en polymère biodégradable et une peau en polymère bioactif, et de les comparer avec les nanofibres obtenues selon la voie electrospinning-plasma. En effet, cette méthode pourrait mener à l'obtention de nanofibres avec des propriétés physico-chimiques, structurales et biologiques différentes.

Dans un premier temps, les homopolymères bioactifs seront synthétisés à partir des monomères AMPS et TBAEMA pour leurs propriétés anticoagulante et antibactérienne respectives. Ensuite l'electrospinning de ces polymères (**Figure 36**) sera optimisé séparément pour obtenir des nanofibres sans défaut. Enfin, l'electrospinning coaxial sera réalisé avec un cœur en polymère biodégradable (PCL), déjà optimisé dans la première voie, et une peau en polymères bioactifs PAMPS ou PTBAEMA. Les caractérisations physico-chimiques seront réalisées afin d'analyser ces fibres et de connaître leur tenue mécanique, leur vitesse de dégradation et leur tenue en milieu biologique. Comme dans la voie en deux étapes, des tests biologiques *in vitro* seront réalisés afin de connaître la biocompatibilité de ces membranes ainsi que leur bioactivité.

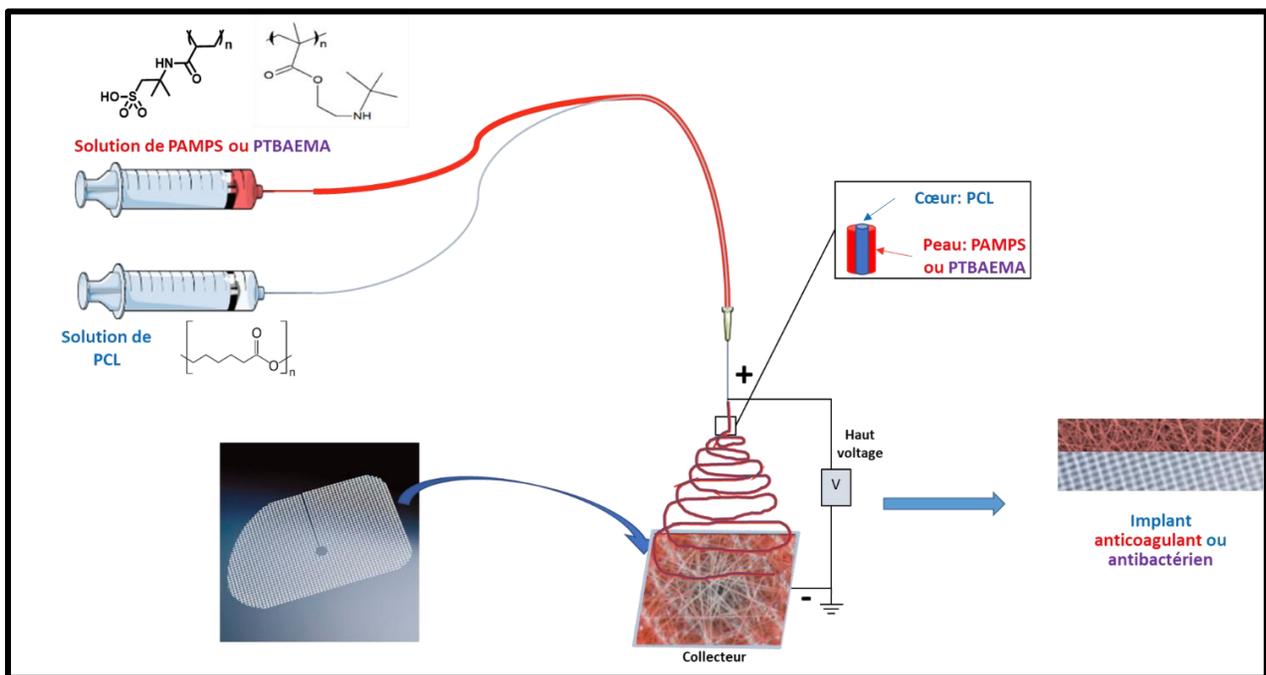


Figure 36: Schéma récapitulatif de la voie electrospinning coaxial

III.c. Comparaison des 2 voies

Pour ces deux voies de production d'implants bioactifs, l'activité envisagée se fera par contact avec les tissus et organes environnants. Pour la voie electrospinning plasma, les monomères bioactifs seront greffés et polymérisés à la surface des nanofibres de polymères biodégradables et pour la voie electrospinning coaxial, les polymères bioactifs correspondants seront électrofilés en peau pour pouvoir permettre ce contact avec les viscères ou la paroi abdominale selon l'effet recherché. La différence entre ces deux voies réside tout d'abord dans le fait que la fonctionnalisation ne se fera pas au même niveau. En effet, pour la première voie, les membranes nanofibreuses seront couvertes d'une couche fine greffée de polymères bioactifs (groupement fonctionnels dirigés vers la surface), alors que dans le deuxième cas, les nanofibres seront couvertes d'une peau de polymères bioactifs (groupements fonctionnels répartis en surface et en masse). Ainsi la surface spécifique de ces polymères bioactifs sera différente. De plus, les propriétés mécaniques et physiques des membranes greffées ou obtenues par voie coaxiale devraient différer, notamment en raison des effets du plasma sur ces propriétés. Les nanofibres fonctionnelles obtenues dans les deux voies devraient présenter un comportement et une activité biologique comparables, mais pouvant être légèrement affectés par l'état de surface des nanofibres suite aux procédés utilisés.

Deuxième partie : Matériels & méthodes

I. Elaboration de nanofibres fonctionnelles

I.a. Matériaux

I.a.i. Implant en PP

Dans l'ensemble des études de ce projet, un filet de PP déjà utilisé dans le traitement de la hernie viscérale sera utilisé comme support pour les nanofibres. Ce filet de PP provient de Cousin BioTech (Wervicq-Sud, France) et possède une porosité de $73 \pm 1\%$, une épaisseur de $0,25 \pm 0,13$ mm et une masse surfacique de 32 ± 4 g/m². Des échantillons de 30x16 cm² sont coupés puis lavés par méthode soxhlet d'abord à l'éthanol, puis à l'eau et de nouveau à l'éthanol (avec 3 cycles de lavage dans chaque cas). Cette étape de lavage est nécessaire pour supprimer tous les produits d'ensimage issus de l'usinage du filet. Toutes les caractéristiques détaillées du produit sont données en **Annexe 1**.

I.a.ii. Polymères biodégradables

Les polymères biodégradables utilisés sont la polycaprolactone (PCL) de masse molaire moyenne $\overline{M}_n \sim 80.000$ g.mol⁻¹ provenant de Aldrich Chemicals (Saint Quentin Fallavier, France), et le PLLA de masse molaire moyenne $\overline{M}_n \sim 200.000$ g.mol⁻¹ provenant de Evonik (Essen, Allemagne). Les structures chimiques de ces polymères sont décrites en **Figure 37**. Les solvants utilisés pour solubiliser ces polymères en vue de leur électrofilage (dichlorométhane, diméthylformamide, acide formique 95-97% et chloroforme) proviennent majoritairement de Acros Organics (Illkirch, France). L'acide acétique glacial (>99,8%) utilisé pour solubiliser la PCL provient de Honeywell (Seelze, Allemagne). Les résultats obtenus pour le PLLA seront présentés en perspectives, à la fin de ce document.

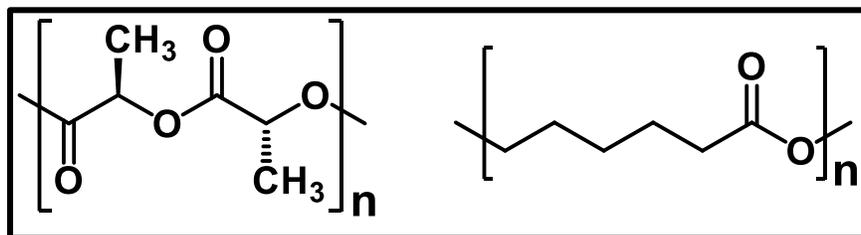


Figure 37: Structure chimique du PLLA (à gauche) et de la PCL (à droite)

I.a.iii. Monomères bioactifs

L'acide acrylique (99,5%) est utilisé comme monomère modèle pour démontrer la faisabilité du greffage par plasma sur des nanofibres de polymères biodégradables et provient de Acros organics (Illkirch, France). Les deux monomères bioactifs, à savoir l'AMPS et le TBAEMA, utilisés dans les deux voies de synthèse, proviennent tous deux de Aldrich chemicals (Saint Quentin Fallavier, France). Ces monomères sont représentés en **Figure 38**. Les caractéristiques physico-chimiques de ces monomères sont répertoriées en **Tableau 2**.

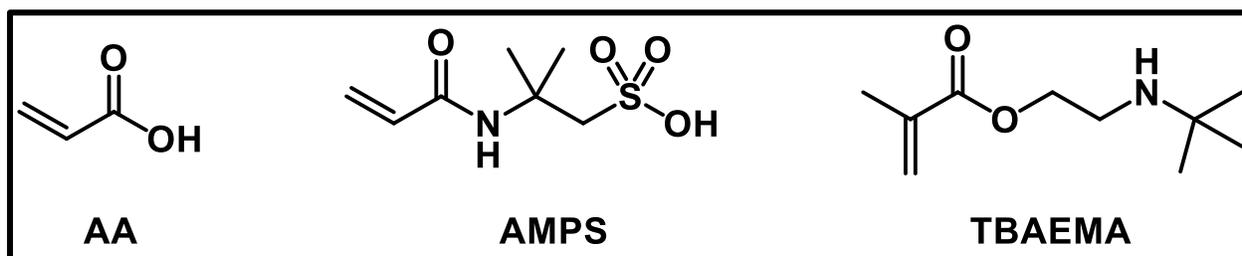


Figure 38: Structure chimique de l'acide acrylique (AA), de l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique (AMPS) et du méthacrylate de 2-tert-butylaminoéthyle (TBAEMA)

Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques des monomères bioactifs

	AA	AMPS	TBAEMA
<i>Température de fusion/ébullition</i>	14°C/141°C	195°C/-	-70°C/100°C
<i>Solubilité en milieu aqueux</i>	Miscible (100 g/100 g d'eau)	Miscible (150 g/100 g d'eau)	Partiellement miscible (1,8 g/100 g d'eau)
<i>Solubilité en milieu organique</i>	Miscible (acétone, DMF)	Soluble (DMF)	Miscible (EtOH)
<i>Densité</i>	1,05	1,45	0,91
<i>pKa</i>	4,25	1,70	9,0

I.a.iv. Polymères bioactifs

Les polymères bioactifs ont été utilisés dans la voie electrospinning coaxiale (voie 2) comme peau des nanofibres coaxiales. Ces polymères sont le PAMPS, le copolymère Poly(acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique-co-acide acrylique) (P(AMPS-co-AA)) et le PTBAEMA. Ces trois polymères ont été synthétisés directement au laboratoire à partir des monomères correspondants en suivant le protocole décrit par la suite.

I.b. Procédés

I.b.i. Appareil d'electrospinning

Dans un premier temps, l'electrospinning des solutions des différents polymères est réalisé à l'aide d'un appareil fabriqué au sein du laboratoire UMET (**Figure 39**).

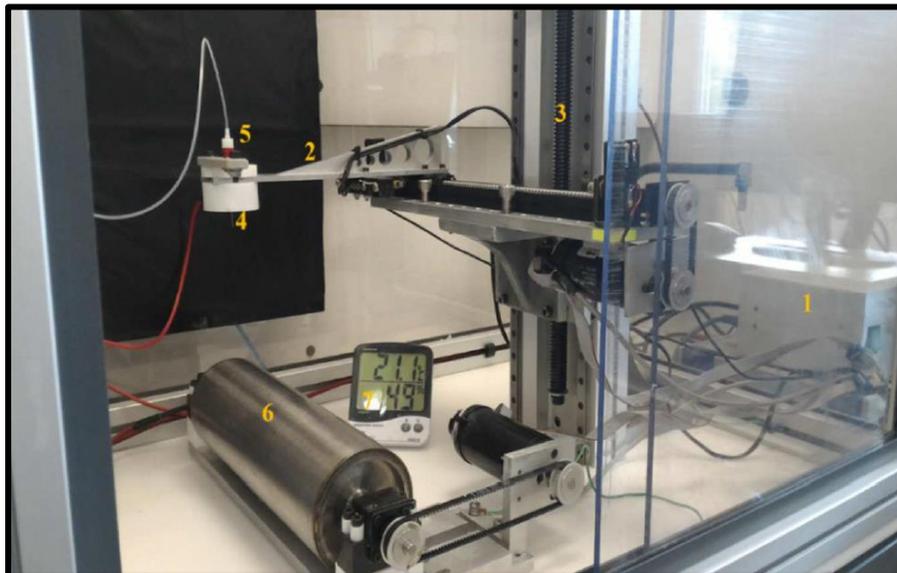


Figure 39: Photo du dispositif confectionné au laboratoire. (1) Vitre de protection, (2) bras pouvant se déplacer horizontalement pendant le procédé, (3) potence réglable en hauteur, (4) aiguille, (5) tubulure reliée à la seringue, (6) collecteur rotatif, (7) hygromètre-thermomètre.

Concrètement, cet appareil est constitué d'une potence réglable en hauteur reliée à un bras mécanique, sur lequel est fixé un support en téflon permettant de maintenir l'aiguille de 21 jauge (diamètre interne de 0,723 mm) (TERUMO, Guyancourt, France). Ce support est relié au pôle positif d'un générateur à haute tension (pouvant aller jusqu'à 25 kV). Au-dessous de ce bras

se trouve un mandrin rotatif jouant le rôle de collecteur qui est, quant à lui, relié au pôle négatif du générateur. L'aiguille est reliée à une seringue à l'aide d'une tubulure de diamètre interne 1 mm et de longueur 100 cm (volume mort de 1,1 ml) provenant de Vygon (Paris, France). La seringue est placée dans un pousse-seringue Fisher Scientific (Waltham, Etats-Unis). La potence permet de régler la distance aiguille-collecteur alors que le bras permet de déplacer la seringue pendant le processus. Le mandrin tourne à une vitesse fixe de 150 tr.min^{-1} et est déplacé de quelques centimètres par rapport à la projection de l'aiguille pour éviter la présence de goutte sur la membrane. Tout le système de mouvement du mandrin et du bras est relié à un ordinateur qui permet de contrôler les paramètres. La température ainsi que l'humidité relative sont évaluées par l'intermédiaire d'un thermomètre-hygromètre.

Un deuxième appareil est utilisé dans le cas de la mise en forme des membranes de PCL et de PLA après optimisation du procédé sur l'appareil précédemment présenté. Cet appareil est un semi-pilote FLUIDNATEK® LE-500 (Bioinicia, Espagne)(**Figure 40**). Dans ce système, toute la procédure est automatisée et les conditions environnementales sont contrôlées afin de favoriser la formation de fibres lisses et sans défaut.



Figure 40: Photo de l'appareil electrospinning LE-500 Fluidnatek provenant de Bioinicia

I.b.ii. Appareil plasma froid

L'appareil de plasma froid basse-pression utilisé pour la fonctionnalisation des nanofibres dans la voie electrospinning-plasma (voie 1) est une chambre de plasma basse pression de décharge RF Europlasma CDI1200-400 COMBI MC (radiofréquence 13,56 MHz) (**Figure 41**) dans laquelle le vide est poussé à 50 mbar avant injection des gaz dans l'enceinte. Différents paramètres sont modifiables : temps de traitement, puissance du plasma et débit des gaz.



Figure 41: Photo de l'enceinte plasma basse pression Europlasma.

I.b.iii. Protocoles de fonctionnalisation

I.b.iii.1. Voie 1 : electrospinning-plasma

➤ Première étape : electrospinning de la PCL.

La PCL est ajoutée à différentes concentrations (entre 7 et 12%wt) dans différents solvants, à savoir le CHCl_3 , le dichlorométhane (DCM), le DMF, l'acide acétique (CH_3COOH) ou l'acide formique (HCOOH), ou dans des mélanges de ces derniers. Ces solutions sont agitées à 150 rpm pendant 6h sur un agitateur orbital. La solution est ensuite prélevée par l'intermédiaire de la seringue et injectée dans l'aiguille *via* la tubulure à un débit contrôlé pouvant varier de 0,5 à 1,5 ml.h^{-1} . La distance aiguille-collecteur s'étend de 15 à 30 cm et le voltage varie de 13 à 19,5 kV suivant les paramètres. Les conditions environnementales n'étant pas contrôlées mais uniquement mesurées, des chiffres approximatifs seront donnés pour apporter une idée du comportement de l'electrospinning face à ces conditions. De ce fait, la température varie de 15 à 25°C et l'humidité relative de 20 à 80%. Dans un premier temps, seulement 0,1 ml de solution est électrofilée et les nanofibres sont récupérées sur une feuille de papier aluminium fixée sur le mandrin de façon à optimiser l'électrofilage de la PCL.

Pour les paramètres les plus prometteurs, le mandrin rotatif est recouvert d'une feuille d'aluminium, elle-même couverte d'un échantillon de 30x16 cm² de filet en polypropylène lavé par soxhlet. L'électrospinning est réalisé de façon à déposer 1 ou 2 ml de solution sur le collecteur. Les nanofibres sont déposées sur les deux faces de l'implant en PP en le retournant après un dépôt de 1 ou 2 ml puis en déposant la même quantité de nanofibres de l'autre côté.

- Deuxième étape : copolymérisation greffante des monomères bioactifs sur les nanofibres par plasma froid basse pression.

Des carrés de 3x3 cm² sont découpés à partir des membranes électrofilées et sont ensuite placés dans la chambre plasma, le gaz utilisé étant l'argon. Le flux d'argon, ainsi que le temps et la puissance de plasma, sont variés de façon à augmenter la mouillabilité de surface des membranes. A la fin du traitement plasma, la chambre est remplie durant 30 secondes d'air déshuilé et asséché. Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution aqueuse de monomère (AA, AMPS ou TBAEMA) à différentes concentrations allant de 10 à 50% en volume pendant des temps variant de 5 secondes à 5 minutes. Un foulardage des échantillons est réalisé après immersion de façon à retirer l'excès de solution (pression entre les rouleaux de 0,2 MPa, 1 passage). Les échantillons sont ensuite placés une nouvelle fois dans la chambre de plasma. Les trois mêmes paramètres (flux, temps et puissance) sont variés de façon à optimiser le greffage du monomère sur la surface des nanofibres. Enfin, les échantillons sont lavés dans un bain d'eau de 200 ml pendant 5 minutes à 48 h, puis séchés dans une étuve à 40°C sous vide pendant 8 h.

La concentration de la solution d'immersion pour les monomères bioactifs (AMPS et TBAEMA) ainsi que les paramètres du deuxième traitement plasma sont optimisés à l'aide d'un plan d'expérience utilisant la méthodologie de réponse de surface (RSM) et décrit ci-après.

L'influence de trois paramètres principaux du procédé de traitement est étudiée : la puissance et le temps de plasma, ainsi que la concentration de monomère (AMPS ou TBAEMA) dans la solution d'immersion. Un plan composite centré, constitué de 17 expériences, est réalisé et composé de la façon suivante :

- Les 8 premières expériences correspondent à un plan factoriel complet à 2 niveaux 2^k, avec k le nombre de variables étudiées (3 dans ce plan d'expérience).

- Les 6 expériences suivantes (2xk) sont les points axiaux à une distance $\alpha = 1,68$ du plan central.

- Enfin, 3 expériences sont répétées pour le point central.

Les expériences sont conduites de façon aléatoire pour éviter les facteurs extérieurs qui peuvent affecter la réponse mesurée. Pour les calculs statistiques, les variables U_i sont codées comme X_i en accord avec l'Equation 1 :

$$X_i = \frac{(U_i - U_0)}{\Delta U} \quad \text{Equation 1}$$

avec X_i la valeur codée sans dimension de la variable U_i ; U_0 représente la valeur de U_i au point central et ΔU est le pas.

Les valeurs expérimentales associées aux niveaux de codes des différentes variables sont données en **Tableau 3**.

Le modèle quadratique pour prédire les conditions optimales est exprimé en accord avec l'Equation 2 :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 \quad \text{Equation 2}$$

avec Y la variable-réponse considérée, β_0 est la valeur de la réponse ajustée au point central, β_i , β_{ii} et β_{ij} correspondent respectivement aux termes d'interaction linéaire et quadratiques.

Tableau 3: Valeurs réelles et codées des paramètres expérimentaux utilisés pour le plan central composite (CCD)

Variables codées	Paramètre	Niveau				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1	U_1 , puissance de plasma (W)	50	70	100	130	150
X_2	U_2 , temps du traitement plasma (s)	60	80	100	140	160
X_3	U_3 , concentration en AMPS ou TBAEMA (g, eau qsp 10g)	1	1.4	2	2.6	3

I.b.iii.2. Voie 2 : electrospinning coaxial

Les solvants utilisés pour les réactions de synthèse des polymères bioactifs (PAMPS ou PTBAEMA) dans la voie electrospinning coaxial (dioxane, DMF) proviennent de Acros Organics

(Illkirch, France). Les monomères, décrits en **Figure 38**, utilisés dans ces synthèses possèdent des doubles liaisons carbone-carbone et polymérisent facilement par réaction radicalaire à l'aide d'un amorceur. Dans notre cas, l'amorceur utilisé est l'azobisisobutyronitrile (AIBN) provenant de Aldrich Chemicals (Saint Quentin Fallavier, France).

La polymérisation de l'AMPS est réalisée dans deux types de solvants différents (**Figure 42A**) de façon à obtenir un homopolymère d'AMPS : le PAMPS. Pour la **première synthèse**, 8,52 g d'AMPS sont dissous dans 19,52 ml de **DMF** dans un ballon de 100 ml sous agitation. Le ballon est ensuite couvert d'un septum et un flux d'azote est appliqué pour retirer un maximum d'oxygène pouvant affecter la réaction de polymérisation radicalaire. Le mélange est ensuite chauffé à 60°C. Parallèlement, l'AIBN est dilué dans 2 ml de DMF puis ajouté au mélange après mise à température. Le temps de réaction de 24 h démarre dès l'ajout de l'AIBN. Une fois la réaction terminée, le brut réactionnel est précipité dans 1 L d'acétone puis le solide est placé dans une étuve sous vide à 60°C pour évaporer le solvant restant. La **deuxième synthèse** est réalisée de la même manière mais avec 45 ml d'un mélange **eau/dioxane (2/8)** comme solvant de réaction. Cependant, dans cette synthèse, le pH de solution est préalablement contrôlé de manière à être autour du pKa de l'AMPS ($pK_a \sim 1,5$). Pour cela, quelques gouttes de solution de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ sont ajoutées au mélange. Enfin, une fois la réaction terminée, la purification est réalisée en suivant le premier protocole.

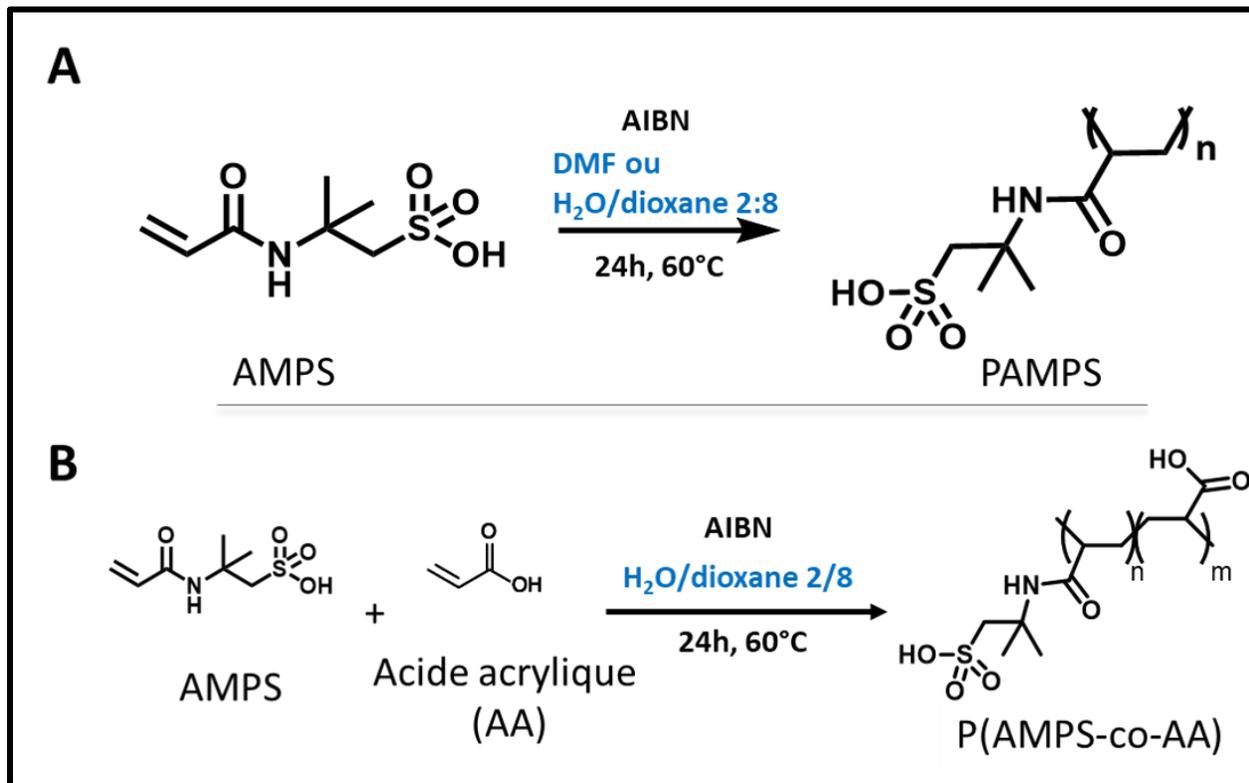


Figure 42: Schéma de synthèse (A) du PAMPS et (B) du P(AMPS-co-AA)

Des copolymères d'AMPS et d'AA (P(AMPS-co-AA)) avec différentes proportions d'AMPS/AA (allant de 1:2 à 2:1) (**Figure 42B**) ont également été synthétisés. Pour réaliser cette synthèse, le deuxième protocole sera suivi en remplaçant seulement une partie de l'AMPS par une même masse d'AA et le pH de solution sera augmenté jusqu'à 4,25 (pKa de l'acide acrylique) par ajout d'une solution de NaOH à 0,1 mol.L⁻¹.

La masse molaire viscosimétrique M_v du PAMPS a été calculée à partir des valeurs de viscosités intrinsèques mesurées à l'aide d'un viscosimètre Ubbelohde n°531-10/I avec un capillaire de diamètre 0,63 mm et en utilisant une solution de NaCl 5N comme solvant à 25°C. Les paramètres de Mark-Houwink du PAMPS dans ce solvant ont été décrits dans la littérature comme étant $\alpha = 0,80$ et $K = 2,11 \times 10^{-5} \text{ g/dL}^{296}$. Les droites représentant la viscosité intrinsèque en fonction de la concentration en polymère de la solution (dmf-PAMPS ou ed-PAMPS) sont répertoriées en **Annexe 2**.

Le monomère TBAEMA est polymérisé suivant le protocole décrit par Sosna *et al.*²⁹⁷. Dans un ballon surmonté d'un septum, 90 ml de TBAEMA sont mélangés dans 180 mL d'éthanol à 70°C

sous un flux d'azote. Ensuite, 0,745 g d'AIBN dissous dans 20 ml de Methylether ketone (« MEK ») provenant de Aldrich Chemicals (Saint Quentin Fallavier, France) sont ajoutés goutte à goutte sous agitation. Après 72 h de réaction, le brut réactionnel est précipité dans 1 L d'eau distillée. Le précipité est ensuite filtré sur Büchner et séché dans une étuve sous vide à 70°C.

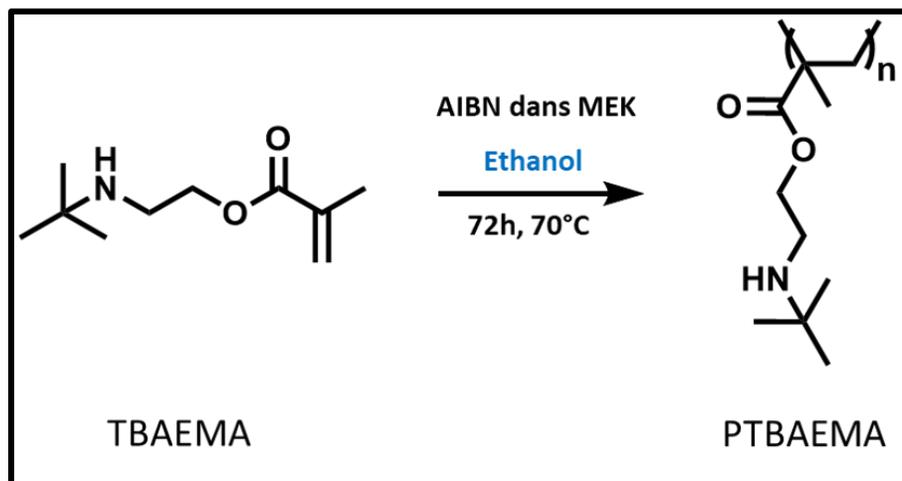


Figure 43: Schéma de synthèse du PTBAEMA

Le PAMPS ainsi que les différents P(AMPS-co-AA) ont été électrofilés via l'appareil d'electrospinning élaboré au laboratoire et en utilisant le collecteur rotatif. Les paramètres de solution, de procédé et environnementaux ont été optimisés de manière à obtenir des nanofibres sans défauts. Lors de certains essais, des polymères non-ionogéniques, comme le PEO ou la PVA, ont été ajoutés aux solutions à électrofiler de manière à contrecarrer les forces de répulsion entre les groupements ionogéniques dans les polyélectrolytes (comme les groupements sulfonates du polyAMPS ou son copolymère avec l'AA) qui peuvent gêner la formation de nanofibres continues²⁹⁸. Concernant l'optimisation des paramètres de solution, différentes concentrations de polymère dans différents solvants ont été utilisées, à savoir le solvant réactionnel (DMF), un mélange eau/éthanol 5:5, l'eau pure et le mélange acide formique/acide acétique 5:5 (AFA5/5). Pour ce qui est des paramètres de procédé, la distance est conservée à 20 cm et le même type d'aiguille que pour la PCL est utilisée. Les paramètres environnementaux ont été mesurés à chaque expérience afin d'estimer leur influence.

De la même manière que pour l'electrospinning du PAMPS, plusieurs solvants ont été utilisés afin d'obtenir des nanofibres de PTBAEMA. Ainsi, trois mélanges de solvants ont été

employés pour solubiliser le PTBAEMA à différentes concentrations : DCM/Acétonitrile 5:5, DMF/Acétate d'éthyle 5:5 et AFA 5/5. Les paramètres de procédé ont également été optimisés, notamment en termes de débit et de distance aiguille-collecteur. Enfin, les paramètres environnementaux ont été pris en compte dans chaque cas pour en estimer l'influence.

L'électrospinning coaxial a été réalisé afin d'obtenir des nanofibres de type cœur-peau avec un cœur en PCL et une peau en polymère bioactif (PAMPS ou PTBAEMA). Plusieurs concentrations différentes seront utilisées pour les solutions de peaux des nanofibres alors que la concentration optimale de PCL sera employée pour former le cœur des nanofibres. Tous les paramètres précédemment fixés seront conservés et seuls les débits de chaque solution seront modifiés pour en évaluer l'effet sur la structure cœur/peau. Pour cela, 2 pousses-seringues indépendants seront utilisés.

II. Caractérisations des échantillons

II.a. Caractérisations physico-chimiques

II.a.i. Microscopie électronique à balayage (MEB) et analyse dispersive en énergie (EDX)

La morphologie et le diamètre des nanofibres sont analysés avant et après chaque étape grâce à un MEB Flexsem 1000 Hitachi avec une tension d'accélération de 5 kV et un courant d'émission de 10 μ A. Les analyses EDX sont réalisées avec le même appareil et dans les mêmes conditions. Tous les échantillons sont préalablement métallisés avec une couche de carbone de 200 Å. Le diamètre des nanofibres est évalué par l'intermédiaire du logiciel ImageJ et les mesures sont faites sur 50 fibres.

II.a.ii. Microscopie électronique à transmission (MET)

La structure type cœur-peau des nanofibres coaxiales est étudiée et comparée à celle des nanofibres classiques grâce à un MET FEI Tecnai G2-20 twin équipé d'un filament LaB6 fonctionnant avec une tension d'accélération de 200 kV.

II.a.iii. Angle de contact de l'eau

L'évolution de la mouillabilité de surface, et donc de l'hydrophilie de surface, après traitement plasma est caractérisée par l'évolution de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur l'échantillon et analysée grâce à un goniomètre Minitec Krüss DSA 100 (Krüss, Hamburg, Allemagne).

II.a.iv. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les thermogrammes ATG des échantillons sont obtenus à l'aide d'un appareil TGA Q50 provenant de TA Instruments (Asse, Belgique). La gamme de température de ces thermogrammes va de la température ambiante à 700°C avec une vitesse de chauffe de 10°C.min⁻¹ sous flux d'oxygène de 10 ml.min⁻¹ ainsi que d'azote de 90 ml.min⁻¹ pour le four et 10 ml.min⁻¹ pour la balance. Les creusets utilisés pour les analyses sont en platine.

II.a.v. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les analyses de calorimétrie différentielle à balayage sont obtenues à l'aide d'un appareil DSC Q100 de TA Instruments (Asse, Belgique). La méthode utilisée pour obtenir les thermogrammes est de la forme chauffage/refroidissement/chauffage sous azote (50 ml.min⁻¹) avec une vitesse de chauffe à 10°C.min⁻¹ et une vitesse de refroidissement de 5°C.min⁻¹.

II.a.vi. Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF-ATR)

Les analyses infrarouges ont été réalisées en mode réflexion totale atténuée (ATR) sur un spectromètre Spectrum Two de Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France). Une accumulation de 16 scans a été réalisée pour chaque spectre avec une résolution de 4 cm⁻¹ pour une échelle de nombre d'onde de 650 à 4000 cm⁻¹.

II.a.vii. Dosage colorimétrique des fonctions carboxyliques (TBO)

Dans le cas des échantillons greffés par l'acide acrylique, la quantité de groupements acides carboxyliques présents sur la surface des nanofibres (exprimée en µmol de groupements COOH par cm² d'échantillons) est évaluée à l'aide d'un test colorimétrique²⁹⁹. Cette analyse permet de quantifier l'efficacité de greffage du monomère à la surface des fibres. Plus précisément, les échantillons greffés et non-greffés sont immergés dans 20 ml d'une solution de bleu de toluidine (TBO), stabilisée à pH 10, pendant 4 heures à température ambiante. Ensuite,

les échantillons sont rincés par une solution de NaOH (0,1 M) de façon à retirer tout le TBO non complexé avec les fonctions COOH. Ensuite, les membranes sont immergées, pendant 1 heure, dans 20 ml d'une solution d'acide acétique à 50% dans l'eau de façon à désorber le TBO (**Figure 44**). Toutes les solutions sont couvertes d'une feuille de papier aluminium pour ne pas affecter la structure chimique du TBO sensible à la lumière. Enfin, les solutions obtenues après désorption sont analysées par spectrophotométrie UV à 634 nm *via* un spectromètre UV-1800 de chez Shimadzu (Noisiel, France). La quantité de TBO adsorbée est finalement corrélée à la quantité de fonctions acide carboxylique en accord avec la loi de Beer-Lambert.

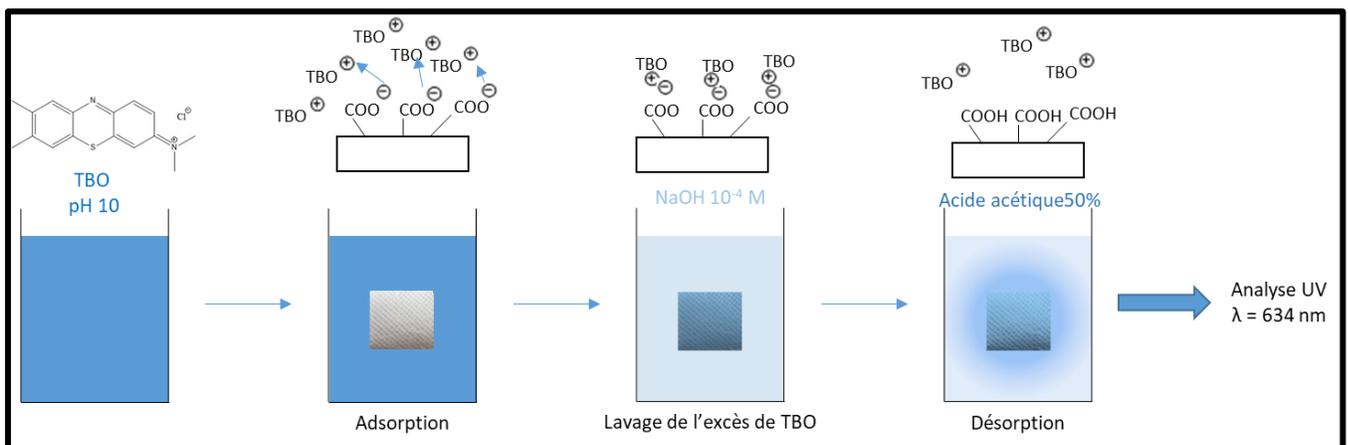


Figure 44: Représentation schématique du test colorimétrique au TBO

II.b. Evaluation du comportement biologique

Les évaluations biologiques ont été réalisées au sein de l'unité INSERM « *Médicaments et biomatériaux à libération contrôlée : mécanismes et optimisation* » (U1008) de l'université de Lille.

Les cellules utilisées au cours de ces études sont des fibroblastes NIH3T3 dans du milieu essentiel minimum de Eagle GIBCO® (αMEM) provenant de ThermoFisher Scientific (Waltham, Etats-Unis). A ce αMEM est ajouté 50 µg/mL de gentamicine provenant de Panpharma (Boulogne-Billancourt, France), 250 µg/mL de Fungizone GIBCO® (ThermoFisher scientific) et 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) provenant de Eurobio (les Ulis, France). Les cellules dans ce milieu sont incubées dans un incubateur Binder (Bohemia, USA) à 37°C dans des conditions d'humidité de 100% et un taux de CO₂ de 5%. Chaque étude est réalisée en triplicata, les résultats sont analysés par ANOVA et une différence est considérée significative pour p<0,05.

II.b.i. Stérilisation

Tous les échantillons obtenus ont été stérilisés avant de réaliser les tests biologiques par l'intermédiaire de la société Ionisos (Sablé-sur-Sarthe, France). Afin de procéder à cette stérilisation, deux méthodes ont été envisagées : la stérilisation par oxyde d'éthylène (ETO) à 50°C, et la stérilisation par irradiation gamma à une puissance de 40 kGy. L'effet de ces traitements sur la morphologie des nanofibres a d'abord été évalué par MEB avant de procéder à toute évaluation biologique.

II.b.ii. Contact indirect

Les cellules fibroblastes NIH3T3 préalablement incubées sont repiquées dans une plaque de 96 puits en polystyrène (TCPS), contenant 100 µl de milieu de culture par puits, à hauteur de 4000 cellules par puits, avant d'être replacées en incubation dans les mêmes conditions. Parallèlement, des disques de 11 mm de diamètre de chaque échantillon sont placés dans des tubes Eppendorf contenant un volume de milieu de culture en accord avec la norme ISO 10993-5 (6 cm²/ml). Ces Eppendorf sont ensuite agités à 80 rpm pendant 24 h à 37°C. Le milieu de culture est ensuite filtré à l'aide de filtres stériles PB Acrodisc® de porosité 0,22 µm (PALL, Saint Germain en Laye, France). Puis, le milieu de culture est retiré, filtré et mis en contact avec les fibroblastes pendant 24 ou 72 h à 37°C. Après cette incubation, le milieu de culture est extrait et remplacé par une solution composée de 180 µl de milieu de culture complet et de 20 µl de Bleu Alamar® (Interchim, Montluçon, France) pendant 2 heures dans un incubateur protégé de la lumière. Le Bleu Alamar® est un indicateur d'oxydoréduction qui change de couleur et produit un signal fluorescent à la suite de l'activité métabolique des cellules. Ainsi, 150 µl de cette solution sont prélevés et versés dans une plaque TCPS (Tissue Culture PolyStyrene). Enfin, la fluorescence est analysée à une longueur d'onde de 590 nm (longueur d'onde d'émission), après excitation à 560 nm, à l'aide d'un fluoromètre TwinkleTMLB 970. Les résultats obtenus sont normalisés à l'aide de contrôle négatif. Les essais en contact indirect sont schématisés en **Figure 45**.

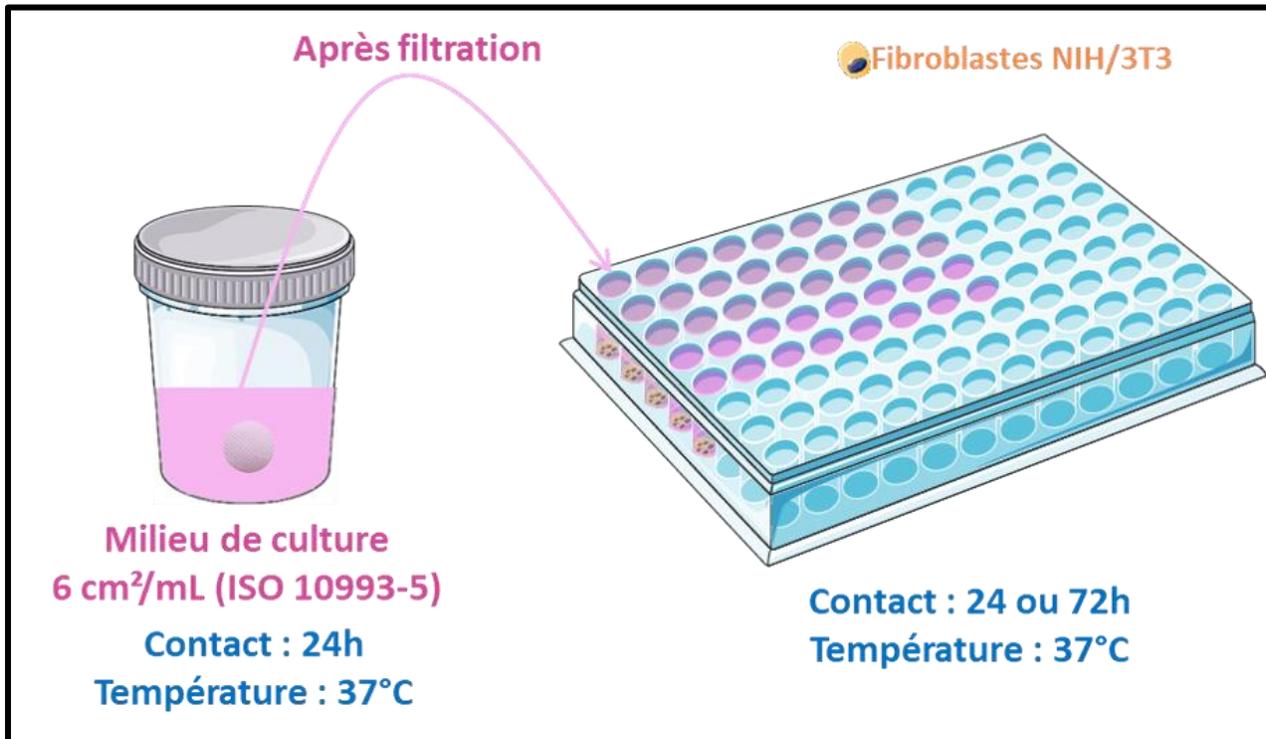


Figure 45: Schéma des essais de viabilité en contact indirect

II.b.iii. Contact direct

Les échantillons présentant la meilleure cytocompatibilité en contact indirect sont ensuite testés par méthode directe pour évaluer la prolifération cellulaire. Le schéma des essais en contact direct est décrit en **Figure 46**. Les disques de 11 mm de diamètre sont placés dans des plaques TCPS de 48 puits. Chaque échantillon est testé en triplicata et comparé au témoin positif TCPS (100% de viabilité cellulaire). Les cellules sont ensuiteensemencées (4000 cellules.cm⁻²) directement sur les disques et mises en culture pendant 3 ou 6 jours sans changement du milieu de culture. De la même manière que pour le contact indirect, le milieu de culture est remplacé par un nouveau milieu de culture contenant du bleu Alamar® qui, après 2 heures d'incubation dans le noir, est analysé par fluorométrie à une longueur d'onde d'émission à 590 nm après une excitation à 560 nm.

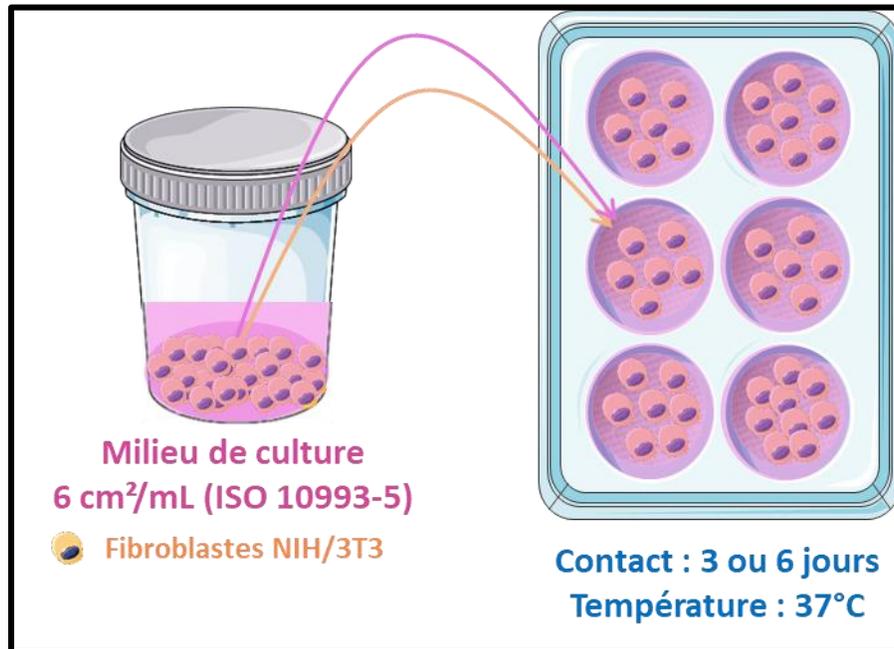


Figure 46: Schéma des essais de viabilité cellulaire en contact direct

II.b.iv. Activité anticoagulante

En accord avec la norme ISO 10993-4, les disques de 11 mm de diamètre de chaque échantillon sont immergés dans du sang complet de jeune patient en bonne santé prélevé *via* des tubes citratés. Les échantillons immergés dans le sang sont incubés à 37°C pendant 30 minutes et agités à 80 rpm puis centrifugés à 2500 g à 14°C pendant 15 minutes, de façon à séparer les globules rouges du plasma pauvre en plaquettes (PPP). Trois tests distincts sont ensuite réalisés : le test du temps de céphaline activée (APTT) dans lequel 50 µl de PPP sont incubés à 37°C pendant 1 minute, mélangés avec 50 µl de réactif TriniCLOT™ aPTT HS, Tcoag® (TCA), incubés pendant 5 minutes et finalement le temps de coagulation est mesuré après addition de 100 µl de CaCl₂ (0,025 mol.ml⁻¹) ; Le test du temps de prothrombine (PT) dans lequel 100 µl de PPP sont incubés à 37°C pendant 2 minutes, mélangés avec 200 µl de NEOPLATINE® de Diganostica Stago, Inc. (Parsippany, USA) (incubé à 37°C pendant 10 minutes) et le temps de coagulation est ensuite mesuré ; Enfin, le dernier test est l'**anti-Xa** qui suit le protocole de constructeur HYPHEN BioMed (Neuville-sur-Oise, France)³⁰⁰.

Comme il a été décrit précédemment, le test TCA permet d'évaluer la voie intrinsèque et commune de coagulation sanguine et le test TP est un indicateur de la voie extrinsèque et

commune. Ces deux tests indiquent s'il y a ou non la formation de caillot de fibrine. Pour ce qui est de l'anti-Xa, il permet d'évaluer la transformation de prothrombine en thrombine puis de fibrinogène en fibrine (formation de caillot sanguin).

Pour chaque expérience, 1, 2 ou 3 disques sont testés indépendamment de manière à pouvoir évaluer l'influence de l'aire de surface active sur l'activité biologique. Le protocole d'évaluation des propriétés anticoagulantes est schématisé en **Figure 47**.

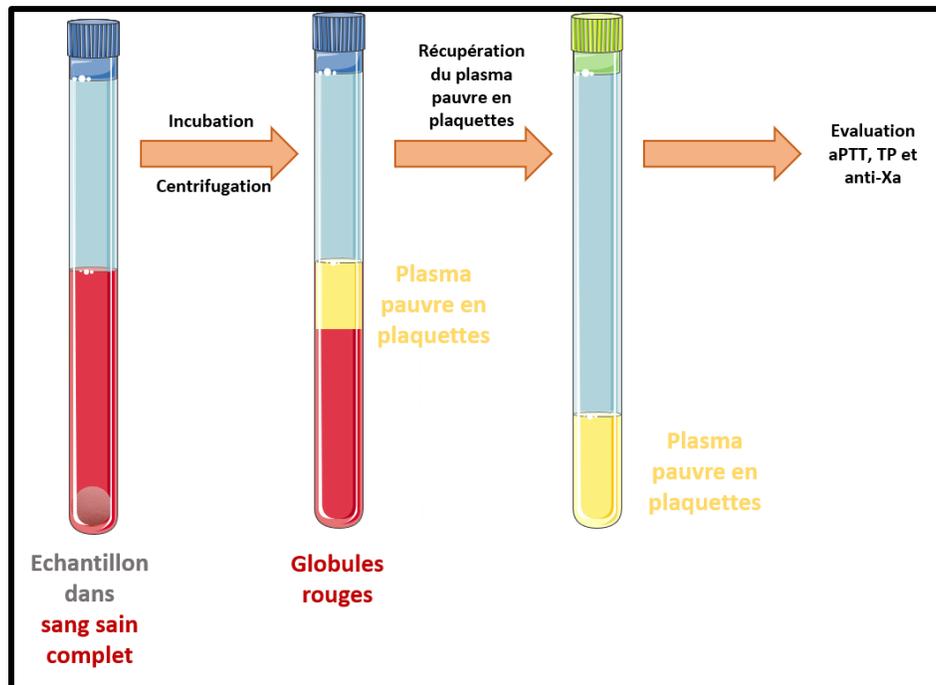


Figure 47: Schéma du protocole d'évaluation des propriétés anticoagulantes

II.b.v. Hémolyse

Les disques de 11 mm de diamètre de chaque échantillon sont immergés dans 1 ml de sang complet sain. Une solution de Triton X-100 de Thermo Scientific (Waltham, Etats-Unis) dans NaCl 0,9% (w/v) est utilisée comme contrôle positif (lyse de 100% des globules rouges) et une solution de NaCl à 0,9% (w/v) est utilisée comme contrôle négatif (lyse de 0% des globules rouges). Une solution de NaCl à 0,9% (w/v) est ajoutée à chaque tube de sang contenant les échantillons de façon à obtenir une concentration de sang de 5 mg.ml^{-1} . Ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 30 minutes, agités à 80 rpm et les disques sont ensuite retirés. Enfin, les solutions de sang sont centrifugées à 2500 g pendant 10 minutes, et les surnageants sont analysés par spectroscopie UV-visible à 540 nm de façon à détecter l'hémoglobine.

II.b.vi. Activité antimicrobienne

Plusieurs groupes d'échantillons ont été testés en termes d'activité microbienne à savoir : la référence (PP-PCL), les échantillons de PP-PCL greffés par l'AMPS dans les conditions optimales de plasma (AMPS opt), les échantillons de PP-PCL greffés par le TBAEMA dans les conditions de plasma optimales (TBAEMA opt), maximales (TBAEMA max) et supérieures (TBAEMA plus). Les conditions supérieures de traitement plasma ont été utilisées de façon à comparer l'effet du traitement plasma sur l'activité antibactérienne des échantillons greffés par le TBAEMA. Ces conditions « plus » sont : P = 210 W, t = 150 s et une solution d'immersion à 3 g de TBAEMA dans 7 ml d'eau.

Les tests microbiologiques sont réalisés suivant la méthode « kill-time », c'est-à-dire que le nombre d'unités formant des colonies bactériennes (ufc) présentes sur les échantillons en fonction du temps de culture sont mesurées. Plusieurs temps de contact sont étudiés entre 30 min et 24h. Lors de ces tests, les analyses sont réalisées en tripliqua et à plusieurs temps différents.

Des pastilles stérilisées de 11 mm de diamètre de membrane en PP-PCL (traitées ou non) sont mises en contact avec une souche bactérienne Gram + : *Staphylococcus aureus* CIP224 et une souche Gram - : *Escherichia coli*. Les souches sont repiquées dans un bouillon de culture avant d'être dispersées sur un milieu de culture solide (gélose) Muller-Hinton afin d'être dans leur période de croissance avant mise en contact avec les échantillons. La culture dans le milieu Muller-Hinton est de 24 h avant la mise en contact avec les échantillons pour éviter la phase de latence des bactéries. En effet, lorsque les bactéries sont mises en culture dans ce milieu, elles suivent d'abord une phase de croissance pendant leur période de prolifération puis, lorsqu'elles sont trop nombreuses, elles atteignent un palier (phase de latence) pendant lequel elles ne peuvent plus proliférer étant donné leur nombre. La phase de croissance dure de 24 à 48 h.

Après les 24h de mise en culture des bactéries dans le milieu Muller-Hinton, 10 ml de liquide de Ringer Cystéiné (RC) sont ajoutés pour assurer l'équilibre osmotique avec les bactéries. Après cet ajout, le nombre de bactéries est au nombre de 10^9 , ces solutions sont donc diluées par 3 dans un premier temps pour réduire le nombre de bactéries. Une fois cette dilution effectuée, 200 μ l sont ajoutés à chaque puits contenant des échantillons puis mis à l'étuve à 37°C. Une fois

le temps d'incubation terminé (entre 30 min et 24 h), les échantillons sont transférés dans des tubes en verre contenant 2 ml de PBS, puis soumis aux ultrasons pendant 1 min et enfin passés au vortex pendant 30 s pour détacher les bactéries des échantillons et les remettre en solution. Pour mesurer le nombre de bactéries, ces solutions sont ensuite diluées 3 fois de plus dans le solvant RC de manière à faciliter le comptage bactérien. Le protocole suivi est schématisé en **Figure 48**.

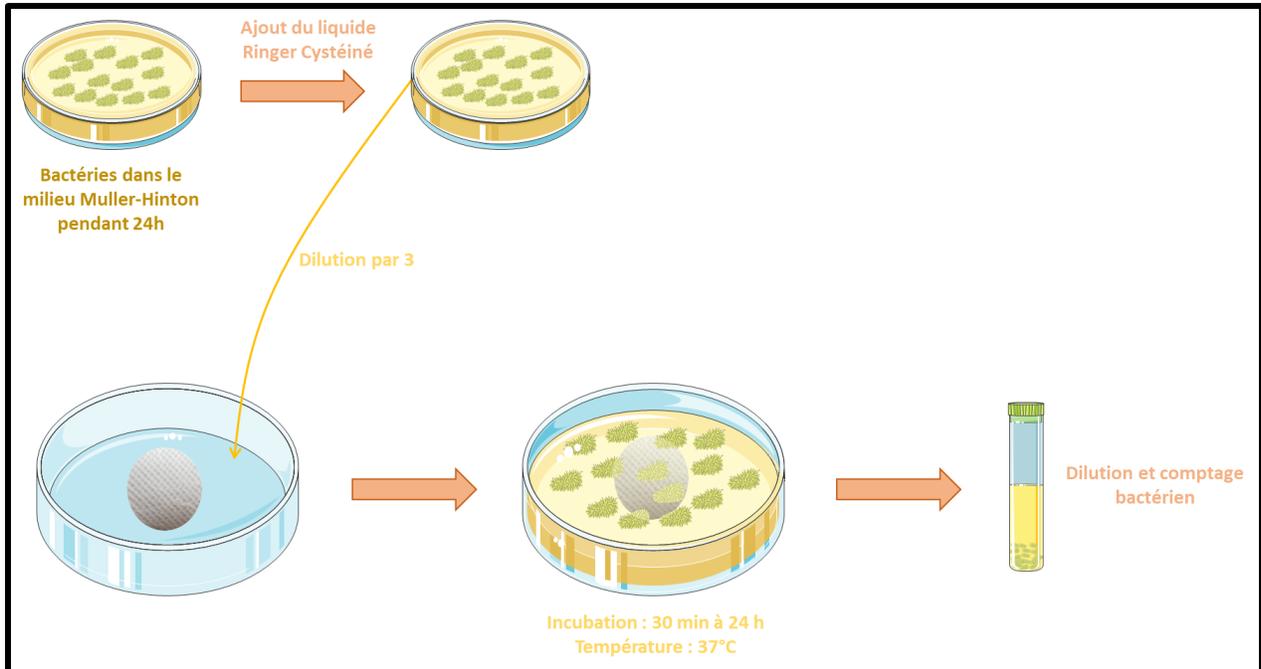


Figure 48: Schéma du protocole d'évaluation de l'activité antimicrobienne des échantillons

II.b.vii. Essais *in vivo*

Des tests *in vivo* ont été réalisés sur des rats (Sprague Dawleys de 250-300 g de 8 semaines) pour les échantillons de référence ainsi que pour les échantillons greffés par l'AMPS *via* plasma dans les conditions optimales et maximales de traitement. Les modèles de rats et d'adhérences post-opératoires sont largement décrits dans la littérature pour évaluer les stratégies de prévention des adhérences^{301,302}. Les avantages offerts par le rat sont la taille moyenne de l'animal facilitant la chirurgie et permettant la transplantation d'une plaque antiadhérente de taille moyenne d'environ 1 à 2 cm². Pour établir le modèle d'adhérences post-opératoires, le rat subit une laparotomie médiane de 3 à 4 cm, sous anesthésie générale à l'isoflurane (l'induction

est faite avec 3% d'isoflurane et un mélange N₂O 70% et O₂ 30% et l'entretien avec 2% d'isoflurane et le mélange N₂O/O₂) à raison de 0,1 ml/rat.

Pour les rats n'ayant pas eu d'implantation de membranes, une électrocoagulation du péritoine pariétal du flanc droit est réalisée à la pince bipolaire (puissance de 40 W) pendant 10 s sur une surface ronde de diamètre de 10 mm. Après cela, une suture résorbable par trois points (5.0 Ethicon PDS*II) est effectuée de façon homogène sur la surface électrocoagulée.

Pour les rats implantés avec des échantillons greffés ou non, le patch est d'abord déposé sur la surface coagulée et puis celle-ci est suturée de la même façon que précédemment. Contrairement aux rats non implantés, les rats ayant eu une pose de patch ont aussi eu une applique d'Aluspray pour éviter les infections.

Dans tous les cas, les rats sont sacrifiés 14 jours après l'implantation du patch. Deux observateurs ont évalué, de manière macroscopique et histologique, la présence d'adhérences. Le procédé suivi pour réaliser les tests *in vivo* est schématisé en **Figure 49**.

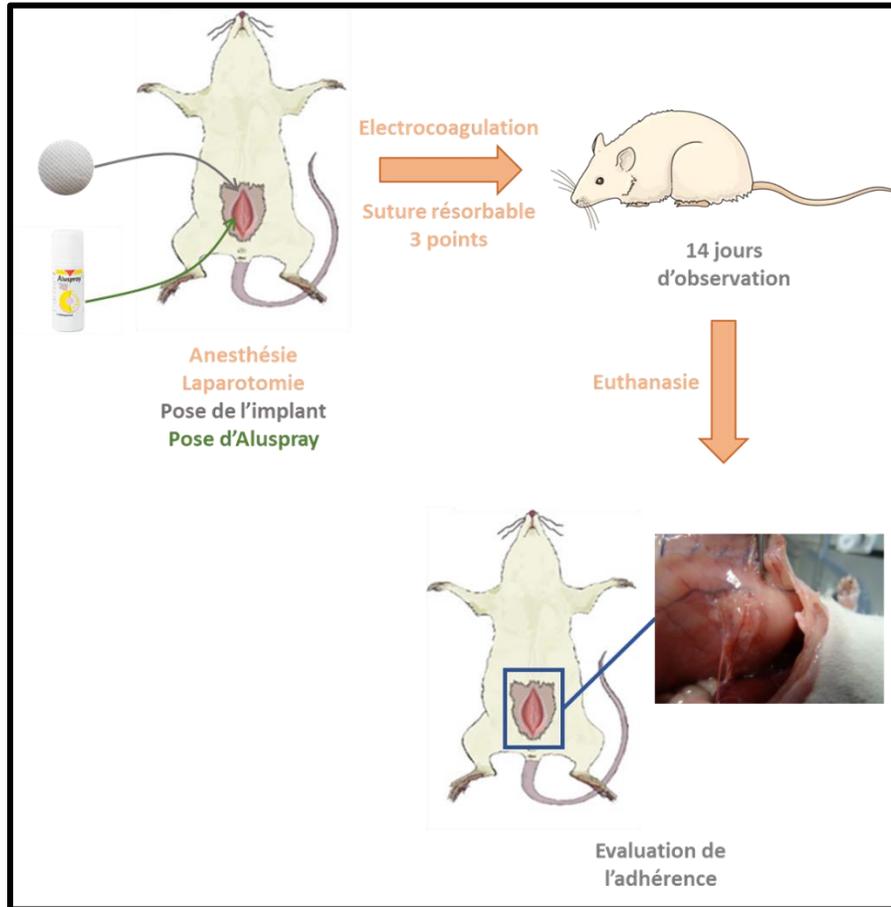


Figure 49: Schéma du procédé de test in vivo sur le rat.

Troisième partie : Résultats et discussions

Voie 1 : Electrospinning - plasma

Cette voie repose sur l'électrospinning d'un polymère biodégradable (la PCL) sur un implant en PP suivi d'une phase de traitement plasma (constituée de plusieurs sous-étapes) qui a pour objectif de greffer et copolymériser des monomères fonctionnels (l'AA, l'AMPS et le TBAEMA) en surface de ces nanofibres. Une optimisation de l'électrospinning de la PCL sera d'abord réalisée. Puis, comme preuve de concept, l'acide acrylique sera utilisé comme monomère modèle pour la polymérisation induite par plasma. Le procédé sera ensuite appliqué à l'AMPS puis au TBAEMA et différentes caractérisations physico-chimiques et biologiques permettront de démontrer l'efficacité de la fonctionnalisation des nanofibres de PCL.

I. Elaboration et caractérisation de nanofibres de PCL

L'obtention de nanofibres homogènes et sans défauts passe par l'optimisation des paramètres de solution, de procédé ainsi qu'environnementaux. Dans un premier temps, l'étude s'est focalisée sur le choix du solvant, qui joue un rôle majeur dans le procédé d'électrospinning, notamment car il régit les propriétés de viscosité et de conductivité de la solution elle-même. Concernant la PCL, de nombreux solvants sont déjà utilisés dans la littérature pour obtenir des nanofibres par électrospinning. Il est possible de diviser ces solvants en deux grandes catégories : les solvants organiques et les acides. En suivant les exemples de la littérature, la PCL a d'abord été solubilisée dans du CHCl_3 et dans un mélange DCM/DMF (4/6) à des concentrations de PCL de 8 et 12% respectivement. Les nanofibres obtenues après le procédé d'électrospinning possèdent des diamètres très disperses avec la présence de défauts caractéristiques (**Figure 50 a et b**). Comme il est possible de voir sur ces images, l'électrospinning de la PCL dans le CHCl_3 conduit à la formation de fibres poreuses avec des diamètres allant de 200 nm à 8 μm , tandis que dans le mélange DCM/DMF, les fibres sont inhomogènes avec des diamètres allant de 400 à 950 nm. Ceci peut s'expliquer par l'effet de l'humidité et de la température en combinaison avec l'utilisation de solvant organique. En effet, la température et l'humidité n'étant pas contrôlées, cela entraîne des variations au cours même du procédé d'électrospinning. Or, il a été décrit par Putti *et al.* que, lors de l'électrospinning de la PCL, ou d'autres polymères, en milieu organique, un phénomène de percolation de goutte d'eau à l'intérieur du jet durant l'évaporation du solvant pouvait avoir

lieu dans le cas d'humidité suffisamment élevée (> 30%) et de température suffisamment basse (<30°C)¹²².

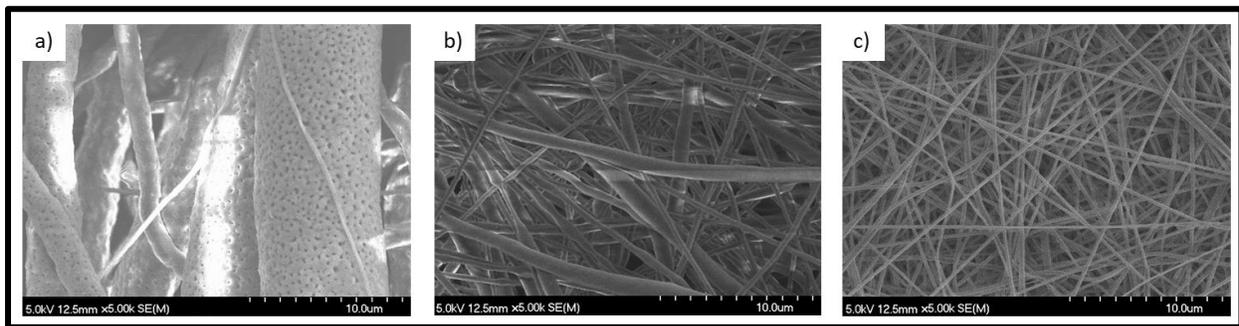


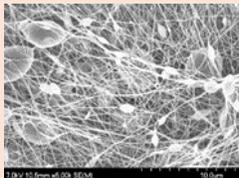
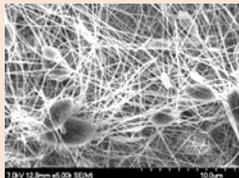
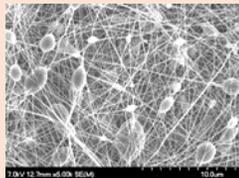
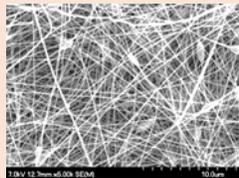
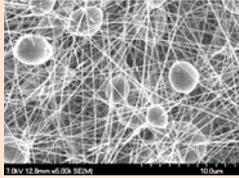
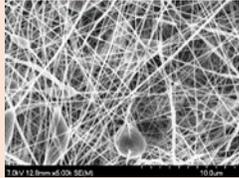
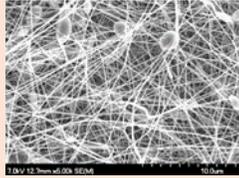
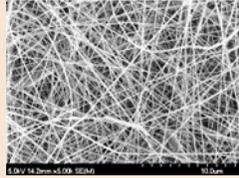
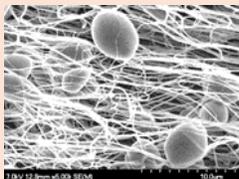
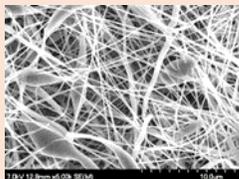
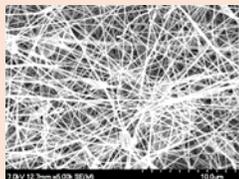
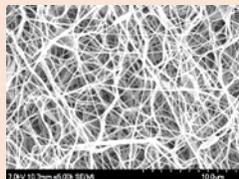
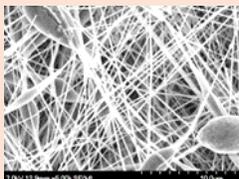
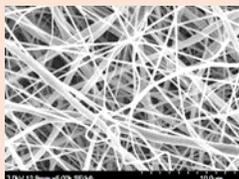
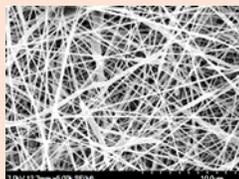
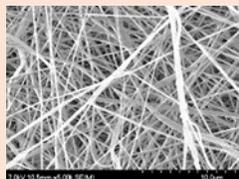
Figure 50: Images MEB des nanofibres de PCL : (a) à 8% dans CHCl_3 (à gauche) ; (b) : à 12% dans DCM/DMF (4/6) ; (c) à 12% dans AFA 5/5 avec un débit de solution de $0,5 \text{ ml.h}^{-1}$, une distance aiguille-collecteur de 25 cm, un voltage de 14 kv, une température de 19 à 22°C et une humidité relative de 30 à 50%

D'autre part, une étude de Liverani *et al.* a montré qu'il était possible de solubiliser et d'électrofiler la PCL à l'aide de solvants moins toxiques et approuvés par la FDA (*food and drug administration*) en concentration plus importante dans le matériau final que les solvants organiques³⁰³. En particulier, l'électrospinning de la PCL peut être réalisé à partir d'un mélange acide formique et acide acétique qui constitue un mélange relativement bénin pour le corps. En effet, les solvants sont regroupés dans différentes classes (de 1 à 3) suivant leur niveau de toxicité (**Annexe 3**). La classe 1 regroupe tous les solvants connus pour être carcinogènes ou dangereux pour l'environnement et qui sont donc proscrits par la FDA. La classe 2 représente les solvants qui possèdent une certaine toxicité, mais qui peuvent être utilisés dans une certaine mesure. Enfin la classe 3 est constituée des solvants à faible potentiel toxique. Comme il est possible de voir en **Annexe 3**, le DCM et le DMF sont des solvants de classe 2 qui peuvent être présents dans le matériau final à hauteur de 600 et 880 ppm respectivement. Au contraire, l'acide formique ainsi que l'acide acétique sont des solvants de classe 3 qui peuvent être présents jusqu'à 5000 ppm dans la membrane finale. Ainsi, l'électrospinning de la PCL a été réalisé dans ce mélange de solvants dans différentes proportions et en variant les paramètres de façon à optimiser la fabrication des nanofibres sans défauts.

Ensuite, les paramètres de la solution d'électrospinning ont été étudiés. Dans ce sens, la concentration en PCL étudiée varie de 7 à 12%wt et le rapport acide formique/acide acétique

varie de 2/8 à 5/5. Le **Tableau 4** regroupe les images MEB des nanofibres obtenues pour chaque couple de ces paramètres.

Tableau 4: Evolution de la morphologie des nanofibres de PCL en fonction de la concentration de la solution et de la proportion de solvant ($T=22-25^{\circ}\text{C}$, $H=20-35\%$, $D_{A-C}=25\text{ cm}$)

Rapport de solvant %wt en PCL	Formique/acétique 2/8	Formique/acétique 3/7	Formique/acétique 4/6	Formique/acétique 5/5
7				
9				
10				
12				

Ces résultats montrent qu'une augmentation de la concentration de la PCL, quel que soit le rapport de solvant (formique/acétique), entraîne la baisse du nombre de beads et donc permet l'obtention de fibres plus homogènes. De la même manière, l'augmentation du rapport de solvant permet aussi de limiter la formation de beads quelle que soit la concentration de la solution. Cependant, une concentration trop faible en acide formique dans le mélange (notamment pour les rapports 2/8 et 3/7) entraîne la formation ponctuelle de goutte de solvant. Il est intéressant de noter que l'électrospinning de solution de PCL dans l'acide acétique seul ou dans des rapports

de solvants supérieur à 5/5 a été étudié, mais sans formation de fibres. En effet, ces solutions entraînent la formation d'un jet instable à l'application du courant, ce qui conduit à la formation d'un spray et donc le dépôt de billes micrométriques de polymère sur le collecteur. Concernant le taux de PCL en solution, une concentration plus faible que 7%wt entraîne le même phénomène de spray, alors qu'une concentration plus élevée entraîne une gélification rapide de la goutte en sortie de l'aiguille et rend donc le dépôt de nanofibres impossible dans la durée. Le phénomène de spray est dû à un problème d'enchevêtrement du polymère, qui, à trop faible concentration, ne permet pas d'interaction entre les chaînes, ce qui a pour conséquences de ne pas les étirer et rend donc impossible la formation de nanofibres. Pour ce qui est des solvants utilisés, un moins bon solvant d'un polymère ne permet pas l'ouverture de la forme de pelote de ces derniers. Ainsi, si les chaînes ne sont pas suffisamment affines du solvant, l'enchevêtrement ne se fera pas suffisamment et il n'y aura pas d'élongation des chaînes par application du potentiel électrique. Le phénomène de gélification de la goutte, quant à lui, est souvent dû à une concentration trop élevée en polymère ainsi qu'une évaporation trop rapide du solvant. En effet, l'évaporation du solvant pendant le procédé d'electrospinning démarre dès la formation de la goutte, et la vitesse d'évaporation dépend de la pression de vapeur saturante de ce solvant (en lien avec sa température d'ébullition). Dans le cas de l'acide formique et de l'acide acétique, leur pression de vapeur saturante est respectivement de 15 et 45 mbar à 20°C. Le mélange acide formique/acide acétique présente donc une pression de vapeur saturante relativement basse, assez proche de celle de l'eau (24 mbar), ce qui implique que l'évaporation ne se fait pas brusquement comme cela peut être le cas des solvants organiques possédant généralement une température d'ébullition plus faible, et donc une pression de vapeur saturante plus élevée. Ainsi, le phénomène de gélification de la goutte semble être lié à une concentration trop élevée de polymère, ce qui empêche une bonne élongation du jet. Cette hypothèse est aussi argumentée par une observation décrite précédemment : à de faibles concentrations d'acide formique, il est possible d'observer des gouttes de solvant sur la membrane en raison de son évaporation trop lente. Ainsi, les paramètres optimaux mis en avant par ces expériences sont une concentration de 12%wt de PCL dans un mélange acide formique/acétique 5/5. Ce mélange d'acides sera nommé AFA5/5 par la suite.

Lorsqu'il est fait mention de l'optimisation des paramètres d'electrospinning, il est important de noter que ceux-ci sont interconnectés. C'est notamment le cas du débit et du voltage. En effet, une augmentation de débit de solution permet un dépôt plus rapide de nanofibres et aussi de limiter la gélification de la goutte dans certains cas, cependant, il est nécessaire d'augmenter le voltage pour obtenir suffisamment de potentiel afin de former le cône de Taylor et donc le jet. La **Figure 51** montre les résultats obtenus pour différents débits de solution de PCL 12%wt dans AFA 5/5. Ces résultats montrent qu'en augmentant le voltage suffisamment pour contrebalancer le débit, il est possible d'obtenir des fibres sans défauts, avec des diamètres qui ne sont pas significativement différents (nanofibres de l'ordre de 200 nm de diamètre). Cependant, à partir d'un certain débit (1,5 ml/h), des beads commencent à apparaître, ce qui induit que le voltage n'est plus suffisant pour contrer le débit trop élevé. Ainsi, le débit optimal pour la formation de nanofibres de PCL dans ces conditions est 1 ml/h.

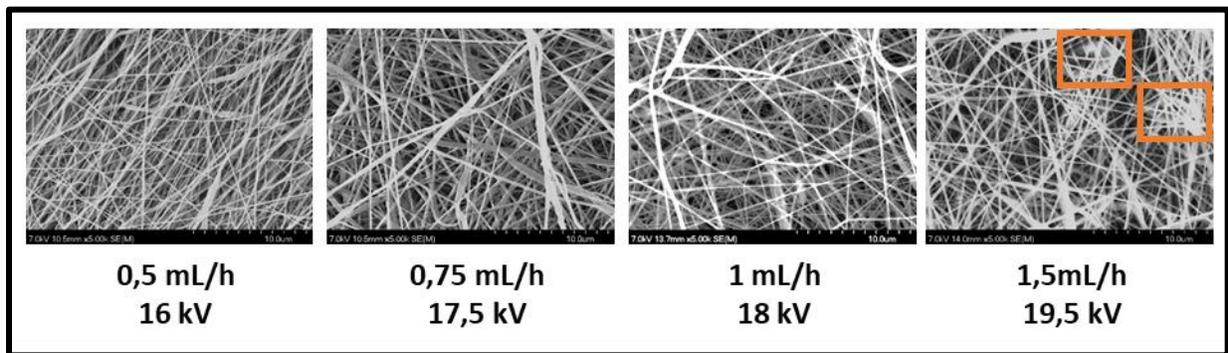


Figure 51: Images MEB des nanofibres de PCL 12%wt dans AFA 5/5 en fonction du débit et du voltage appliqué ($T=20-23^{\circ}\text{C}$, $H=20-30\%$, $D_{A-C}=25\text{ cm}$)

D'autre part, la distance aiguille-collecteur (D_{A-C}) peut avoir un effet important sur la morphologie des nanofibres. En effet, il est souvent décrit dans la littérature que l'augmentation de cette distance entraîne d'abord une diminution du diamètre des nanofibres puis une augmentation pour une distance trop élevée. Dans le cas de l'electrospinning de la PCL 12% dans AFA 5/5, aucune modification significative du diamètre des fibres n'a été observée après une modification de la distance aiguille-collecteur. Ceci peut être dû à la dispersité dans le diamètre des nanofibres obtenu qui est trop important pour observer une modification significative ($170 \pm 90\text{ nm}$). Ainsi, la D_{A-C} conservée pour le reste des expériences est de 25 cm pour cette solution.

Concernant les paramètres environnementaux, ils ne sont pas contrôlables sur l'appareil de paillasse, cependant, l'électrospinning de la PCL a pu être réalisée à différentes températures et humidité lorsque ces dernières étaient constantes sur une durée suffisamment longue (1 à 2 heures) de manière qualitative. Aucun effet significatif de la température n'a pu être observé entre 18 et 28°C pour une humidité de $30 \pm 2\%$. Néanmoins, concernant l'humidité, une variation importante de l'aspect des fibres a pu être observée (**Figure 52**). En effet, pour une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, une humidité inférieure à 40% permet l'obtention de nanofibres sans défaut. Cependant, lorsque l'humidité augmente, il est possible d'observer des zones dans lesquelles la structure nanofibreuse est perdue. L'apparition de ces zones résulte de la présence de solvant dans la membrane déposée en raison d'une mauvaise évaporation durant le temps de vol du jet. L'hypothèse envisagée pour expliquer ce phénomène est que la pression de vapeur saturante du mélange de solvant AFA 5/5 est atteinte de façon beaucoup plus rapide lorsque l'humidité est élevée, en raison de la présence de molécules d'eau en plus grande quantité dans la cabine. Ainsi, l'évaporation de ce mélange de solvant se fait moins efficacement et entraîne la formation de ces taches de solvant.

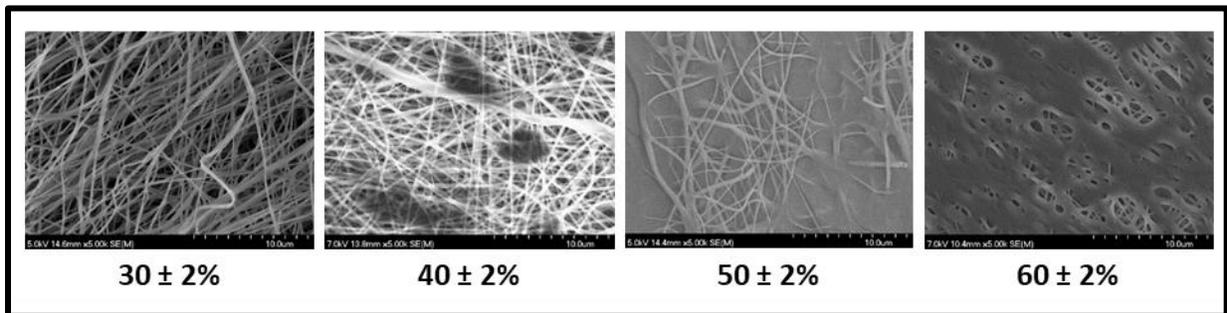


Figure 52: Images MEB des nanofibres de PCL obtenues à différents taux d'humidité ($T=20 \pm 2^\circ\text{C}$, $D_{A-C}= 25 \text{ cm}$, $V=16,0 \pm 0,5 \text{ kV}$, $D= 0,5 \text{ ml/h}$).

Au regard de toutes ces optimisations, des paramètres optimaux ont pu être définis pour la mise en forme de nanofibres de PCL. Ces paramètres sont, pour une solution de PCL à 12%wt dans un mélange AFA 5/5: une D_{A-C} de 25cm, un débit de 1 ml/h au maximum pour éviter la formation de beads avec un voltage allant de 16 à 18 kV et une humidité inférieure à 40% à la température du laboratoire (17 - 24°C). Les nanofibres obtenues dans ces conditions sont présentées en **Figure 50c** et sont utilisées pour toutes les expériences présentées par la suite.

II. Fonctionnalisation des nanofibres par plasma froid basse pression

La fonctionnalisation des nanofibres de PCL ou de PLLA par plasma froid a été réalisée en suivant un protocole expérimental développé au sein du laboratoire pour la fonctionnalisation de microfilaments de polypropylène par l'acide acrylique³⁰⁴. Ainsi, une première étape d'activation des nanofibres par plasma froid a été effectuée, suivie d'une immersion dans une solution aqueuse de monomère et pour terminer par un deuxième traitement plasma froid en vue de copolymériser les monomères en surface des fibres.

II.a. Activation de la surface

L'activation de la surface des nanofibres par plasma basse pression permet d'apporter des groupements hydrophiles sur les nanofibres. Pour optimiser cette étape, trois paramètres ont été variés : la puissance du plasma, le temps de traitement et le débit d'argon. Ainsi, des premiers essais ont été réalisés en suivant l'évolution du diamètre ainsi que la morphologie des nanofibres de PCL, après une soumission à un plasma basse pression avec un débit d'argon allant de 5 à 25 sccm, une puissance de plasma allant de 50 à 150 W et un temps de traitement de 90 à 270 s (**Figure 53**). Les images MEB montrent que, même pour les conditions maximales de traitement, le plasma d'activation n'affecte pas la morphologie des nanofibres de PCL. De plus, le graphique en **Figure 53** indique qu'il n'y a aucune différence significative entre les diamètres des nanofibres avant et après chaque traitement plasma.

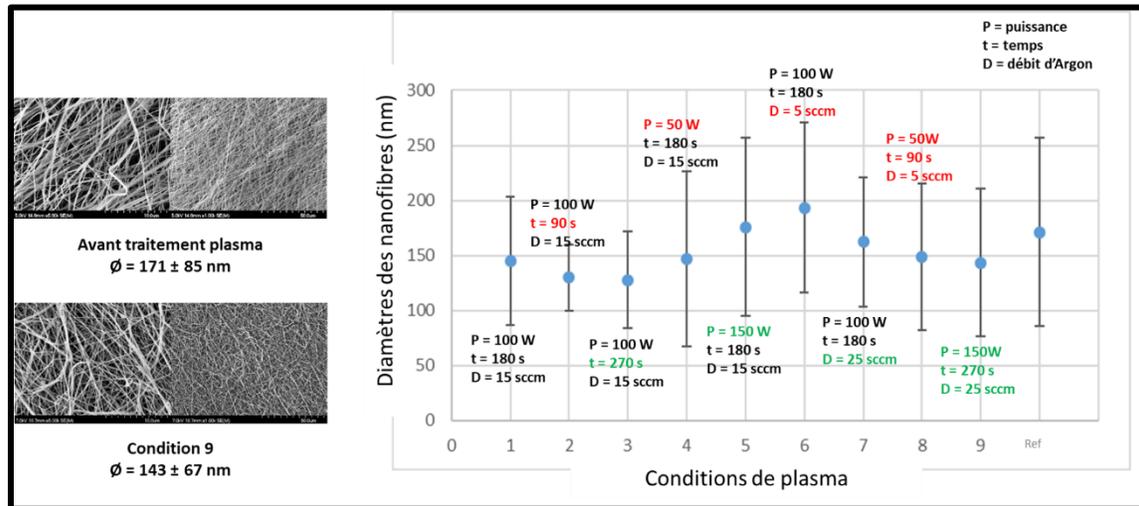


Figure 53: Images MEB des nanofibres de PCL avant et après traitement plasma basse pression en conditions maximales et évolution du diamètre de ces fibres après différents traitements (en vert: conditions maximales; en rouge: conditions minimales; en noir: conditions moyennes) avec P = puissance de plasma, t = temps de plasma et D = débit d'argon

De façon à qualifier l'efficacité du plasma d'activation, des mesures d'angle de goutte ont été réalisées en déposant une goutte d'eau sur les membranes nanofibreuses de PCL avant et après traitement plasma. L'angle de goutte formé par l'eau sur les nanofibres de PCL non-traitées est de $138 \pm 2^\circ$, confirmant le caractère hydrophobe de la PCL. Après le traitement plasma, il est possible d'observer une absorption totale de la goutte d'eau dans les membranes. Cette absorption est due à la porosité des membranes couplée à l'augmentation de l'hydrophilie de surfaces de nanofibres en raison de la formation de fonctions hydrophiles. Cependant, l'absorption de la goutte d'eau dans la membrane de nanofibres ne se fait pas immédiatement et le temps d'absorption est dépendant du temps et de la puissance de traitement. Ainsi, l'effet du traitement plasma sur les nanofibres peut être qualifié par le temps d'absorption de la goutte d'eau. Cependant, il n'est pas possible d'estimer une tendance sur son évolution en fonction de la puissance du traitement plasma qui permettrait d'obtenir des résultats reproductibles. En effet, l'augmentation de la puissance du traitement plasma entraîne à la fois la formation de fonctions hydrophiles en surfaces, mais aussi une augmentation de la profondeur de pénétration, ce qui induit une légère dégradation des fibres. Ainsi, il est difficile de contrôler l'activation de la surface lorsque la puissance est trop élevée. En revanche, l'augmentation du temps de traitement mène à une modification de surface sans influencer le cœur des fibres et permet donc de conserver une

activation homogène. Dans ce sens, différents temps de traitement (50 à plus de 200 s) ont été appliqués sur les nanofibres de PCL et le temps d'absorption totale de la goutte d'eau a été estimé à l'aide de la caméra intégrée dans le goniomètre Krüss. Les résultats, présentés en **Figure 54**, indiquent que plus le temps de traitement augmente, plus l'absorption de la goutte d'eau est rapide. Ces résultats étaient attendus, cependant une tendance peut être dégagée : en effet, après 100 s de traitement, le temps d'absorption de la goutte diminue proportionnellement avec l'augmentation du temps de traitement.

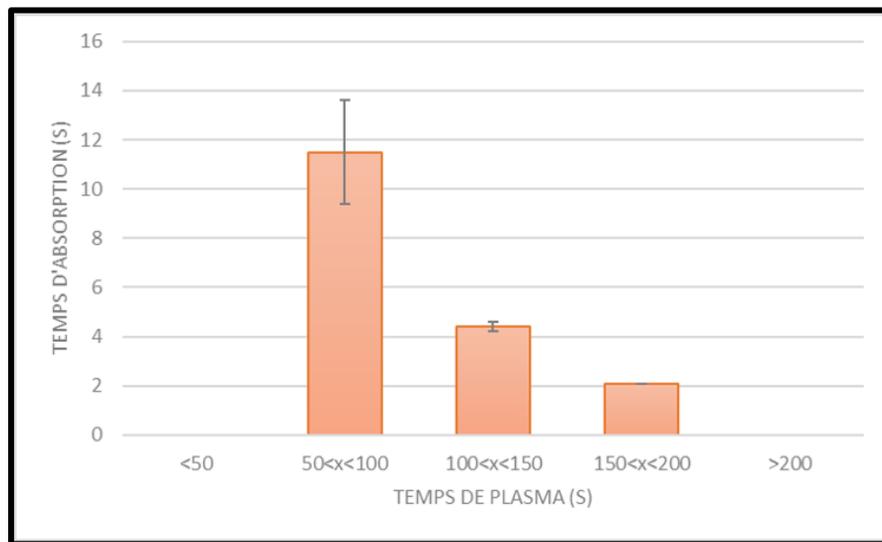


Figure 54: Influence du temps de traitement plasma de nanofibres de PCL sur le temps d'absorption d'une goutte d'eau de $4,0 \pm 0,3 \mu\text{l}$

Concernant le troisième paramètre étudié, à savoir le débit d'argon, aucun effet significatif sur l'évolution de l'hydrophilie n'a été observé quel que soit la puissance ou le temps de traitement. Cependant, pour un débit de 5 sccm, le plasma n'est pas créé de manière continue, ce qui peut causer un manque d'homogénéité dans la fonctionnalisation. Ainsi, pour toutes les prochaines études, le débit d'argon sera fixé à 10 sccm.

Le plasma d'activation n'a donc pas d'effet directement visible sur la morphologie des nanofibres, mais l'augmentation de l'hydrophilie peut être évaluée à l'aide du temps d'absorption de la goutte malgré la porosité de la structure nanofibreuse. Cependant, afin d'optimiser un peu plus finement les paramètres du premier traitement plasma, il est nécessaire d'étudier toutes les étapes du procédé.

II.b. Copolymérisation greffante de l'AA

Une première étude de faisabilité de la copolymérisation greffante par plasma froid a été réalisée avec l'AA comme monomère modèle, ce dernier étant connu pour polymériser facilement par plasma³⁰⁵.

Après l'activation par traitement plasma, les nanofibres sont immergées dans une solution aqueuse de monomère. Dans ce sens, plusieurs concentrations d'AA dans l'eau (10/0 à 1/9, v/v), ainsi que différents temps d'immersion (5 s à 8 min) ont été étudiés. Pour des concentrations d'AA dans l'eau supérieures ou égales à 5/5 (v/v), les membranes nanofibreuses se solubilisent dès l'immersion. Pour une concentration de 4/6, la membrane se rétracte au bout de 5 secondes et la structure nanofibreuse est perdue. Enfin, pour des concentrations inférieures ou égales à 3/7, la membrane se solubilise au bout de 8 minutes, est rétractée au bout de 5 minutes mais conserve sa structure nanofibreuse ainsi que sa forme d'origine au bout de 5 secondes d'immersion. La concentration (2/8) a donc été choisie pour la suite de l'étude.

Un procédé complet a ensuite été réalisé dans les conditions nommées standard. Le procédé complet est décomposé en 5 sous-étapes : le plasma d'activation, l'immersion dans la solution de monomère, le foulardage, le plasma de fonctionnalisation et enfin le lavage à l'eau. Les conditions standards sont constituées des temps et puissance de plasma ainsi que le débit d'argon utilisé pour les deux étapes de plasma (activation et fonctionnalisation) qui sont respectivement $t = 180$ s, $P = 100$ w et $D = 15$ sccm pour ces deux plasmas ; ainsi que les paramètres d'immersion en termes de concentration de solution de monomère dans l'eau et de temps d'immersion de 2/8 (v/v) et 5 secondes respectivement. La morphologie des nanofibres de PCL à chaque sous-étape de ce procédé est présentée sur les images MEB de la **Figure 55**. Ces images montrent, qu'après le plasma de fonctionnalisation, la formation d'un film est observée (**Figure 55 c**). Cependant, l'étape de lavage, permettant de retirer l'excédent de monomère ne s'étant pas greffé à la membrane, permet de retrouver la structure nanofibreuse (**Figure 55 d**).

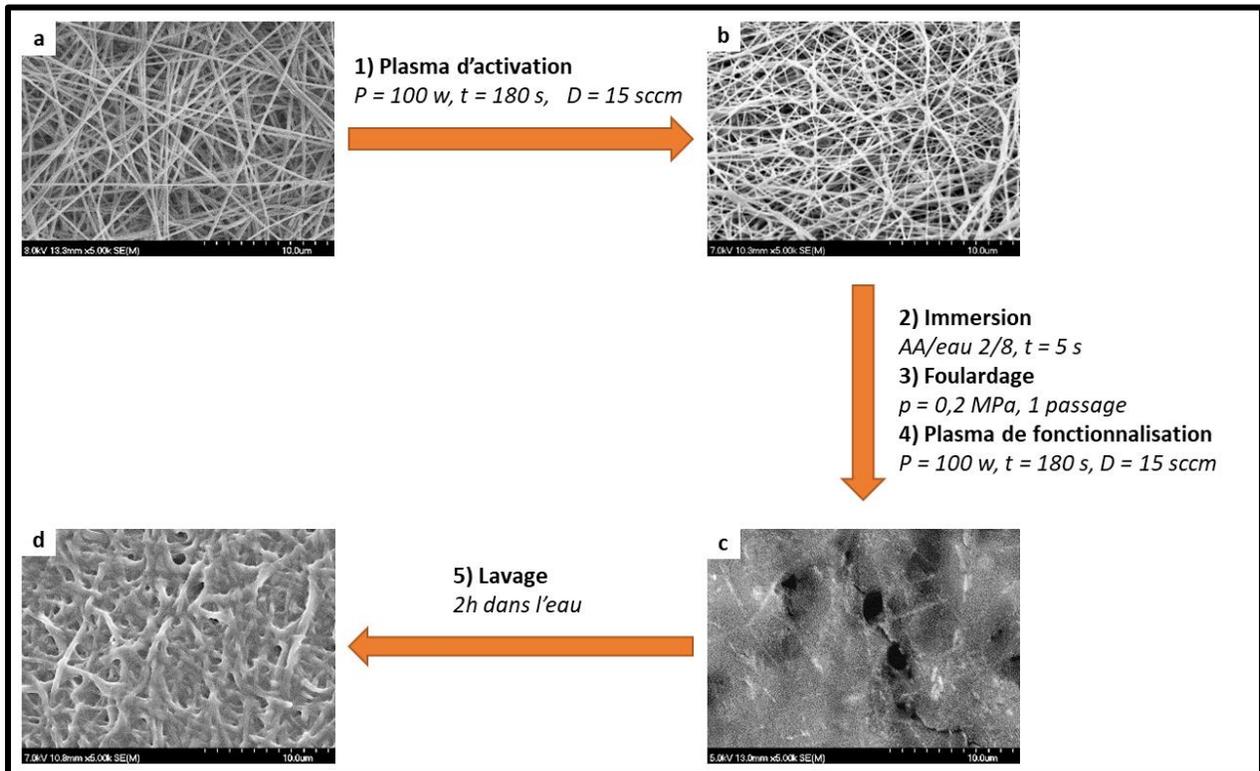


Figure 55: Images MEB des nanofibres de PCL après chaque étape du procédé de greffage d'acide acrylique dans les conditions standard

On observe une augmentation importante du diamètre des nanofibres à la fin du procédé. En effet, avant le traitement plasma, ainsi qu'après le premier traitement plasma, le diamètre des nanofibres est de $170 \pm 90 \text{ nm}$ contre $480 \pm 190 \text{ nm}$ après le procédé complet dans les conditions standard. Cette augmentation du diamètre peut être due à plusieurs facteurs : un temps de lavage trop court qui ne permet pas l'élimination complète des monomères n'ayant pas réagi, un greffage excessif, ou un gonflement dû à la pénétration de solution à l'intérieur des fibres. Pour déterminer l'origine de ce phénomène, un lavage de 2 jours a été réalisé, et la même morphologie des nanofibres a été observée. Parallèlement, le même procédé a été réalisé mais en remplaçant la solution aqueuse de monomère par de l'eau pure. Dans ce cas, un gonflement important a aussi été observé (**Figure 56 d**) ce qui implique que l'augmentation du diamètre des nanofibres n'est pas ou pas seulement due au greffage du monomère. Afin de connaître l'origine de ce gonflement des nanofibres dans l'eau, ces dernières ont été immergées dans l'eau dans différentes conditions puis analysées par MEB : sans aucun traitement (**Figure 56 a**), immergées dans l'eau après le plasma d'activation (**Figure 56 b**), immergées dans l'eau puis traitées par le plasma de

fonctionnalisation (**Figure 56 c**) et enfin les nanofibres ayant suivi tout le procédé avec une immersion dans l'eau comme décrit précédemment (**Figure 56 d**).

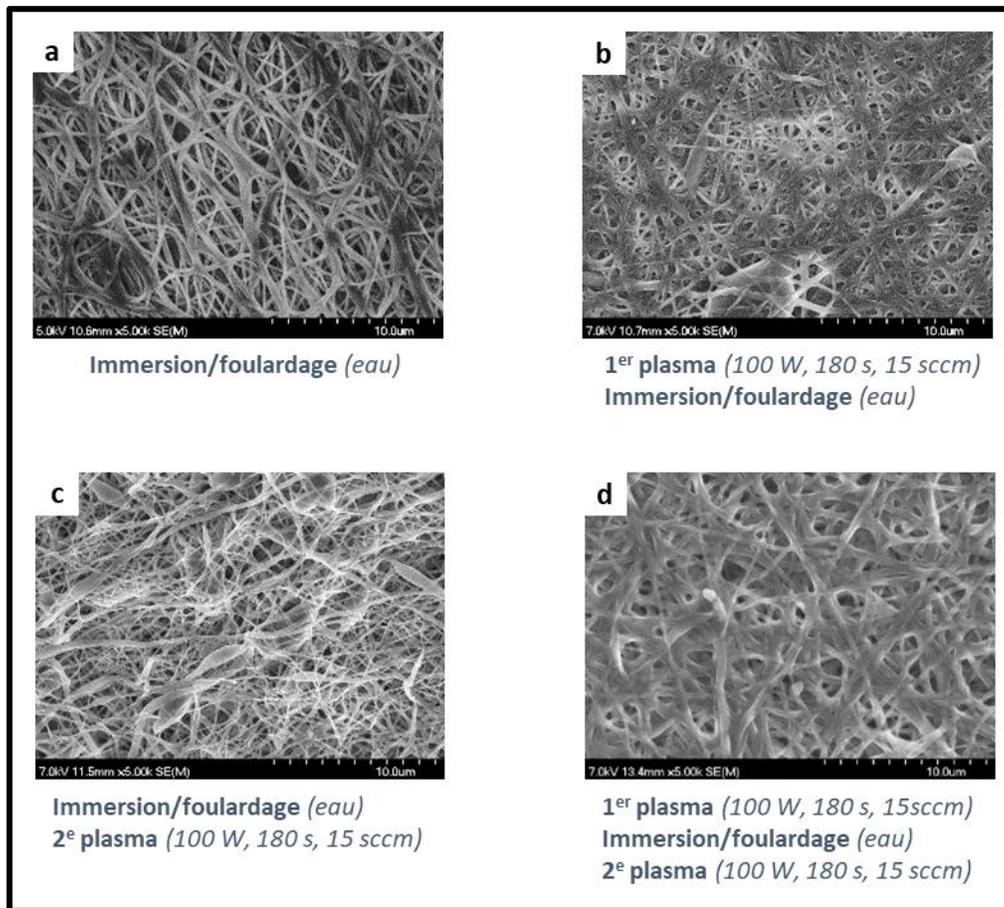


Figure 56: Images MEB des nanofibres de PCL immergées dans l'eau après différentes sous-étapes du procédé

Ces images montrent une faible augmentation du diamètre des nanofibres, ainsi qu'une conservation notable de la structure nanofibreuse, après immersion dans l'eau (**a**) (290 ± 84 nm) ou après une immersion suivie du plasma de fonctionnalisation (**c**) (256 ± 62 nm). Cependant, lorsque les nanofibres sont traitées par le plasma d'activation, puis immergées dans l'eau (**b**) ou ont subi le procédé complet (**d**), la structure nanofibreuse est affectée en raison de l'augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre des nanofibres (430 ± 65 nm et 495 ± 100 nm respectivement). Il semble alors que le premier traitement plasma suivi de l'immersion soit responsable de cette augmentation importante du diamètre. L'hypothèse la plus probable est que le premier plasma ne permet pas uniquement l'activation de la surface par création de radicaux de surface, mais entraîne également une augmentation de la porosité interne des

nanofibres, permettant ainsi la pénétration de l'eau ou de la solution d'immersion à l'intérieur des nanofibres. En effet, le plasma est connu pour avoir 3 effets particuliers sur les surfaces traitées : la gravure plasma, la réticulation de surface et la modification chimique. De ces 3 effets, la gravure plasma est la seule modification physique qui résulte en une dégradation des nanofibres en créant notamment une porosité fine de ces fibres. Ainsi, la solution d'immersion peut être absorbée à l'intérieur des fibres par l'intermédiaire de ces pores, engendrant ainsi le gonflement des fibres.

De manière à limiter ce gonflement des nanofibres dû à l'augmentation de la porosité de ces dernières, un traitement plasma d'activation plus doux, appelé P_{low} ($t = 80$ s, $P = 50$ w et $D = 15$ sccm), a été réalisé sur les membranes suivi d'une immersion dans l'eau ou dans une solution AA/eau 2/8 et enfin un plasma de fonctionnalisation dans les conditions de P_{low} . Les résultats montrent que, dans le cas de l'immersion dans l'eau (**Figure 57 a**), la structure nanofibreuse est conservée avec une très faible augmentation du diamètres de fibres (191 ± 57 nm contre 170 ± 90 nm avant immersion). Dans le cas de l'immersion dans la solution AA/eau 1/9 (**Figure 57 b**), la membrane a conservé sa structure nanofibreuse malgré l'augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre des fibres (292 ± 84 nm). Cette différence dans l'augmentation du diamètre des fibres entre l'immersion dans l'eau et dans la solution d'acide acrylique est un argument pour démontrer le greffage d'AA sur les nanofibres. En effet, dans le cas de l'immersion de l'eau, le gonflement n'est dû qu'au passage de l'eau à l'intérieur des fibres, alors que pour la solution d'AA, l'augmentation est bien plus notable et n'est donc pas seulement due à la porosité.

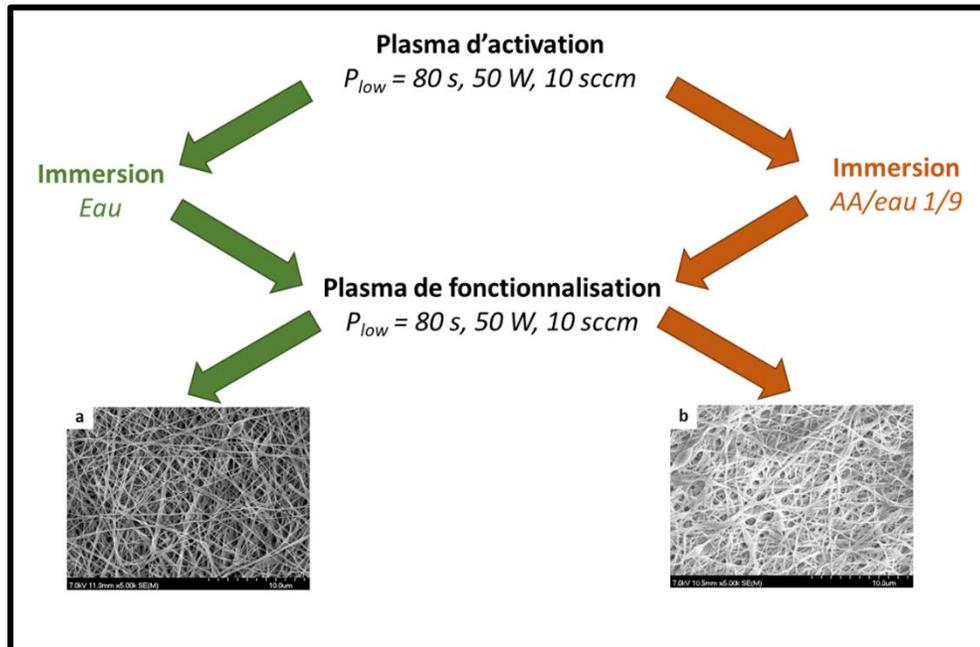


Figure 57: Images MEB des nanofibres ayant subi le procédé complet après immersion dans l'eau (a) ou dans le mélange AA/eau 2/8 (b)

Dans le but de confirmer le greffage d'AA sur les nanofibres de PCL, un dosage des fonctions acides carboxyliques en surface a été effectué avant et après greffage. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 58.

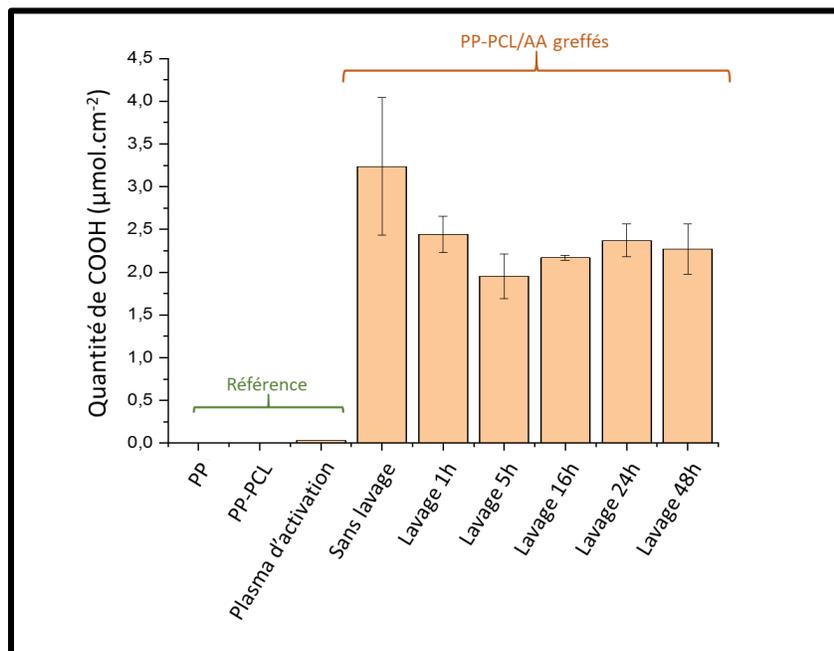


Figure 58: Quantité de fonction COOH de surface détecté par unité de surface à chaque étape du procédé de greffage ainsi qu'après plusieurs lavages

L'absence de fonctions acide carboxylique en surface du PP, du PP couvert de PCL (PP-PCL) ou des membranes n'ayant subi que la première étape de plasma (plasma d'activation) était attendue dans la mesure où la PCL ou le PP ne possèdent aucune fonction COOH libre. Concernant les membranes ayant subi tout le procédé (sans lavage), une quantité de COOH notable est observée avec un écart-type important ($3,3 \pm 0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$). Cet écart-type est dû à la présence de nombreuses molécules de monomères AA n'ayant pas réagi et qui sont en quantité variable sur les membranes. En effet, une simple étape de lavage (1h à 48h) est suffisante pour réduire considérablement cette dispersité. Il est aussi intéressant de noter qu'il n'y a aucun changement significatif dans la quantité de COOH en surface quel que soit le temps de lavage. Cependant, un temps de lavage inférieur à 1h ne permet d'obtenir une structure nanofibreuse convenable. Le temps de lavage considéré pour la suite est donc de 1h.

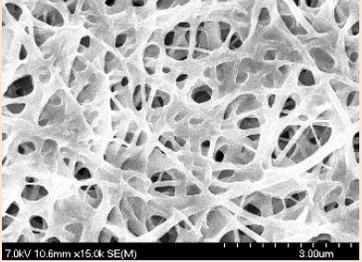
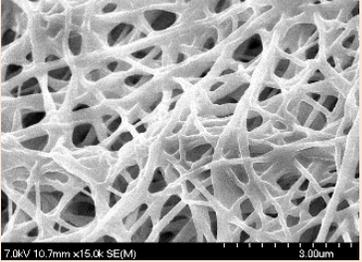
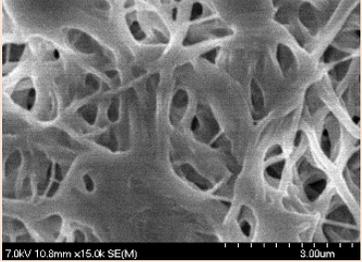
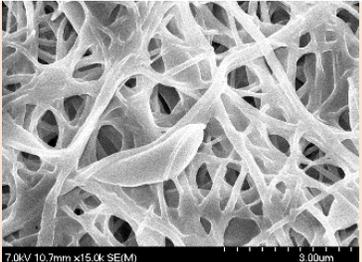
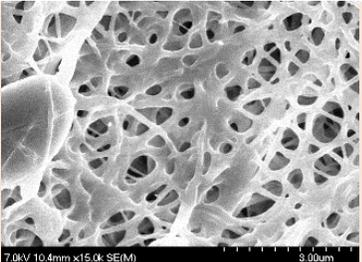
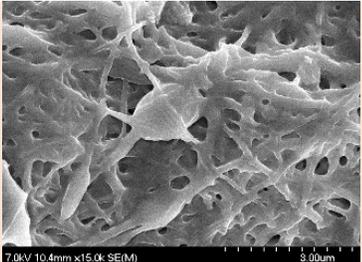
La présence d'une quantité significative de fonction COOH en surface des nanofibres après lavage confirme qu'il y a bien eu greffage des monomères AA sur les nanofibres de PCL et permet de valider ce protocole de greffage.

II.c. Copolymérisation greffante de l'AMPS

La polymérisation greffante de l'AA ayant servi de preuve de concept pour la suite de cette étude, la méthode a ensuite été appliquée à de nouveaux monomères à greffer. Ainsi, l'AA a été remplacé par l'AMPS dans les solutions d'immersion et les mêmes paramètres de traitement plasma et de solution que précédemment ont été optimisés.

Afin d'observer le comportement des nanofibres de PCL après un enchaînement : plasma d'activation, immersion de 5 secondes dans une solution d'AMPS, puis plasma de fonctionnalisation, les membranes ont subi différents traitements dans des conditions plus ou moins rudes. Dans un premier temps, seuls les paramètres du premier traitement plasma (activation) ont été modifiés ainsi que la concentration de la solution d'immersion. Ainsi, le plasma d'activation suit 2 sets de paramètres : P_{low} ($t = 80 \text{ s}$, $P = 50 \text{ w}$ et $D = 15 \text{ sccm}$) et P_{high} ($t = 120 \text{ s}$, $P = 90 \text{ w}$ et $D = 15 \text{ sccm}$). La concentration de la solution d'immersion varie entre 1/9 et 3/7 AMPS/eau (w/v). Les conditions du second traitement plasma (fonctionnalisation) sont maintenues constantes à P_{low} . Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5: Morphologie des nanofibres de PCL dans différentes conditions de traitement par plasma/immersion/plasma. Les diamètres indiqués en rouge n'ont été mesurés que sur un nombre limité de nanofibres (25 contre 50 pour les noirs).

	AMPS/eau 1/9	AMPS/eau 2/8	AMPS/eau 3/7
$P_{\text{activation}} = P_{\text{low}}$ $P_{\text{fonctionnalisation}} = P_{\text{low}}$	 <p>7.0kV 10.6mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>152 ± 46 nm</p>	 <p>7.0kV 10.7mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>217 ± 55 nm</p>	 <p>7.0kV 10.8mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>302 ± 84 nm</p>
$P_{\text{activation}} = P_{\text{high}}$ $P_{\text{fonctionnalisation}} = P_{\text{low}}$	 <p>7.0kV 10.7mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>156 ± 42 nm</p>	 <p>7.0kV 10.4mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>215 ± 73 nm</p>	 <p>7.0kV 10.4mm x15.0k SE(M) 3.00um</p> <p>302 ± 113 nm</p>

Comme attendu dans un premier temps, l'augmentation de la concentration de la solution d'AMPS dans l'eau entraîne une augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre des fibres quels que soient les paramètres du traitement plasma d'activation. L'augmentation de cette concentration entraîne aussi la formation d'agrégats et cause la perte partielle, voir totale, de la structure nanofibreuse pour des concentrations trop élevées (3/7 AMPS/eau ou plus). Parallèlement, la modification des paramètres du plasma entraîne une augmentation significative ($p < 0,05$) du diamètre des nanofibres pour une concentration en AMPS dans l'eau de 2/8. En effet, ce phénomène n'est pas observé pour une concentration de 1/9, notamment en raison de la formation majoritaire d'agrégats et d'un trop faible enrobage des fibres, ce qui explique l'absence de différence significative des diamètres avant (170 ± 90 nm) et après traitement (152 ± 46 nm pour P_{low} et 156 ± 42 nm pour P_{high}). Pour des concentrations trop élevées, l'effet de l'augmentation des paramètres du premier traitement plasma ne peut pas être évalué dans la mesure où les membranes perdent presque totalement la structure nanofibreuse. Ces résultats valident l'hypothèse précédente faite dans le cas greffage de l'AA : les paramètres du plasma

d'activation jouent un rôle clé dans l'augmentation du diamètre des nanofibres. Ainsi, pour tous les procédés suivants, les paramètres P_{low} seront conservés pour le plasma d'activation.

De plus, le spectre EDX des nanofibres ayant subi tout le traitement (plasma d'activation, immersion dans une solution d'AMPS dans l'eau et plasma de greffage fonctionnalisation) a été réalisé (**Figure 59**). Les résultats montrent la présence d'un pic à 2,15 keV, correspondant au soufre, ce qui confirme la présence d'AMPS sur la surface des nanofibres (ce pic n'étant pas observé pour les nanofibres non traitées).

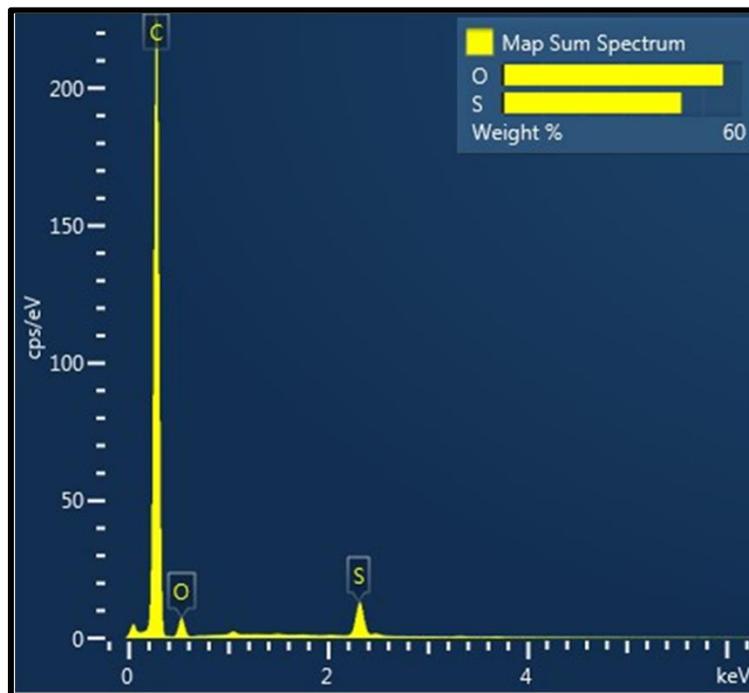


Figure 59: Spectre EDX des nanofibres de PCL greffés par l'AMPS via plasma

Ces résultats préliminaires ont montré que le greffage d'AMPS a bien été réalisé et est conservé même après 1h de lavage. Cependant, les conditions du deuxième traitement plasma (de fonctionnalisation), ainsi que la concentration d'AMPS dans la solution d'immersion nécessitent une optimisation de manière à obtenir un revêtement uniforme sans agrégats pour les échantillons greffés par l'AMPS. Pour cette raison, une méthodologie de réponse de surface a été appliquée à l'étape de greffage plasma sous la forme d'un plan d'expérience.

La qualité du greffage d'AMPS après traitement plasma a été prise en compte comme réponse dans le plan composite. Pour quantifier précisément ce critère, la morphologie des nanofibres après greffage est analysée par MEB et une classification allant de 0 (distribution

La signification statistique des effets des variables principal, quadratique et d'interaction a été déterminée par analyse de variance (ANOVA) et une analyse de régression multiple a été utilisée pour ajuster les données expérimentales à l'équation polynomiale du second degré (**Equation 2**). Les coefficients de détermination R^2 et $R^2_{\text{ajusté}}$ décrivent respectivement la fraction de variation de la réponse expliquée par le modèle et la fraction de variation expliquée par le modèle ajustée pour les degrés de liberté. Le coefficient de prédiction, Q^2 , décrit la fraction de variation de la réponse qui peut être prédite par le modèle.

Lorsque les 17 expériences sont considérées, le coefficient de détermination est faible ($R^2 = 69\%$). Pour améliorer la signification statistique du modèle, les expériences 11 et 12 ont été retirées du plan composite étant donné qu'il ne s'ajuste pas correctement avec le modèle. Ces expériences correspondent respectivement au temps de traitement le plus court (60 s) et au plus long (160 s), ce qui suggère que l'efficacité de greffage est fortement modifiée lorsque le temps de plasma est significativement augmenté ou diminué. Après l'élimination de ces deux expériences, R^2 est de 98,8%, ce qui indique que moins de 2% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle. La valeur du coefficient de détermination ajusté est aussi élevée ($R^2_{\text{ajusté}} = 96,6\%$), ce qui montre une bonne pertinence du modèle. De plus, la qualité de greffage est correctement prédite par le modèle avec un coefficient de prédiction (Q^2) égal à 80.3%. Après avoir évalué la fiabilité du modèle, la signification des différents termes du modèle peut être discutée. Leurs valeurs sont listées en **Tableau 7**.

Tableau 7: Coefficients principal, quadratique et d'interaction du modèle déterminés par Modde7.0 pour le greffage de l'AMPS

Coefficients	Qualité de greffage
β_0	0,63
β_1	0,010
β_2	0,25
β_3	0,156
β_{11}	-0,151
β_{22}	0,466
β_{33}	0,013
β_{12}	0,043
β_{13}	-0,083
β_{23}	-0,333

Parmi les différents effets principaux et quadratique, les termes β_2 et β_{22} ont les plus hautes valeurs. Ainsi, dans la gamme testée, le greffage est fortement affecté par une modification du temps de traitement plasma (paramètre X2). De plus, ces termes sont positifs, ce qui veut dire qu'une augmentation du temps de plasma entraîne une augmentation de la réponse. Etant donné que la valeur de la qualité de greffage (Y) doit être le plus proche possible de 0 (caractéristique du revêtement uniforme), le temps de traitement plasma doit être minimisé.

Cependant, il a été montré précédemment que le temps de traitement devait être supérieur à 80 s pour satisfaire au critère statistique. Ainsi, la surface de réponse a été tracée pour un temps allant de 80 à 140 s (**Figure 61 A**). Cette figure permet de confirmer que les réponses les plus basses sont obtenues lorsque le temps est faible, plus précisément entre 80 et 100 s. Ainsi, ce paramètre est fixé à 90 s.

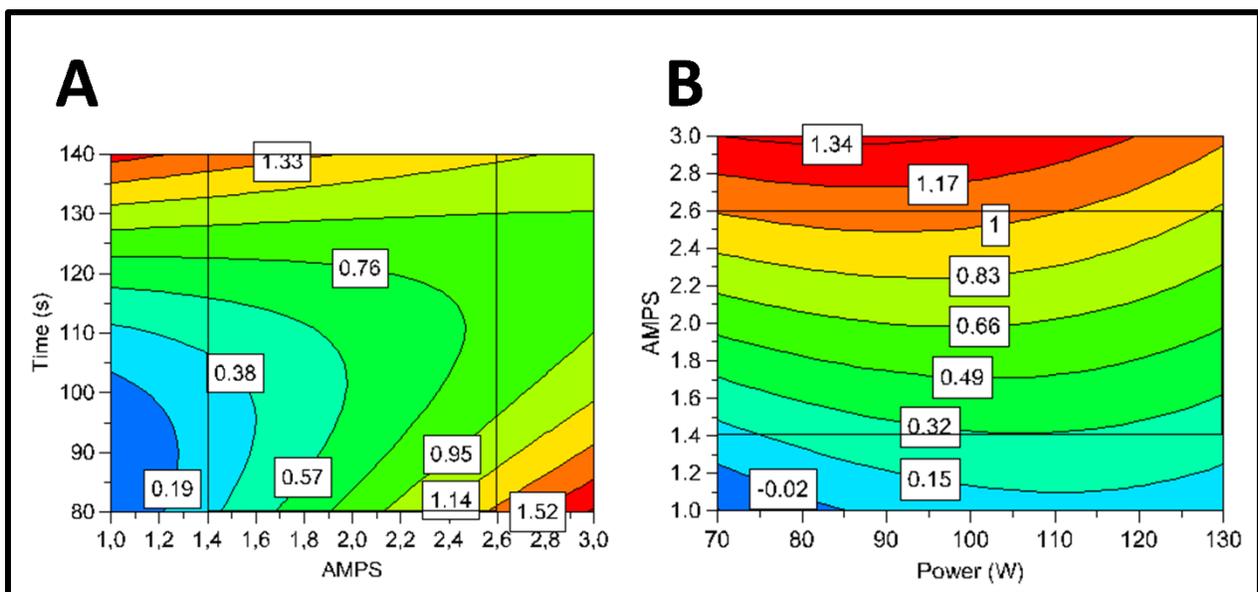


Figure 61: A: tracé de contour montrant l'évolution du greffage en fonction de la concentration en AMPS et du temps de traitement plasma pour une puissance constante de 90 W; B: tracé de contour montrant l'évolution du greffage en fonction de la concentration en AMPS et la puissance du traitement plasma pour un temps constant de 90 s.

Ensuite, la troisième variable correspondant à la concentration en monomère est caractérisée par un important coefficient principal (β_3) et aussi une forte interaction avec le temps de plasma (haute valeur absolue de β_{23}). Ainsi, ce paramètre doit être considéré pour l'optimisation du greffage. La **Figure 61A** montre que le résultat le plus bas est obtenu pour de faibles concentrations d'AMPS. Plus précisément, il peut être remarqué que des réponses inférieures à 0,2 peuvent être obtenues pour des concentrations d'AMPS allant de 1 à 1,2, en

combinaison avec un temps de traitement allant de 80 à 100 s. Ainsi, la concentration d'AMPS a été fixée à 1,1.

Enfin, le coefficient principal associé à la première variable (*i.e.* β_1) ainsi que les coefficients d'interactions contenant le paramètre X1 (*i.e.* β_{12} et β_{13}) sont très faibles, ce qui implique que le greffage est très faiblement influencé par une modification de la puissance de plasma. La **Figure 61 B** permet de confirmer cette constatation en démontrant que, pour une concentration donnée d'AMPS et un temps de traitement donné, la réponse reste presque constante quelle que soit la puissance de plasma. Dans les conditions précédemment fixées (temps de plasma de 90 s et concentration d'AMPS de 1,1), la réponse est toujours inférieure à 0,15. C'est pourquoi, pour des raisons économiques et pratiques, la puissance a été fixée à 90 W.

Ainsi, les conditions permettant d'optimiser le greffage ont été déterminées comme étant les suivantes : une immersion dans une solution de concentration de 1,1 g d'AMPS dans 8,9 ml d'eau suivi d'un traitement plasma de 90 s à 90 W. Dans ces conditions, la valeur de greffage prédite par le modèle est autour de 0,08. La morphologie des nanofibres après greffage dans ces conditions optimales a été analysée par MEB (**Figure 62**). La membrane présente une structure nanofibreuse sans agrégats ce qui permet de valider la méthode du plan d'expérience.

Pour les essais biologiques, la membrane obtenue dans ces conditions est ensuite mise dans une étude sous vide à 40°C pendant 4 h.

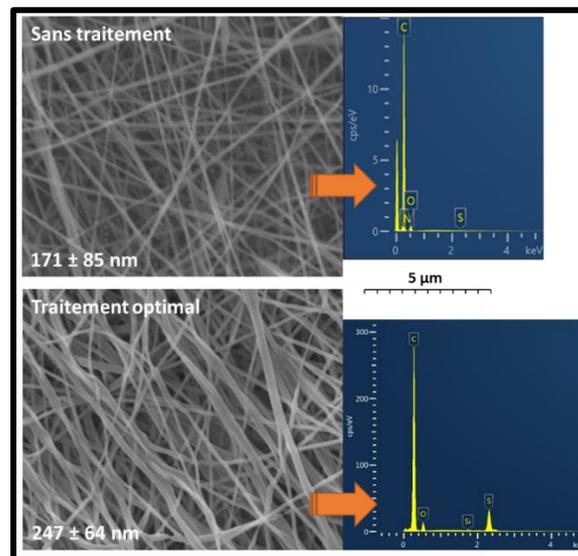


Figure 62: Images MEB et spectre EDX d'un échantillon non traité (PP-PCL) et d'un échantillon greffé par l'AMPS dans les conditions optimales (90 W, 90 s, 1,1 g d'AMPS)(PP-PCL opt).

II.d. Copolymérisation greffante du TBAEMA

Concernant le greffage du monomère à propriété antibactérienne, à savoir le TBAEMA, les mêmes observations ont pu être effectuées concernant l'effet du premier traitement plasma comme il était attendu. Ainsi, ce premier traitement plasma sera fixé dans les conditions P_{low} ($t = 80$ s, $P = 50$ w et $D = 15$ sccm). L'immersion des nanofibres dans des solutions de concentrations différentes en TBAEMA dans l'eau a montré un comportement similaire de ces fibres que lors de l'augmentation de la concentration en AMPS dans le cas précédent. Ainsi, les nanofibres semblent présenter un comportement similaire quelle que soit la solution d'immersion.

La présence de TBAEMA sur les nanofibres peut être détectée par cartographie EDX, en ciblant l'azote, absent de la PCL. Les résultats (**Figure 63**) montrent la présence de carbone, d'oxygène mais aussi d'azote dans la membrane après greffage, contrairement à la présence seule de carbone et d'oxygène dans les nanofibres non traitées.

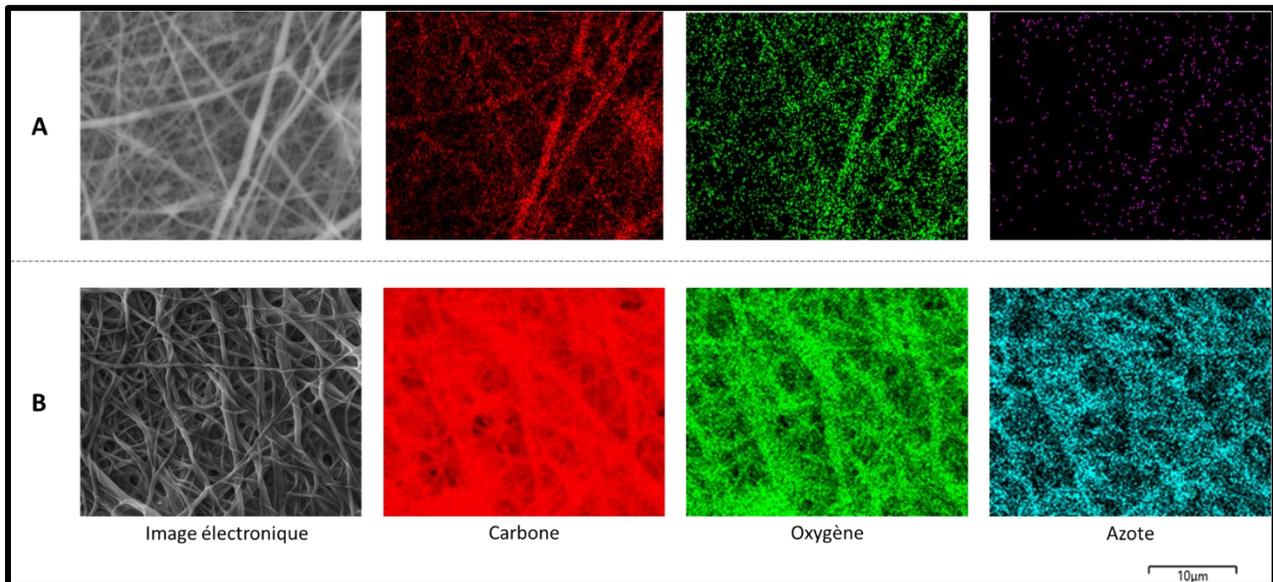


Figure 63: Images MEB et cartographies EDX des nanofibres de PCL non traitées (A) et greffées par le TBAEMA via plasma (B).

Un plan d'expérience dans les mêmes conditions que pour le greffage de l'AMPS a ensuite été réalisé. En effet, les nanofibres semblent se comporter de façon similaire dans ces les deux cas de greffage, les paramètres à varier ainsi que les conditions limites ont été conservées par rapport au premier plan composite.

De la même manière que pour le PAMPS, le coefficient de détermination est faible lorsque toutes les expériences sont prises en compte ($R^2 = 74,6\%$). Pour améliorer la signification de ce

modèle, les expériences 4 et 7 ont été retirées du plan étant donné leur variation divergente vis-à-vis du modèle. Ces expériences représentent toutes deux des expériences à temps long (140 s) et à des puissances différentes (130 W et 70 W respectivement) ce qui confirme l'effet important du temps de plasma sur le greffage de monomère possédant des groupements éthyléniques *via* traitement plasma. Après l'élimination de ces deux expériences, R^2 est de 99,2%. La pertinence du modèle est aussi confirmée avec un $R^2_{\text{ajusté}}$ de 97,8%, tout autant que la prédiction du modèle avec un Q^2 de 85,8%. Les valeurs des différents termes du modèle de greffage du TBAEMA sont listées en **Tableau 8**.

Tableau 8: Coefficients principal, quadratique et d'interaction du modèle déterminés par Modde7.0 pour le greffage du TBAEMA

Coefficients	Qualité de greffage
β_0	0,827
β_1	0,164
β_2	0,215
β_3	0,065
β_{11}	-0,139
β_{22}	-0,051
β_{33}	-0,259
β_{12}	0,092
β_{13}	-0,058
β_{23}	0,073

Parmi les différents effets principaux et quadratiques, seul le terme β_2 est élevé. Ainsi, comme pour le greffage de l'AMPS, le greffage du TBAEMA est affecté de façon plus importante par une modification du temps de traitement plasma (facteur X2) que par la modification d'un autre paramètre. La même conclusion que pour l'AMPS est donc possible car ce facteur est positif. Ainsi, une augmentation du temps de traitement entraîne une augmentation de la réponse, donc du taux de greffage. En effet, lorsque l'on compare la **Figure 64A** et la **Figure 64B**, qui diffèrent par le paramètre temps fixé pour le traitement plasma, il est possible de voir que les valeurs de réponses sont supérieures lorsque le temps de traitement augmente. Ce facteur doit donc être minimisé pour pouvoir conserver la structure nanofibreuse tout en ayant un greffage suffisant. Pour une question de praticité lors des différents greffages (AMPS ou TBAEMA), le temps de traitement sera fixé, là encore, à 90 s étant donné que la réponse maximale pour ce temps est convenable.

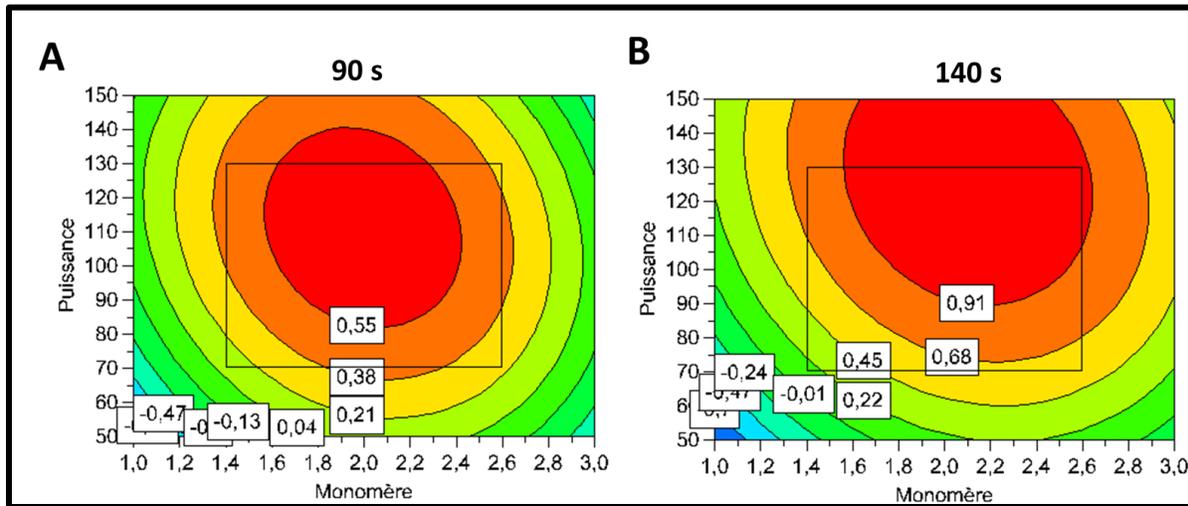


Figure 64: A: tracé de contour montrant l'évolution du greffage en fonction de la puissance de traitement plasma et de la concentration en TBAEMA pour un temps constant de 90 s; B: tracé de contour montrant l'évolution du greffage en fonction de la puissance de traitement plasma et de la concentration en TBAEMA pour un temps constant de 140 s.

Concernant les facteurs X1 et X3, il est difficile de conclure uniquement grâce aux valeurs des coefficients principaux et quadratiques. En effet, pour X1, les valeurs des coefficients β_1 et β_{11} sont élevés, ce qui pourrait indiquer une forte influence de ce facteur sur le greffage, mais de signe opposé, ce qui rend la conclusion difficile quant à l'effet de la puissance du plasma sur le greffage. Concernant le facteur X3, seule la valeur du terme quadratique β_{33} est élevée, ce qui rend là encore la conclusion difficile au sujet de l'effet de la concentration en monomère. Cependant, la **Figure 64** nous montre que les valeurs de greffage les plus basses sont obtenues pour des valeurs de X1 et X3 faibles. Pour faciliter la mise en place du procédé, les valeurs optimales de puissance et de concentration en monomère sont donc fixées à des valeurs basses égales à celles de l'optimisation de l'AMPS c'est-à-dire 90 W et 1,1 g de monomère respectivement.

Ainsi, les conditions permettant d'optimiser le greffage ont été déterminées comme étant les mêmes que pour le greffage de l'AMPS (90 s de traitement plasma à 90 W, avec une concentration de la solution d'immersion de 1,1 g de TBAEMA dans 8,9 ml d'eau). Dans ces conditions, la valeur de greffage prédite par le modèle est autour de 0,03 et la morphologie des nanofibres obtenues dans ces conditions est présentée en **Figure 65**. Le plan d'expérience est donc validé étant donné que nous obtenons, dans ces conditions optimisées, une membrane

nanofibreuse sans agrégats. De même que pour les nanofibres PCL/PAMPS, les nanofibres sont ensuite traitées thermiquement sous vide à 40°C pendant 4 h avant les essais biologiques.

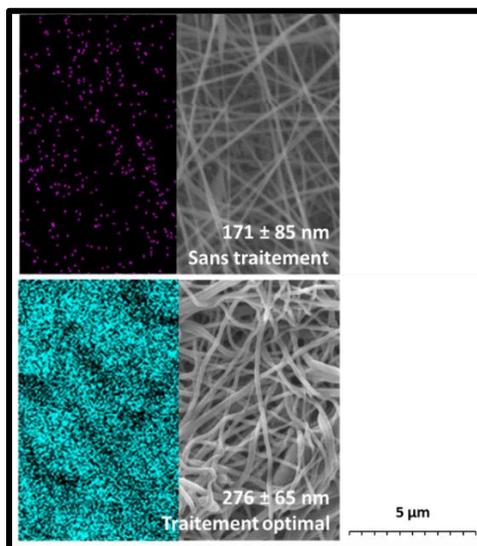


Figure 65: Images MEB et cartographie EDX de l'azote de l'échantillon non traité et de l'échantillon greffé par le TBAEMA dans les conditions optimales (90 W, 90 s, 1,1 g de TBAEMA)

III. Caractérisations physico-chimiques des membranes

Les membranes ont été caractérisées avant et après greffage par différentes techniques physico-chimiques. Dans un premier temps, des études ATG des membranes greffées ou non par l'AMPS ont été réalisées (Figure 66).

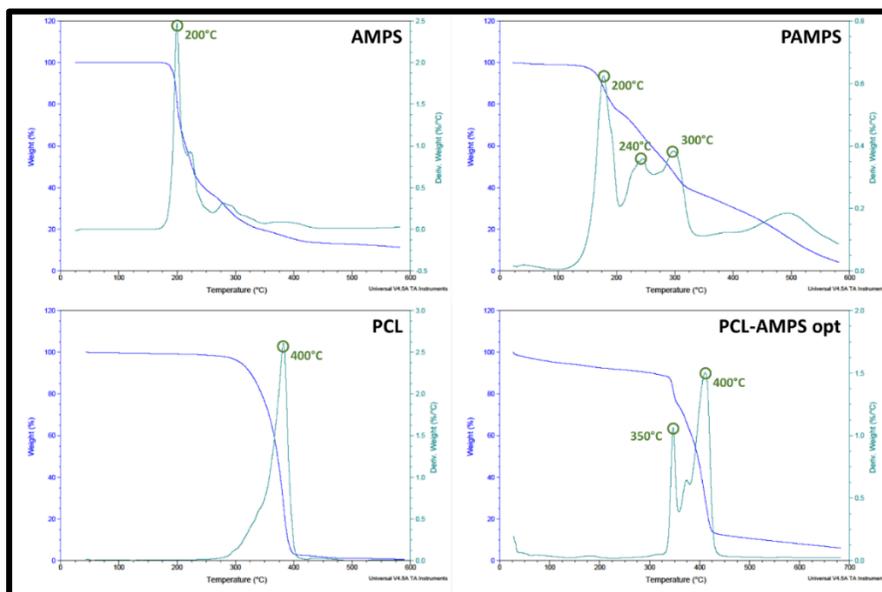


Figure 66: Thermogrammes ATG de l'AMPS, du PAMPS, de la PCL et des échantillons de PCL greffés par l'AMPS dans les conditions optimales.

Ces thermogrammes montrent une température de début de dégradation à 200°C pour l'AMPS et le PAMPS, relatifs aux groupements SO_3H , contre 400°C pour la PCL (chaîne carbonée). Le thermogramme de la membrane nanofibreuse de PCL greffée par l'AMPS dans les conditions optimales montre un premier pic de dégradation à 350°C et un deuxième à 400°C. Ainsi, il est possible de conclure sur une modification de la structure chimique de la PCL par l'AMPS sans pouvoir argumenter sur une quantité de greffage. Il est intéressant de noter que le thermogramme de la PCL greffées par l'AMPS dans les conditions maximales ne montre aucune différence avec celui obtenu dans les conditions optimales.

Les membranes greffées ou non par le TBAEMA ont également été caractérisées par ATG et les résultats sont présentés en **Figure 67**.

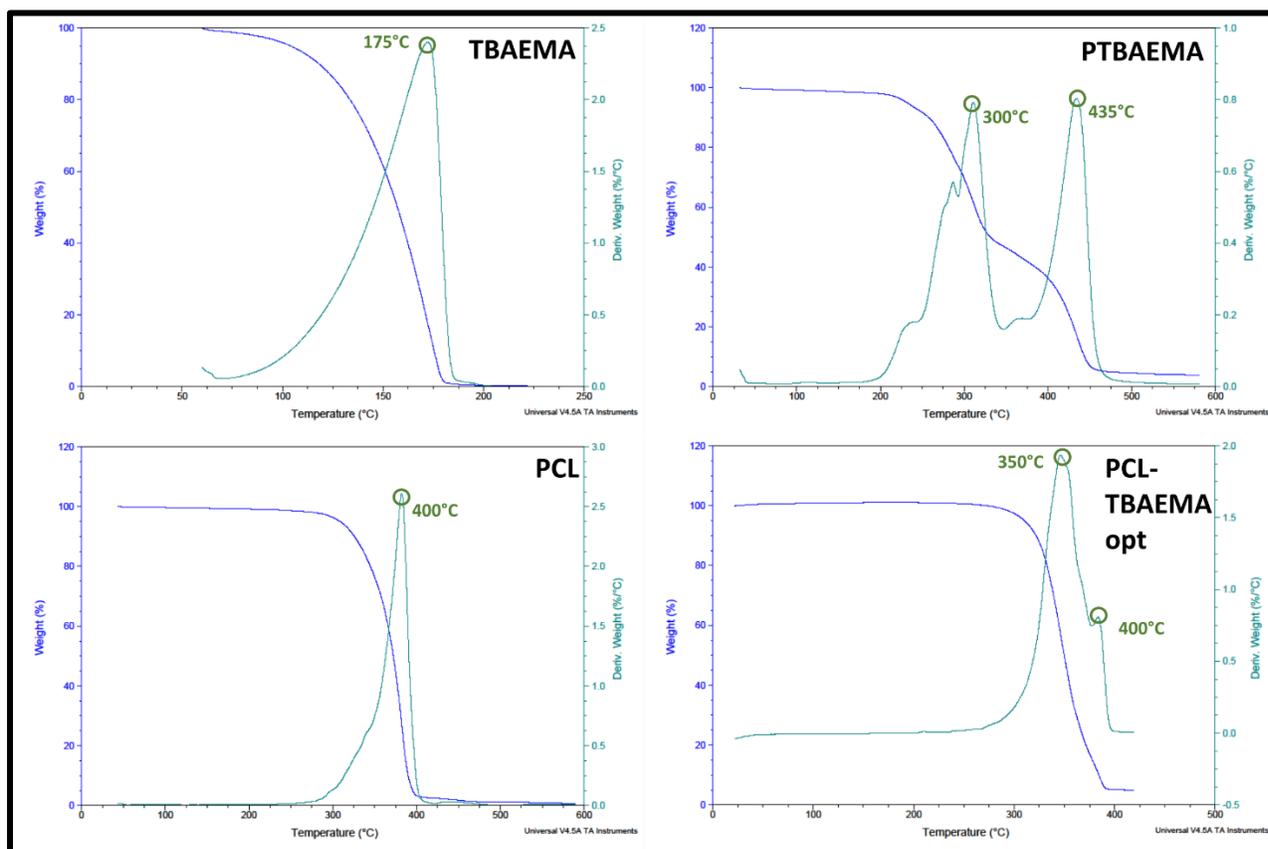


Figure 67: Thermogrammes ATG du TBAEMA, du PTBAEMA, de la PCL et des échantillons de PCL greffés par le TBAEMA dans les conditions optimales.

De la même manière que pour les échantillons greffés par l'AMPS, le thermogramme des échantillons greffés par le TBAEMA montre un pic de dégradation à 350°C avec un épaulement à 400°C. Ce pic à 350°C peut être attribué à la présence du TBAEMA qui se dégrade à plus basse

température que la PCL. Ainsi, ces résultats démontrent une modification apportée par le greffage mais, là encore sans pouvoir le quantifier. D'autre part, la différence entre les pics de dégradation de la PCL et des monomères ou polymères bioactifs pris seuls avec les échantillons greffés peut être expliqué par le traitement plasma. En effet, le traitement plasma mène à une modification chimique de la surface qui peut modifier les interactions entre les chaînes en créant de nouvelles liaisons, ce qui peut décaler les pics de dégradation.

Des études DSC ont aussi été réalisées et sont présentées en **Figure 68**.

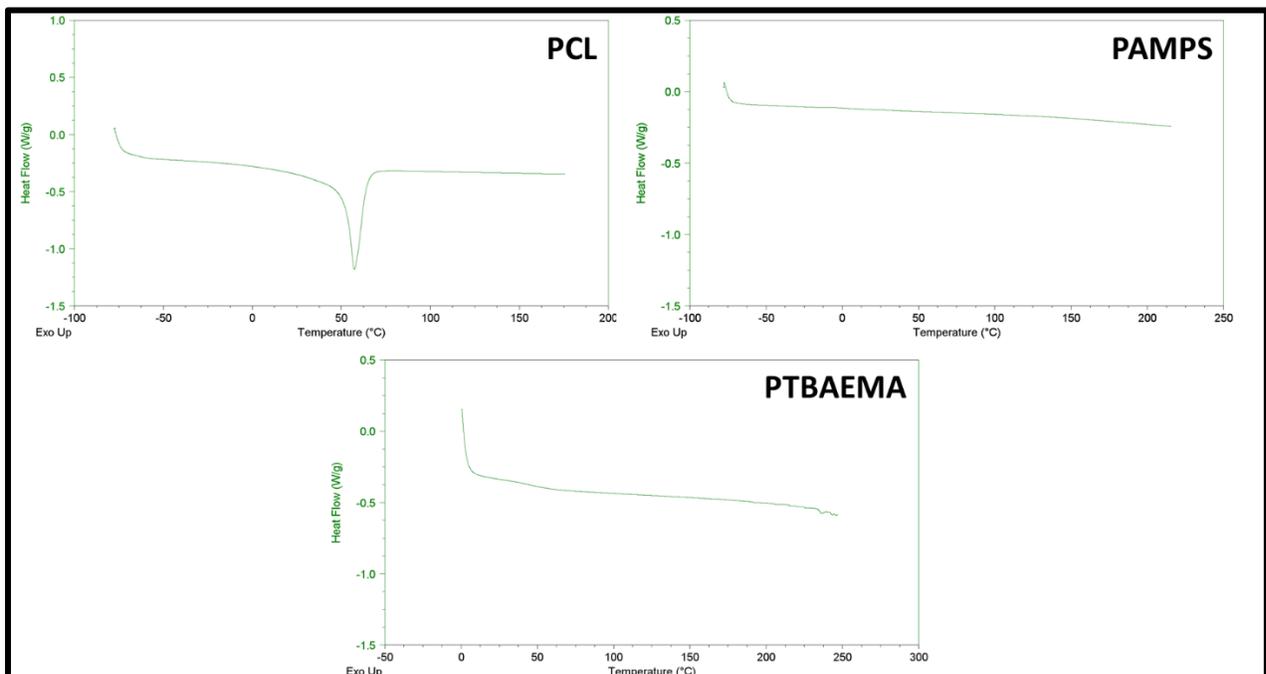


Figure 68: Thermogrammes DSC de la PCL du PAMPS et du PTBAEMA

Ces études montrent une température de fusion de la PCL de l'ordre de 60°C. Cependant, aucun pic caractéristiques d'une transition vitreuse n'est observée pour le PAMPS ou le PTBAEMA dans cette gamme de température. Ainsi, il n'est pas possible de caractériser le greffage d'AMPS ou de TBAEMA par cette technique. En effet, le graphes DSC des échantillons greffés par le TBAEMA ou l'AMPS dans les conditions optimales ou maximales de greffages sont similaires à celui de la PCL seule. Il est néanmoins possible de conclure que le traitement plasma n'a pas affecté les propriétés thermiques de la PCL.

Enfin, des analyses IRTF-ATR ont été réalisées pour les échantillons greffés ou non par l'AMPS et les spectres sont présentés en **Figure 69**.

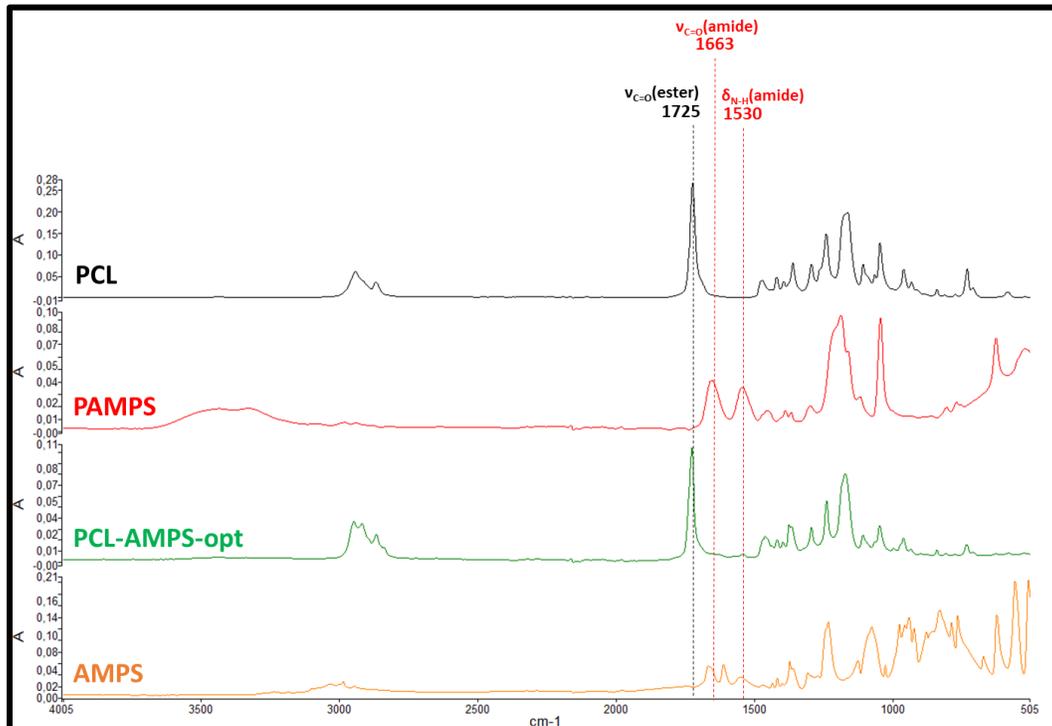


Figure 69: Spectres IRTF-ATR de la PCL, du PAMPS, des échantillons greffés par l'AMPS et de l'AMPS seul.

Ces spectres montrent une bande à 1725 cm^{-1} caractéristique des vibrations d'élongations C=O des esters de la PCL ainsi que deux bandes à 1663 et 1530 cm^{-1} , respectivement caractéristiques des vibrations d'élongations C=O et de déformations N-H des amides du PAMPS et de l'AMPS. Ces spectres indiquent une très légère augmentation de l'absorbance à 1663 et 1530 cm^{-1} pour les échantillons de PCL greffés par l'AMPS. Ceci indique la présence d'AMPS dans les membranes nanofibreuses après traitement. La faible intensité du signal indique une faible quantité de ces molécules dans les membranes, ce qui est attendu car le greffage est réalisé dans de faibles proportions pour limiter la perte de la structure nanofibreuse.

Les spectres IRTF-ATR des échantillons greffés par le TBAEMA sont présentés en **Figure 70**.

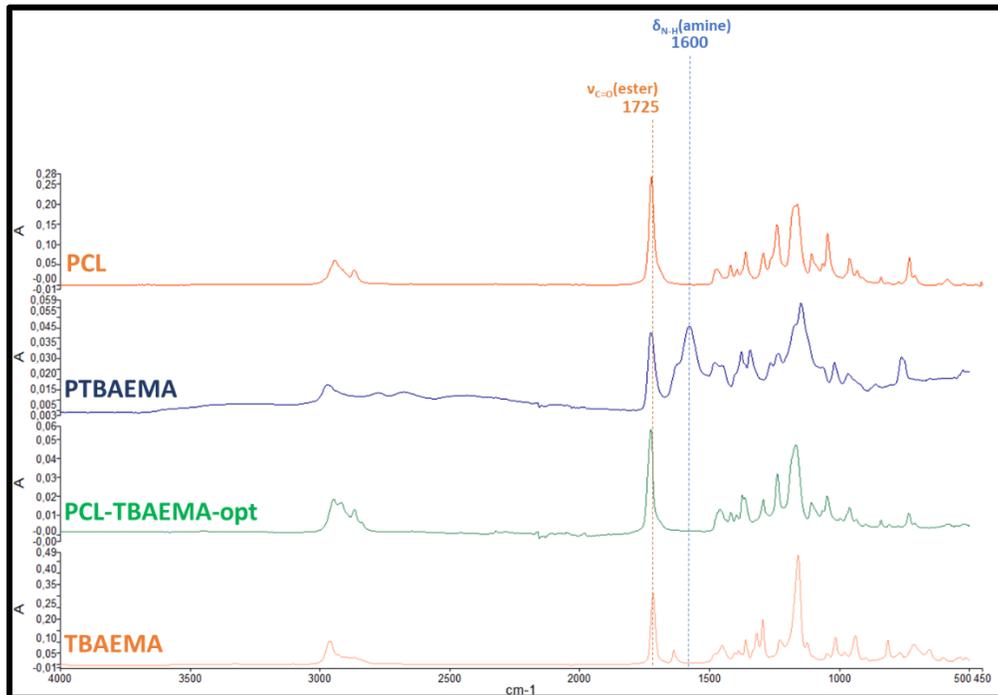


Figure 70: Spectres IR de la PCL, du PTBAEMA, des échantillons greffés par le TBAEMA et du TBAEMA seul.

Le pic caractéristique des déformations N-H des amines du TBAEMA et du PTBAEMA se situant à 1600 cm^{-1} n'est pas observable sur les échantillons de PCL greffés par le TBAEMA. Ceci n'indique pas nécessairement que le greffage n'a pas eu lieu. En effet, ce pic caractéristique des déformations des N-H d'amines secondaires est de faible intensité, ainsi, il est difficile de l'observer lorsque la quantité de TBAEMA est faible comme c'est le cas avec le greffage réalisé dans des conditions douces pour limiter l'augmentation trop importante du diamètre des nanofibres.

Ces résultats de caractérisations physico-chimiques indiquent une modification de la structure chimique des échantillons après le traitement plasma et, dans le cas de l'AMPS, cette modification est aussi due à un greffage de l'AMPS. Cependant, il n'est pas possible de conclure sur le greffage du TBAEMA seulement par ces techniques.

IV. Etude des propriétés biologiques des échantillons greffés

IV.a. Stérilisation

Afin d'évaluer les propriétés biologiques et microbiologiques des échantillons, une stérilisation préalable est nécessaire. Pour cela, deux méthodes ont été testées à savoir la stérilisation par oxyde d'éthylène (EtO) à 50°C et la stérilisation par rayonnement gamma. Les membranes nanofibreuses de PCL, traitées ou non par plasma pour greffage du TBAEMA ou de l'AMPS, ont été analysées par MEB avant et après stérilisation et ont montré des morphologies similaires quelle que soit l'étape de procédé pour une méthode de stérilisation donnée. En effet, une perte totale de la structure nanofibreuse après un traitement à l'oxyde d'éthylène à 50°C a été observée pour tous les échantillons traités (**Figure 71 A**). L'hypothèse avancée dans ce cas est que la température de traitement étant trop proche de la température de fusion de la PCL (59°C) en addition avec l'utilisation d'oxyde d'éthylène, cela a pu affecter l'intégrité de la membrane et causer la formation de ce film. Concernant la stérilisation gamma, les images MEB (**Figure 71 B**) montrent une conservation de la structure nanofibreuse. Cette méthode de stérilisation a donc été choisie pour l'évaluation des tests biologiques et microbiologiques.

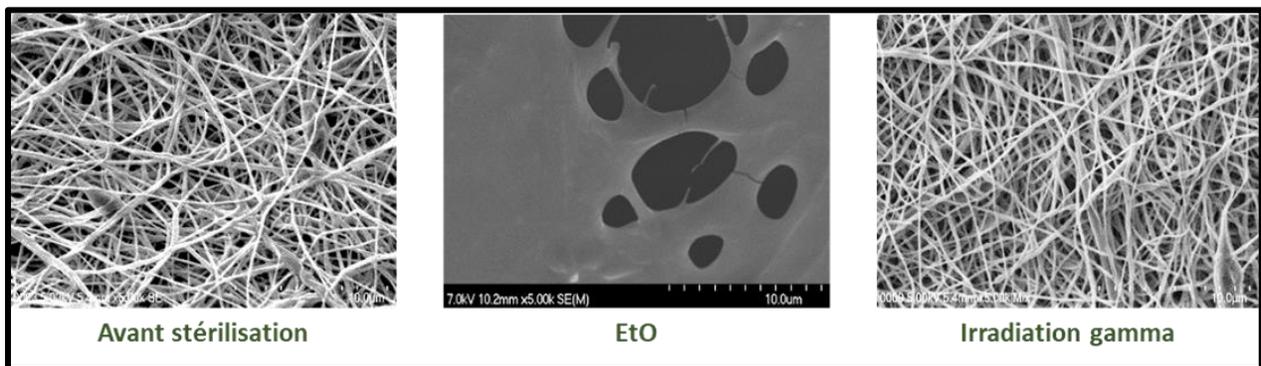


Figure 71: Images MEB des nanofibres de PCL avant ou après stérilisation à l'oxyde d'éthylène ou par irradiation gamma.

IV.b. Viabilité cellulaire

Pour les tests de viabilité cellulaire, plusieurs échantillons ont été testés. Quel que soit le type de greffage que nous souhaitons évaluer, les échantillons de **référence** sont les implants en PP recouverts sur leurs deux faces de nanofibres de PCL. Pour le greffage d'AMPS ou de TBAEMA

sur les nanofibres de PCL, deux types d'échantillons sont testés à savoir : (i) les membranes greffées par l'AMPS ou le TBAEMA selon les conditions optimales (**AMPS opt** et **TBAEMA opt**) déterminées par le plan d'expérience (premier plasma dans les conditions P_{low} , solution d'immersion à 1,1 g de monomère dans l'eau et second plasma de 90 W pendant 90 s) ; et (ii) les membranes greffées par l'AMPS ou le TBAEMA selon les conditions maximales (**AMPS** et **TBAEMA max**) (premier plasma dans les conditions P_{low} , solution d'immersion à 3 g de monomère dans l'eau et second plasma de 150 W pendant 120 s) .

IV.c. Contact indirect

Les échantillons ont dans un premier temps été placés dans du milieu de culture cellulaire qui a ensuite été mis en contact avec des fibroblastes NIH/3T3 pendant 24 et 72h. La viabilité des cellules a ensuite été évaluée par fluorométrie. Il est tout d'abord intéressant de noter que, sans séchage des nanofibres à 40°C sous vide, les membranes, greffées ou non, présentent une viabilité cellulaire nulle ou quasiment nulle. De plus, l'immersion de ces échantillons non thermiquement traités dans le milieu de culture entraîne une modification de couleur de la solution de rose vers jaune, indiquant la libération d'espèces acides. Ainsi, ces tests préliminaires permettent également de mettre en évidence la présence d'acide au sein des membranes nanofibreuses traitées ou non.

Dans un second temps, les échantillons greffés par l'AMPS et le TBAEMA ayant subi un séchage à 40°C pendant 4 h sous vide ont été testés selon deux conditions, différant par la quantité de nanofibres présente sur chaque échantillon. En effet, dans un premier cas, 2 ml de solution de PCL à 12% dans le mélange acide formique/acide acétique ont été déposées sur un implant en PP de 16x30 cm². Dans le deuxième cas, seul 1 ml de solution a été déposé sur des implants de mêmes dimensions.

Concernant le greffage d'AMPS, les résultats de viabilité cellulaire en contact indirect sont présentés en **Figure 72**.

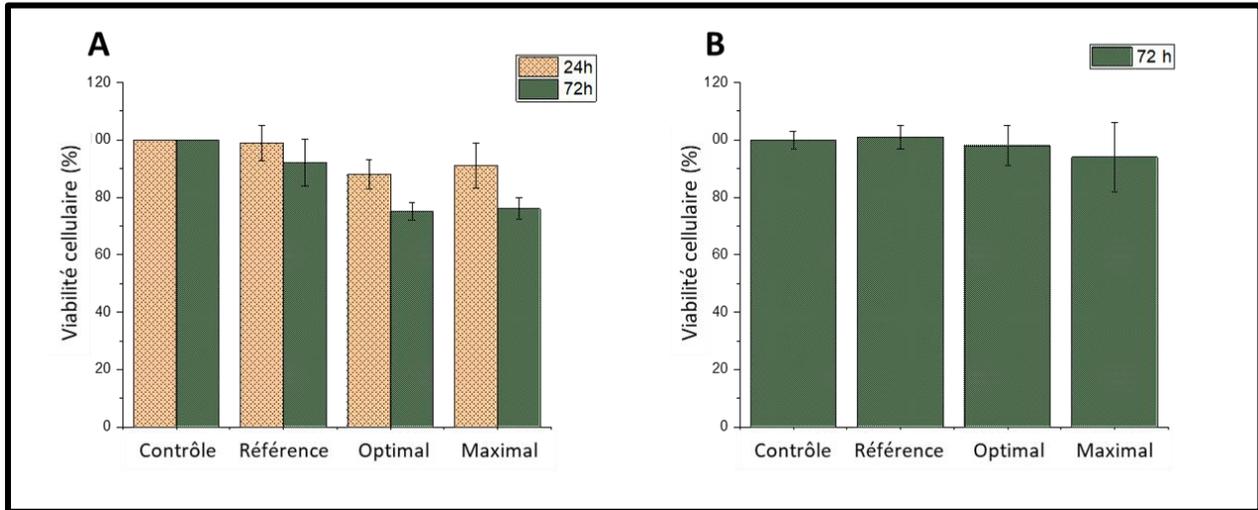


Figure 72: Viabilité des cellules NIH/3T3 après 24 et 72 h de contact avec le milieu de culture (*contrôle*) ou avec le milieu d'extraction des échantillons de PP-PCL non traités (*référence*) ou greffés par l'AMPS via plasma dans les conditions *optimales* et *maximales* avec (A) : 2 ml de solution de PCL par face de PP de 16x30 cm² et (B) : 1 ml de solution de PCL par face de PP de 16x30 cm².

Ces résultats montrent dans un premier temps que, quel que soit la quantité de nanofibres déposée sur l'implant de PP, la viabilité cellulaire des milieux de cultures mis en contact avec les échantillons greffés ou non par l'AMPS n'atteint jamais une valeur significativement inférieure à 70% si un traitement thermique est opéré. Ainsi, il est possible de conclure que les échantillons greffés ou non par l'AMPS ne libèrent pas de produits cytotoxiques et aussi de confirmer que le traitement thermique sous vide permet d'évaporer le solvant résiduel présent dans les nanofibres. Par ailleurs, il est aussi possible de noter une différence significative entre la viabilité cellulaire des milieux de culture mis en contact avec les échantillons greffés par l'AMPS lorsque la quantité de nanofibres de PCL déposée par unité de surface est doublée. En effet, la viabilité cellulaire s'approche des 100% pour des dépôts de 1 ml de solution sur les implants de 30x16 cm² après 72 h de contact (**Figure 72 B**) contre environ 75% pour les dépôts de 2 ml sur une même surface (**Figure 72 A**). L'hypothèse avancée pour expliquer ces résultats est que plus le dépôt de nanofibres est important, plus il est difficile d'éliminer le solvant résiduel par traitement thermique entraînant ainsi une libération de molécules acides dans le milieu de culture. Pour ce qui est du greffage de TBAEMA sur les nanofibres de PCL, l'influence négative de la quantité de nanofibres déposées sur l'implant a pu être confirmée dans une plus large mesure (**Figure 73**). En effet, le dépôt de 2 ml de solution entraîne une libération d'une grande quantité de produit cytotoxique dans la mesure où la viabilité cellulaire est nulle (**Figure 73 A**). Cependant, une

augmentation de cette viabilité a pu être observée pour un dépôt de 1 ml de solution sur les implants de $16 \times 30 \text{ cm}^2$ (**Figure 73 B**). Comme première approximation, il est possible d'expliquer ce phénomène de la même façon que pour le greffage d'AMPS. Néanmoins, il est aussi possible de noter que les échantillons greffés par le TBAEMA dans les conditions optimales présentent, dans ce cas, une viabilité cellulaire bien plus faible (environ 40%) par rapport à ceux greffés dans les conditions maximales (environ 100%). Une hypothèse pour expliquer ce deuxième phénomène est que dans les conditions optimales (plus douces que les maximales), le greffage du TBAEMA s'est réalisé de manière partielle entraînant ainsi la présence de monomères non greffés de TBAEMA piégés dans les nanofibres malgré l'étape de lavage. Ainsi, ces monomères vont se libérer dans le milieu de culture et ensuite entrer en contact avec les cellules, ce qui entraîne la diminution de la viabilité cellulaire.

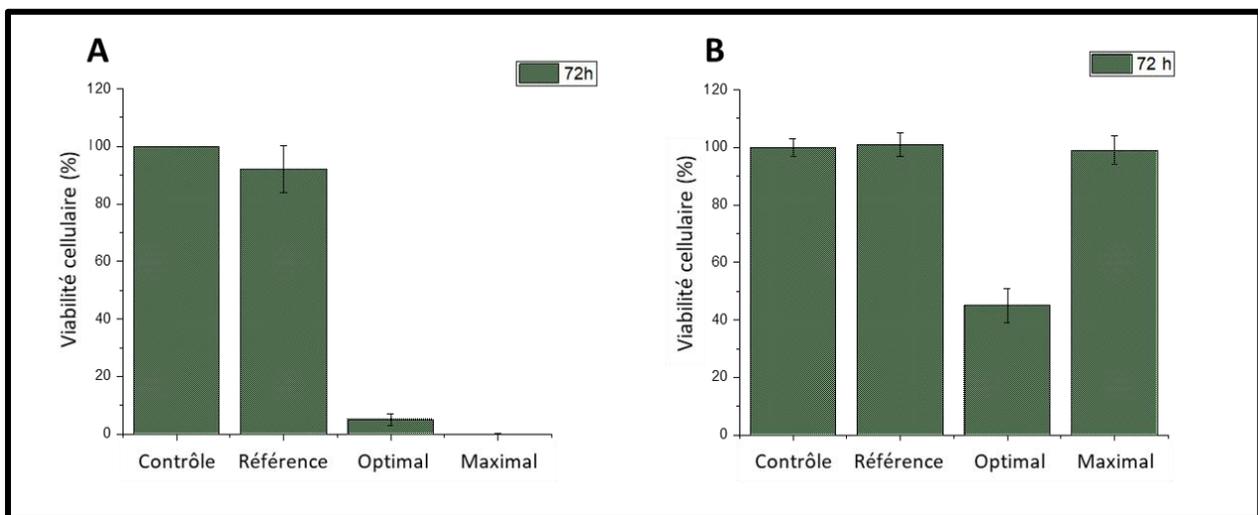


Figure 73: Viabilité des cellules NIH/3T3 après 24 et 72 h de contact avec le milieu de culture (*contrôle*) ou avec le milieu d'extraction des échantillons de PP-PCL non traités (*référence*) ou greffés par le TBAEMA via plasma dans les conditions *optimales* et *maximales* avec (A) : 2 ml de solution de PCL par face de PP de $16 \times 30^2 \text{ cm}$ et (B) : 1 ml de solution de PCL par face de PP de $16 \times 30 \text{ cm}^2$.

IV.d. Contact direct

La cytocompatibilité des implants recouverts de 1 ml de solution par face, fonctionnalisés ou non, a ensuite été évaluée par mise en contact direct avec des cellules NIH/3T3. Dans ce cas, la libération de produits cytotoxiques est évaluée de la même façon que précédemment, mais aussi l'influence de l'aspect de surface des matériaux sur la viabilité cellulaire. Les données de

viabilité en contact direct, ainsi que leur morphologie de surface respective, des échantillons greffés par l'AMPS et le TBAEMA sont présentés respectivement en **Figure 74** et **Figure 75**.

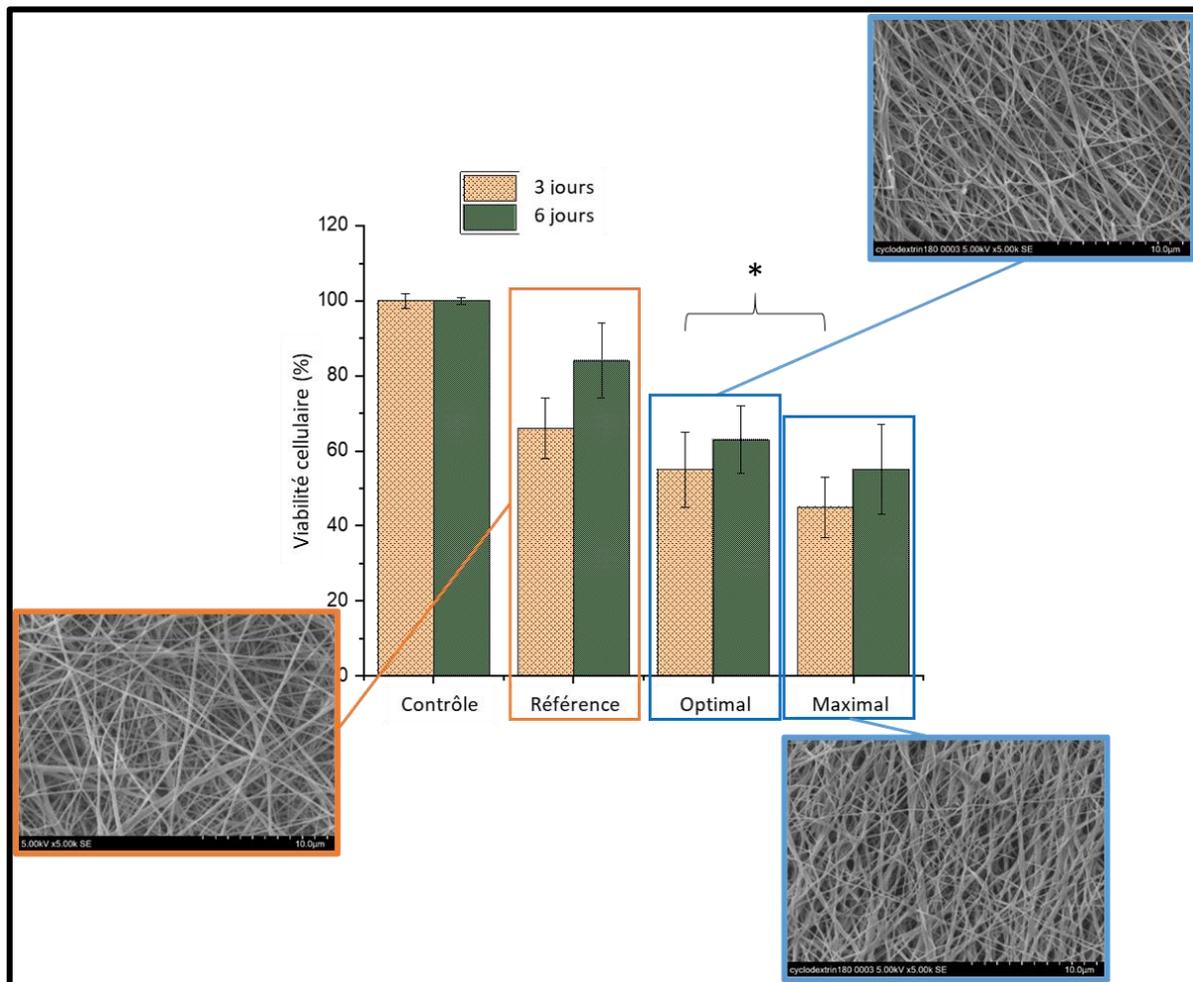


Figure 74: Viabilité des cellules NIH/3T3 après 3 et 6 jours de contact avec le TCPS (*contrôle*) ou avec les échantillons de PP-PCL (1 ml par face) non traités (*référence*) ou greffés par l'AMPS via plasma dans les conditions *optimales* et *maximales* avec les images MEB des surfaces correspondantes. * $p < 0,05$.

Dans un premier temps, il est possible de noter une baisse significative de la viabilité cellulaire après 3 jours de contact pour les nanofibres de PCL avant greffage (*référence*) comparées à la plaque TCPS (*contrôle*) avec des valeurs de $66 \pm 8\%$ et 100% respectivement. D'après les résultats de viabilité cellulaire en contact indirect décrits précédemment, les membranes nanofibreuses de PCL ne libèrent pas de produits cytotoxiques. Ainsi, il est possible de conclure que la baisse de la viabilité cellulaire par contact direct des cellules est directement due à l'état de surface de ces nanofibres. Plusieurs hypothèses principales peuvent être avancées

concernant cette baisse de la viabilité : (i) les cellules prolifèrent plus facilement sur une surface hydrophile, or, la PCL est naturellement hydrophobe ; (ii) la rugosité de surface des nanofibres peut entraîner une baisse de l'adhérence cellulaire et donc une baisse de la viabilité ; (iii) une hypothèse, moins probable, est que des fonctions chimiques cytotoxiques peuvent être présentes en surface des nanofibres de PCL. Après 6 jours de contact, une légère augmentation de la viabilité peut être observée, ce qui démontre un retard de la croissance cellulaire induisant cette baisse de la viabilité et écarte l'hypothèse (iii) qui implique un effet cytotoxique de la surface.

Pour ce qui est des échantillons greffés par l'AMPS (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), une baisse significative de la viabilité est observée après 3 jours de contact pour les conditions optimales ($55 \pm 10\%$) et maximales ($45 \pm 8\%$) de greffage en comparaison aux échantillons non-traités ($66 \pm 8\%$). Cette diminution peut être expliquée par l'importante densité de charges en surface, due à la présence des fonctions greffées, ce qui induit une réduction du pH local comme il a été décrit dans une précédente étude³⁰⁶. Après 6 jours de contact, la même augmentation de la viabilité que pour les échantillons non-traités peut être observée, ce qui permet de conclure encore une fois sur un retard de la croissance cellulaire en raison de la surface et non en raison d'une éventuelle cytotoxicité de cette dernière. Parallèlement, un des objectifs des implants en PP couverts de nanofibres de PCL pour une application de réparation de la hernie est d'empêcher les adhérences postopératoires qui ont lieu en raison d'un dépôt excessif de fibrine 7 jours après l'opération. C'est pourquoi une prolifération cellulaire limitée sur ces membranes peut être un effet positif pour réduire la déposition des fibroblastes à condition d'une absence de cytotoxicité, qui est mise en évidence par la constance de la viabilité cellulaire avec le temps. Enfin, un autre résultat qu'il est important de noter est que la viabilité cellulaire est significativement plus importante après 3 jours de contact sur les échantillons greffés dans les conditions optimales que dans les conditions maximales ($p < 0,05$). Cependant, cette tendance n'est pas observée après 6 jours de contact (pas de différence significative par ANOVA pour $p < 0,05$). Ainsi, les meilleures conditions de greffage (optimales ou maximales) pour les tests *in vivo* ne sont pas clairement établies si nous considérons uniquement ces résultats de viabilité cellulaire.

Concernant les échantillons greffés par le TBAEMA (**Figure 75**), les résultats démontrent là aussi une diminution de la viabilité cellulaire suite au traitement plasma. En effet, après 3 jours contact avec les cellules, la viabilité cellulaire passe de $65 \pm 6\%$ pour les échantillons non-traités à $19 \pm 20\%$ pour les échantillons traités dans les conditions optimales et $46 \pm 9\%$ pour ceux traités dans les conditions maximales. Cette différence peut s'expliquer de la même manière que pour les essais de contact indirect. En effet, dans les conditions optimales, le greffage du TBAEMA ne s'est pas réalisé complètement et entraîne une certaine toxicité du matériau final. Ajouté à cela, la surface peut, elle aussi, jouer un rôle dans la diminution de la cytocompatibilité du matériau, comme cela est le cas pour les échantillons greffés par l'AMPS. Dans les conditions maximales de greffage, il est aussi possible d'observer une augmentation significative ($p < 0,05$) de la viabilité cellulaire entre 3 et 6 jours de contact ($62 \pm 8\%$ après 6 jours). Ce phénomène est un nouvel argument étayant l'hypothèse faite précédemment sur la faible viabilité cellulaire à court terme due à une faible adhérence initiale, ce qui entraîne une prolifération cellulaire retardée.

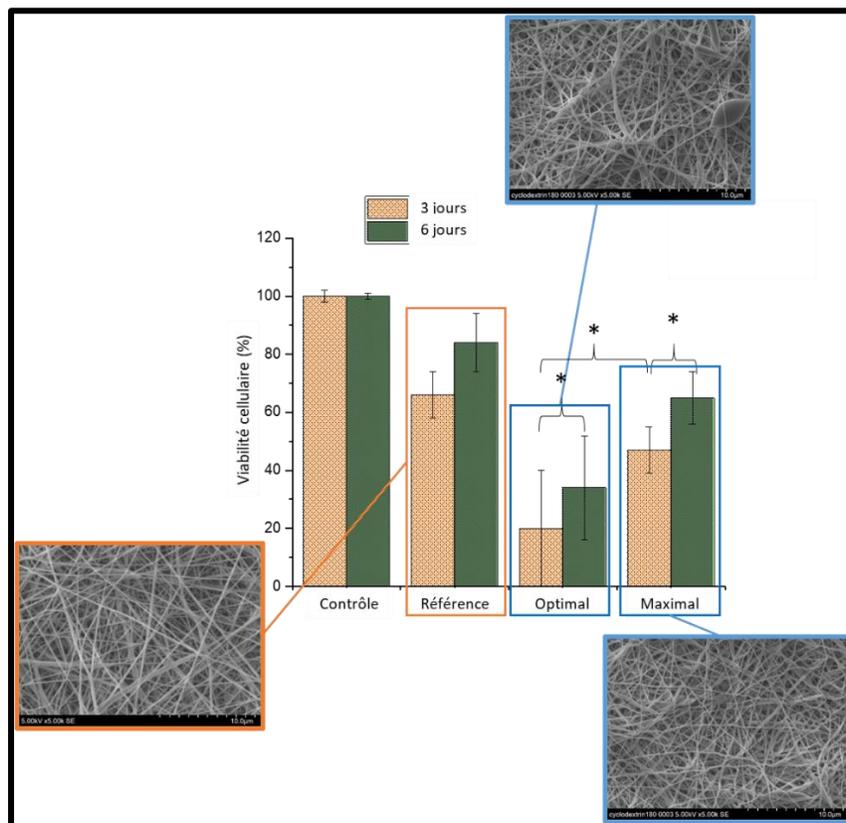


Figure 75: Viabilité des cellules NIH/3T3 après 3 et 6 jours de contact avec le TCPS (contrôle) ou avec les échantillons de PP-PCL (1 ml par face) non traités (référence) ou greffés par le TBAEMA via plasma dans les conditions optimales et maximales avec les images MEB des surfaces correspondantes. * $p < 0,05$.

IV.e. Coagulation et hémocompatibilité (échantillons greffés par l'AMPS)

Pour prouver l'efficacité du greffage d'AMPS via l'activité anticoagulante, les échantillons ont été testés à travers trois essais *in vitro* en contact avec un sang complet. Le temps de coagulation du sang a été évalué par l'immersion de 1, 2 et 3 échantillons sous la forme de disques. Les résultats sont présentés en **Figure 76**.

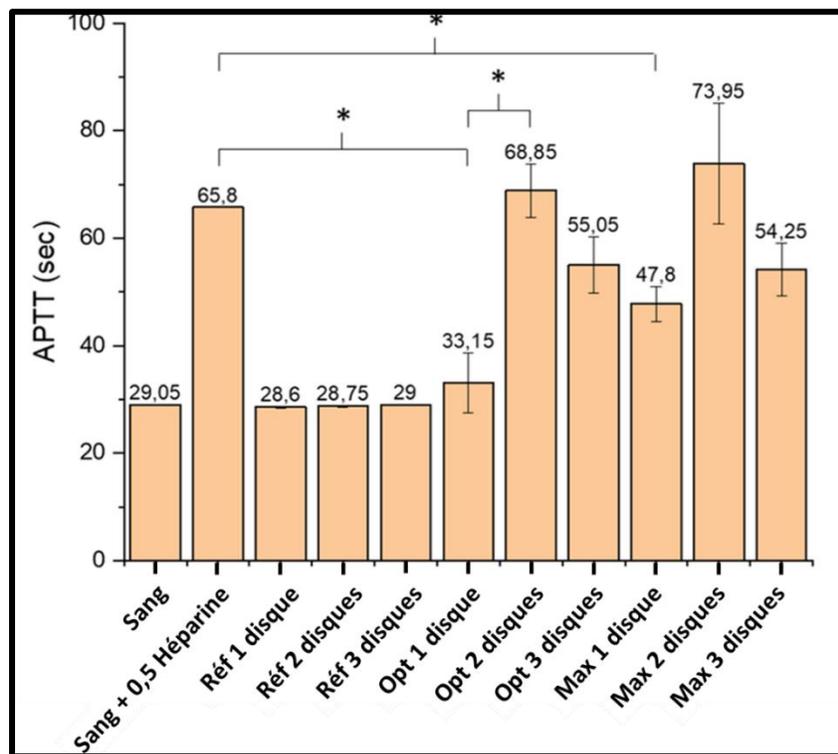


Figure 76: Temps de coagulation du sang sain sur le TCPS (contrôle) avec ou sans 0,5 unité d'héparine et sur un nombre variable de disques d'échantillons de PP couvert de nanofibres fonctionnalisées (optimal et maximal) ou non (référence) ; 1 disque, 2 disques et 3 disques représentent différentes surface spécifique mises en contact avec le sang (respectivement 760, 1520 et 2280 mm²) ; * $p < 0,05$.

Comme il était attendu, des comportements similaires sont observés pour les échantillons contrôle (sang seul) et pour les échantillons non traités (référence) qui servent de surfaces non-anticoagulantes. A l'exception des résultats pour un disque d'échantillon traité dans les conditions optimales (Opt 1 disque), tous les autres groupes montrent une activité anticoagulante avec une APTT moyenne supérieure à 40 s. De plus, l'augmentation du nombre de disques (2 ou 3 disques) des échantillons greffés dans les conditions optimales ou maximales dans le milieu d'immersion mène à une meilleure activité anticoagulante (APPT moyenne autour de 65 s),

comparable à celle de 0,5 unité d'héparine, et ce sans différence notable entre conditions maximale et optimale (si le même nombre de disque est pris en compte) ($p > 0,05$). Il est intéressant de noter qu'il y a une activité anticoagulante significativement différente lorsque l'on compare un disque (760 mm² de surface spécifique) en conditions optimales ou maximales avec 2 ou 3 disques dans les mêmes conditions. Ceci laisse suggérer une activité dose-dépendante des surfaces greffées. Enfin, les résultats d'hémolyse ont montré qu'il n'y a aucun pic d'absorbance significatif relatif à l'hémoglobine (540 nm) observable sur le spectre UV pour les échantillons, quel que soit le nombre de disques immergés dans le sang. Ces résultats sont particulièrement prometteurs pour obtenir une bonne hémocompatibilité des échantillons greffés.

Grâce à leur cytocompatibilité et leur hémocompatibilité, les échantillons greffés par l'AMPS démontrent un effet anticoagulant intéressant lorsqu'un minimum d'aire spécifique est utilisé. Comme il a été décrit précédemment, la cascade de coagulation joue un rôle majeur dans le phénomène d'adhérence, et donc, en retardant cette cascade, les adhérences pourraient être efficacement limitées. Ainsi, ces nanofibres de PCL greffés par l'AMPS sont des candidats prometteurs pour la limitation des adhérences postopératoires dans le cas de la réfection de hernie.

IV.f. Microbiologie (échantillons greffés par le TBAEMA)

De manière à prouver l'efficacité du greffage du TBAEMA sur les échantillons de PP couverts de nanofibres de PCL, des essais de microbiologie par « kill-time » ont été réalisés sur des souches d'*E. coli* pour les Gram négatifs et de *S. aureus* pour les Gram positifs. Les résultats sont présentés en **Figure 77**.

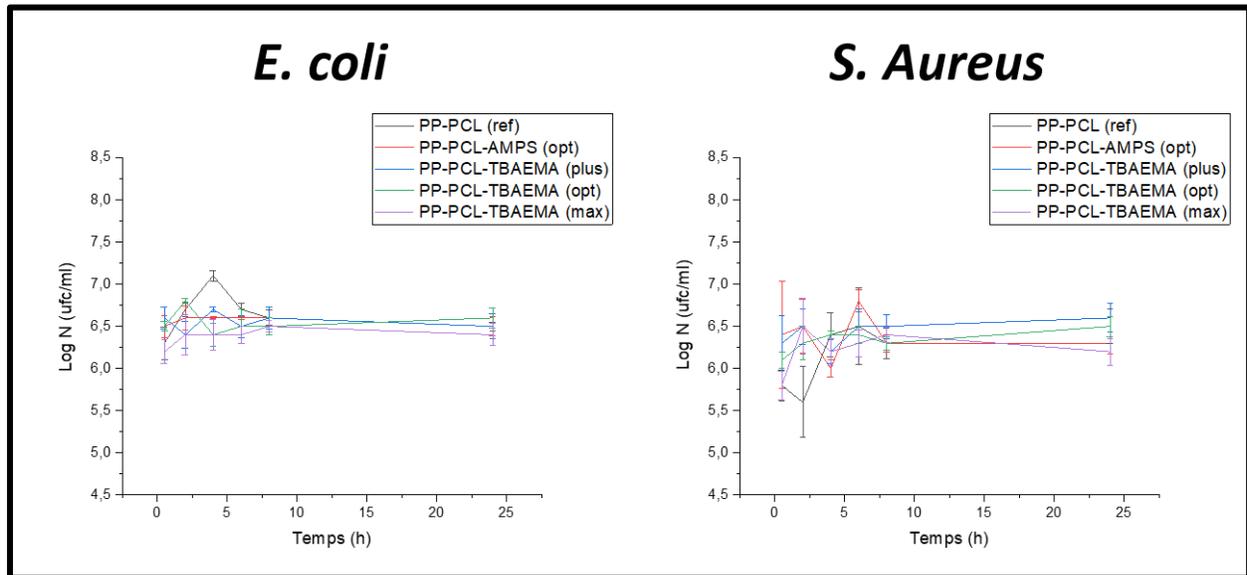


Figure 77: Graphiques représentant l'évolution de la population bactérienne (Log N) en fonction du temps de culture bactérienne pour 2 souches de bactéries mises en contact avec les échantillons couverts de nanofibres de PCL fonctionnalisés ou non par le TBAEMA.

Dans ces essais, aucun effet antibactérien n'était attendu pour la référence (PP-PCL) ainsi que pour les échantillons greffés par l'AMPS, étant donné l'absence de fonctions antibactériennes. Au contraire, étant donné l'activité antibactérienne connue du TBAEMA et de son polymère, une baisse caractéristique de la population bactérienne était attendue pour les échantillons greffés par le TBAEMA. Cependant, les résultats montrent le même taux de population bactérienne sur chaque échantillon greffé ou non par le TBAEMA et ce quel que soit le temps pris en compte. Ainsi, les échantillons greffés par le TBAEMA ne présentent aucun effet antibactérien même au cours du temps. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène : (i) la quantité de TBAEMA greffée sur les nanofibres est inférieure à sa concentration minimale inhibitrice (CMI), (ii) les paramètres du traitement plasma ne sont pas suffisamment élevés pour engendrer le greffage du monomère, (iii) le monomère s'est dégradé au cours du traitement plasma, ce qui pourrait affecter l'amine quaternarisable et donc l'effet antibactérien, (iv) le monomère n'a pas pu se greffer sur les nanofibres et le gonflement observé est dû qu'au passage des molécules de monomères à travers les pores des nanofibres.

La première hypothèse est la plus probable dans la mesure où la quantité de greffage du TBAEMA sur les nanofibres se trouve être assez faible du fait du faible gonflement de la structure nanofibreuse. Cependant, aucune étude, à notre connaissance ne traite de la CMI du TBAEMA sur

ce type de bactéries. Ainsi, des essais plus approfondis sont à envisager dans ce sens. En ce qui concerne la deuxième hypothèse, aucune évolution de l'activité antibactérienne n'a pu être observée pour les différents sets de paramètres de traitement plasma pour le greffage du TBAEMA (opt, max et plus). Ainsi, cette hypothèse peut être facilement écartée. Pour la troisième hypothèse, aucune étude décrit, à notre connaissance, une possible dégradation de ce type de monomères lors qu'ils sont soumis au plasma. Il n'est donc pas possible d'écarter cette hypothèse sans étude plus approfondie sur le devenir du TBAEMA après traitement plasma. Enfin, la dernière hypothèse est facilement écartée par analyse des cartographies EDX des échantillons greffés par le TBAEMA mettant en évidence la présence d'azote et donc de TBAEMA distribué sur la surface des nanofibres de PCL.

IV.g. Essais *in vivo*

Etant donné l'absence de propriétés antibactériennes *in vitro* des échantillons greffés par le TBAEMA testés, ces dernières n'ont pas pu être testés lors d'essais *in vivo*. Cependant, les échantillons greffés par l'AMPS ont présenté des résultats prometteurs à la fois en termes de viabilité cellulaire mais aussi en termes de propriétés anticoagulantes et hémocompatibilité. Ainsi, des essais *in vivo* ont été réalisés sur ces échantillons sur un modèle de rat. Les rats ont subi une incision au niveau de l'abdomen de façon à mimer une opération de hernie et les échantillons ont ensuite été disposés au niveau de la zone d'incision comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes.

14 jours après la lésion péritonéale, les rats sont sacrifiés et une évaluation qualitative de l'adhérence post-opératoire est réalisée. Pour cela, la présence ou l'absence d'adhérence péritonéale a été notée et le statut de cette adhérence a été évaluée en fonction de ces critères : 0 = pas d'adhérence ; 1 = adhérence non-vascularisée sous forme de film fin ; 2 = adhérence vascularisée sous forme de film ; et 3 = adhérence dense et vascularisée. L'adhérence péritonéale est définie comme étant sous forme d'un film si l'échelle de la règle est visible à travers le tissu, et comme dense lorsque cette échelle est invisible. Les résultats de cette étude quantitative sont répertoriés en **Figure 78**.

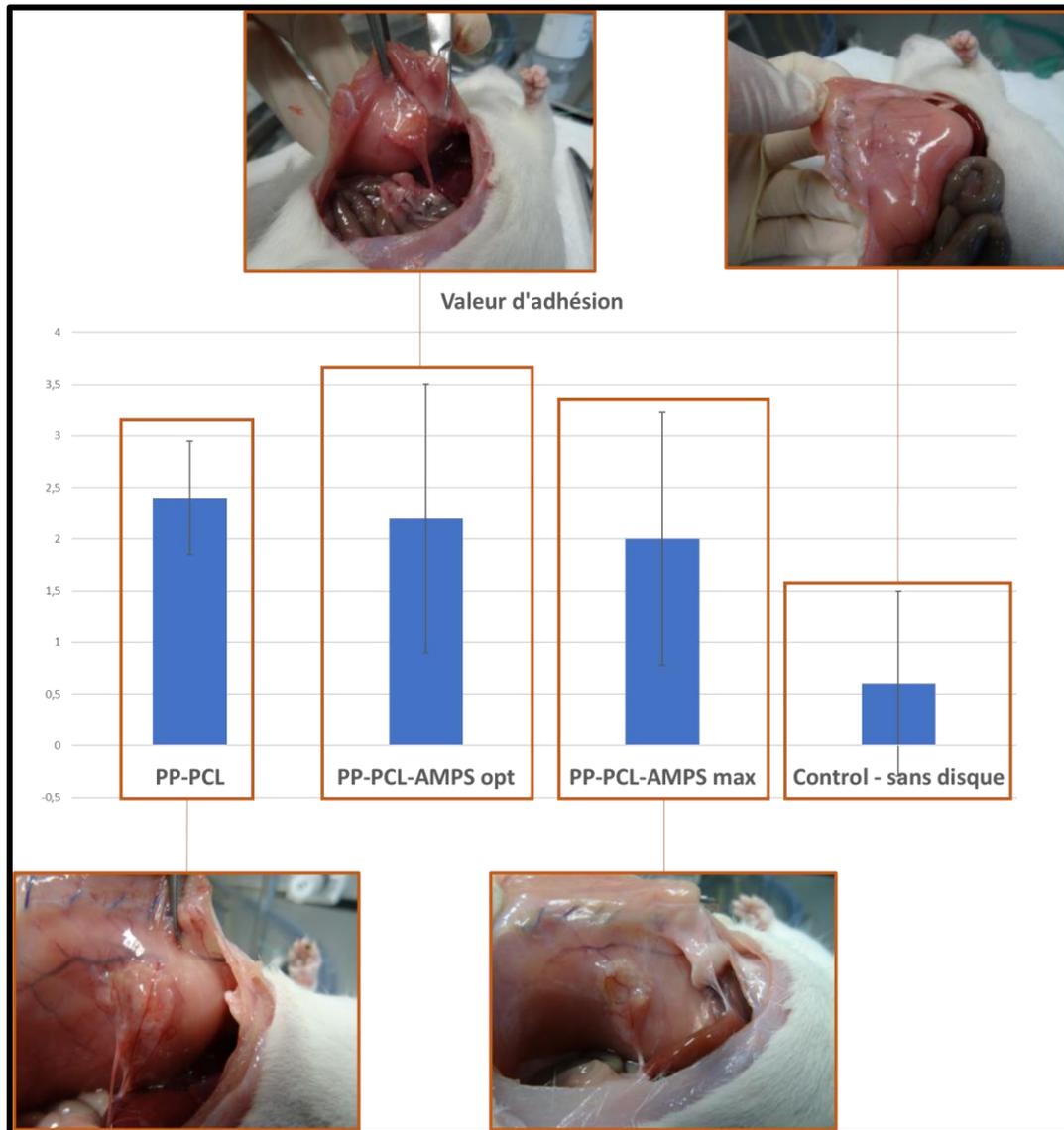


Figure 78: Valeurs d'adhérences pour les échantillons greffés ou non par l'AMPS et sans échantillons avec les images correspondantes ayant permis d'évaluer le taux d'adhérence péritonéale.

Ces résultats montrent une forte propension à la formation d'adhérence postopératoires chez les rats implantés par les échantillons greffés ou non par l'AMPS, comparé aux rats n'ayant pas eu d'implantation (contrôle - sans disque). En effet, les échantillons non greffés par l'AMPS donnent des valeurs d'adhérence de $2,4 \pm 0,5$ contre $0,6 \pm 0,9$ lorsque qu'aucun disque n'est implanté. Les analyses ANOVA démontrent une différence significative à $p < 0,05$ entre ces deux groupes. Concernant les échantillons greffés par l'AMPS, les valeurs obtenues sont de $2,2 \pm 1,3$ pour les conditions optimales de greffage et de $2 \pm 1,2$ pour les conditions maximales, sans différence significative avec les échantillons non-traités et une différence significative à $p < 0,1$

lorsqu'il n'y a pas eu d'implantation. Une étude histologique a complété cette étude pour mettre en évidence la présence de tissus adhérentiels. Les résultats sont les mêmes que pour l'étude macroscopique avec la présence d'une grande majorité de tissus adhérentiels dans le cas des échantillons nanofibreux greffés ou non. En effet, des tissus adhérentiels (**Figure 79A**) sont mis en évidence sur la plupart de ces échantillons en comparaison aux tissus de rats non-implantés (**Figure 79B**). Néanmoins, ces images montrent aussi qu'aucune inflammation n'a lieu suite à la mise en place de l'implant au niveau abdominal, ce qui implique que l'implant est bien intégré dans les tissus et ne provoque pas de rejets.

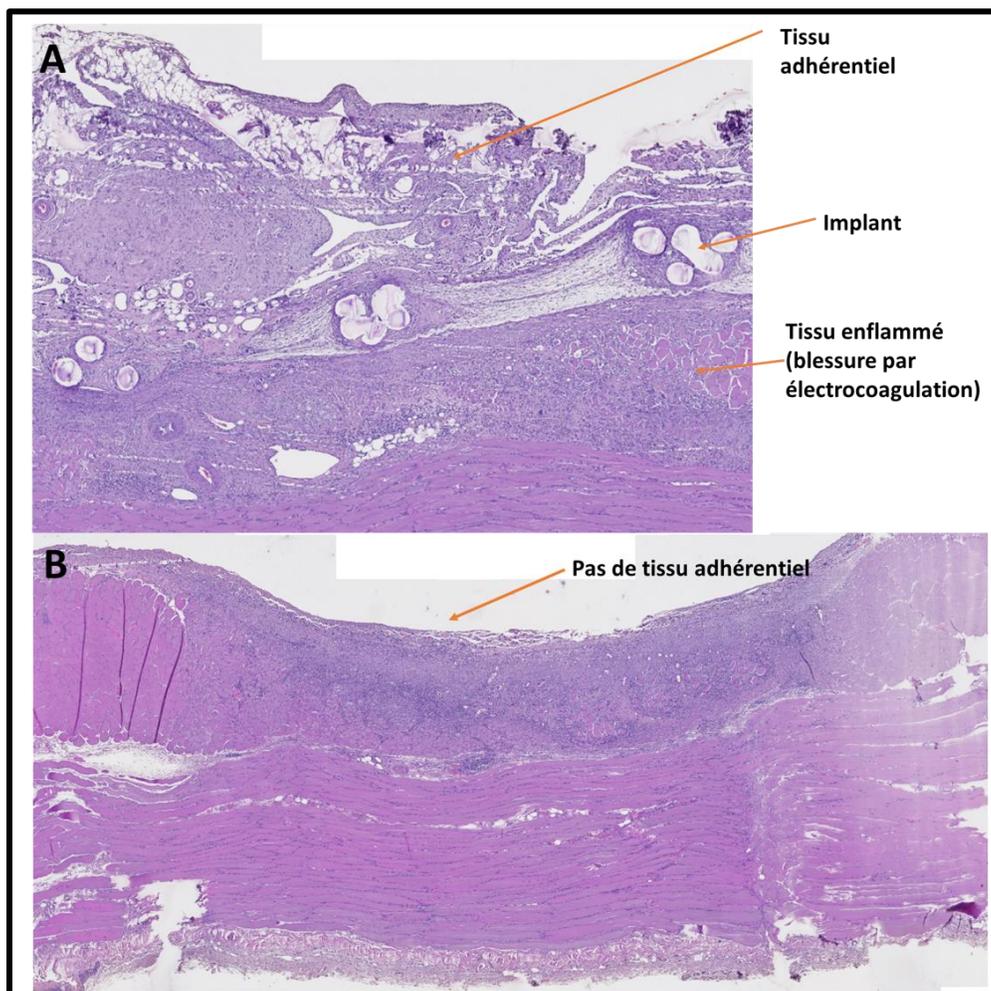


Figure 79: Images histologiques des parois abdominales des rats implantés (A) et non implantés (B).

Ainsi, malgré les propriétés anticoagulantes de ces membranes, elles ne présentent pas les propriétés anti-adhérentes attendues. Cependant, une bonne intégration de l'implant a pu être observée, ce qui est prometteur pour la suite des études.

V. Conclusion

Le but de cette voie était de déposer des nanofibres de polymère biodégradables pour les fonctionnaliser par des monomères bioactifs anticoagulants ou antibactériens, pour des applications dans le traitement de la hernie viscérale. Pour cela, la PCL a été électrofilée directement sur les deux faces d'un implant en PP, et ce dans des conditions optimisées de procédé. De plus, le mélange de solvants utilisé pour l'électrospinning de ce polymère a l'avantage d'être approuvé par la FDA dans des proportions plus importantes que les solvants habituels (organiques).

La copolymérisation greffante induite par plasma froid de plusieurs monomères fonctionnels a été réalisée à savoir : l'acide acrylique, l'AMPS et le TBAEMA. Leur greffage a pu être confirmé grâce à différentes techniques de dosage ou d'imagerie électronique.

Concernant l'évaluation biologique des membranes nanofibreuses greffées par l'AMPS et le TBAEMA, des résultats prometteurs ont été obtenus en termes de cytocompatibilité, et de propriétés anticoagulantes (échantillons greffés par l'AMPS). Cependant, les essais *in vivo* n'ont pas permis de dégager un effet antiadhérent des membranes greffées par l'AMPS, malgré une bonne intégration de ces échantillons dans les tissus des rats testés. De plus amples études sont nécessaires pour connaître la cause de cette absence d'effet anti-adhérent malgré l'action anticoagulante *in vitro* de ces membranes. En effet, l'hypothèse avancée est une augmentation de la rugosité des nanofibres due au traitement plasma, ce qui pourrait être confirmé par des analyses par microscope à force atomique (AFM).

Pour ce qui est de l'effet antibactérien des membranes greffées par le TBAEMA, aucun effet bactéricide n'a pu être mis en avant au cours de cette étude. En effet, les mêmes résultats sont obtenus pour les membranes greffées que pour les échantillons de contrôle. Une étude plus approfondie sur le taux de greffage de TBAEMA sur les échantillons, couplée à une étude de la CMI de cette molécule permettra de mettre en lumière une solution à ce manque d'effet antibactérien.

Voie 2 : Electrospinning Coaxial

Le but de cette voie est de développer des nanofibres coaxiales avec un cœur à base de polymère biodégradable (PCL) et une peau à base de polymère bioactif (PAMPS ou PTBAEMA) pour conserver les propriétés biologiques de contact de ces derniers. Dans un premier temps, les polymères bioactifs seront synthétisés puis les paramètres d'électrospinning seront optimisés pour ces polymères en solution et enfin, l'électrospinning coaxial sera décrit pour chacun des deux types d'activité biologique (effet anti-adhérent pour les nanofibres coaxiales PCL/PAMPS et effet antibactérien pour les nanofibres coaxiales PCL/PTBAEMA).

I. Synthèse et caractérisation des polymères bioactifs

Dans cette voie, la synthèse préalable des monomères utilisés précédemment pour le greffage est nécessaire pour procéder à l'électrospinning coaxial. Le PAMPS ainsi que le PTBAEMA sont décrits comme ayant les mêmes propriétés biologiques que leurs monomères respectifs.

I.a. Synthèse et caractérisation du PAMPS

Dans un premier temps, le PAMPS a été synthétisé dans deux solvant différents, à savoir le DMF (dmf-PAMPS) et dans un mélange eau/dioxane 2/8 (ed-PAMPS), en utilisant l'AIBN comme amorceur. Ces polymérisations radicalaires sont suivies par **RMN ¹H (Figure 80)**. La disparition des pics correspondant aux protons vinyliques du monomère à 6,2 ppm et 5,7 ppm démontre une progression de la réaction dans le sens de la formation du polymère, avec l'absence de monomère résiduel en fin de réaction. Un suivi cinétique a montré une conversion totale du monomère en polymère au bout de 24 h, pour les deux types de solvant.

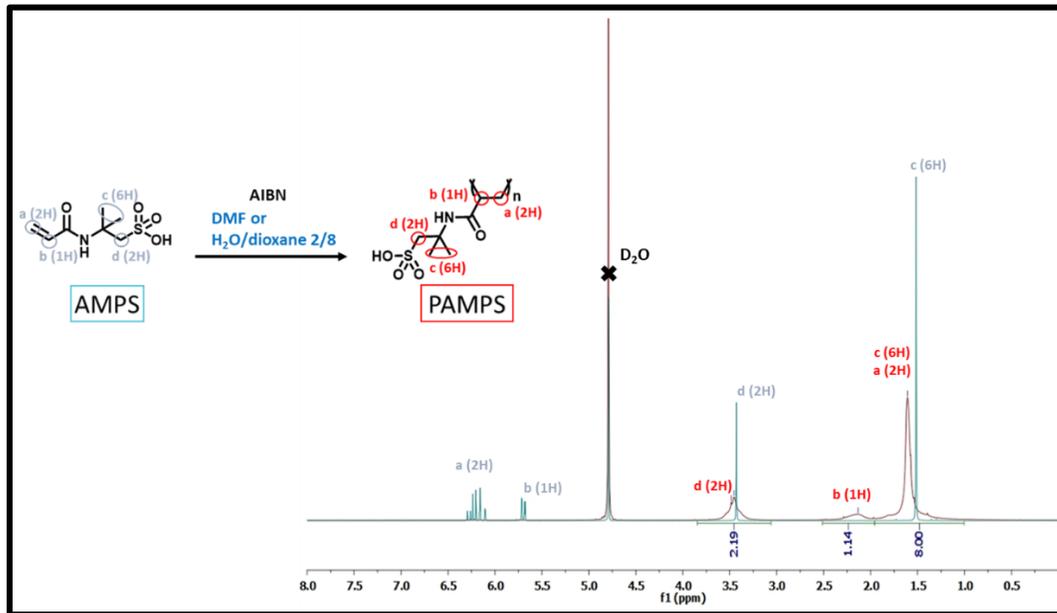


Figure 80: Spectre RMN ^1H du monomère AMPS (en vert) et ed-PAMPS après 24h de réaction (un spectre similaire est obtenu pour le dmf-PAMPS).

Le spectre **IRTF-ATR** du PAMPS obtenu dans les deux conditions de synthèse (**Figure 81**) montre la disparition du pic à 1612 cm^{-1} lorsque l'on compare au spectre IRTF-ATR de l'AMPS seul. Ce pic est relatif à l'insaturation $\text{C}=\text{C}$ du monomère, ce qui prouve également que la polymérisation radicalaire a bien eu lieu. L'absence de pic ou même d'épaulement à ce nombre d'onde démontre qu'il n'y a plus de monomère résiduel dans le polymère final après purification, ce qui appuie les données apportées par la RMN ^1H .

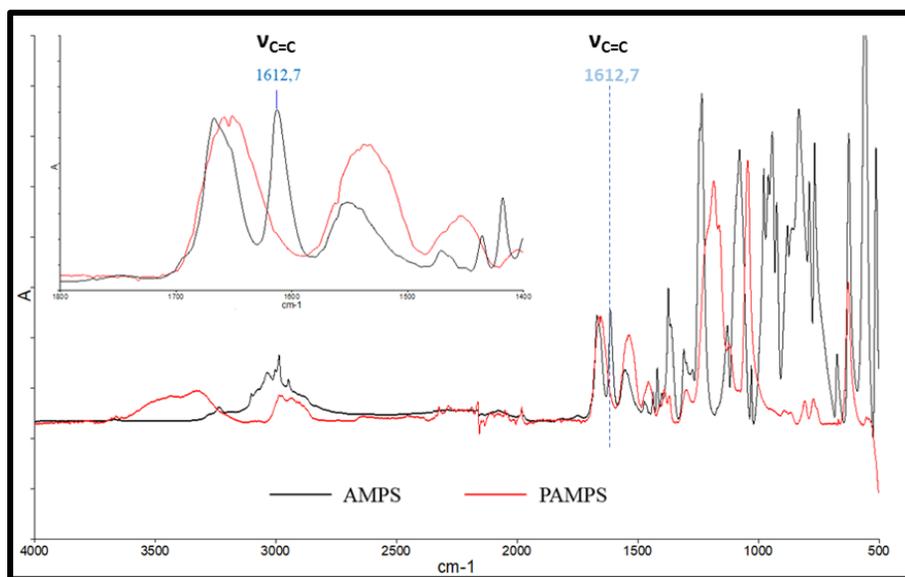


Figure 81: Spectre IR de l'AMPS (en noir) et du PAMPS (en rouge).

Par ailleurs, les **analyses thermiques** ont permis de démontrer une différence de propriétés thermiques entre le dmf-PAMPS et le ed-PAMPS. Dans un premier temps, une analyse **ATG** a mis en lumière une température de dégradation complètement différente entre ces deux polymères (**Figure 82**). En effet, la température de dégradation du dmf-PAMPS se situe aux alentours de 170°C contre 339°C pour le ed-PAMPS. Ce phénomène peut être expliqué par une observation faite par Bhardwaj *et al.* concernant les groupements sulfonates du PAMPS obtenu en milieu aqueux³⁰⁷. En effet, ils ont démontré que, lors de l'obtention de ce polymère en milieu aqueux, la présence de groupements sulfonates chargés et non chargés entraîne une réticulation de ce polymère, ce qui augmente ces propriétés thermiques et notamment la température de dégradation. Il est intéressant de noter que le résidu de l'ordre de 30% obtenu pour le ed-PAMPS est dû à la présence de sodium sous forme Na⁺ associée aux groupements sulfonates. Enfin, aucune perte de masse n'a été observée aux températures d'ébullition des solvants (153°C pour le DMF, 100°C pour l'eau ou 101°C pour le dioxane), ce qui indique donc que les polymères obtenus ont bien été purifiés.

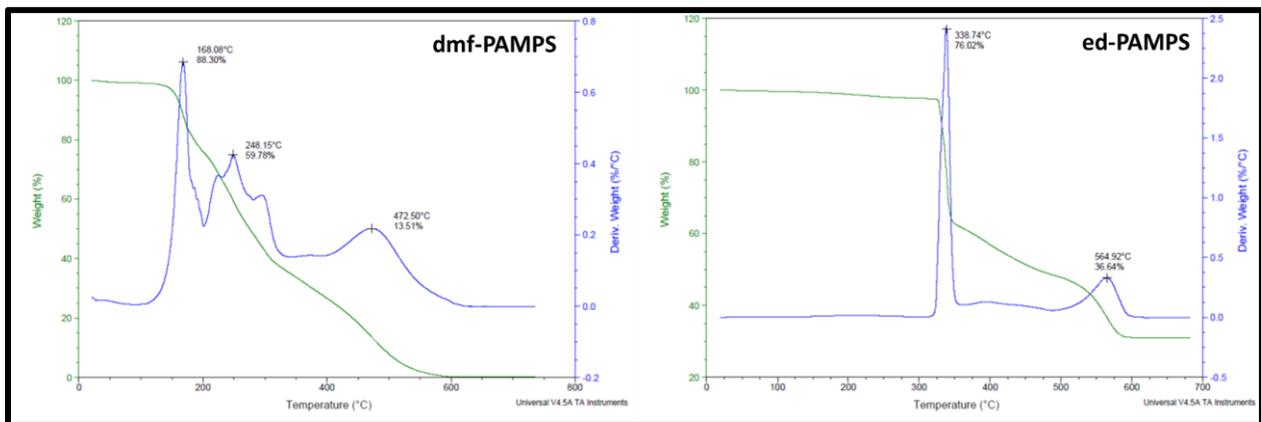


Figure 82: Thermogrammes ATG du dmf-PAMPS (à gauche) et de l'ed-PAMPS (à droite).

Une différence entre ces deux polymères a également été observée lors de l'analyse des thermogrammes **DSC** (**Figure 83**). En effet, un pic endothermique relatif à la transition vitreuse (T_g) du PAMPS a été observé aux alentours de 46°C pour le dmf-PAMPS contre 55°C pour le ed-PAMPS. Cette différence peut être expliquée de la même façon que précédemment lors de l'observation des thermogrammes ATG. En effet, la réticulation du polymère entraîne une diminution de la mobilité inter-chaines et donc une augmentation de la T_g .

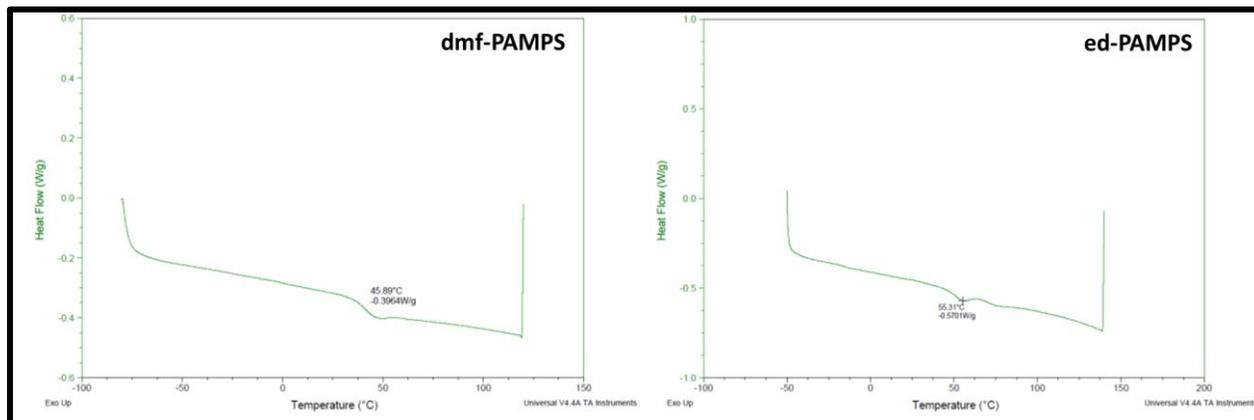


Figure 83: Thermogrammes DSC du dmf-PAMPS (à gauche) et de l'ed-PAMPS (à droite).

Enfin, la masse molaire de ces polymères a été évaluée par **viscosimétrie capillaire** en utilisant les paramètres de Mark-Houwink ($\alpha = 0,80$; $K = 2,11 \times 10^{-5} \text{ g/dL}$)²⁹⁶. Les résultats ont montré une masse molaire viscosimétrique M_V de l'ordre de $180.000 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le dmf-PAMPS contre $200.000 \text{ g.mol}^{-1}$ pour le ed-PAMPS.

Ainsi, tous ces résultats montrent que le type de solvant utilisé pour la synthèse influe sur la structure du PAMPS obtenu et sur ses propriétés. Le dmf-PAMPS est plus difficile à extraire à la fin de la synthèse, ce qui fait du mélange eau/dioxane un meilleur candidat. De plus, le mélange eau/dioxane est un couple de solvants moins toxique pour l'organisme que le DMF. En effet, d'après l'institut national de recherche et de sécurité (INRS), la DL_{50} (dose létale pour 50% des animaux d'un groupe) du DMF est de 1500 à 4720 mg/kg chez le lapin contre 7855 mg/kg pour le dioxane par voie cutanée. Pour toutes ces raisons, nous utiliserons donc l'ed-PAMPS pour tous les expérimentations suivantes.

I.b. Synthèse et caractérisation du P(AMPS-co-AA)

La synthèse de copolymères P(AMPS-co-AA) a été réalisée pour pouvoir moduler la proportion de groupements sulfonates dans les nanofibres et éventuellement post-fonctionnaliser le polymère. En effet, les seules fonctions réactives du PAMPS sont les groupements sulfonates responsables de l'activité anticoagulante qui est visée dans notre cas. Il n'est donc pas intéressant de modifier ces fonctions chimiques. Cependant, il peut être nécessaire

Voie 2 : Electrospinning Coaxial

de modifier ce polymère de manière à augmenter sa stabilité, et notamment sa tenue dans des milieux aqueux.

Plusieurs polymères P(AMPS-co-AA) ont été synthétisés en suivant le protocole en milieu aqueux et en différentes proportions de AMPS/AA, à savoir : 1:2, 1:1, 2:1 et 1:0 (PAMPS pur). La synthèse de ces différents P(AMPS-co-AA) a été suivie par RMN ^1H et les spectres correspondants à chaque proportion sont présentés en **Figure 84**.

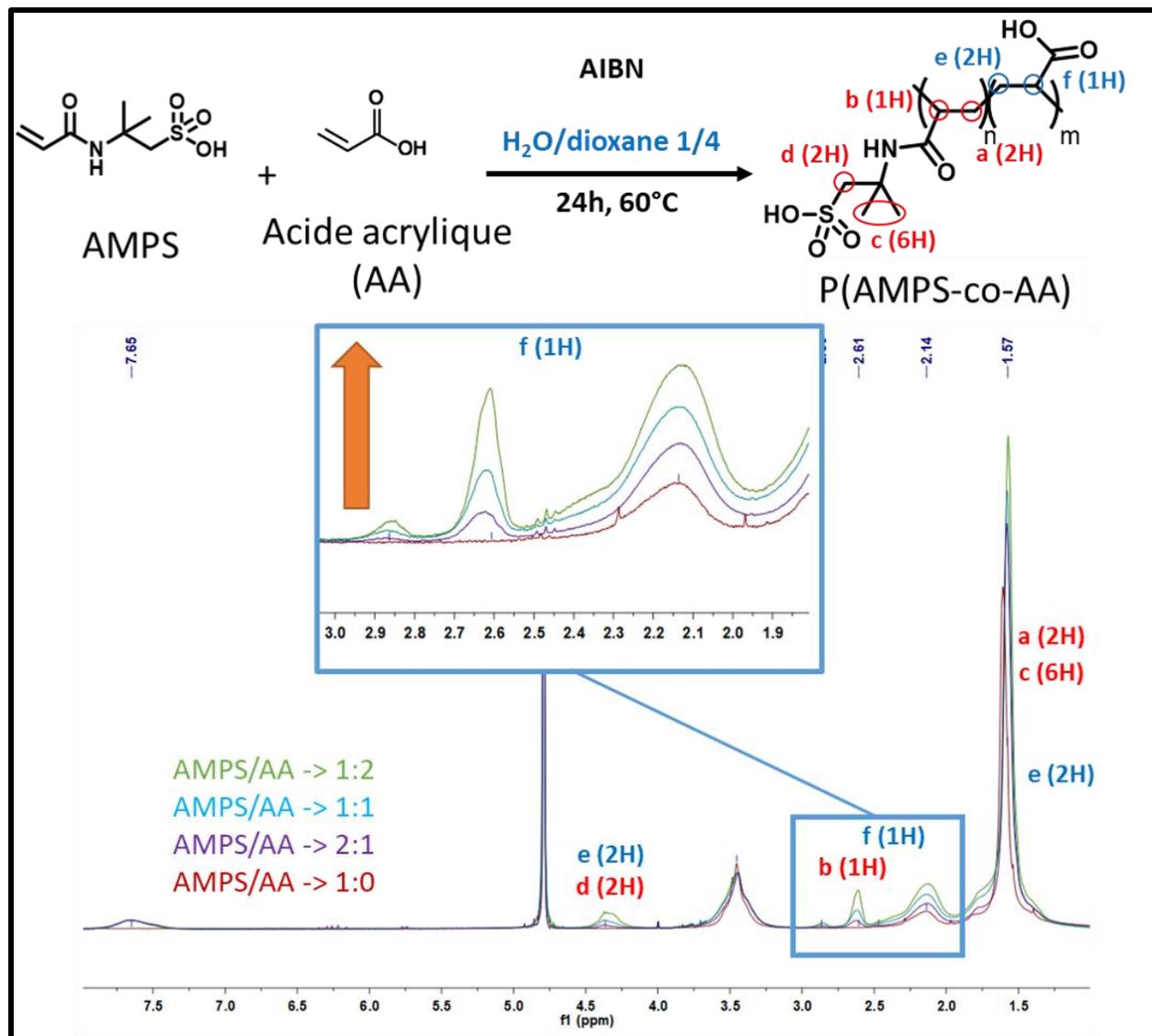


Figure 84: Spectre RMN ^1H des différents copolymères P(AMPS-co-AA)

Les différentes RMN ^1H montrent une augmentation de l'intensité du pic à 2,15 ppm lorsque l'on augmente la quantité d'acide acrylique. En effet, ce pic est déjà présent dans le spectre RMN ^1H du PAMPS pur, mais le grossissement montre bien une augmentation de

l'intensité de ce pic, ainsi que l'apparition de nouveaux pics à des déplacements plus élevés. Cette observation peut laisser penser à l'apparition de nouveaux protons par rapport au PAMPS lors de l'ajout d'acide acrylique. Cependant, les nouveaux protons sont attendus à des déplacements chimiques proches de ceux de la chaîne principale du PAMPS. En effet, la polymérisation se fait par voie radicalaire et l'environnement des protons vinyliques de l'acide acrylique est assez proche de celui des mêmes protons pour l'AMPS. L'apparition des pics à 2,65 et 2,85 ppm est expliqué par un « effet de toit » lié à la présence d'un carbone asymétrique qui crée un environnement différent pour deux protons similaires. Ce phénomène se caractérise par la présence de pics satellites au pic principal de ce proton avec des intensités de plus en plus faibles au fur et à mesure que l'on s'écarte du pic principal. Ainsi, le pic à 2,15 ppm est le pic principal, les pics satellites se trouvent à 2,65 et 2,85 ppm et nous devrions retrouver les mêmes à 1,65 et 1,45 ppm. Néanmoins, le signal de ces pics se trouvent être dissimulés dans le signal des protons situés à 1,60 ppm. Donc, il n'est pas possible de conclure quant à la quantité d'acide acrylique réellement présent dans chaque type de copolymères synthétisé. Cependant, qualitativement, il est possible de voir qu'en augmentant la quantité d'acide acrylique dans le milieu de synthèse, la quantité de motifs acide acrylique augmente aussi dans le copolymère étant donné à l'augmentation de l'intensité du pic à 2,15 ppm et de ses satellites.

L'analyse des spectres **IRTF-ATR** de ces copolymères confirme ces résultats (**Figure 85**) par l'apparition d'un pic d'intensité faible et large à 1718 cm^{-1} relatif aux vibrations d'élongation C=O d'acide carboxylique, lorsque l'on compare les spectres du PAMPS et des copolymères. Comme pour la RMN ^1H , l'intensité de ce pic augmente avec la quantité d'acide acrylique dans le milieu réactionnel. Ainsi, il est possible de conclure qualitativement sur l'augmentation du nombre de motifs acide acrylique dans les chaînes de copolymère lorsque l'on augmente la proportion de ce monomère dans la synthèse. Cependant, la présence du pic à 1663 cm^{-1} relatif aux vibrations d'élongation C=O des liaisons amides empêche là encore l'estimation correcte de la proportion d'acide acrylique dans chaque copolymère.

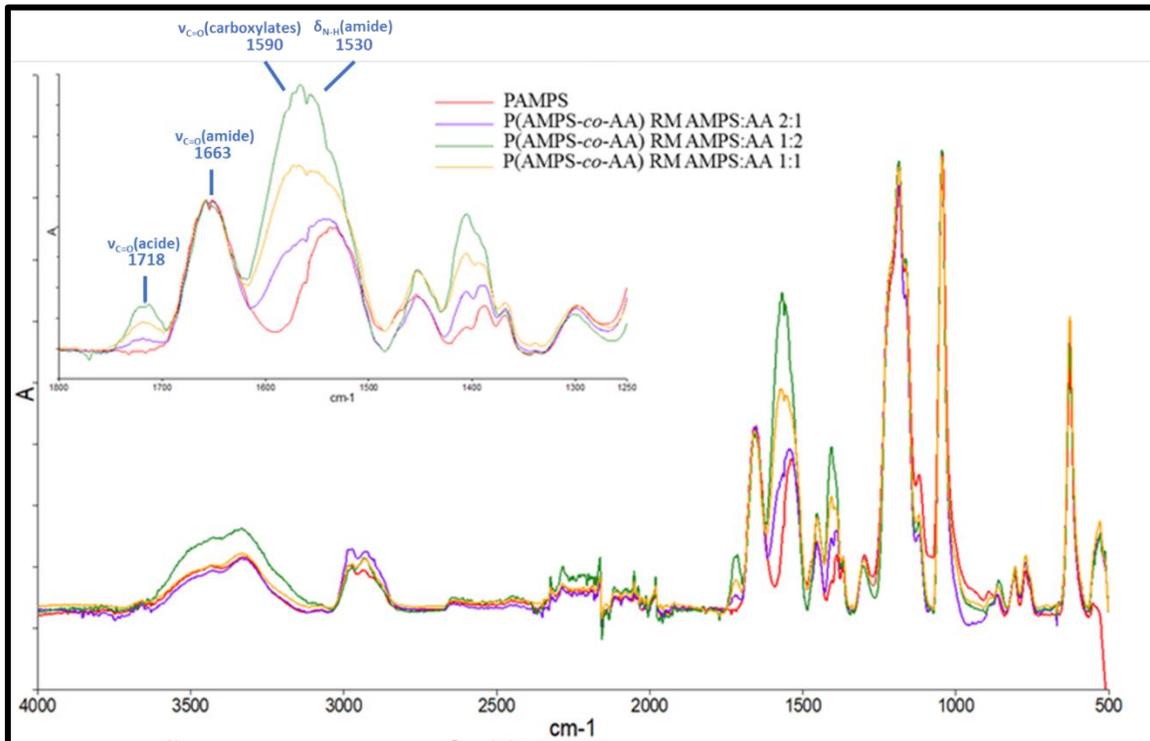


Figure 85: Spectres IRTF-ATR du PAMPS et des copolymères P(AMPS-co-AA) à différentes proportions d'AA.

I.c. Synthèse et caractérisation du PTBAEMA

Le PTBAEMA a été synthétisé dans des conditions proches du PAMPS avec l'AIBN comme amorceur, dans un solvant organique (éthanol) à une température de 70°C pendant 72 h et sous atmosphère inerte. Le polymère est facilement récupéré après sa synthèse par précipitation/filtration et un traitement thermique à 50°C sous vide a été réalisé afin d'éliminer le solvant résiduel. La synthèse a été suivie par RMN ^1H (Figure 86) et la conversion du monomère en polymère est facilement observable par la disparition des pics éthyléniques à 5,60 et 5,25 ppm qui laissent place à des pics élargis notamment entre 2,05 et 2,25 ppm. Un suivi cinétique a été réalisé pour étudier la conversion du TBAEMA en PTBAEMA dans ces conditions et a montré que le temps de réaction de 72h est nécessaire pour avoir une conversion totale du monomère en polymère.

Les propriétés thermiques du PTBAEMA ont été analysées par ATG et DSC et les résultats sont présentés en Annexe 4. Concernant l'ATG, il est possible de voir que la partie organique du PTBAEMA commence à se dégrader à 220°C mais aussi qu'aucun solvant résiduel n'est présent étant donné l'absence de perte de masse à 79°C (température d'ébullition de l'éthanol, solvant

de réaction). Cependant, comme il a été décrit dans la **partie III** de la **voie 1**, la DSC du PTABEMA n'indique aucune transition vitreuse dans la gamme de température étudiée.

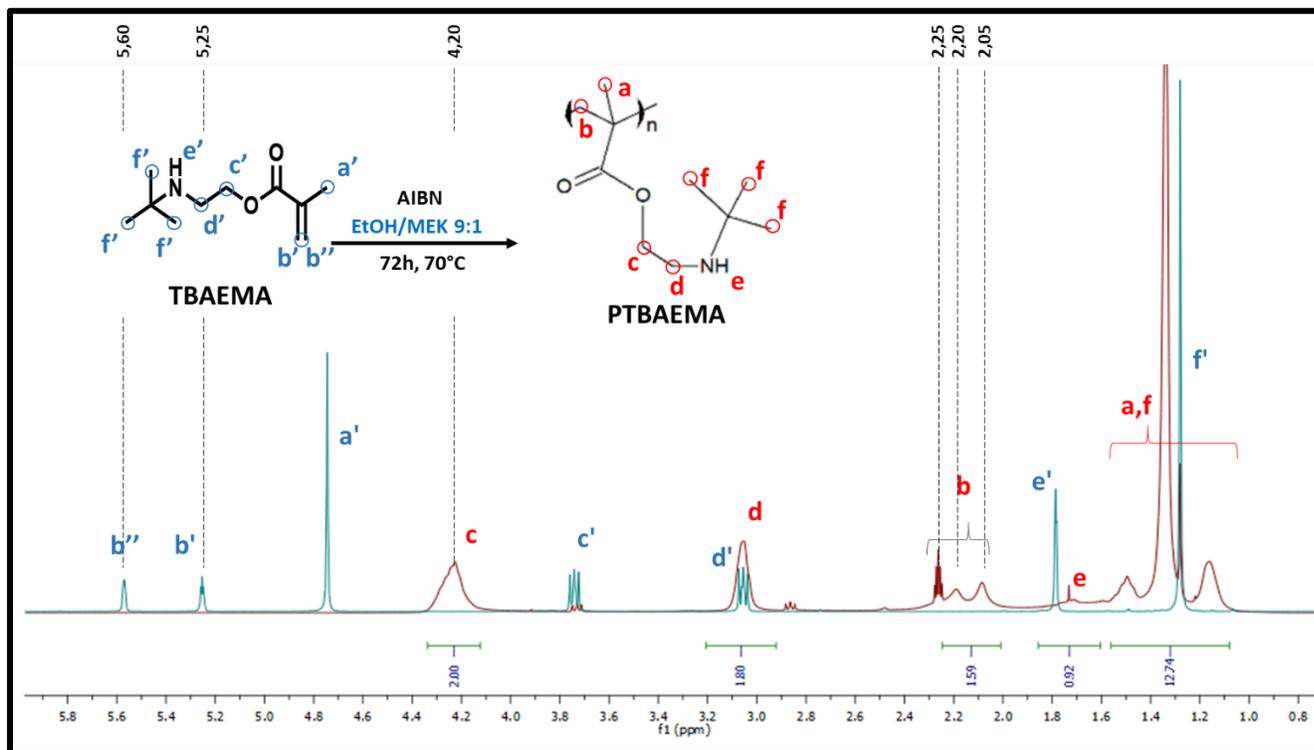


Figure 86: RMN ^1H du TBAEMA (en bleu) et du PTBAEMA (en rouge)

II. Elaboration et caractérisation des nanofibres cœur/peau

II.a. Nanofibres de PAMPS et des P(AMPS-co-AA)

II.a.i. Electrospinning du PAMPS et des P(AMPS-co-AA)

Dans un premier temps, l'électrospinning du PAMPS et des copolymères P(AMPS-co-AA) seuls a été réalisé de manière à identifier les meilleurs paramètres d'électrospinning.

L'électrospinning du brut réactionnel du dmf-PAMPS après 24 h de réaction a tout d'abord été testé. La concentration en PAMPS estimée dans ce milieu réactionnel est de 30%wt. L'observation au MEB a montré des nanofibres sans défauts avec un diamètre moyen de 306 ± 61 nm pour un débit de 0,3 ml/h et un voltage de 23 kV (**Figure 87A**). Ce résultat présente un intérêt en industrie dans la mesure où ceci permettrait d'éviter des étapes de purification du polymère avant l'électrospinning. Cependant, le thermogramme ATG de ces nanofibres après traitement

thermique sous vide à 120°C pendant 24h (**Figure 87B**) montre la présence de solvant résiduel en très grande quantité (de l'ordre de 10%wt), ce qui empêche leur utilisation pour notre application.

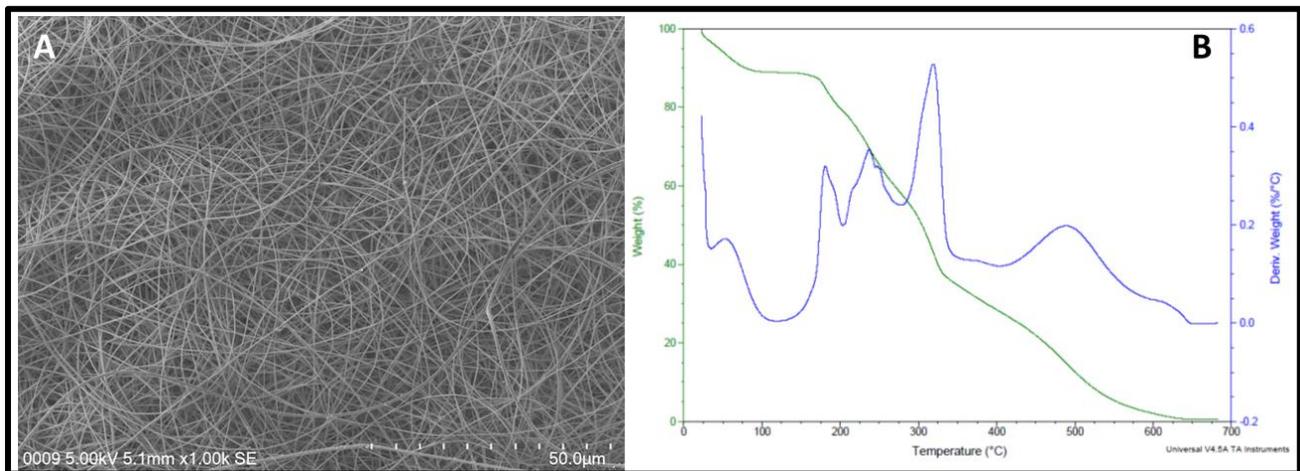


Figure 87: (A): Image MEB des nanofibres de dmf-PAMPS obtenues par electrospinning du brut réactionnel ($d_{A-C} = 20$ cm, $D = 0,3$ ml/h, $V = 23$ kV, $T = 21^\circ\text{C}$, $H = 35\%$); (B) Thermogramme ATG des nanofibres de dmf-PAMPS obtenue par le brut réactionnel après traitement thermique à 120°C sous vide pendant 24h.

Le ed-PAMPS est facilement purifié et resolubilisé dans de nombreux solvants à différentes concentrations notamment dans un mélange acide formique/eau 1:6 jusqu'à 2,6%wt, dans un mélange eau/éthanol 1:1 jusqu'à 6%wt, dans l'eau pure à 6%wt et dans le mélange AFA 5/5 jusqu'à 20%wt, déjà utilisé pour l'électrofilage de la PCL. Ainsi, le ed-PAMPS a été solubilisé à hauteur de 20%wt dans AFA 5/5 puis électrofilé sur un collecteur rotatif. Des nanofibres sans défaut ont alors été obtenues avec un diamètre de 290 ± 68 nm pour un voltage de 24 kV et un débit de 0,1 ml/h. Il est intéressant de noter que pour des voltages et débits plus élevés ou plus faibles, le jet se déstabilise et rend impossible l'obtention de nanofibres. Ceci peut être expliqué par la présence de forces répulsives au sein même des chaînes de PAMPS, étant donné sa nature polyélectrolytique, qui sont responsables de l'instabilité du jet. Il est aussi impossible de procéder à l'electrospinning du PAMPS dans ces conditions pour des concentrations plus basses. L'ed-PAMPS sera donc utilisé dans la suite de l'étude et appelé PAMPS.

Les mêmes résultats ont été observés pour l'electrospinning des différents copolymères P(AMPS-co-AA) avec des conditions d'electrospinning similaires à celles isolées pour le PAMPS.

II.a.ii. Augmentation de la stabilité des nanofibres de PAMPS en milieu aqueux

Etant donné la solubilité du PAMPS dans l'eau, un post-traitement est nécessaire de manière à stabiliser la structure nanofibreuse lors de l'immersion dans l'eau pour des applications biomédicales. Dans un premier temps, les nanofibres de PAMPS obtenues par electrospinning de la solution à 20%wt dans AFA5/5 ont été traitées thermiquement de 120°C à 160°C sous vide pendant 1 à 24 h. Cependant, même après le traitement thermique le plus agressif (160°C pendant 24h), la membrane nanofibreuse reste soluble dans l'eau, et une augmentation notable de la friabilité est observée.

Pour pallier ce problème, plusieurs solutions ont été envisagées. La première est l'utilisation d'un **polymère de combinaison** (« blend polymer ») : le poly(alcool vinylique) (PVA). En effet, ces polymères sont souvent utilisés pour faciliter l'electrospinning d'autres polymères mais aussi pour permettre une augmentation de la stabilité *via* un post-traitement thermique. Ainsi, deux mélanges PAMPS/PVA (1:3 à 8%wt et 9:1 à 11%wt) ont été électrofilés à des débits de 0,5 ml/h pour des voltages de 14 et 16 kV respectivement. Pour ces paramètres, les membranes obtenues ne présentent pas de défauts et des diamètres de 405 ± 36 nm et 156 ± 65 nm respectivement. Ensuite, plusieurs traitements thermiques ont été réalisés entre la température de transition vitreuse du PVA (85°C) et sa température de fusion (200°C), suivis d'une immersion dans un milieu aqueux pour en étudier la stabilité. Cependant, là encore les membranes présentent un caractère hydrosoluble.

La deuxième solution envisagée pour répondre au problème de solubilisation du PAMPS est l'utilisation des **copolymères P(AMPS-co-AA)** en combinaison avec le **PVA**. En effet, les copolymères présentent des fonctions acides carboxyliques disposées aléatoirement sur leurs chaînes. L'hypothèse avancée pour cette solution est que les fonctions alcools du PVA peuvent interagir avec certaines fonctions acides carboxyliques du P(AMPS-co-AA) pendant le procédé d'electrospinning ou pendant un post-traitement thermique. Plusieurs paramètres ont été testés avec les différents copolymères synthétisés précédemment et des ratios P(AMPS-co-AA)/PVA de 9:1 ou 1:3. Dans tous les cas, des nanofibres ont été formées au cours de l'electrospinning pour

des débits de 0,3 ml/h avec des diamètres allant de 200 à 800 nm suivant les conditions. Cependant, même après traitements thermiques (allant de 80 à 130 °C pendant 15 minutes à 4 heures), les membranes obtenues se solubilisent immédiatement dans l'eau.

La troisième voie étudiée pour parer à ce problème de solubilité est la **réticulation amorcée par UV**. Cette technique repose dans notre cas sur l'utilisation d'un agent photoréticulant (le tétraacrylate de pentaérythrite « PETA ») mélangé à la solution d'électrospinning puis une soumission des membranes à une lampe UV à deux intensités différentes : haute (HIUV) et basse (LIUV). Les nanofibres ont été obtenues *via* une solution 19:1 PAMPS/PETA à 20%wt dans AFA 5/5 puis soumises à différentes irradiations UV. Le comportement des liaisons chimiques a été suivi par IRTF-ATR et les résultats sont présentés en **Figure 88**.

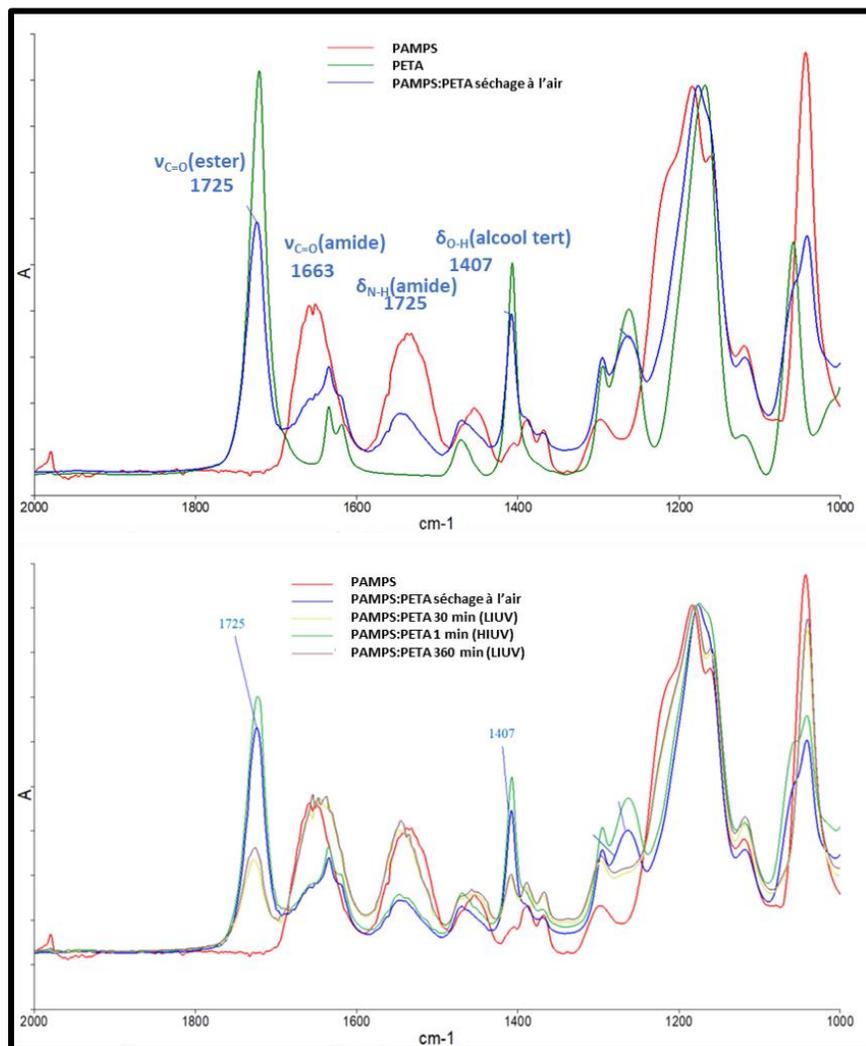


Figure 88: (en haut): Spectres IRTF du PAMPS, du PETA et des nanofibres de PAMPS:PETA séchées à l'air; (en bas): Spectres IR des nanofibres de PAMPS:PETA séchées à l'air ou irradiées pendant différents temps et sous des lampes de différentes intensités.

Les spectres IRTF-ATR montrent dans un premier temps que les pics présents dans le spectre des nanofibres PAMPS:PETA séchées à l'air et absents de celui du PAMPS sont relatifs au PETA (1725 et 1407 cm^{-1}), et donc qu'il n'y a pas de réaction particulière lors du séchage à l'air. De plus, lorsque les nanofibres PAMPS:PETA sont irradiées pendant 30 minutes avec une lampe LIUV, une légère diminution de la proportion de PETA est observée. Cependant, une augmentation du temps d'irradiation jusqu'à 360 minutes ne permet pas d'observer de différence par rapport à 30 minutes d'irradiation. En contraste, lorsque les nanofibres de PAMPS:PETA sont irradiées pendant 1 minute par une lampe HIUV, aucune différence n'a été observée par rapport aux échantillons non-irradiés. Finalement, après immersion dans l'eau chaque membrane se solubilise immédiatement, ce qui montre que la réticulation n'a pas eu lieu comme attendu. Il est intéressant de noter que malgré une augmentation du taux de PETA (PAMPS:PETA 9:1), le même résultat est observé et ainsi aucune amélioration de la réticulation n'a pu être observée. Ces résultats indiquent que le PETA, qui est décrit comme agent réticulant du PEO³⁰⁸, ne permet pas de réticuler le PAMPS.

D'autres essais ont été réalisés en ajoutant du PEO dans les solutions d'electrospinning de manière à obtenir un ratio PAMPS/PEO/PETA de 18:2:5. L'electrospinning de cette solution dans différentes conditions est présenté sur la **Figure 89A-C**. Les membranes nanofibreuses de PAMPS:PEO:PETA ont été exposées à une irradiation UV pendant 10 à 20 minutes sous une lampe HIUV. Les images MEB montrent que la morphologie et la taille des nanofibres ne change pas significativement lors de l'exposition à l'irradiation UV (**Figure 89B-C**). La stabilité dans un milieu aqueux a été testée pour les membranes réticulées par UV en les immergeant pendant 30 minutes, puis en les séchant dans une étuve sous vide à 40 °C pendant 12 h. Les **Figure 89 D et E** montrent un gonflement des nanofibres suite au contact avec l'eau, mais sans solubilisation totale de la membrane. Cependant, le gonflement des nanofibres semble trop important pour l'application souhaitée étant donné que la porosité a presque totalement disparu. En effet, la porosité joue un rôle important dans le comportement cellulaire.

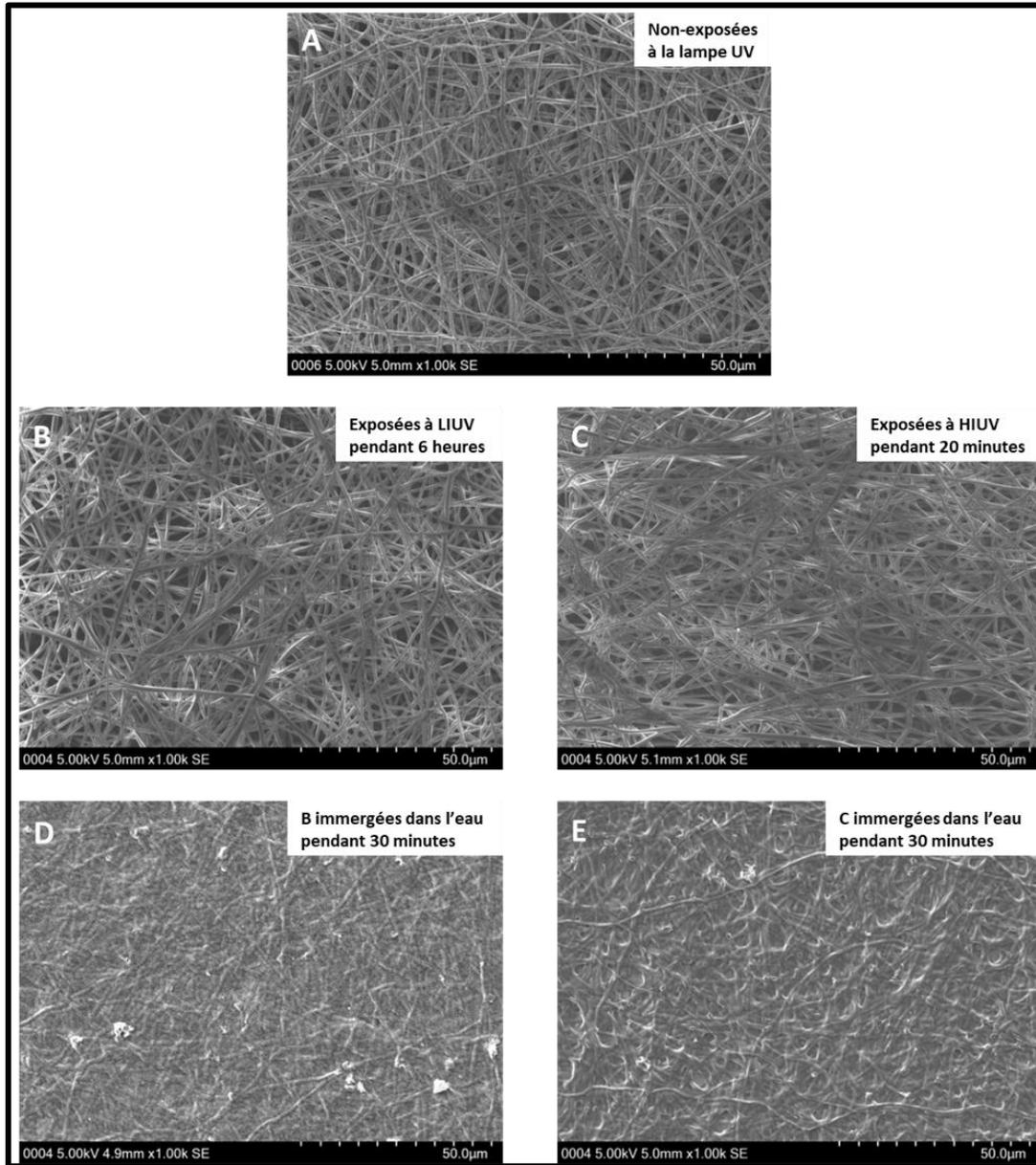


Figure 89: Images MEB des nanofibres PAMPS:PEO:PETA électrofilées dans un solvant AFA 5/5 à 12 kV et 0,5 ml/h avec un diamètre de nanofibres de: (A) : 689 ± 209 nm; (B) : 658 ± 93 nm ; (C) : 767 ± 112 nm ; (D) : non mesurable ; (E) : non mesurable.

La dernière solution de traitement envisagée pour limiter la solubilisation des nanofibres de PAMPS est la réticulation des nanofibres de PAMPS:PEO:PETA par **plasma froid basse pression**. Des tests préliminaires ont été réalisés de manière à s'assurer que le traitement plasma n'affecte pas négativement la morphologie des nanofibres de PAMPS. Pour cela, deux conditions de plasma ont été testées (**Tableau 9**) sur des nanofibres de PAMPS obtenues par electrospinning de la solution à 20%wt dans AFA 5/5 à 0,1 ml/h et 27 kV. Après traitement plasma froid, et quelles que

soient les conditions, la membrane nanofibreuse est devenue fragile et reste hydrosoluble. Cependant, aucune modification de la morphologie des nanofibres n'a pu être observée après les traitements plasma.

Tableau 9: Conditions de traitement plasma des nanofibres de PAMPS et de PEO/PETA.

Conditions	Temps (s)	Puissance (W)	Débit d'argon (sccm)
<i>P1</i>	120	400	100
<i>P2</i>	60	200	100

Des essais ont également été réalisés sur des membranes nanofibreuses de PEO:PETA de manière à observer, ou non, la réticulation de ces fibres *via* plasma froid. Pour cela, les mêmes conditions de plasma que pour les membranes d'PAMPS ont été appliquées sur des nanofibres obtenues à partir d'une solution de PEO/PETA 8:2 à 4%wt dans AFA 5/5 électrofilées à 0,5 ml/h et 9 kV (**Figure 90A**). Après le traitement plasma froid, aucune évolution de la morphologie et du diamètre des nanofibres n'est observée (**Figure 90B et D**). Lorsque ces membranes sont ensuite immergées dans l'eau pendant 10 secondes puis séchées à l'air, un gonflement est observé mais la porosité des membranes est toujours présente (**Figure 90C et E**). Ces résultats sont prometteurs et d'autres études approfondies pourraient permettre de rendre les nanofibres de PAMPS/PEO/PETA insolubles dans l'eau après une immersion pendant une longue période.

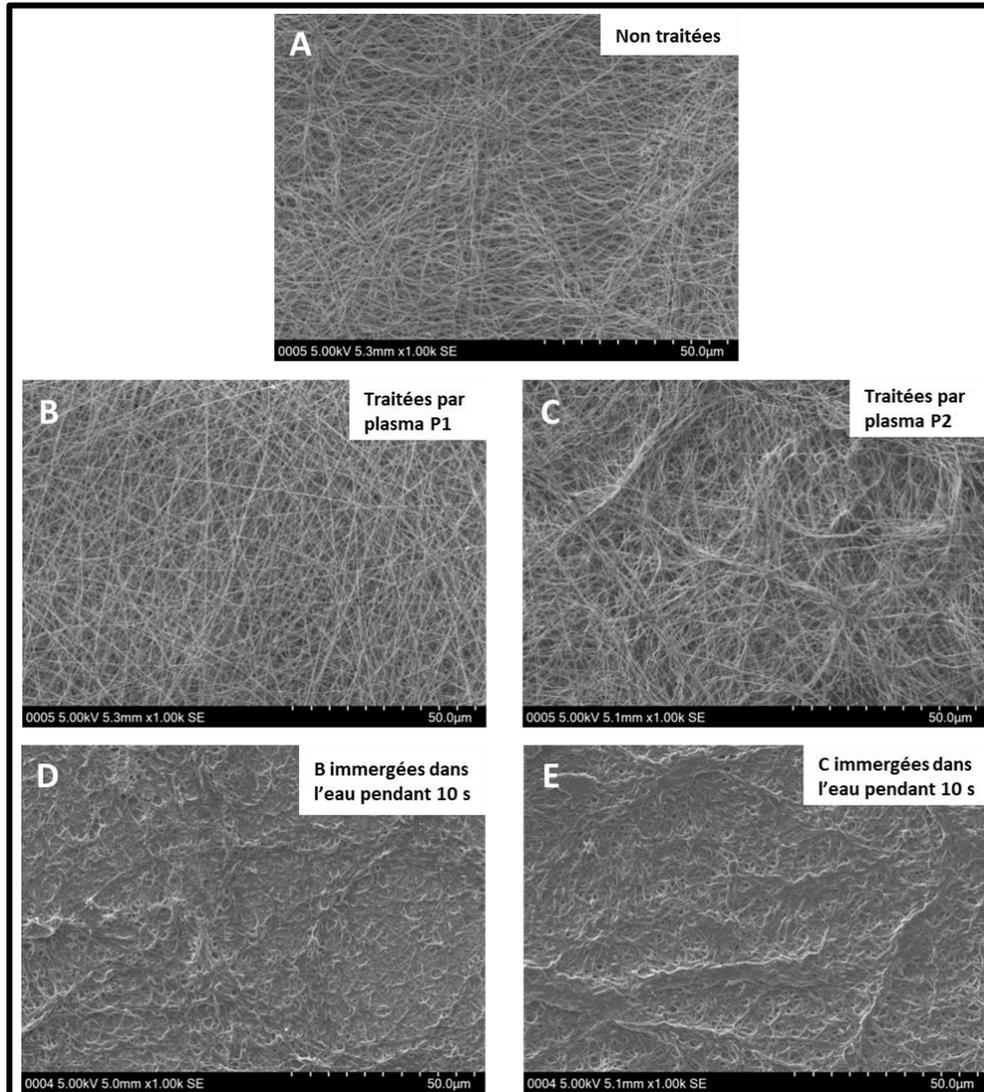


Figure 90: Images MEB de nanofibres de PEO:PETA traitées ou non par plasma froid avec un diamètre de nanofibres de (A) 183 ± 36 nm ; (B) 181 ± 61 nm ; (C) 145 ± 51 nm ; (D) non mesurable ; (E) non mesurable.

II.b. Nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS

II.b.i. Electrospinning coaxial de PCL/PAMPS

Les nanofibres cœur/peau ont été obtenues par électrofilage de la solution de PCL à 12%wt dans AFA 5/5 comme solution de cœur et de la solution de PAMPS à 20%wt dans AFA 5/5 comme solution de peau. Le paramètre crucial de l'électrospinning coaxial est le débit auquel chaque solution est électrofilée. De ce fait, plusieurs couples de débit ont été étudiés et sont répertoriés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10: Débits utilisés pour l'electrospinning des nanofibres cœur-peau de PCL/PAMPS dans AFA 5/5.

	12% PCL (cœur)	20% ed-PAMPS (peau)
C1	0,5 ml/h	0,1 ml/h
C2	0,2 ml/h	0,1 ml/h
C3	0,1 ml/h	0,1 ml/h
C4	0,1 ml/h	0,2 ml/h

La morphologie des nanofibres électrofilées dans ces combinaisons de débits est présentée en **Figure 91**.

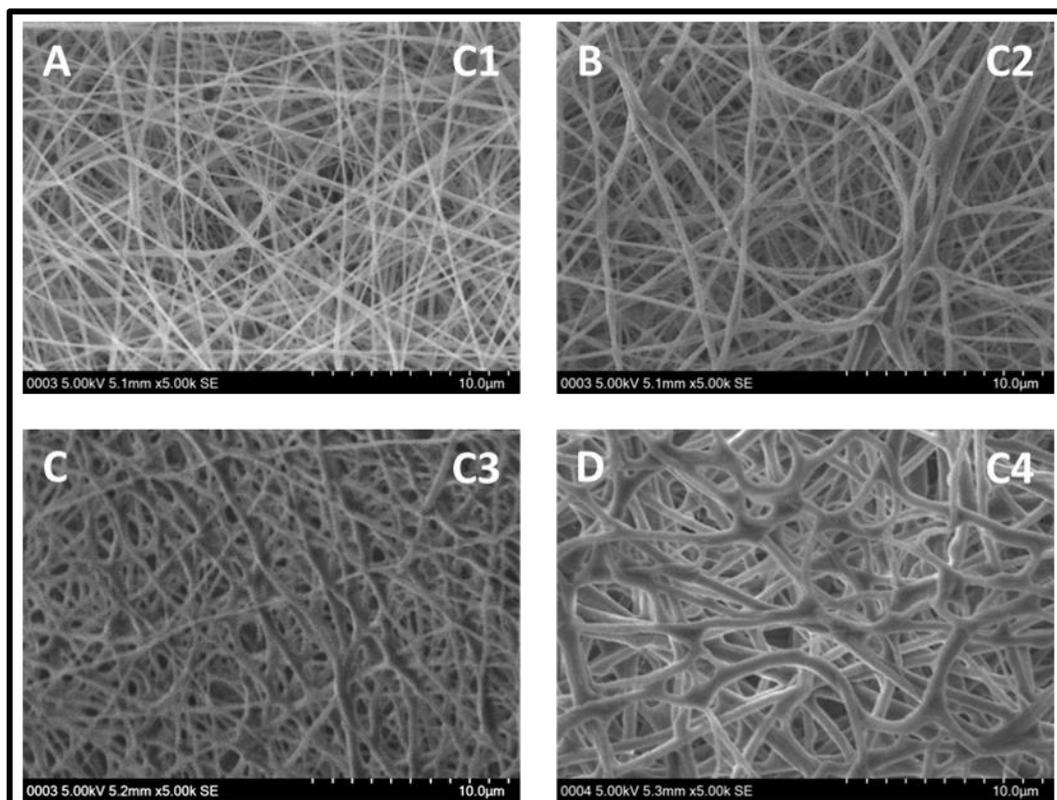


Figure 91: Images MEB des nanofibres coaxiales obtenues à partir d'une solution de cœur de PCL 12% et d'une solution de peau de PAMPS 20%, toutes deux dans le mélange AFA 5/5 dans les conditions : (A) C1 (147 ± 38 nm) ; (B) C2 (209 ± 64 nm) ; (C) C3 (292 ± 107) nm ; (D) C4 (514 ± 112) nm.

Il est important de noter que les paramètres d'electrospinning diffèrent d'une condition à l'autre de façon à obtenir des nanofibres sans défauts. En effet, pour C1, un grand potentiel électrique est nécessaire (23 kV) et le cône de Taylor est difficile à stabiliser. Pour les conditions C3, un haut potentiel électrique est aussi nécessaire (26 kV) ce qui entraîne une instabilité du jet et ainsi la formation de gouttelettes pendant le procédé. La membrane obtenue présente des

taches de solvant dues à ces gouttelettes, cependant la morphologie des nanofibres semble homogène avec un diamètre moyen de 292 ± 107 nm. Les conditions C4 permettent l'obtention de nanofibres à un voltage de 15 kV avec une plus grande quantité de PAMPS attendue dans les nanofibres coaxiales (débit plus élevé de PAMPS que de PCL), étant donné le débit plus élevé de peau que de cœur, ce qui peut être intéressant pour l'application anticoagulante. Cependant, les nanofibres obtenues dans ces conditions ont un diamètre moyen plus élevé (514 ± 112 nm) ce qui pose un problème pour la caractérisation par MET. Enfin, les conditions C2 permettent l'obtention de nanofibres avec un voltage de 22 kV, sans formation de gouttelettes et avec un diamètre moyen de l'ordre de 200 nm. Pour la suite des expérimentations, les nanofibres obtenues dans les conditions C2 et C4 seront utilisées du fait de leur morphologie homogène et sans défauts et des conditions d'electrospinning.

II.b.ii. Caractérisations physico-chimiques des nanofibres coaxiales

PCL/PAMPS

De manière à comparer les propriétés physico-chimiques des nanofibres cœur-peau avec une structure monolithique, une solution composée de 6% de PCL et 10% de PAMPS dans le mélange AFA 5/5 a été électrofilée à un débit de 0,3 ml/h (conditions similaires à C2). Les nanofibres obtenues ont un diamètre moyen de l'ordre de 220 nm avec une structure sans défaut. Ces conditions d'electrospinning seront appelées Amix par la suite.

Les analyses MEB permettent de mettre en évidence la structure de la surface des nanofibres, mais ne permettent pas de mettre en évidence la structure coaxiale de ces fibres. Pour cela, des analyses au **MET** ont été effectuées et les images obtenues sont présentées en **Figure 92**.

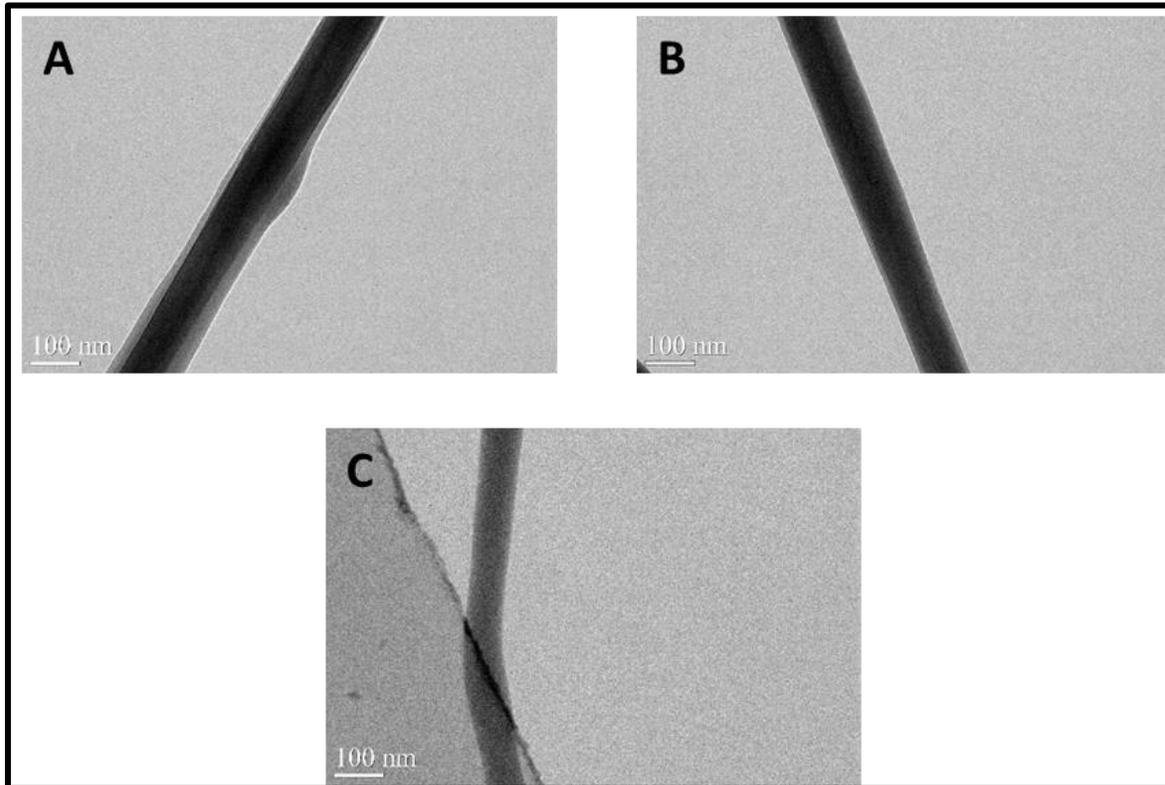


Figure 92: Images MET des nanofibres de PCL et PAMPS avec : (A) Nanofibre coaxiale obtenue dans les conditions C2 ; (B) Nanofibre obtenue dans les conditions C4 ; (C) Nanofibre obtenue dans les conditions Amix.

Ces images montrent, comme attendu, que les nanofibres obtenues dans les conditions Amix ne présentent pas une structure coaxiale (**Figure 92 C**). De la même manière, ces images montrent aussi que cette structure type coaxiale n'est pas observable pour les nanofibres obtenues dans les conditions C4 (**Figure 92 B**). En revanche, les nanofibres électrofilées dans les conditions C2 présentent cette structure type cœur-peau, avec une différence de contraste (**Figure 92 A**). Les conditions C4 sont donc écartées et les conditions Amix serviront de comparaison.

Des **analyses thermiques** ont été réalisées mais n'ont pas permis de montrer de différence significative entre les nanofibres C2 et Amix. Les thermogrammes DSC et ATG de ces membranes sont présentés en **Annexe 5**. Les faibles différences observables entre ces thermogrammes sont dues à une différence de rapport entre chaque polymère dans ces membranes. En effet, il est difficile d'obtenir une quantité contrôlée de chaque polymère lors de l'électrospinning coaxial.

Des essais d'**angle de goutte** ont été réalisés sur les membranes obtenues dans les conditions C2 et Amix et n'ont pas présenté de différence significative. En effet, l'angle de goutte

formé par l'eau sur les nanofibres coaxiales obtenues dans les conditions C2 est de $56 \pm 2^\circ$ contre $64 \pm 4^\circ$ pour les nanofibres obtenues dans les conditions Amix. Comme attendu, une plus grande hydrophilie a néanmoins été obtenue pour les nanofibres obtenues dans les conditions C2. En effet, la PCL étant hydrophobe, et le PAMPS plutôt hydrophile (angle de contact de l'ordre de 52° pour les nanofibres de PAMPS seul), les nanofibres de structure cœur-peau devraient présenter un caractère hydrophile plus important, étant donné que le contact de la goutte d'eau ne se fait qu'au niveau de la peau. Au contraire, dans le cas des nanofibres obtenues dans les conditions Amix, le caractère hydrophile ou hydrophobe des deux polymères mélangés (PCL et PAMPS) doivent s'exprimer, ce qui entraîne une augmentation de l'hydrophobie. Cependant, la structure nanofibreuse ne permet pas de conclure efficacement sur le caractère hydrophobe ou hydrophile des matériaux, car la goutte d'eau passe à travers les pores de la structure nanofibreuse. Ainsi, ce résultat constitue un argument supplémentaire pour prouver la structure cœur-peau des nanofibres obtenues dans les conditions C2, mais tout en laissant une réserve liée à l'influence de la structure nanofibreuse sur la mouillabilité.

L'étude des spectres **IRTF-ATR (Figure 93)** permet de confirmer la présence de PCL ainsi que de PAMPS dans les membranes obtenues dans les conditions C2 et Amix. En effet, le pic à 1724 cm^{-1} (vibration d'élongation C=O d'ester) est présent à la fois dans le spectre de la PCL et ceux des membranes obtenues dans ces conditions. De la même façon, le pic à 1652 cm^{-1} (vibration d'élongation C=O d'amide) est présent dans ces mêmes spectres ainsi que dans celui du PAMPS seul. Il est donc possible de conclure sur la présence de ces deux polymères dans chaque membrane (C2 et Amix). Cependant, il n'est pas possible de distinguer les deux types de structures (coaxiale ou non). En effet, nous aurions pu interpréter la diminution de l'intensité relative du pic à 1724 cm^{-1} par rapport à celui à 1652 cm^{-1} dans le spectre des nanofibres obtenues dans les conditions C2 par rapport au spectre de Amix comme un témoin de la structure cœur-peau, dans la mesure où la PCL semble moins s'exprimer que le PAMPS dans ce spectre. Néanmoins, il n'est pas possible d'estimer la quantité de chaque polymère dans ces membranes étant donné que la profondeur de pénétration du faisceau IRTF est de 5 mm^{309} . La diminution de l'intensité de ce pic est donc probablement due à la seule présence de PAMPS en quantité plus importante dans les nanofibres obtenues dans les conditions C2.

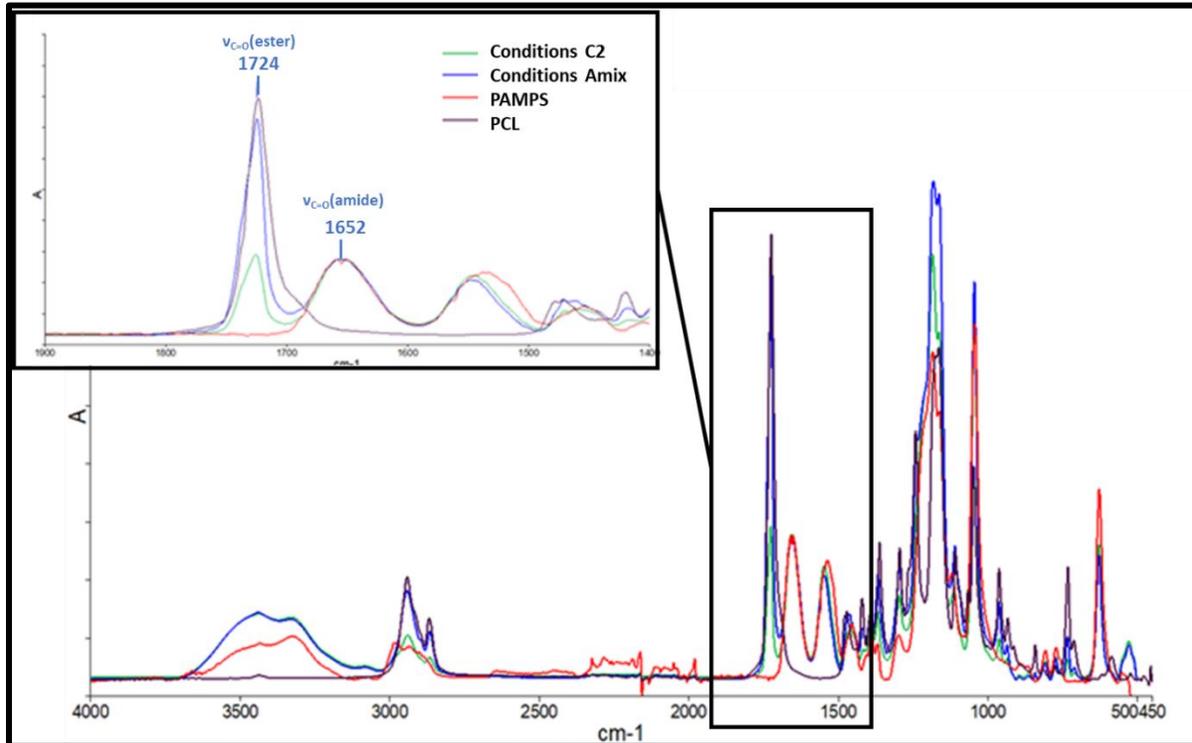


Figure 93: Spectres IR des nanofibres : obtenues dans les conditions C2; dans les conditions Amix; du PAMPS et de la PCL.

II.b.iii. Amélioration de la stabilité des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS en milieu aqueux

Pour les évaluations biologiques, il est nécessaire que la structure des membranes soit stable en milieu aqueux. Les échantillons obtenus dans les conditions C2 et C4 ont donc été immergés dans l'eau pendant 30 minutes et leur morphologie a ensuite été observée par MEB (**Figure 94**). Étonnamment, les membranes ont conservé leur structure nanofibreuse avec un diamètre moyen similaire à celui des nanofibres avant immersion (209 ± 64 nm avant immersion contre 202 ± 77 nm après immersion pour les conditions C2 et 514 ± 112 nm avant immersion contre 488 ± 155 nm après immersion pour les conditions C4). Cependant, une analyse EDX a montré une diminution significative de la quantité de soufre avant et après immersion. En effet, les membranes présentaient toutes deux un rapport soufre/oxygène de 20/80 avant immersion contre 3/97 après immersion et séchage. L'hypothèse dégagée de ces résultats est que la peau en PAMPS s'est presque totalement dissoute dans l'eau, ne laissant place qu'au cœur en PCL qui

a subi un gonflement au contact de l'eau, ce qui explique les diamètres similaires avant et après immersion.

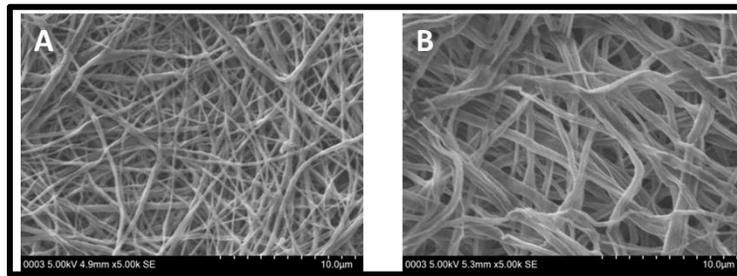


Figure 94: Images MEB des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS obtenues dans les conditions (A) C2 et (B) C4 après immersion dans l'eau pendant 30 minutes puis séchées à l'air.

Afin d'améliorer la tenue dans l'eau des nanofibres cœur/peau, un traitement thermique a été appliqué. En effet, la température de fusion de la PCL se situe autour de 60°C. Ainsi, un traitement thermique à des températures supérieures à la fusion de la PCL entraînerait une fusion du cœur qui pourrait partiellement diffuser dans la peau en PAMPS, qui ne serait pas affectée par la température (température de dégradation du PAMPS d'environ 339°C). Un traitement thermique de 80°C pendant 30 minutes a donc été réalisé. Cette étude a été suivie par EDX pour quantifier la présence de soufre dans les membranes C2 et Amix avant et après immersion dans l'eau (Figure 95).

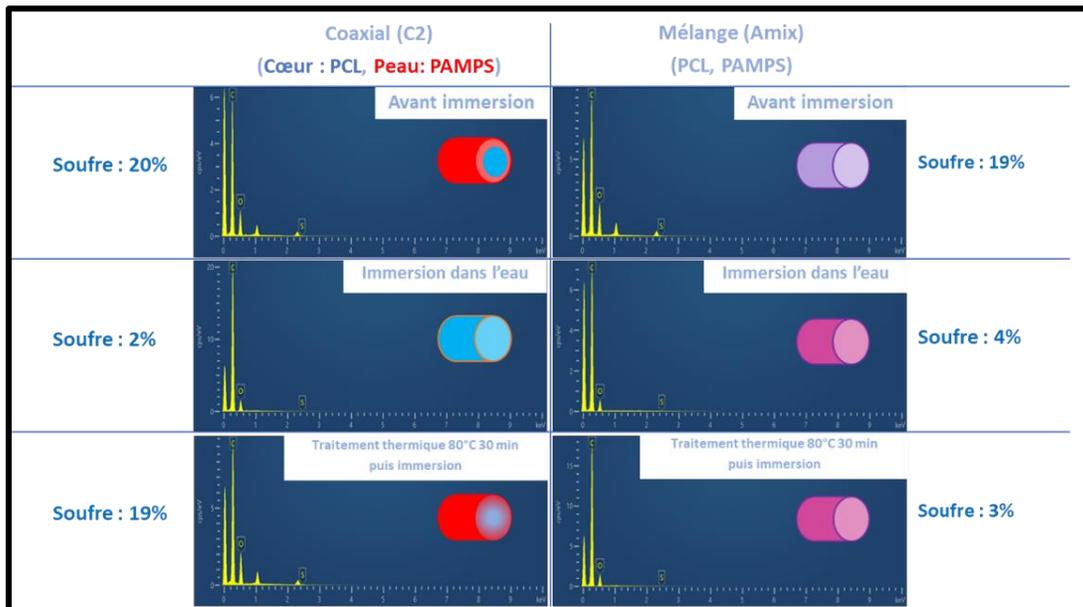


Figure 95: Suivi de la quantité de soufre par EDX des membranes nanofibreuses C2 et Amix avant et après immersion puis après traitement thermique à 80°C pendant 30 minutes suivi d'une immersion. La quantité de soufre est donnée en pourcentage par rapport à un total soufre + oxygène. Sur chaque spectre se trouve une schématisation de la structure proposée d'une nanofibre dans chaque condition.

Ces résultats montrent que, dans le cas des nanofibres obtenues dans les conditions C2, la quantité de soufre diminue après une immersion dans l'eau, tandis qu'aucune diminution significative de ce taux n'a été observée lorsqu'un traitement thermique à 80°C a été réalisé. En comparaison, pour le mélange PAMPS/PCL (Amix), le traitement thermique n'a pas permis de conserver le taux de soufre après l'immersion dans l'eau. Ainsi, l'hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est que le cœur de PCL a fondu et est passé partiellement à travers la peau en PAMPS, ce qui a entraîné des points de contact plus importants entre la PCL et le PAMPS, tout en conservant les fonctions sulfonates d'intérêt, et empêchant ainsi la dissolution de la peau en PAMPS dans le milieu aqueux (**Annexe 6**).

Ainsi, toutes ces analyses ont permis de mettre en avant la structure coaxiale obtenue dans les conditions C2 d'électrospinning, ainsi qu'une conservation de l'intégrité des nanofibres après immersion dans un milieu aqueux. Ces résultats sont donc prometteurs pour les évaluations biologiques.

II.c. Nanofibres de PTBAEMA

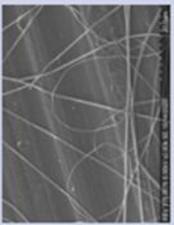
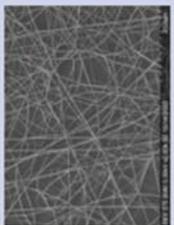
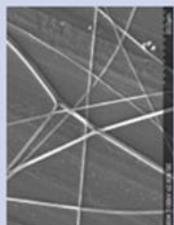
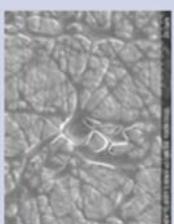
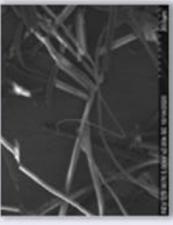
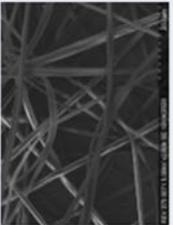
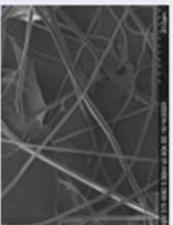
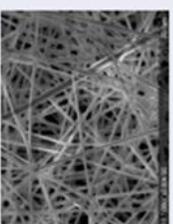
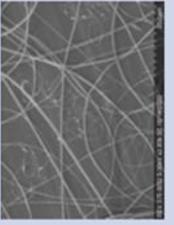
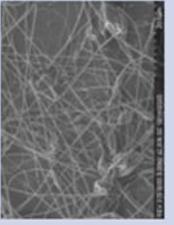
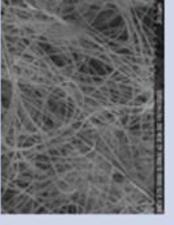
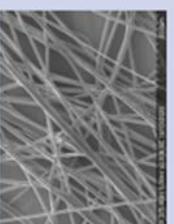
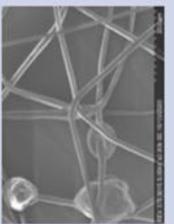
II.c.i. Electrospinning du PTBAEMA

Tout comme le PAMPS, le PTBAEMA a tout d'abord été électrofilé seul. Trois mélanges de solvant ont été utilisés : le mélange acide formique/acide acétique 5/5 (AFA 5/5), le mélange DCM/acétonitrile 5/5 (Dac 5/5) et un mélange DMF/acétate d'éthyle 5/5 (DMFAe 5/5). Tous ces couples de solvants sont capables de solubiliser rapidement (en 3 heures environ) le PTBAEMA jusqu'à des concentrations de 25%wt. Des électrofilages à plusieurs concentrations ont été réalisés allant de 14 à 25%wt. Le débit ainsi que la distance aiguille-collecteur ont été fixés respectivement à 0,5 ml/h et 20 cm dans un premier temps. La morphologie des membranes obtenues a été suivie par MEB et est répertoriée dans le **Tableau 11**. Ces résultats montrent que, pour des concentrations de 14 ou 25%wt et quel que soit le mélange de solvant utilisé, il n'est pas possible d'obtenir des nanofibres sans défaut. En effet, lorsque des fibres sont obtenues, elles présentent de nombreux défauts, tels qu'une grande dispersité du diamètre de ces nanofibres, la présence de fibres partiellement dissoutes (en raison d'un manque d'évaporation du solvant) et aussi l'obtention de nanofibres cassantes. En se focalisant sur les concentrations de 16 à 18%wt,

il est possible d'obtenir des nanofibres de diamètres homogènes (entre 100 et 300 nm) pour tous les solvants sauf pour le mélange Dac 5/5. Pour ce qui est des deux autres mélanges de solvants, la concentration optimale est de 18%wt, pour laquelle des diamètres homogènes de 247 ± 47 et 152 ± 39 nm sont obtenus pour le mélange AFA 5/5 et DMFAe 5/5 respectivement. Les autres paramètres d'electrospinning ont ensuite été variés, à savoir la distance aiguille-collecteur et le débit. La présence de défauts (beads et diamètre inhomogène) a été observée pour toutes les modifications. Ainsi, les paramètres optimaux sont une distance aiguille-collecteur de 20 cm, un débit de 0,5 ml/h et une concentration de PTBAEMA de 18%wt dans les mélanges AFA 5/5 et DMFAe 5/5.

Des analyses DSC et ATG des nanofibres ont été réalisées et n'ont pas montré de différences avec les résultats obtenues pour le PTBAEMA sous forme de poudre (**Partie III voie 1**).

Tableau 11: Images MEB des nanofibres de PTBAEMA obtenues à partir de différentes conditions d'electrospinning.

Solvants	Concentration	14% wt	16% wt	18% wt	20% wt	25% wt
Acide formique /Acide acétique 5/5		Impossible à filer.				
DCM/Acétonitrile						Impossible à filer.
DMF/Acétate d'éthyle						

II.d. Electrospinning coaxial PCL/PTBAEMA

L'électrospinning coaxial a été réalisé avec une solution de cœur à base de PCL à 12%wt dans le mélange AFA 5/5 et une solution de peau à base de PTBAEMA à 18%wt dans le mélange AFA 5/5 ou DMFAe 5/5. Plusieurs couples de débits ont été étudiés, à savoir : 0,2/0,4 ml/h ; 0,4/0,2 ml/h et 0,2/0,2 ml/h en cœur/peau. Aucune fibre n'a pu être obtenue pour le couple 0,2/0,2 ml/h quel que soit le couple de solvants. Cependant, des nanofibres de morphologie différentes ont été observées pour les autres couples de débits (**Tableau 12**).

Tableau 12: Morphologies des nanofibres coaxiales de PCL/PTBAEMA obtenues dans les différents mélanges de solvants et selon plusieurs combinaisons de débits.

Débits	Solvants	DMFAe 5/5	AFA 5/5
Cœur : 0,2 ml/h Peau : 0,4 ml/h			

Les résultats montrent que pour le couple de débits cœur/peau de 0,4/0,2, il n'est pas possible d'obtenir des nanofibres de diamètres homogènes et de nombreuses taches de solvants sont observables sur ces membranes. Néanmoins, pour un couple de débit de 0,2/0,4 les nanofibres présentent des diamètres homogènes de 235 ± 80 nm pour le mélange AFA 5/5. Au contraire, pour le mélange DMFAe 5/5, des nanofibres avec une grande dispersité de diamètres sont obtenues avec un diamètre moyen de 732 ± 253 nm. Ainsi, les paramètres optimaux sont :

18%wt de PTBAEMA comme solution de peau et 12%wt de PCL comme solution de cœur dans AFA 5/5 pour un couple de débit cœur/peau de 0,2/0,4 ml/h.

Des analyses EDX des nanofibres cœur/peau PCL/PTBAEMA obtenues dans ces conditions optimales d'electrospinning ont permis de mettre en évidence la présence d'azote de l'ordre de 4,3% dans les nanofibres (**Figure 96**). Ainsi, cette analyse prouve la présence du PTBAEMA dans les nanofibres mais des images MET sont encore nécessaire pour prouver la structure type cœur/peau de ces nanofibres.

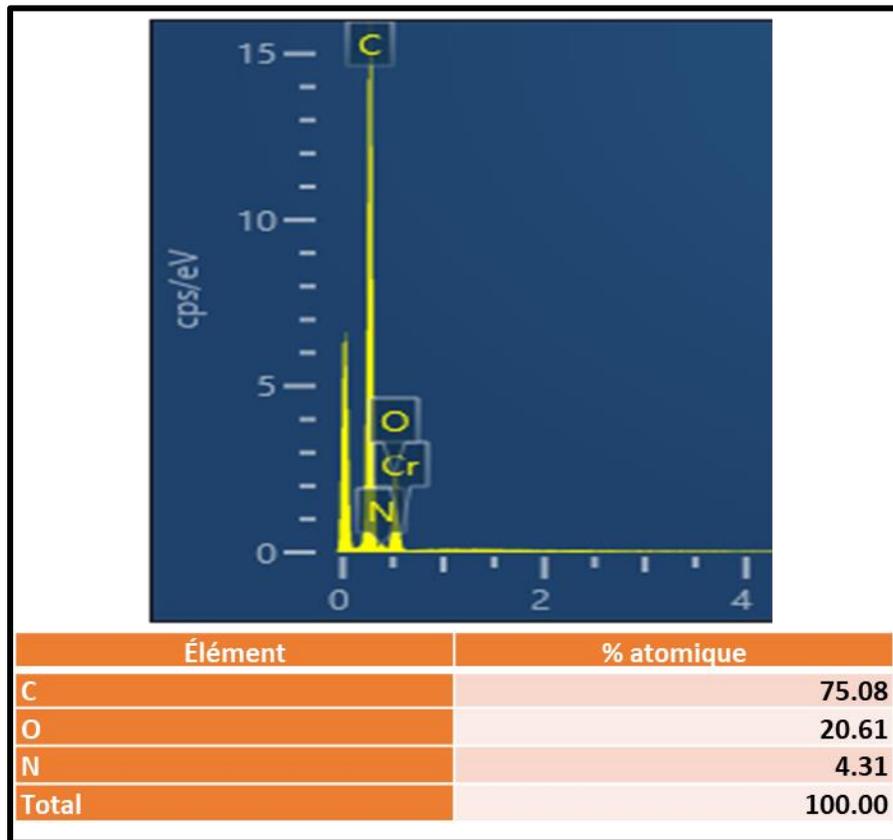


Figure 96: Spectre EDX des nanofibres cœur/peau PCL/PTBAEMA obtenues dans les conditions optimales d'electrospinning.

III. Evaluation de la cytocompatibilité

La viabilité cellulaire des membranes en contact indirect a été réalisée sur les échantillons cœur-peau PCL/PAMPS obtenues dans deux conditions différentes C4 ou C2 et après traitement thermique de 80°C pendant 30 minutes. Les résultats sont présentés en **Figure 97**.

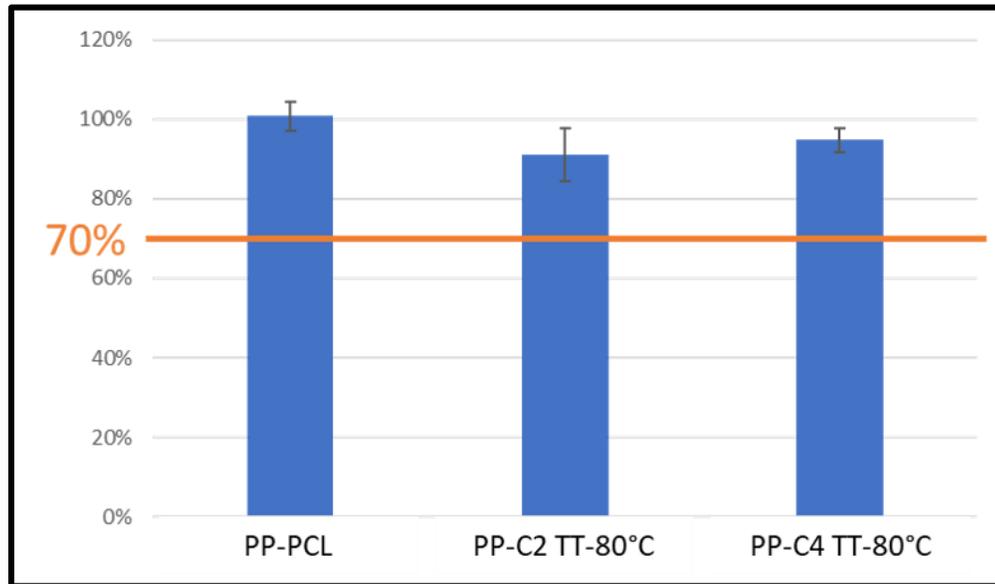


Figure 97: Viabilité des cellules NIH/3T3 après 72 h de contact avec le milieu d'extraction des échantillons de PP-PCL ou des échantillons de PP couvert de nanofibres cœur-peau PCL-PAMPS dans les conditions 0,1/0,2 ou 0,2/0,1 ml/h après traitement thermique à 80°C pendant 30 minutes.

Dans un premier temps, il est important de noter qu'aucun test de viabilité cellulaire n'a pu être effectué sur les nanofibres de PAMPS étant donné leur solubilisation dans l'eau. Les résultats de cytocompatibilité montrent que, quelles que soient les conditions de mise en forme des nanofibres coaxiales (0,1/0,2 ou 0,2/0,1 ml/h), aucune des membranes ne libère de produit cytotoxique au-delà du seuil acceptable des 70% de viabilité cellulaire. Cependant, à la suite du traitement thermique permettant la stabilisation des membranes en milieux aqueux, celles-ci sont devenues friables et donc inutilisables en essais par contact direct. Une optimisation du traitement thermique est donc nécessaire pour obtenir un équilibre entre tenue du PAMPS dans un milieu aqueux et maintien de la stabilité mécanique des nanofibres.

IV. Optimisation du traitement thermique des nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS

Comme il a été décrit précédemment, il est nécessaire de réaliser un traitement thermique à une température supérieure à la température de fusion de la PCL, de manière à faire fondre le cœur des nanofibres cœur-peau pour permettre sa diffusion partielle à travers la peau en PAMPS et ainsi leur stabilité en milieu aqueux. Plusieurs traitements thermiques ont donc été

réalisés allant de 60°C (température de fusion de la PCL) à 80°C, pendant des temps allant de 5 minutes à 4 heures.

Tout d'abord, les résultats ont montré qu'une température de traitement inférieure à 70°C ne permettait pas de conserver la quantité de soufre en surface des nanofibres et ce même après 4 h de traitement. De plus, ces résultats ont montré que le traitement thermique à 80°C entraînait systématiquement une augmentation significative de la friabilité de la membrane. Ainsi, le traitement le plus approprié semble se situer à 70°C.

Un premier suivi par IRTF-ATR des membranes C2 traitées thermiquement à 70°C pendant différents temps suivi d'une immersion dans l'eau a permis de mettre en évidence une évolution qualitative du taux de PAMPS dans la membrane (**Figure 98**). En effet, pour 20 minutes de traitement à 70°C suivi d'une immersion, le spectre IR présente un faible signal à 1652 cm⁻¹ (vibration d'élongation C=O de fonction amide) donc une faible composition en PAMPS. Il est aussi intéressant de noter que la même observation peut être faite pour un traitement thermique de 4 h suivi d'une immersion. Néanmoins, pour un traitement de 1h, le spectre IR montre un épaulement au niveau du signal à 1652 cm⁻¹ attribué au PAMPS. Ainsi, un temps intermédiaire de traitement permet de conserver une partie de la peau en PAMPS alors que des temps trop courts ou trop longs ne le permettent pas. Une hypothèse expliquant ce phénomène est basée sur la fusion du cœur en PCL à travers la peau en PAMPS. En effet, pour des temps trop courts, la PCL n'a pas le temps de diffuser dans la peau en PAMPS alors que pour des temps trop longs, le cœur a complètement diffusé et diminue la proportion de PAMPS en surface. Ainsi, le temps optimal se situe aux alentours d'1 h de traitement.

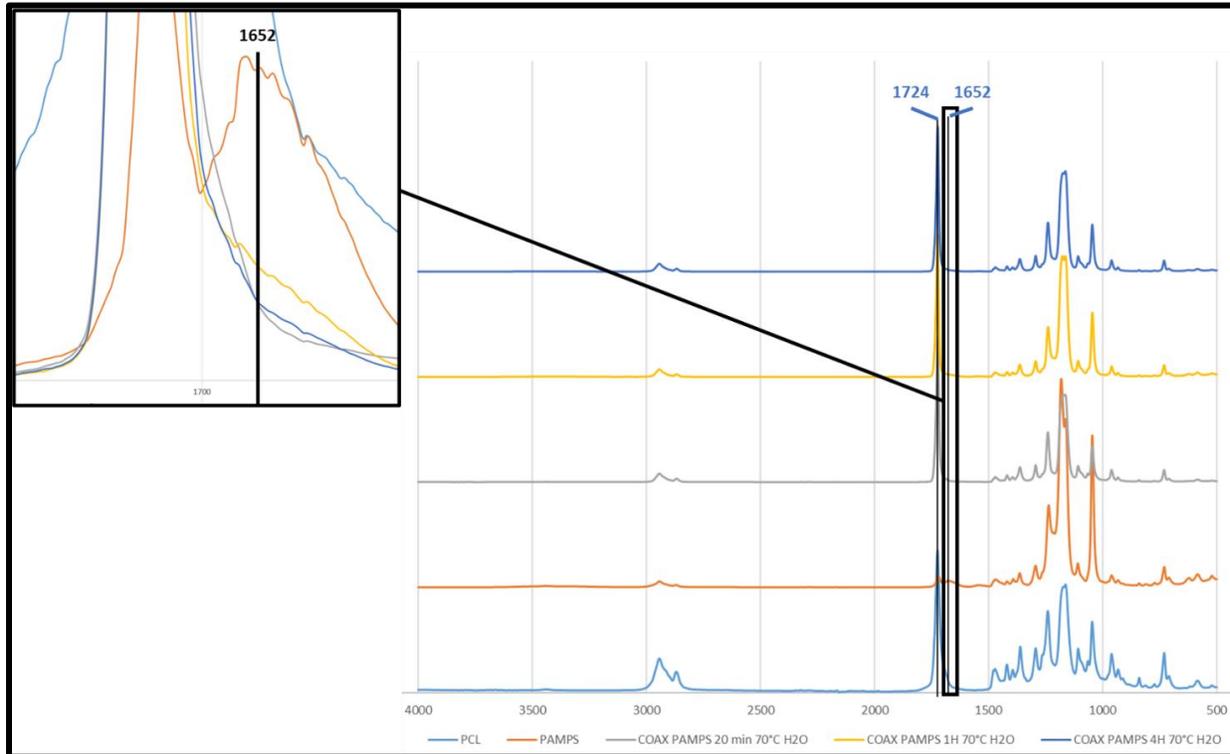


Figure 98: Spectres IR de la PCL; du PAMPS; et des nanofibres coaxiales traitées thermiquement à 70°C pendant 20 min, 1 h et 4 h puis trempées dans l'eau.

Des analyses EDX ont également été réalisées pour démontrer la présence de soufre en surface des membranes coaxiales après les différents traitements thermiques à 70°C (**Figure 99**). Ces résultats montrent un taux de soufre plus élevé dans le cas des nanofibres traitées pendant 1 h comparées à 4 h et sont donc en accord avec ceux de la spectroscopie infrarouge. De plus, le rapport soufre/oxygène reste élevé après immersion dans l'eau, de l'ordre de 16/84 pour 1 h de traitement et de 10/90 pour 4 h de traitement.

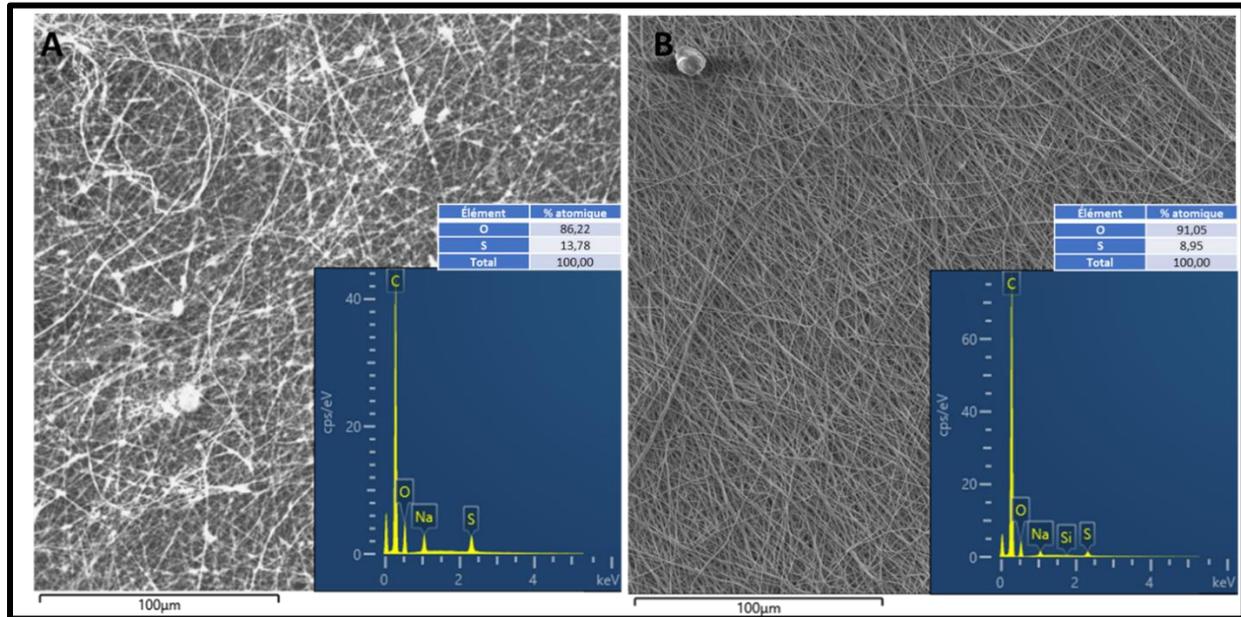


Figure 99: Images MEB et EDX des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS obtenues dans les conditions C2 traitées thermiquement à 70°C pendant : (A) 1 heure et (B) 4 heures, puis immergées dans l'eau pendant 30 minutes.

Ces résultats démontrent une bonne tenue des nanofibres coaxiales PCL/PAMPS après traitement thermique à 70°C pendant 1h. En effet, aucune friabilité de la membrane n'est observée sur ces membranes nanofibreuses, ce qui implique la faisabilité des essais biologique *in vitro* en contact direct.

V. Conclusion

Dans cette voie, l'objectif était de fonctionnaliser des implants en PP par des nanofibres coaxiales avec un cœur en polymère biodégradable (PCL) et une peau en polymère bioactifs. La synthèse des polymères bioactifs (PAMPS et PTBAEMA) a été réalisée par polymérisation radicalaire sous atmosphère inerte. L'électrospinning de ces polymères seuls a pu être réalisé dans différents solvants et notamment dans le mélange de solvant optimal déterminé pour la PCL. Ces résultats ont permis de procéder à l'électrospinning coaxial des nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS et PCL/PTBAEMA.

Dans le cas des nanofibres PCL/PAMPS, il a été nécessaire de réaliser un traitement thermique optimisé à 70°C pendant 1 h pour éviter la dispersion de la peau en PAMPS dans le milieu aqueux. Différentes caractérisations par EDX, IR et MET ont permis d'argumenter en faveur d'une composition de type cœur-peau des nanofibres PCL/PAMPS affectée par un mécanisme de

diffusion partielle du cœur dans la peau lors du traitement thermique, ce qui permet de conserver cette structure après immersion dans un milieu aqueux et ainsi dans le milieu de culture cellulaire. Des essais de viabilité cellulaire en contact indirect ont été réalisés sur ces nanofibres PCL/PAMPS et ont montré qu'aucun produit cytotoxique n'a été libéré dans les 72 h.

Concernant les nanofibres cœur/peau de PTBAEMA, des conditions optimales d'electrospinning ont été identifiées pour obtenir des nanofibres sans défauts. Les différentes caractérisations physico-chimiques ont permis de prouver la présence de PTBAEMA dans les nanofibres mais des analyses sont complémentaires (MET notamment) nécessaires pour prouver la structure type coaxiale de ces nanofibres.

Conclusion générale

Au cours du projet CAPSPIN, deux voies principales ont été étudiées pour fonctionnaliser un implant en PP par des nanofibres biodégradables de PCL *via* la technique d'électrospinning pour réduire les complications post-opératoires de ces implants au cours du traitement de la hernie viscérale. La première voie repose sur le dépôt de nanofibres de PCL sur l'implant en PP suivi d'un procédé de traitement plasma froid basse pression en vue de post-fonctionnaliser ces nanofibres par des monomères bioactifs, à savoir l'AMPS et le TBAEMA. La deuxième voie décrit la déposition de nanofibres coaxiales avec un cœur en PCL et une peau en polymères bioactifs synthétisés à partir des monomères utilisés dans la première voie. Le but de ces fonctionnalisations est d'apporter des propriétés anticoagulantes (*via* l'AMPS ou le PAMPS) et/ou antibactériennes (*via* le TBAEMA ou le PTBAEMA) à l'implant viscéral.

Concernant la première voie (electrospinning-plasma), l'électrospinning de la PCL a d'abord été optimisé de façon à obtenir des nanofibres sans défauts. Puis, ces nanofibres ont été fonctionnalisées par l'acide acrylique *via* la méthode de traitement plasma froid basse pression développé au cours du projet, et ce en vue de prouver la faisabilité du concept. Ensuite, les copolymérisations greffantes de l'AMPS et du TBAEMA par plasma froid sur les nanofibres de PCL ont été optimisées grâce à un plan d'expérience. La caractérisation physico-chimique et structurale des nanofibres PCL/AMPS et PCL/TBAEMA a mis en évidence une fonctionnalisation homogène de la surface des nanofibres et une stabilité en milieux aqueux après traitement thermique.

Les échantillons greffés par l'AMPS ont démontré des propriétés anticoagulantes *in vitro* similaires à celles de 0,5 unité d'héparine lorsqu'une quantité suffisante d'aire spécifique est utilisée. Ces résultats montrent tout d'abord que le traitement plasma n'a pas affecté l'activité anticoagulante de l'AMPS, mais aussi que la copolymérisation greffante par plasma froid de ce monomère sur des implants en PP couverts de nanofibres de PCL conduit à une répartition des groupes sulfonates en surface suffisante pour observer une activité anticoagulante prometteuse pour l'application de réfection pariétale. Des essais *in vivo* sur un modèle de rat ont néanmoins démontré que ces propriétés anticoagulantes ne permettent pas de limiter les adhérences post-opératoires, avec un taux de tissus adhérentiels plus important dans le cas de la pose d'implant. Cependant, les études macroscopiques et histologiques des tissus abdominaux des rats implantés

ont mis en évidence une bonne intégration tissulaire des échantillons sans marque de rejet. Ce fait a d'ailleurs été partiellement observé au cours des essais de viabilité cellulaire, qui ont montré une bonne viabilité des fibroblastes NIH/3T3 sur les échantillons greffés par l'AMPS sans libération de produits cytotoxiques.

Les membranes greffées par le TBAEMA ont montré une viabilité cellulaire acceptable sans libération de produit cytotoxique pour les fibroblastes NIH/3T3. Cependant, l'effet antibactérien *in vitro* attendu pour ces échantillons, étant donné la présence de l'amine quaternarisable, n'a pu être observé quelles que soient les conditions de plasma froid utilisées pour le greffage. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène est un taux de greffage trop faible du TBAEMA sur les échantillons, ce qui ne permet pas d'atteindre la concentration minimale inhibitrice de cette molécule contre les souches Gram négative et positive.

Pour la deuxième voie (electrospinning coaxial), les synthèses du PAMPS ainsi que du PTBAEMA ont été réalisées dans des conditions classiques de polymérisation radicalaire avec l'AIBN comme amorceur. L'electrospinning de ces deux polymères seuls a été réalisée et a permis l'obtention de nanofibres de diamètre inférieur à 600 nm sans défauts avec l'utilisation du solvant AFA 5,5 déjà utilisé pour la PCL.

Etant donné la solubilité du PAMPS dans l'eau, plusieurs stratégies ont été proposées pour augmenter la stabilité des nanofibres en milieu aqueux et donc en milieu biologique. Parmi elles, l'augmentation de la stabilité par l'utilisation d'un agent réticulant a montré des résultats prometteurs dans un premier temps. L'electrospinning coaxial des nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS et PCL/PTBAEAMA a ensuite été optimisé en variant les débits avec la solution à 12%wt de PCL dans AFA 5,5 et respectivement la solution à 20%wt de PAMPS et 18%wt de PTBAEMA dans le même mélange de solvants.

Les essais de stabilité en milieux aqueux des membranes de nanofibres coaxiales de PAMPS ont montré une solubilisation de la partie PAMPS. Cependant, un traitement thermique au-dessus de la température de fusion de la PCL a permis de faire fondre le cœur pour qu'il diffuse partiellement dans la peau en PAMPS, empêchant ainsi sa solubilisation. L'évaluation de la cytocompatibilité *in vitro* de de ces nanofibres traitées thermiquement a montré qu'aucun produit cytotoxique n'est libéré lors d'une immersion dans un milieu de culture pendant 72 h.

Cependant, le traitement thermique a augmenté la friabilité de la membrane, les rendant inutilisable en essais *in vitro* en contact direct ou essais *in vivo*. Une optimisation du traitement thermique a permis de limiter cette friabilité en traitant les fibres pendant 1 h à 70°C.

Les nanofibres coaxiales de PTBAEMA ont été notamment par EDX de manière à prouver la présence d'azote et donc de groupements quaternarisables. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour prouver la structure type cœur/peau de ces nanofibres.

A notre connaissance, aucun implant viscéral présentant à la fois des propriétés anticoagulantes et antibactériennes n'a été développé à ce jour. Malgré l'absence d'activité anti-adhérente attendue *in vivo*, le matériau développé dans ce projet présente une forte activité anticoagulante *in vitro* qui peut encore être améliorée en vue de l'application visée. Néanmoins, ce type de matériau peut aussi être utilisé dans d'autres applications, tel que le traitement de plaie pour éviter leur infections par exemple.

Perspectives

Dans un court terme, quelques études sont encore nécessaires pour atteindre les propriétés recherchées.

Voie 1 (electrospinning-plasma)

En ce qui concerne les membranes fonctionnalisées par l'AMPS, des essais sont encore nécessaires pour comprendre pourquoi les échantillons greffés par l'AMPS ne présentent pas d'effet anti-adhérent in vivo malgré leurs propriétés anticoagulantes in vitro. Par exemple, les membranes pourraient être fonctionnalisées par l'héparine, « gold standard » des molécules anticoagulantes, et testées in vivo afin de confirmer le lien entre l'activité anticoagulante et l'adhérence des tissus.

Pour les membranes fonctionnalisées par le TBAEMA, les études vont se porter notamment vers les propriétés antibactériennes en améliorant le traitement plasma pour le greffage du TBAEMA et atteindre la CMI des souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli*.

Voie 2 (electrospinning coaxial)

Des caractérisations supplémentaires par MET sont nécessaires confirmer la structure coaxiale des nanofibres PCL/PTBAEMA.

La stabilité en milieu aqueux sera optimisée, en utilisant notamment la stratégie développée pour les membranes coaxiales PCL/PAMPS ou en utilisant l'agent réticulant PETA, tout en limitant l'effet sur la tenue mécanique des nanofibres.

Dans ce projet, le polymère biodégradable utilisé est la PCL. Une évaluation du temps de dégradation des échantillons optimaux greffés ou non est encore nécessaire pour déterminer l'adéquation avec le temps d'activité recherché pour l'application. En effet, comme décrit précédemment, le phénomène d'adhérence a lieu dans les 7 jours après l'opération si aucune fibrinolyse n'a lieu, quant aux infections, elles peuvent avoir lieu dans les 30 jours après l'opération. Ainsi, notre matériau doit résister pendant au moins un mois pour ensuite laisser place à l'implant en PP seul pour éviter les récurrences des hernies. Quelques essais préliminaires ont déjà été réalisés sur les échantillons de PCL greffés ou non par les monomères bioactifs et

montrent un léger gonflement des nanofibres après une immersion d'un mois dans une solution de PBS (**Figure 100**). Cette étude biodégradabilité sera appliquée aux nanofibres coaxiales.

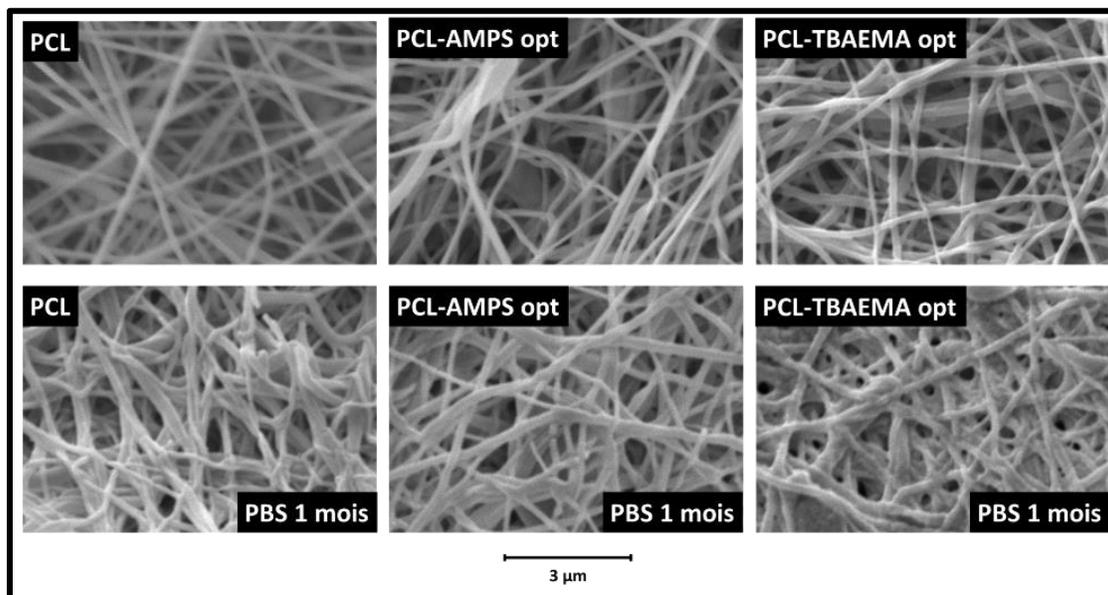


Figure 100: Echantillons de nanofibres de PCL greffés ou non par l'AMPS ou le TBAEMA dans les conditions optimales de traitement plasma avant et après immersion dans une solution de PBS.

De plus, des études plus approfondies seront nécessaires pour vérifier si l'effet anticoagulant et antibactérien sont toujours présents après une immersion d'un mois dans un milieu biologique pour valider l'activité de notre matériau.

Concernant le choix du polymère biodégradable, il est aussi possible d'utiliser d'autres polymères tels que le PLA, ou même encore le PLGA pour pouvoir moduler le temps de dégradation des matériaux. Ainsi, quelques essais ont aussi été réalisés pour la voie 1 (electrospinning - plasma) en utilisant le PLA comme polymère biodégradable pour l'electrospinning. L'electrospinning de ce polymère a été optimisé en utilisant un mélange DMF/acétonitrile 5:5. Dans certains cas, des nanofibres poreuses ont été obtenues, mais un traitement thermique à 100°C pendant 1 h de ces membranes a permis de réduire la porosité des nanofibres, sans réduire celle de la membrane en elle-même (**Annexe 7**). Cependant, une certaine rigidité est observée après ce traitement thermique, ce qui peut avoir un effet pour les évaluations biologiques. Les traitements plasma optimal et maximal ont été réalisés sur ces nanofibres et aucune modification de la morphologie n'a pu être observée.

Néanmoins, l'avantage d'utiliser le PLA au lieu de la PCL réside dans la possibilité d'un traitement par plasma froid atmosphérique ULD disponible au laboratoire. En effet, la température en sortie d'un tel plasma est de l'ordre de 100°C, ce qui fait fondre les nanofibres de PCL, mais qui permettrait la fonctionnalisation du PLA. Ainsi, une grande majorité des études d'optimisation sur ce polymère résidera sur la fonctionnalisation par plasma froid atmosphérique. Outre l'avantage de ce traitement en termes d'« upscaling », le plasma ULD permet de fonctionnaliser préférentiellement une face par rapport à une autre. En effet, l'échantillon traité est posé sur une plaque qui va se déplacer sous le rideau plasma, ce qui permettra de réaliser des implants bifaciaux fonctionnalisés par electrospinning et plasma froid. L'intérêt est que, dans le cas des complications post-opératoires de la hernie, les adhérences ont lieu au niveau pariétal (vers l'extérieur) et les infections au niveau viscéral (vers l'intérieur). Ainsi, fonctionnaliser l'implant avec une face anticoagulante (*via* l'AMPS) et l'autre face antibactérienne (*via* le TBAEMA) permettrait d'obtenir un effet combiné optimal. Le procédé théorique de la chaîne de production est décrit en **Figure 101**.

Concernant la voie 2 (electrospinning coaxial), ce même type de fonctionnalisation est possible en électrofilant sur une face les nanofibres cœur/peau PCL/PAMPS et sur l'autre face les nanofibres PCL/PTBAEMA.

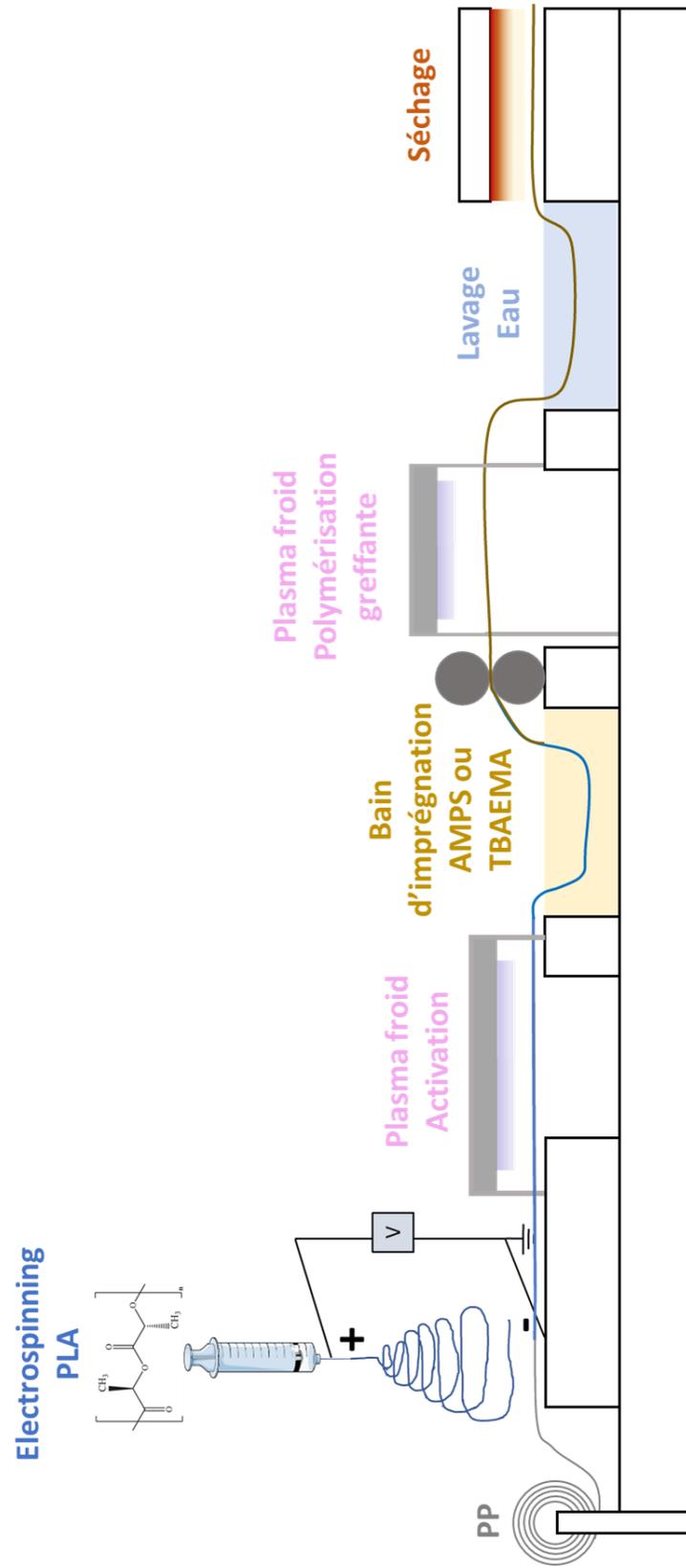


Figure 101: Schéma de la chaîne de production théorique du procédé electrospinning - plasma atmosphérique

Références bibliographiques

1. Kingsnorth, A. & LeBlanc, K. Hernias: inguinal and incisional. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1561–1571 (2003).
2. Pouly, J.-L. & Audebert, A. La prévention des adhérences postopératoires en chirurgie gynécologique: les techniques et produits anti-adhérentiels disponibles. *Mises À Jour En Gynécologie Obstétrique* (2012).
3. Satishkumar, R. *et al.* Evaluation of the Antimicrobial Activity of Lysostaphin-Coated Hernia Repair Meshes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4379–85 (2011).
4. Duque Sánchez, L., Brack, N., Postma, A., Pigram, P. J. & Meagher, L. Surface modification of electrospun fibres for biomedical applications: A focus on radical polymerization methods. *Biomaterials* **106**, 24–45 (2016).
5. Wei, Q. F., Gao, W. D., Hou, D. Y. & Wang, X. Q. Surface modification of polymer nanofibres by plasma treatment. *Appl. Surf. Sci.* **245**, 16–20 (2005).
6. Atyabi, S. M. *et al.* Cell Attachment and Viability Study of PCL Nano-fiber Modified by Cold Atmospheric Plasma. *Cell Biochem. Biophys.* **74**, 181–190 (2016).
7. Kenry & Lim, C. T. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Prog. Polym. Sci.* **70**, 1–17 (2017).
8. Yi, Y. *et al.* Acrylic acid-grafted pre-plasma nanofibers for efficient removal of oil pollution from aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **371**, 165–174 (2019).
9. Schmitz, M., Bertram, M., Kneser, U., Keller, A. K. & Horch, R. E. Experimental total wrapping of breast implants with acellular dermal matrix: A preventive tool against capsular contracture in breast surgery? *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **66**, 1382–1389 (2013).
10. Cardoso, M. H. Experimental study of the human anterolateral abdominal wall : biomechanical properties of Fascia and muscles. (Universidade do Porto, 2012).
11. Kingsnorth, A. & LeBlanc, K. Hernias: inguinal and incisional. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1561–1571 (2003).
12. MacFadyen, null & Mathis, null. Inguinal Herniorrhaphy: Complications and Recurrences. *Semin. Laparosc. Surg.* **1**, 128–140 (1994).

13. Barrat, C., Seriser, F., Arnoud, R., Trouette, P. & Champault, G. Inguinal hernia repair with beta glucan-coated mesh: Prospective multicenter study (115 cases)—Preliminary results. *Hernia* **8**, 33–38 (2004).
14. Dabbas, N., Adams, K., Pearson, K. & Royle, G. Frequency of abdominal wall hernias: is classical teaching out of date?: *JRSM Short Rep.* (2011) doi:10.1258/shorts.2010.010071.
15. Dabbas, N., Adams, K., Pearson, K. & Royle, G. Frequency of abdominal wall hernias: is classical teaching out of date? *JRSM Short Rep.* **2**, 1–6 (2011).
16. Jenkins, J. T. & O'Dwyer, P. J. Inguinal hernias. *BMJ* **336**, 269–272 (2008).
17. Muysoms, F. E. *et al.* Classification of primary and incisional abdominal wall hernias. *Hernia J. Hernias Abdom. Wall Surg.* **13**, 407–414 (2009).
18. Chevrel, J. P. [Inguinal, crural, umbilical hernias. Physiopathology, diagnosis, complications, treatment]. *Rev. Prat.* **46**, 1015–1023 (1996).
19. Lang, B., Lau, H. & Lee, F. Epigastric hernia and its etiology. *Hernia* **6**, 148–150 (2002).
20. Henriksen, N. A. *et al.* Guidelines for treatment of umbilical and epigastric hernias from the European Hernia Society and Americas Hernia Society. *Br. J. Surg.* (2020) doi:10.1002/bjs.11489.
21. *Hernias: Incisional hernia repair.* (Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2016).
22. Akrami, M., Karami, M., Zangouri, V., Deilami, I. & Maalhigh, M. Small Bowel Obstruction Secondary to Femoral Hernia; Case Report and Review of the Literature. *Bull. Emerg. Trauma* **4**, 51–53 (2016).
23. Spangen, L. Spigelian hernia. *World J. Surg.* **13**, 573–580 (1989).
24. Bjork, K. J., Mucha, P. & Cahill, D. R. Obturator hernia. *Surg. Gynecol. Obstet.* **167**, 217–222 (1988).
25. Robnett-Filly, B., Goldstein, R. B., Sampior, D. & Hom, M. Morgagni Hernia: A Rare Form of Congenital Diaphragmatic Hernia. *J. Ultrasound Med.* **22**, 537–539 (2003).
26. Kw, M. Incisional hernia repair. *Surg. Clin. North Am.* **83**, 1223–1234 (2003).

27. Hernies abdominales : une chirurgie pas si simple. <https://sante.lefigaro.fr/actualite/2016/01/22/24523-hernies-abdominales-chirurgie-pas-si-simple> (2016).
28. Évaluation des implants de réfection de paroi, de suspension et d'enveloppement en chirurgie digestive et dans les indications spécifiques à la chirurgie pédiatrique. *HAS* 1–14 (2008).
29. Les Hernies abdominales. <https://m.20-bal.com/istoriya/1154/index.html>.
30. Barchah, O. La prothèse idéale pour cure d'événtration post-opératoire : étude rétrospective au service de chirurgie viscérale. (Faculté de médecine et de pharmacie - Marrakech, 2017).
31. Elango, S., Perumalsamy, S., Ramachandran, K. & Vadodaria, K. Mesh materials and hernia repair. *BioMedicine* **7**,.
32. Torcivia, A., Vons, C., Barrat, C., Dufour, F. & Champault, G. Influence of mesh type on the quality of early outcomes after inguinal hernia repair in ambulatory setting controlled study: Glucamesh® vs Polypropylene®. *Langenbecks Arch. Surg.* **396**, 173–178 (2011).
33. Brüggmann, D. *et al.* Intra-abdominal adhesions: definition, origin, significance in surgical practice, and treatment options. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **107**, 769–775 (2010).
34. Dubuisson, J. *et al.* Incidence of intraabdominal adhesions in a continuous series of 1000 laparoscopic procedures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **203**, 111.e1–3 (2010).
35. Audebert, A. *et al.* Adhérences postopératoires et leur prévention en chirurgie gynécologique : I. Ce qu'il faut savoir. </data/revues/12979589/v40i6/S1297958911003948/> (2012).
36. Adamou, H. *et al.* Etiologies et pronostic des occlusions intestinales aiguës mécaniques à l'Hôpital National de Zinder: étude transversale sur 171 patients. *Pan Afr. Med. J.* **24**, (2016).
37. Kelly, E. E. Peritoneal Adhesions. *Calif. State J. Med.* **2**, 9–11 (1904).
38. Buckman, R. F., Woods, M., Sargent, L. & Gervin, A. S. A unifying pathogenetic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J. Surg. Res.* **20**, 1–5 (1976).
39. S, M., Sl, K. & A, B. Intra-abdominal healing: gastrointestinal tract and adhesions. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 1227–1236 (2010).

40. steve. What steps are involved in the formation of focal adhesions? *MBInfo*
<https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-are-focal-adhesions/what-steps-are-involved-in-the-formation-of-focal-adhesions/>.
41. Arung, W., Meurisse, M. & Detry, O. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World J. Gastroenterol. WJG* **17**, 4545–4553 (2011).
42. Falagas, M. E. & Kasiakou, S. K. Mesh-related infections after hernia repair surgery. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 3–8 (2005).
43. Prévention de l'infection en pratique libérale | HPCI.
<https://www.hpci.ch/prevention/bases-theoriques/sp%C3%A9cialit%C3%A9s/pr%C3%A9vention-de-linfection-en-pratique-lib%C3%A9rale>.
44. Burger, J. W. A. *et al.* Long-term Follow-up of a Randomized Controlled Trial of Suture Versus Mesh Repair of Incisional Hernia. *Ann. Surg.* **240**, 578–585 (2004).
45. Grant, A. M. & EU Hernia Trialists Collaboration. Open mesh versus non-mesh repair of groin hernia: meta-analysis of randomised trials based on individual patient data [corrected]. *Hernia J. Hernias Abdom. Wall Surg.* **6**, 130–136 (2002).
46. Rosch, R. *et al.* The Instable Scar. in *Recurrent Hernia: Prevention and Treatment* 59–62 (2007). doi:10.1007/978-3-540-68988-1_6.
47. Vassiliou, I. *et al.* Late polypropylene mesh susceptibility to infection during intra-abdominal sepsis. *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* **24**, 199–204 (2011).
48. Leber, G. E., Garb, J. L., Alexander, A. I. & Reed, W. P. Long-term complications associated with prosthetic repair of incisional hernias. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* **133**, 378–382 (1998).
49. Davey, A. K. & Maher, P. J. Surgical adhesions: a timely update, a great challenge for the future. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **14**, 15–22 (2007).
50. Gaity, A. *et al.* Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2014).
51. Tingstedt, B., Isaksson, K., Andersson, E. & Andersson, R. Prevention of Abdominal Adhesions – Present State and What's beyond the Horizon? *Eur. Surg. Res.* **39**, 259–268 (2007).

52. Brown, C. B. *et al.* Adept (icodextrin 4% solution) reduces adhesions after laparoscopic surgery for adhesiolysis: a double-blind, randomized, controlled study. *Fertil. Steril.* **88**, 1413–1426 (2007).
53. Mayenga, J. M. Prévention des adhérences postopératoires. *Lett. Gynécologue* **309**, 41–43 (2006).
54. Mettler, L., Audebert, A., Lehmann-Willenbrock, E., Schive, K. & Jacobs, V. R. Prospective clinical trial of SprayGel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.* **10**, 339–344 (2003).
55. Pace Napoleone, C. *et al.* An observational study of CoSeal for the prevention of adhesions in pediatric cardiac surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **9**, 978–982 (2009).
56. Mais, V., Bracco, G. L., Litta, P., Gargiulo, T. & Melis, G. B. Reduction of postoperative adhesions with an auto-crosslinked hyaluronan gel in gynaecological laparoscopic surgery: a blinded, controlled, randomized, multicentre study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 1248–1254 (2006).
57. Baptista, M. L., Bonsack, M. E. & Delaney, J. P. Seprafilm reduces adhesions to polypropylene mesh. *Surgery* **128**, 86–92 (2000).
58. Wiseman, D. M., Gottlick, L. E. & Diamond, M. P. Effect of thrombin-induced hemostasis on the efficacy of an absorbable adhesion barrier. *J. Reprod. Med.* **37**, 766–770 (1992).
59. Terzi, C. Antimicrobial prophylaxis in clean surgery with special focus on inguinal hernia repair with mesh. *J. Hosp. Infect.* **62**, 427–436 (2006).
60. Kumar, S. Chronic groin sepsis following tension-free inguinal hernioplasty. *Br. J. Surg.* **86**, 1482 (1999).
61. Guillaume, O. *et al.* Infections associated with mesh repairs of abdominal wall hernias: Are antimicrobial biomaterials the longed-for solution? *Biomaterials* **167**, 15–31 (2018).
62. Goëau-Brissonnière, O., Leflon, V., Letort, M. & Nicolas, M. H. Resistance of antibiotic-bonded gelatin-coated polymer meshes to *Staphylococcus aureus* in a rabbit subcutaneous pouch model. *Biomaterials* **20**, 229–232 (1999).
63. Klink, C. D. *et al.* In vitro and in vivo characteristics of gentamicin-supplemented polyvinylidene fluoride mesh materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100**, 1195–1202 (2012).

64. Laurent, T. *et al.* Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomater.* **7**, 3141–3149 (2011).
65. Vermet, G. *et al.* Cyclodextrin modified PLLA parietal reinforcement implant with prolonged antibacterial activity. *Acta Biomater.* **53**, (2017).
66. Guillaume, O., Garric, X., Lavigne, J.-P., Van Den Berghe, H. & Coudane, J. Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: preparation and antimicrobial efficacy in vitro. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **162**, 492–501 (2012).
67. Saygun, O. *et al.* Gold and gold-palladium coated polypropylene grafts in a *S. epidermidis* wound infection model. *J. Surg. Res.* **131**, 73–79 (2006).
68. Zhou, H. Y. *et al.* Improving the antibacterial property of porcine small intestinal submucosa by nano-silver supplementation: a promising biological material to address the need for contaminated defect repair. *Ann. Surg.* **253**, 1033–1041 (2011).
69. GORE® DUALMESH® PLUS Biomaterial. *Gore Medical*
<https://www.goremedical.com/products/dualmeshplus>.
70. Pérez-Köhler, B., García-Moreno, F., Brune, T., Pascual, G. & Bellón, J. M. Preclinical Bioassay of a Polypropylene Mesh for Hernia Repair Pretreated with Antibacterial Solutions of Chlorhexidine and Allicin: An In Vivo Study. *PLoS ONE* **10**, (2015).
71. Yurko, Y. *et al.* Antibacterial Mesh: A Novel Technique Involving Naturally Occurring Cellular Proteins. *Surg. Innov.* **19**, 20–6 (2011).
72. Poelstra, K. A. *et al.* Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 206–215 (2002).
73. Harrell, A. G. *et al.* In vitro infectability of prosthetic mesh by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Hernia* **10**, 120–124 (2006).
74. Muñoz-Bonilla, A. & Fernández-García, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 281–339 (2012).
75. Kenawy, E.-R., Abdel-Hay, F. I., El-Shanshoury, A. E.-R. R. & El-Newehy, M. H. Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly(glycidyl methacrylate-

- co-2-hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **40**, 2384–2393 (2002).
76. Gelman, M. A., Weisblum, B., Lynn, D. M. & Gellman, S. H. Biocidal Activity of Polystyrenes That Are Cationic by Virtue of Protonation. *Org. Lett.* **6**, 557–560 (2004).
77. Tiller, J. C., Liao, C.-J., Lewis, K. & Klibanov, A. M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5981–5985 (2001).
78. Gottenbos, B., Grijpma, D., van der Mei, H., Feijen, J. & Busscher, H. Antimicrobial effects of positively charged surface on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**, 7–13 (2001).
79. Ravikumar, T., Murata, H., Koepsel, R. R. & Russell, A. J. Surface-active antifungal polyquaternary amine. *Biomacromolecules* **7**, 2762–2769 (2006).
80. Thomassin, J.-M., Lenoir, S., Riga, J., Jérôme, R. & Detrembleur, C. Grafting of Poly[2-(tert-butylamino)ethyl methacrylate] onto Polypropylene by Reactive Blending and Antibacterial Activity of the Copolymer. *Biomacromolecules* **8**, 1171–1177 (2007).
81. Wang, Y. *et al.* Membrane Perturbation Activity of Cationic Phenylene Ethynylene Oligomers and Polymers: Selectivity against Model Bacterial and Mammalian Membranes. *Langmuir* **26**, 12509–12514 (2010).
82. Chojnowski, J. *et al.* Polysilsesquioxanes and Oligosilsesquioxanes Substituted by Alkylammonium Salts as Antibacterial Biocides. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **16**, 219–230 (2006).
83. Gao, B., Zhang, X. & Zhu, Y. Studies on the preparation and antibacterial properties of quaternized polyethyleneimine. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **18**, 531–544 (2007).
84. Guittard, F. & Geribaldi, S. Highly Fluorinated Molecular Organized Systems: Strategy and Concept. *J. Fluor. Chem.* **107**, 363–374 (2001).
85. Patel, J. N., Dolia, M. B., Patel, K. H. & Patel, R. M. Homopolymer of 4-chloro-3-methyl Phenyl Methacrylate and its Copolymers with Butyl Methacrylate: Synthesis, Characterization, Reactivity Ratios and Antimicrobial Activity. *J. Polym. Res.* **13**, 219–228 (2006).
86. Marr, A. K., Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 468–472 (2006).

87. Béven, L., Castano, S., Dufourcq, J., Wieslander, A. & Wróblewski, H. The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class Mollicutes. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2207–2217 (2003).
88. Zhu, J., Luther, P. W., Leng, Q. & Mixson, A. J. Synthetic histidine-rich peptides inhibit *Candida* species and other fungi in vitro: role of endocytosis and treatment implications. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2797–2805 (2006).
89. Zhang, Y., Jiang, J. & Chen, Y. Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts. *Polymer* **40**, 6189–6198 (1999).
90. Szymanski, J. M., Jallerat, Q. & Feinberg, A. W. ECM Protein Nanofibers and Nanostructures Engineered Using Surface-initiated Assembly. *J. Vis. Exp. JoVE* (2014) doi:10.3791/51176.
91. Plencner, M. *et al.* Significant improvement of biocompatibility of polypropylene mesh for incisional hernia repair by using poly- ϵ -caprolactone nanofibers functionalized with thrombocyte-rich solution. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 2635–2646 (2015).
92. Vasita, R. & Katti, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 15–30 (2006).
93. Reneker, D. H. & Yarin, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* **49**, 2387–2425 (2008).
94. Pant, B., Park, M. & Park, S.-J. Drug Delivery Applications of Core-Sheath Nanofibers Prepared by Coaxial Electrospinning: A Review. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
95. Zhang, B. *et al.* Solvent-free electrospinning: opportunities and challenges. *Polym. Chem.* **8**, 333–352 (2017).
96. Li, Z. & Wang, C. Effects of Working Parameters on Electrospinning. in *One-Dimensional nanostructures* 15–28 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-36427-3_2.
97. 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) doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015.
98. Mirjalili, M. & Zohoori, S. Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry. *J. Nanostructure Chem.* **6**, 207–213 (2016).

99. Huan, S. *et al.* Effect of Experimental Parameters on Morphological, Mechanical and Hydrophobic Properties of Electrospun Polystyrene Fibers. *Materials* **8**, 2718–2734 (2015).
100. Huang, C. *et al.* Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology* **17**, 1558 (2006).
101. Wannatong, L., Sirivat, A. & Supaphol, P. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. *Polym. Int.* **53**, 1851–1859 (2004).
102. Nezarati, R. M., Eifert, M. B. & Cosgriff-Hernandez, E. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng. Part C Methods* **19**, 810–819 (2013).
103. Koski, A., Yim, K. & Shivkumar, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater. Lett.* **58**, 493–497 (2004).
104. Tao, J. & Shivkumar, S. Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA. *Mater. Lett.* **61**, 2325–2328 (2007).
105. Tarus, B., Fadel, N., Aloufy, A. & Elmessiry, M. Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. *AEJ - Alex. Eng. J.* **55**, 2975–2984 (2016).
106. Beachley, V. & Wen, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **29**, 663–668 (2009).
107. Matabola, K. P. & Moutloali, R. M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- effect of sodium chloride. *J. Mater. Sci.* **48**, 5475–5482 (2013).
108. 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* **42**, 261–272 (2001).
109. Zargham, S., Bazgir, S., Tavakoli, A., Rashidi, A. S. & Damerchely, R. The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun nylon 6 nanofiber. *J. Eng. Fibers Fabr.* **7**, 42–49 (2012).
110. Liu, Y., He, J.-H., Yu, J. & Zeng, H. Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers. *Polym. Int.* **57**, 632–636 (2008).

111. Macossay, J., Marruffo, A., Rincon, R., Eubanks, T. & Kuang, A. Effect of needle diameter on nanofiber diameter and thermal properties of electrospun poly(methyl methacrylate). *Polym. Adv. Technol.* **18**, 180–183 (2007).
112. Tan, S.-H., Inai, R., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer* **46**, 6128–6134 (2005).
113. Gou, Y., Liu, C., Lei, T. & Yang, F. Nanofiber alignment during electrospinning: Effects of collector structures and governing parameters. in *2014 International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO)* 62–65 (2014). doi:10.1109/3M-NANO.2014.7057341.
114. Alfaro De Prá, M. A., Ribeiro-do-Valle, R. M., Maraschin, M. & Veleirinho, B. Effect of collector design on the morphological properties of polycaprolactone electrospun fibers. *Mater. Lett.* **193**, 154–157 (2017).
115. Liu, C.-K., Sun, R.-J., Lai, K., Sun, C.-Q. & Wang, Y.-W. Preparation of short submicron-fiber yarn by an annular collector through electrospinning. *Mater. Lett.* **62**, 4467–4469 (2008).
116. Kostakova, E., Lukas, D., Pokorny, P. & Seps, M. Study of polycaprolactone wet electrospinning process. *EXPRESS Polym. Lett.* **8**, 554–564 (2014).
117. Katta, P., Alessandro, M., Ramsier, R. D. & Chase, G. Continuous Electro-Spinning of Aligned Polymer Nanofibers on a Wire Drum Collector. *Nano Lett. - NANO LETT* **4**, (2004).
118. Yee, W. A. *et al.* Stress-induced structural changes in electrospun polyvinylidene difluoride nanofibers collected using a modified rotating disk. *Polymer* **49**, 4196–4203 (2008).
119. Lavielle, N. *et al.* Structuring and Molding of Electrospun Nanofibers: Effect of Electrical and Topographical Local Properties of Micro-Patterned Collectors. *Macromol. Mater. Eng.* **297**, 958–968 (2012).
120. Salas, C. 4 - Solution electrospinning of nanofibers. in *Electrospun Nanofibers* (ed. Afshari, M.) 73–108 (Woodhead Publishing, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100907-9.00004-0.
121. Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C. & Sheng, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polym. Int.* **53**, 1704–1710 (2004).

122. 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* **63**, 189–195 (2015).
123. Vrieze, S. D. *et al.* The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J. Mater. Sci.* **44**, 1357 (2009).
124. Ray, S. S., Chen, S.-S., Li, C.-W., Nguyen, N. C. & Nguyen, H. T. A comprehensive review: electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. *RSC Adv.* **6**, 85495–85514 (2016).
125. Zhu Miaomiao *et al.* Electrospun Nanofibers Membranes for Effective Air Filtration. *Macromol. Mater. Eng.* **302**, 1600353 (2016).
126. Gopal, R. *et al.* Electrospun nanofibrous polysulfone membranes as pre-filters: Particulate removal. *J. Membr. Sci.* **289**, 210–219 (2007).
127. Scholten, E., Bromberg, L., Rutledge, G. C. & Hatton, T. A. Electrospun Polyurethane Fibers for Absorption of Volatile Organic Compounds from Air. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 3902–3909 (2011).
128. Yılmaz, F., Celep, G. & Tetik, G. Nanofibers in Cosmetics. in *Nanofiber Research - Reaching New Heights* 127–146 (2016). doi:10.5772/64172.
129. Fan, L. P. *et al.* A Novel Skin-Care Product Based on Silk Fibroin Fabricated by Electrospinning. in *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* 1–4 (2010). doi:10.1109/ICBBE.2010.5516470.
130. Haji, A., Mousavi Shoushtari, A. & Rabbi, A. Fabrication of Electrospun Polyacrylonitrile and Polyurathane Nanofibers for Sound Absorption. in *2013 6th Texteh International Conference* (2013).
131. Ahmed, F. E., Lalia, B. S. & Hashaikeh, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination* **356**, 15–30 (2015).
132. Bagherzadeh, R. *et al.* Transport properties of multi-layer fabric based on electrospun nanofiber mats as a breathable barrier textile material. *Text. Res. J.* **82**, 70–76 (2011).

133. Ngadiman, N. H. A., Noordin, M. Y., Idris, A. & Kurniawan, D. A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* **231**, 597–616 (2017).
134. Yin Anlin *et al.* Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101A**, 1292–1301 (2012).
135. Vasita, R. & Katti, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 15–30 (2006).
136. Yang, F., Murugan, R., Wang, S. & Ramakrishna, S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 2603–2610 (2005).
137. Xu, C. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* **25**, 877–886 (2004).
138. Kim, J. I., Hwang, T. I., Aguilar, L. E., Park, C. H. & Kim, C. S. A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up. *Sci. Rep.* **6**, 23761 (2016).
139. Liu, M., Duan, X.-P., Li, Y.-M., Yang, D.-P. & Long, Y.-Z. Electrospun nanofibers for wound healing. *Mater. Sci. Eng. C* **76**, 1413–1423 (2017).
140. Hassiba, A. J. *et al.* Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of novel double layer nanocomposite electrospun fibers for wound dressing applications. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 2205–2213 (2017).
141. Kim, K. *et al.* Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Controlled Release* **98**, 47–56 (2004).
142. Singh, A. & Singh, N. RECENT REVIEW ON NANOFIBER FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS. *World J. Pharm. Res.* (2017) doi:10.20959/wjpr20174-8190.
143. Ouerghemmi, S. *et al.* Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *Int. J. Pharm.* **513**, 483–495 (2016).

144. Kenawy, E.-R. *et al.* Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J. Controlled Release* **81**, 57–64 (2002).
145. Hoffman, A. S. Surface modification of polymers: Physical, chemical, mechanical and biological methods. *Macromol. Symp.* **101**, 443–454 (1996).
146. Penn, L. S. & Wang, H. Chemical modification of polymer surfaces: a review. *Polym. Adv. Technol.* **5**, 809–817 (1994).
147. Baszkin, A., Nishino, M. & Ter Minassian-Saraga, L. Solid—liquid adhesion of oxidized polyethylene films: Effect of temperature. *J. Colloid Interface Sci.* **54**, 317–328 (1976).
148. Penn, L. S. & Bowler, E. R. A new approach to surface energy characterization for adhesive performance prediction. *Surf. Interface Anal.* **3**, 161–164 (1981).
149. Penn, L. S., Byerley, T. J. & Liao, T. K. The Study of Reactive Functional Groups in Adhesive Bonding at the Aramid-Epoxy Interface. *J. Adhes.* **23**, 163–185 (1987).
150. Wu, Y. & Tesoro, G. C. Chemical modification of Kevlar fiber surfaces and of model diamides. *J. Appl. Polym. Sci.* **31**, 1041–1059 (1986).
151. Ikada, Y. Comparison of surface modification of polymers by different methods. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part C Radiat. Phys. Chem.* **39**, 509–511 (1992).
152. Mansoori, G. A. *et al.* Surface Modification and Application of Functionalized Polymer Nanofibers. in (2007). doi:10.1007/978-0-387-39938-6_5.
153. Cacho, L. Développement des procédés ‘verts’ pour modifier la surface d’ABS avant sa métallisation. (2009).
154. Kayaci, F., Aytac, Z. & Uyar, T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* **261C**, 286–294 (2013).
155. Yixiang, D., Yong, T., Liao, S., Chan, C. K. & Ramakrishna, S. Degradation of electrospun nanofiber scaffold by short wave length ultraviolet radiation treatment and its potential applications in tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **14**, 1321–1329 (2008).
156. Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J. & Leprince, P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **61**, 2–30 (2006).

157. Boulos, M. I., Fauchais, P. & Pfender, E. The Plasma State. in *Thermal Plasmas: Fundamentals and Applications* (eds. Boulos, M. I., Fauchais, P. & Pfender, E.) 1–47 (Springer US, 1994). doi:10.1007/978-1-4899-1337-1_1.
158. Jelil, R. A. A review of low-temperature plasma treatment of textile materials. *J. Mater. Sci.* **50**, 5913–5943 (2015).
159. Chizoba Ekezie, F.-G., Sun, D.-W. & Cheng, J.-H. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* **69**, 46–58 (2017).
160. Merche, D., Vandencastele, N. & Reniers, F. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. *Thin Solid Films* **520**, 4219–4236 (2012).
161. Dey, A. *et al.* *Cold Plasma Processing: A review*. vol. 9 (2016).
162. Conrads, H. & Schmidt, M. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci. Technol.* **9**, 441–454 (2000).
163. Chang, J.-, Lawless, P. A. & Yamamoto, T. Corona discharge processes. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **19**, 1152–1166 (1991).
164. Seyffarth, P. & Krivtsun, I. *Laser-Arc Processes and Their Applications in Welding and Material Treatment*. (CRC Press, 2014).
165. Kogelschatz, U. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chem. Plasma Process.* **23**, 1–46 (2003).
166. Fridman, A., Nester, S., Kennedy, L. A., Saveliev, A. & Mutaf-Yardimci, O. Gliding arc gas discharge. *Prog. Energy Combust. Sci.* **25**, 211–231 (1999).
167. Tendero, C., Desmaison, J. & Tixier, C. *Torche plasma micro-onde à la pression atmosphérique: application au traitement de surfaces métalliques*. (S.C.D. de l'Université, 2005).
168. Maurau, R. *et al.* Atmospheric pressure, low temperature deposition of photocatalytic TiO_x thin films with a blown arc discharge. *Surf. Coat. Technol.* **232**, 159–165 (2013).
169. La technologie plasma. <https://www.acxys.com/fr/plasma-technology.html>.
170. Bárdos, L. & Baránková, H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* **518**, 6705–6713 (2010).

171. Laroussi, M. & Akan, T. Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Process. Polym.* **4**, 777–788 (2007).
172. Comparatif Plasma Basse Pression et Atmosphérique. <https://www.plasma.com/fr/plasmatechnik/comparatif-plasma-basse-pression-et-atmosphérique/>.
173. Sparavigna, A. Plasma treatment advantages for textiles. *ArXiv08013727 Phys.* (2008).
174. Belkind, A. & Gershman, S. A. Belkind and S. Gershman, Plasma Cleaning of Surfaces, Vacuum Technology and Coating, November 2008, p. 46. (2015).
175. Guimond, S., Hanselmann, B., Amberg, M. & Hegemann, D. Plasma functionalization of textiles: Specifics and possibilities. *Pure Appl. Chem.* **82**, 1239–1245 (2010).
176. Chen, K.-S., Chang, S.-J., Feng, C.-K., Lin, W.-L. & Liao, S.-C. Plasma Deposition and UV Light Induced Surface Grafting Polymerization of NIPAAm on Stainless Steel for Enhancing Corrosion Resistance and Its Drug Delivery Property. *Polymers* **10**, 1009 (2018).
177. Degoutin, S. *et al.* Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles. *Biomed. Mater.* **7**, 035001 (2012).
178. Tajima, S. & Komvopoulos, K. Effect of reactive species on surface crosslinking of plasma-treated polymers investigated by surface force microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 124102–124102 (2006).
179. Bres, L. Interaction entre un plasma froid à la pression atmosphérique et des surfaces thermoplastiques industrielles : application à l'activation de surface. (Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017).
180. Klämpfl, T. G. *et al.* Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5077–5082 (2012).
181. Carrino, L., Moroni, G. & Polini, W. Cold plasma treatment of polypropylene surface: a study on wettability and adhesion. *J. Mater. Process. Technol.* **121**, 373–382 (2002).
182. Keidar, M. *et al.* Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Phys. Plasmas* **20**, 057101 (2013).
183. Heinlin, J. *et al.* Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **25**, 1–11 (2011).

184. Tiede, R. *et al.* Plasma Applications: A Dermatological View. *Contrib. Plasma Phys.* **54**, 118–130 (2014).
185. Isbary, G., Morfill, G., Zimmermann, J., Shimizu, T. & Stolz, W. Cold Atmospheric Plasma: A Successful Treatment of Lesions in Hailey-Hailey Disease. *Arch. Dermatol.* **147**, 388–390 (2011).
186. Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Knorr, D. & Schlüter, O. Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control* **55**, 221–229 (2015).
187. Pankaj, S. K., Wan, Z. & Keener, K. M. Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* **7**, 4 (2018).
188. Winands, G. J. J. *et al.* An Industrial Streamer Corona Plasma System for Gas Cleaning. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **34**, 2426–2433 (2006).
189. Okumoto, M. & Mizuno, A. Conversion of methane for higher hydrocarbon fuel synthesis using pulsed discharge plasma method. *Catal. Today - CATAL TODAY* **71**, 211–217 (2001).
190. Ichiki, T., Sugiyama, Y., Taura, R., Koidesawa, T. & Horiike, Y. Plasma applications for biochip technology. *Thin Solid Films* **435**, 62–68 (2003).
191. Sakudo, A., Yagyū, Y. & Onodera, T. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5216 (2019).
192. Marchant, R. Anticoagulant Plasma Polymer-Modified Substrate. (1994).
193. Bhattacharya, A. & Misra, B. N. Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* **29**, 767–814 (2004).
194. Wei, Q. F., Gao, W. D., Hou, D. Y. & Wang, X. Q. Surface modification of polymer nanofibres by plasma treatment. *Appl. Surf. Sci.* **245**, 16–20 (2005).
195. Chlanda, A. *et al.* Structure and physico-mechanical properties of low temperature plasma treated electrospun nanofibrous scaffolds examined with atomic force microscopy. *Micron* **107**, 79–84 (2018).

196. Dolci, L. S. *et al.* Carboxyl Surface Functionalization of Poly(L-lactic acid) Electrospun Nanofibers through Atmospheric Non-Thermal Plasma Affects Fibroblast Morphology. *Plasma Process. Polym.* **11**, 203–213 (2014).
197. Bacakova, L. *et al.* Nanofibrous Scaffolds as Promising Cell Carriers for Tissue Engineering | IntechOpen. in *Nanofiber Research* vol. Chapter 3 29–54 (2016).
198. Sahebalzamani, M. A., Khorasani, M. T. & Joupari, M. D. Enhancement of Fibroblasts Outgrowth onto Polycaprolactone Nanofibrous Grafted by Laminin Protein Using Carbon Dioxide Plasma Treatment. *Nano Biomed. Eng.* **9**, 191–198 (2017).
199. Asadian, M. *et al.* Effects of pre- and post-electrospinning plasma treatments on electrospun PCL nanofibers to improve cell interactions. *J. Phys. Conf. Ser.* **841**, 012018 (2017).
200. Thevenot, P., Hu, W. & Tang, L. SURFACE CHEMISTRY INFLUENCE IMPLANT BIOCOMPATIBILITY. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 270–280 (2008).
201. Surucu, S., Masur, K., Sasmazel, H. T., Von Woedtke, T. & Dieter Weltmann, K. Atmospheric plasma surface modifications of electrospun PCL/chitosan/PCL hybrid scaffolds by nozzle type plasma jets for usage of cell cultivation. *Appl. Surf. Sci.* **385**, 400–409 (2016).
202. Yan, D. *et al.* Plasma treatment of electrospun PCL random nanofiber meshes (NFMs) for biological property improvement. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101A**, 963–972 (2013).
203. Prabhakaran, M. P., Venugopal, J., Chan, C. K. & Ramakrishna, S. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology* **19**, 455102 (2008).
204. Abbasi, N., Soudi, S., Hayati-Roodbari, N., Dodel, M. & Soleimani, M. The Effects of Plasma Treated Electrospun Nanofibrous Poly (ϵ -caprolactone) Scaffolds with Different Orientations on Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation. *Cell J. Yakhteh* **16**, 245–254 (2014).
205. Ozkan, O. & Turkoglu Sasmazel, H. Effects of nozzle type atmospheric dry air plasma on L929 fibroblast cells hybrid poly (ϵ -caprolactone)/chitosan/poly (ϵ -caprolactone) scaffolds interactions. *J. Biosci. Bioeng.* **122**, 232–239 (2016).
206. Asadian, M. *et al.* A comparative study on pre- and post-production plasma treatments of PCL films and nanofibers for improved cell-material interactions. *Appl. Surf. Sci.* **481**, 1554–1565 (2019).

207. Ghobeira, R. *et al.* Comparative Study of the Surface Properties and Cytocompatibility of Plasma-Treated Poly- ϵ -Caprolactone Nanofibers Subjected to Different Sterilization Methods. *J. Biomed. Nanotechnol.* **13**, 699–716 (2017).
208. Nadri, S., Barati, G., Mostafavi, H., Esmaeilzadeh, A. & Enderami, S. E. Differentiation of conjunctiva mesenchymal stem cells into secreting islet beta cells on plasma treated electrospun nanofibrous scaffold. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **46**, 178–187 (2018).
209. Liu, R. *et al.* Low-temperature plasma treatment-assisted layer-by-layer self-assembly for the modification of nanofibrous mats. *J. Colloid Interface Sci.* **540**, 535–543 (2019).
210. Asadian, M. *et al.* Plasma Functionalization of Polycaprolactone Nanofibers Changes Protein Interactions with Cells, Resulting in Increased Cell Viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 41962–41977 (2018).
211. Liu, W. *et al.* Dose-dependent enhancement of bone marrow stromal cells adhesion, spreading and osteogenic differentiation on atmospheric plasma-treated poly(L-lactic acid) nanofibers. *J. Bioact. Compat. Polym.* **28**, 453–467 (2013).
212. Ardeshiryajimi, A. *et al.* Enhanced reconstruction of rat calvarial defects achieved by plasma-treated electrospun scaffolds and induced pluripotent stem cells. *Cell Tissue Res.* **354**, 849–860 (2013).
213. 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* **85**, 408–417 (2008).
214. Birhanu, G., Akbari Javar, H., Seyedjafari, E., Zandi-Karimi, A. & Dusti Telgerd, M. An improved surface for enhanced stem cell proliferation and osteogenic differentiation using electrospun composite PLLA/P123 scaffold. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **46**, 1274–1281 (2018).
215. Ballesteros, C. A. S. Plasma Treatment of Random and Aligned Electrospun PCL Nanofibers. *J. Med. Biol. Eng.* **33**, 171–178 (2012).
216. Correia, D. M. *et al.* Superhydrophilic poly(L-lactic acid) electrospun membranes for biomedical applications obtained by argon and oxygen plasma treatment. *Appl. Surf. Sci.* **371**, 74–82 (2016).

217. Andrade, J. D. & Hlady, V. Vroman effects, techniques, and philosophies. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2**, 161–172 (1991).
218. Zhu, W., Castro, N. J., Cheng, X., Keidar, M. & Zhang, L. G. Cold Atmospheric Plasma Modified Electrospun Scaffolds with Embedded Microspheres for Improved Cartilage Regeneration. *PLOS ONE* **10**, e0134729 (2015).
219. Zhu, W., Keidar, M. & Zhang, L. G. Enhanced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation on Cold Atmospheric Plasma Modified Cartilage Scaffold. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **1723**, mrsf14-1723-g03-08 (2014).
220. Wang, M. *et al.* Cold atmospheric plasma (CAP)-modified and bioactive protein-loaded core–shell nanofibers for bone tissue engineering applications. *Biomater. Sci.* **7**, 2430–2439 (2019).
221. Onak, G. *et al.* Aspartic and Glutamic Acid Templated Peptides Conjugation on Plasma Modified Nanofibers for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study. *Sci. Rep.* **8**, 17620 (2018).
222. Kalani, M. M., Nourmohammadi, J. & Negahdari, B. Osteogenic potential of Rosuvastatin immobilized on silk fibroin nanofibers using argon plasma treatment. *Biomed. Mater.* **14**, 025002 (2018).
223. Tavangar, B. *et al.* Hardystonite-Coated Poly(L-lactide) Nanofibrous Scaffold and Efficient Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: HS-Containing Nanofibers Induce Osteogenesis of Stem Cells. *Artif. Organs* **42**, E335–E348 (2018).
224. Alemi, P. S. *et al.* Synergistic effect of pressure cold atmospheric plasma and carboxymethyl chitosan to mesenchymal stem cell differentiation on PCL/CMC nanofibers for cartilage tissue engineering. *Polym. Adv. Technol.* **30**, 1356–1364 (2019).
225. Meghdadi, M., Pezeshki-Modaress, M., Irani, S., Atyabi, S. M. & Zandi, M. Chondroitin sulfate immobilized PCL nanofibers enhance chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **136**, 616–624 (2019).
226. Zhang, X.-F., Liu, H.-X., Ortiz, L. S., Xiao, Z.-D. & Huang, N.-P. Laminin-modified and aligned poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/polyethylene oxide nanofibrous nerve

- conduits promote peripheral nerve regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e627–e636 (2018).
227. Tucker, B. S., Baker, P. A., Xu, K. G., Vohra, Y. K. & Thomas, V. Atmospheric pressure plasma jet: A facile method to modify the intimal surface of polymeric tubular conduits. *J. Vac. Sci. Technol. A* **36**, 04F404 (2018).
228. Techaikool, P. *et al.* Effects of plasma treatment on biocompatibility of poly[(L-lactide)-co-(ϵ -caprolactone)] and poly[(L-lactide)-co-glycolide] electrospun nanofibrous membranes - Techaikool - 2017 - Polymer International - Wiley Online Library. *Polym. Int.* **66**, 1640–1650 (2017).
229. Daranarong, D. *et al.* Effect of surface modification of poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) membranes by low-pressure plasma on support cell biocompatibility. *Surf. Coat. Technol.* **306**, 328–335 (2016).
230. Soleimanifar, F., Mortazavi, Y., Nadri, S. & Soleimani, M. Conjunctiva derived mesenchymal stem cell (CJMSCs) as a potential platform for differentiation into corneal epithelial cells on bioengineered electrospun scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **105**, 2703–2711 (2017).
231. Bacakova, M. *et al.* Effects of fiber density and plasma modification of nanofibrous membranes on the adhesion and growth of HaCaT keratinocytes. *J. Biomater. Appl.* **29**, 837–853 (2015).
232. Atyabi, S. M. *et al.* Cell Attachment and Viability Study of PCL Nano-fiber Modified by Cold Atmospheric Plasma. *Cell Biochem. Biophys.* **74**, 181–190 (2016).
233. Savoji, H. *et al.* 3D Electrospun Scaffolds for Vascular Graft Applications: Fine Tuning of Properties by Plasma-Assisted Etching and Coating. in *Coatings and Processes for Biomedical and Environmental Applications* 107–114 (2016). doi:10.14332/svc15.proc.1978.
234. Baèáková, L. & Švorèík, V. Cell Colonization Control by Physical and Chemical Modification of Materials. in *Cell growth Processes: New Research* 1–54 (Nova science Publishers, 2009).
235. Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T. & Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.* **29**, 739–767 (2011).

236. Soliman, S. *et al.* Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. *J. Biomed. Mater. Res. A* **96**, 566–574 (2011).
237. Wan, Y., Tu, C., Yang, J., Bei, J. & Wang, S. Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(l-lactide) scaffolds. *Biomaterials* **27**, 2699–2704 (2006).
238. Wan, Y., Yang, J., Yang, J., Bei, J. & Wang, S. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly-(l-lactide) surface under shear stress field. *Biomaterials* **24**, 3757–3764 (2003).
239. Das, P. *et al.* Surface modification of electrospun PVA/chitosan nanofibers by dielectric barrier discharge plasma at atmospheric pressure and studies of their mechanical properties and biocompatibility. *Int. J. Biol. Macromol.* **114**, 1026–1032 (2018).
240. Arik, N. *et al.* Modification of electrospun PVA/PAA scaffolds by cold atmospheric plasma: alignment, antibacterial activity, and biocompatibility. *Polym. Bull.* 1–16 (2018) doi:10.1007/s00289-018-2409-8.
241. Choudhury, A. J. *et al.* Effect of impinging ion energy on the substrates during deposition of SiO_x films by radiofrequency plasma enhanced chemical vapor deposition process. *Thin Solid Films* **519**, 7864–7870 (2011).
242. Liguori, A. *et al.* Cold atmospheric plasma treatment affects early bacterial adhesion and decontamination of soft relined palatal obturators. *Clin. Plasma Med.* **7–8**, 36–45 (2017).
243. Dorraki, N., Safa, N. N., Jahanfar, M., Ghomi, H. & Ranaei-Siadat, S.-O. Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization. *Appl. Surf. Sci.* **349**, 940–947 (2015).
244. Wang, Q. *et al.* Fabrication of hydrophilic nanoporous PMMA/O-MMT composite microfibrillar membrane and its use in enzyme immobilization. *J. Porous Mater.* **20**, 457–464 (2013).
245. Afshari, E., Mazinani, S., Ranaei-Siadat, S.-O. & Ghomi, H. Surface modification of polyvinyl alcohol/malonic acid nanofibers by gaseous dielectric barrier discharge plasma for glucose oxidase immobilization. *Appl. Surf. Sci.* **385**, 349–355 (2016).

246. Mohammadi, Z. B., Hamidi-Esfahani, Z., Sahari, M. A. & Khosravi-Darani, K. Optimization of Phospholipase A1 Immobilization on Plasma Surface Modified Chitosan Nanofibrous Mat. *Appl. Food Biotechnol.* **3**, 25–34 (2016).
247. Meghdadi, M. *et al.* Cold atmospheric plasma as a promising approach for gelatin immobilization on poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffolds. *Prog. Biomater.* **8**, 65–75 (2019).
248. Mahmoudifard, M. & Vossoughi, M. Different PES nanofibrous membrane parameters effect on the efficacy of immunoassay performance. *Polym. Adv. Technol.* pat.4629 (2019) doi:10.1002/pat.4629.
249. Mahmoudifard, M., Soleimani, M. & Vossoughi, M. Ammonia plasma-treated electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membrane: the robust substrate for protein immobilization through glutaraldehyde coupling chemistry for biosensor application. *Sci. Rep.* **7**, 9441 (2017).
250. Manakhov, A. *et al.* Carboxyl-anhydride and amine plasma coating of PCL nanofibers to improve their bioactivity. *Mater. Des.* **132**, 257–265 (2017).
251. Lü, L., Deegan, A., Musa, F., Xu, T. & Yang, Y. The effects of biomimetically conjugated VEGF on osteogenesis and angiogenesis of MSCs (human and rat) and HUVECs co-culture models. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **167**, 550–559 (2018).
252. Ghorbani, F. & Zamanian, A. Oxygen-plasma treatment-induced surface engineering of biomimetic polyurethane nanofibrous scaffolds for gelatin-heparin immobilization. *E-Polym.* **18**, 275–285 (2018).
253. Wang, S., Zhang, Y., Wang, H. & Dong, Z. Preparation, characterization and biocompatibility of electrospinning heparin-modified silk fibroin nanofibers. *Int. J. Biol. Macromol.* **48**, 345–353 (2011).
254. Mahmoodinia Maymand, M. *et al.* Hepatogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem cells on Collagen-Coated Polyethersulfone Nanofibers. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **63**, 316–323 (2017).
255. Mahmoodinia Maymand, M. *et al.* Improvement of hepatogenic differentiation of iPS cells on an aligned polyethersulfone compared to random nanofibers. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 1–8 (2017) doi:10.1080/21691401.2017.1345929.

256. Shabani, I., Haddadi-Asl, V., Seyedjafari, E., Babaeijandaghi, F. & Soleimani, M. Improved infiltration of stem cells on electrospun nanofibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 129–133 (2009).
257. Liguori, A. *et al.* Atmospheric Pressure Non-Equilibrium Plasma as a Green Tool to Crosslink Gelatin Nanofibers. *Sci. Rep.* **6**, 38542 (2016).
258. Kedroňová, E. *et al.* Plasma Enhanced CVD of Organosilicon Thin Films on Electrospun Polymer Nanofibers. *Plasma Process. Polym.* **12**, 1231–1243 (2015).
259. Shao, M., Chen, L. & Yang, Q. Preparation and surface modification of electrospun aligned poly(butylene carbonate) nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **130**, 411–418 (2013).
260. Sharif, S. *et al.* Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* (2017) doi:10.1002/jbm.b.33966.
261. Biazar, E. *et al.* Electro-spun polyethylene terephthalate (PET) mat as a keratoprosthesis skirt and its cellular study. *Fibers Polym.* **18**, 1545–1553 (2017).
262. Heidari-Keshel, S. *et al.* Surface modification of Poly Hydroxybutyrate (PHB) nanofibrous mat by collagen protein and its cellular study. *Mater. Technol.* **31**, 799–805 (2016).
263. Permyakova, E. S. *et al.* Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization. *Mater. Des.* **153**, 60–70 (2018).
264. Karahaliloğlu, Z. *et al.* Plasma polymerization-modified bacterial polyhydroxybutyrate nanofibrillar scaffolds. *J. Appl. Polym. Sci.* **128**, 1904–1912 (2013).
265. Lee, M. *et al.* Hydrophobization of silk fibroin nanofibrous membranes by fluorocarbon plasma treatment to modulate cell adhesion and proliferation behavior. *Macromol. Res.* **22**, 746–752 (2014).
266. Ko, Y.-G. *et al.* Guiding bone regeneration using hydrophobized silk fibroin nanofiber membranes. *Macromol. Res.* **24**, 824–828 (2016).
267. Padil, V. V. T., Nguyen, N. H. A., Rožek, Z., Ševců, A. & Černík, M. Synthesis, fabrication and antibacterial properties of a plasma modified electrospun membrane consisting of gum Kondagogu, dodecanyl succinic anhydride and poly (vinyl alcohol). *Surf. Coat. Technol.* **271**, 32–38 (2015).

268. Buttafoco, L. *et al.* Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* **27**, 724–734 (2006).
269. Meng, L., Arnoult, O., Smith, M. & Wnek, G. E. Electrospinning of in situ crosslinked collagen nanofibers. *J. Mater. Chem.* **22**, 19412–19417 (2012).
270. Vashist, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagn. Basel Switz.* **2**, 23–33 (2012).
271. Rombaldoni, F. *et al.* Adhesion enhancement of electrospun nanofiber mats to polypropylene nonwoven fabric by low-temperature oxygen plasma treatment. *Surf. Coat. Technol.* **216**, 178–184 (2013).
272. Yi, Y. *et al.* Acrylic acid-grafted pre-plasma nanofibers for efficient removal of oil pollution from aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **371**, 165–174 (2019).
273. Miroshnichenko, S. *et al.* Plasma-Coated Polycaprolactone Nanofibers with Covalently Bonded Platelet-Rich Plasma Enhance Adhesion and Growth of Human Fibroblasts. *Nanomaterials* **9**, 637 (2019).
274. Asadian, M. *et al.* Thiolation of polycaprolactone (PCL) nanofibers by inductively coupled plasma (ICP) polymerization: Physical, chemical and biological properties. *Appl. Surf. Sci.* **479**, 942–952 (2019).
275. Li, C., Hsieh, J. H. & Wang, H. Y. Plasma polymerised poly(methyl methacrylate) and cyclopropylamine films on polylactic acid nanofibres by electrospinning. *Int. J. Nanotechnol.* **14**, 977 (2017).
276. Michlíček, M., Manakhov, A., Dvořáková, E. & Zajíčková, L. Homogeneity and penetration depth of atmospheric pressure plasma polymerization onto electrospun nanofibrous mats. *Appl. Surf. Sci.* **471**, 835–841 (2019).
277. Lee, J. H., Lee, J. W., Khang, G. & Lee, H. B. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials* **18**, 351–358 (1997).
278. Lee, J. H., Jung, H. W., Kang, I.-K. & Lee, H. B. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials* **15**, 705–711 (1994).

279. Caton, J. G. & Zander, H. A. The Attachment Between Tooth and Gingival Tissues After Periodic Root Planing and Soft Tissue Curettage. *J. Periodontol.* **50**, 462–466 (1979).
280. Lee, S.-W. & Kim, S.-G. Membranes for the Guided Bone Regeneration. *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* **36**, 239–246 (2014).
281. Otoni, C. G. *et al.* Ultraviolet-B radiation induced cross-linking improves physical properties of cold- and warm-water fish gelatin gels and films. *J. Food Sci.* **77**, E215-223 (2012).
282. Ozeki, M. & Tabata, Y. In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**, 549–561 (2005).
283. Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R. & Azeredo, J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res. Microbiol.* **156**, 506–514 (2005).
284. Chen, G. *et al.* Effects of tetrahedral amorphous carbon film deposited on dental cobalt–chromium alloys on bacterial adhesion. *Surf. Coat. Technol.* **206**, 3386–3392 (2012).
285. Ramezani Kakroodi, A., Cheng, S., Sain, M. & Asiri, A. Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of Nanocomposites Based on Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanofiber from Aloe vera Rind. *J. Nanomater.* **2014**, 1–7 (2014).
286. Latag, G. V. & Vasquez, M. R. Effects of RF plasma modification on the thermal and mechanical properties of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofiber mats. *J. Vac. Sci. Technol. B* **36**, 041101 (2018).
287. On, S. Y., Kim, M. S. & Kim, S. S. Effects of post-treatment of meta-aramid nanofiber mats on the adhesion strength of epoxy adhesive joints. *Compos. Struct.* **159**, 636–645 (2017).
288. Zhou, X. *et al.* Glass transition of oxygen plasma treated enzymatic hydrolysis lignin. *Bioresources* **7**, (2012).
289. Kim, B., Kim, K., Park, C. & Ryu, C. Improvement of wettability and reduction of aging effect by plasma treatment of low-density polyethylene with argon and oxygen mixtures. *J. Adhes. Sci. Technol. - J ADHES SCI TECHNOL* **16**, 509–521 (2002).
290. Asadian, M. *et al.* Effects of a dielectric barrier discharge (DBD) treatment on chitosan/polyethylene oxide nanofibers and their cellular interactions. *Carbohydr. Polym.* **201**, 402–415 (2018).

291. Kalaska, B. *et al.* Anticoagulant Properties of Poly(sodium 2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate)-Based Di- and Triblock Polymers. *Biomacromolecules* **19**, (2018).
292. MARRA, J. *et al.* Effect of an acrylic resin combined with an antimicrobial polymer on biofilm formation. *J. Appl. Oral Sci.* **20**, 643–648 (2012).
293. Kalaska, B. *et al.* Anticoagulant Properties of Poly(sodium 2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate)-Based Di- and Triblock Polymers. *Biomacromolecules* **19**, (2018).
294. Paneva, D. *et al.* Copolymers of 2-acryloylamido-2-methylpropanesulfonic acid and acrylic acid with anticoagulant activity. *E-Polym.* **3**, (2003).
295. SBI: Structural Bioinformatics.
http://sbi.imim.es/web/files/projects/master/2010/Coagulation_serine_proteases/coagulationProcess.html.
296. Fisher, L. W., Sochor, A. R. & Tan, J. S. Chain Characteristics of Poly(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate) Polymers. 1. Light-Scattering and Intrinsic-Viscosity Studies. *Macromolecules* **10**, 949–954 (1977).
297. Sosna, F., Ottersbach, P. & Kossmann, B. Antimicrobial additives. (2004).
298. Mincheva, R., Manolova, N., Paneva, D. & Rashkov, I. Preparation of Polyelectrolyte-Containing Nanofibers by Electrospinning in the Presence of a Non-Ionogenic Water-Soluble Polymer. *J. Bioact. Compat. Polym. - J BIOACT COMPAT POLYM* **20**, 419–435 (2005).
299. Blanchemain, N. *et al.* Selective biological response of human pulmonary microvascular endothelial cells and human pulmonary artery smooth muscle cells on cold-plasma-modified polyester vascular prostheses. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **6**, 065003 (2011).
300. BIOPHEN. BIOPHEN HEPARIN ANTI-Xa (2 stages) REF: 221010. (2015).
301. Bölgen, N., Vargel, İ., Korkusuz, P., Menceloğlu, Y. Z. & Pişkin, E. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **81B**, 530–543 (2007).
302. Chang, J.-J., Lee, Y.-H., Wu, M.-H., Yang, M.-C. & Chien, C.-T. Electrospun anti-adhesion barrier made of chitosan alginate for reducing peritoneal adhesions. *Carbohydr. Polym.* **88**, 1304–1312 (2012).

303. Liverani, L. & Boccaccini, A. R. Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. *Nanomaterials* **6**, (2016).
304. Degoutin, S. *et al.* Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **7**, 035001 (2012).
305. Degoutin, S. *et al.* Anticoagulant and antimicrobial finishing of non-woven polypropylene textiles. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **7**, 035001 (2012).
306. Blanchemain, N. *et al.* Selective biological response of human pulmonary microvascular endothelial cells and human pulmonary artery smooth muscle cells on cold-plasma-modified polyester vascular prostheses. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **6**, 065003 (2011).
307. Bhardwaj, P., Singh, V., Aggarwal, S. & Mandal, U. K. Poly(acrylamide-co-2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic Acid) Nanogels made by Inverse Microemulsion Polymerization. *J. Macromol. Sci. Part A* **46**, 1083–1094 (2009).
308. Zhou, C., Wang, Q. & Wu, Q. UV-initiated crosslinking of electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1779–1786 (2012).
309. Absorption par les tissus et pénétration des rayonnements. *Ann Kinésithér* **t. 14**, 219–223 (1987).

Liste des communications

Publications

Nguyen Thai, C; Barrau, S; **Dufay, M**; Tabary, N; Da Costa, A; Ferri, A; Lazzaroni, R; Raquez, J M, Leclere, P. On the Nanoscale Mapping of the Mechanical and Piezoelectric Properties of Poly (L-Lactic Acid) Electrospun Nanofibers. *Applied Sciences* 10;2, 652 (2020)

Dufay, M; Jimenez, M; Degoutin, S. Effect of Cold Plasma Treatment on Electrospun Nanofibers Properties: A Review. *ACS Applied Bio Materials* 3 (8), 4696-4716 (2020)

Dufay, M; Jimenez, M; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Degoutin, S. PCL covered PP meshes plasma-grafted by sulfonated monomer for the prevention of postoperative abdominal adhesions. *Materials Today Communications* 26,101968 (2021)

Communications orales

Dufay, M; Degoutin, S; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Janus, L; Jimenez, M. PP peritoneal meshes covered with PCL nanofibers functionalized by cold plasma with antiadhesive properties. *13th International Conference on Frontiers in Biomedical Polymers (FBPS)*. Tenerife (Espagne), 19 - 23 Mai, 2019

Dufay, M; Degoutin, S; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Janus, L; Jimenez, M. Functionalized nanofibers with anticoagulant activity for postoperative adhesions prevention: Plasma grafting or coaxial electrospinning. *3rd Biomat Congress (BIOMAT2019)*. La Grande Motte (France), 03 - 07 Juin, 2019

Dufay, M; Degoutin, S; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Janus, L; Jimenez, M. Polypropylene peritoneal meshes functionalized by electrospinning and cold plasma treatment for anticoagulant properties. *47ème Journées d'Etudes des Polymères (JEPO2019)*. Latresne (France), 29 Septembre - 04 Octobre, 2019

Dufay, M; Degoutin, S; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Janus, L; Jimenez, M. Plasma grafting or coaxial electrospinning: comparison of functionalized PP meshes with anticoagulant activity. *11th World Biomaterials Congress (WBC virtual 2020)*. En ligne, 11 - 15 Décembre, 2020

Poster

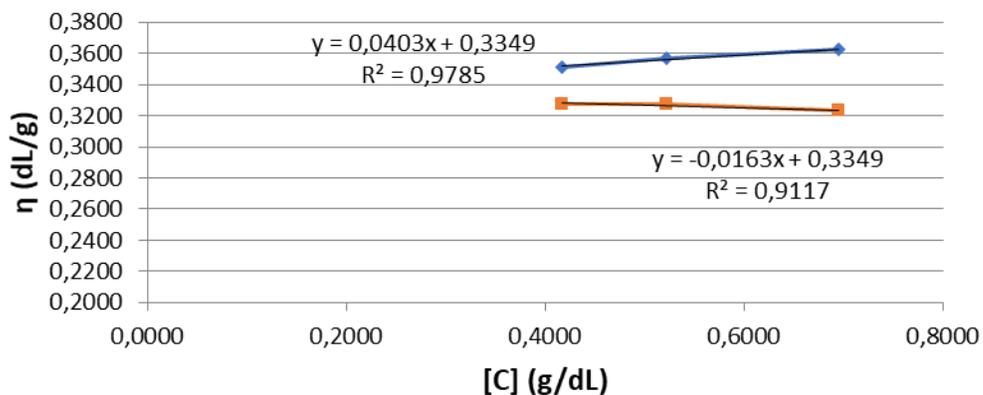
Dufay, M; Degoutin, S; Cazaux, F; Chai, F; Blanchemain, N; Bellayer, S; Casetta, M; Stoclet, G; Janus, L; Jimenez, M. PP meshes covered with PCL nanofibers functionalized by cold plasma for biomedical application. *29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (ESB2018)*. Maastricht (Pays-Bas), 09 - 13 Septembre, **2018**

Annexes

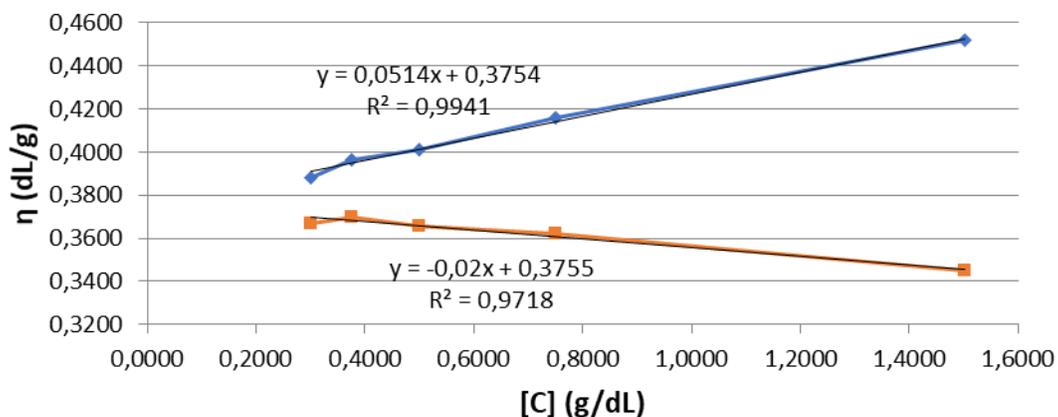
Annexe 2

Evolution de la viscosité intrinsèque du dmf-PAMPS et de l'ed-PAMPS en fonction de leur concentration dans une solution saline

dmf-PAMPS

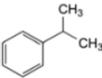


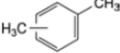
ed-PAMPS



Annexe 3

Niveaux de toxicité des différents solvants classifiés par la FDA

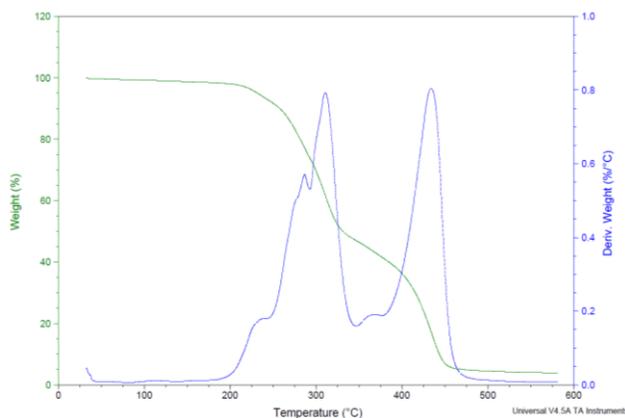
Solvant	Autres désignations	Formule chimique	Classe
Acide acétique	Acide éthanóïque	CH ₃ COOH	Classe 3
Acétone	2-Propanone Propan-2-one	CH ₃ COCH ₃	Classe 3
Acétonitrile		CH ₃ CN	Classe 2
Anisole	Méthoxybenzène		Classe 3
Benzène	Benzol		Classe 1
1-Butanol	Alcool <i>n</i> -butylique Butan-1-ol	CH ₃ [CH ₂] ₃ OH	Classe 3
2-Butanol	Alcool <i>sec</i> -butylique Butan-2-ol	CH ₃ CH ₂ CH(OH)CH ₃	Classe 3
Acétate de butyle	Ester butylique de l'acide acétique	CH ₃ COO[CH ₂] ₃ CH ₃	Classe 3
<i>tert</i> -Butylméthyléther	2-Méthoxy-2-méthylpropane	(CH ₃) ₃ C-OCH ₃	Classe 3
Tétrachlorure de carbone	Tétrachlorométhane	CCl ₄	Classe 1
Chlorobenzène			Classe 2
Chloroforme	Trichlorométhane	CHCl ₃	Classe 2
Cumène	Isopropylbenzène (1-Méthyléthyl)benzène		Classe 3
Cyclohexane	Hexaméthylène		Classe 2
1,2-Dichloroéthane	<i>sym</i> -Dichloroéthane Dichlorure d'éthylène Chlorure d'éthylène	CH ₂ ClCH ₂ Cl	Classe 1
1,1-Dichloroéthène	1,1-Dichloroéthylène Chlorure de vinylidène	H ₂ C=CCl ₂	Classe 1
1,2-Dichloroéthène	1,2-Dichloroéthylène Dichlorure d'acéthylène	ClHC=CHCl	Classe 2
Dichlorométhane	Chlorure de méthylène	CH ₂ Cl ₂	Classe 2
1,2-Diméthoxyéthane	Ethylène glycol diméthyl éther Monoglyme Diméthyl cellosolve	H ₃ COCH ₂ CH ₂ OCH ₃	Classe 2
<i>N,N</i> -Diméthylacétamide	DMA	CH ₃ CON(CH ₃) ₂	Classe 2
<i>N,N</i> -Diméthylformamide	DMF	HCON(CH ₃) ₂	Classe 2
Diméthylsulfoxyde	Méthylsulfinylméthane Sulfoxyde de méthyle DMSO	(CH ₃) ₂ SO	Classe 3
1,4-Dioxane	<i>p</i> -Dioxane [1,4]Dioxane		Classe 2
Ethanol	Alcool éthylique	CH ₃ CH ₂ OH	Classe 3
2-Ethoxyéthanol	Cellosolve	CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OH	Classe 2
Acétate d'éthyle	Ester éthylique de l'acide acétique	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	Classe 3
Ethylène glycol	1,2-Dihydroxyéthane 1,2-Ethanediol	HOCH ₂ CH ₂ OH	Classe 2
Ether éthylique	Ether diéthylique Ethoxyéthane 1,1'-Oxybiséthane	CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	Classe 3
Formate d'éthyle	Ester éthylique de l'acide formique	HCOOCH ₂ CH ₃	Classe 3
Formamide	Méthanamide	HCONH ₂	Classe 2

Solvant	Autres désignations	Formule chimique	Classe
Acide formique		HCOOH	Classe 3
Heptane	<i>n</i> -Heptane	CH ₃ [CH ₂] ₅ CH ₃	Classe 3
Hexane	<i>n</i> -Hexane	CH ₃ [CH ₂] ₄ CH ₃	Classe 2
Acétate d'isobutyle	Ester isobutylique de l'acide acétique	CH ₃ COOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	Classe 3
Acétate d'isopropyle	Ester isopropylique de l'acide acétique	CH ₃ COOCH(CH ₃) ₂	Classe 3
Méthanol	Alcool méthylique	CH ₃ OH	Classe 2
2-Methoxyéthanol	Méthyl cellosolve	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ OH	Classe 2
Acétate de méthyle	Ester méthylique de l'acide acétique	CH ₃ COOCH ₃	Classe 3
3-Méthyl-1-butanol	Alcool isoamylique Alcool isopentylique 3-Méthylbutan-1-ol	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ OH	Classe 3
Méthylbutylcétone	2-Hexanone Hexan-2-one	CH ₃ [CH ₂] ₃ COCH ₃	Classe 2
Méthylcyclohexane	Cyclohexylméthane		Classe 2
Méthyléthylcétone	2-Butanone MEK Butan-2-one	CH ₃ CH ₂ COCH ₃	Classe 3
Méthylisobutylcétone	4-Méthylpentan-2-one 4-Méthyl-2-pentanone MIBK	CH ₃ COCH ₂ CH(CH ₃) ₂	Classe 3
2-Méthyl-1-propanol	Alcool isobutylique 2-Méthylpropan-1-ol	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ OH	Classe 3
<i>N</i> -Méthylpyrrolidone	1-Méthylpyrrolidin-2-one 1-Méthyl-2-pyrrolidinone		Classe 2
Nitrométhane		CH ₃ NO ₂	Classe 2
Pentane	<i>n</i> -Pentane	CH ₃ [CH ₂] ₃ CH ₃	Classe 3
1-Pentanol	Alcool amylique Pentan-1-ol	CH ₃ [CH ₂] ₃ CH ₂ OH	Classe 3
1-Pentanol	Alcool amylique Pentan-1-ol	CH ₃ [CH ₂] ₃ CH ₂ OH	Classe 3
1-Propanol	Alcool pentylique Propan-1-ol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	Classe 3
2-Propanol	Alcool propylique Propan-2-ol	(CH ₃) ₂ CHOH	Classe 3
Acétate de propyle	Alcool isopropylique Ester propylique de l'acide acétique	CH ₃ COOCH ₂ CH ₂ CH ₃	Classe 3
Pyridine			Classe 2
Sulfonane	1,1-Dioxyde de tétrahydrothiophène		Classe 2
Tétrahydrofurane	Oxyde de tétraméthylène Oxacyclopentane		Classe 2
Tétraline	1,2,3,4-Tétrahydronaphthalène		Classe 2
Toluène	Méthylbenzène		Classe 2
1,1,1-Trichloroéthane	Méthylchloroforme	CH ₃ CCl ₃	Classe 1
1,1,2-Trichloroéthène	Trichloroéthène	HClC=CCl ₂	Classe 2
Xylène*	Diméthylbenzène Xylol		Classe 2

*habituellement 60 pour cent de *m*-xylène, 14 pour cent de *p*-xylène, 9 pour cent d'*o*-xylène avec 17 pour cent d'éthylbenzène.

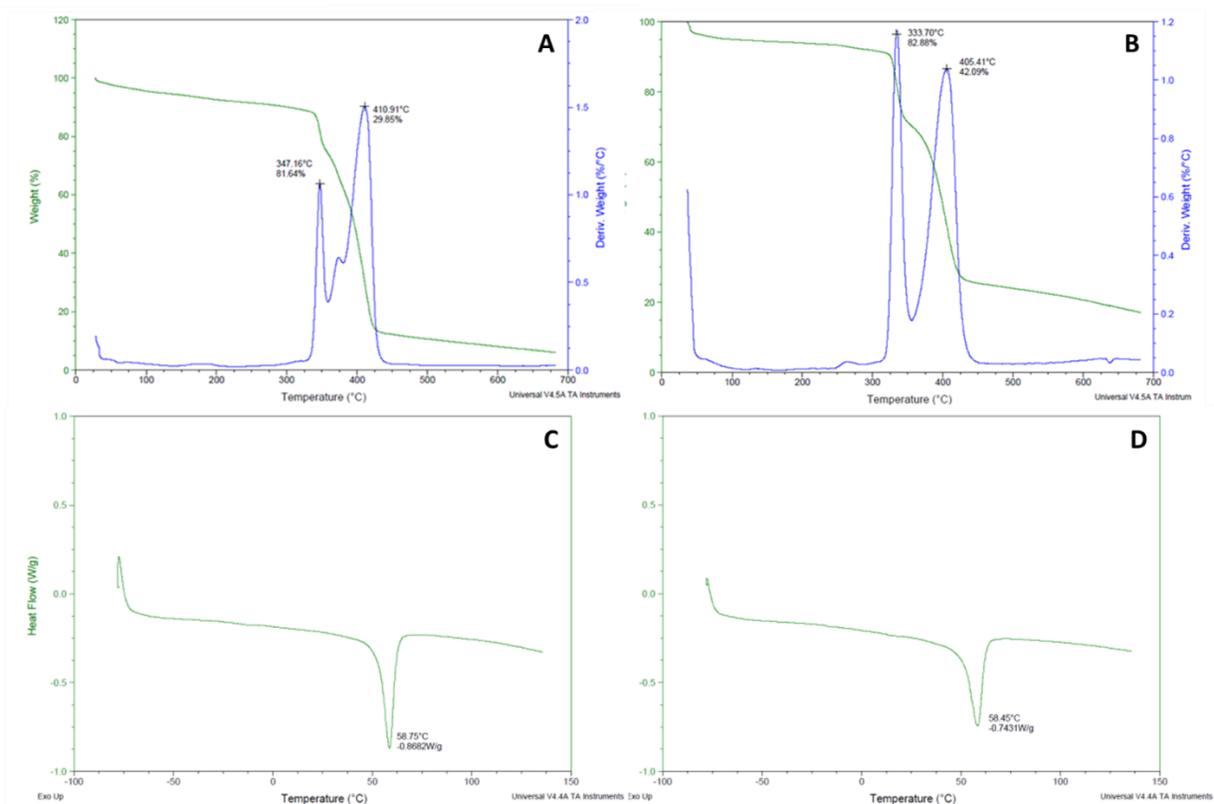
Annexe 4

ATG du PTBAEMA



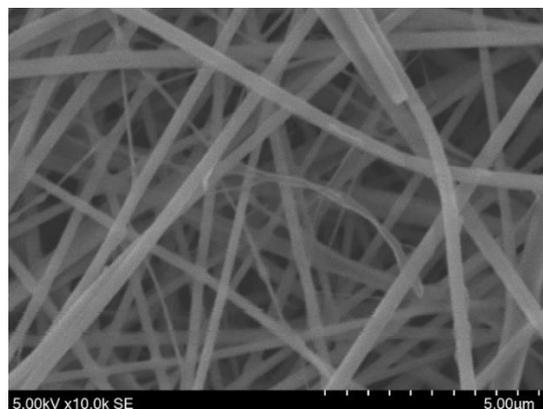
Annexe 5

ATG et DSC des nanofibres de PCL/PAMPS obtenues dans les conditions C2 (A et C) et dans les conditions Amix (B et D)



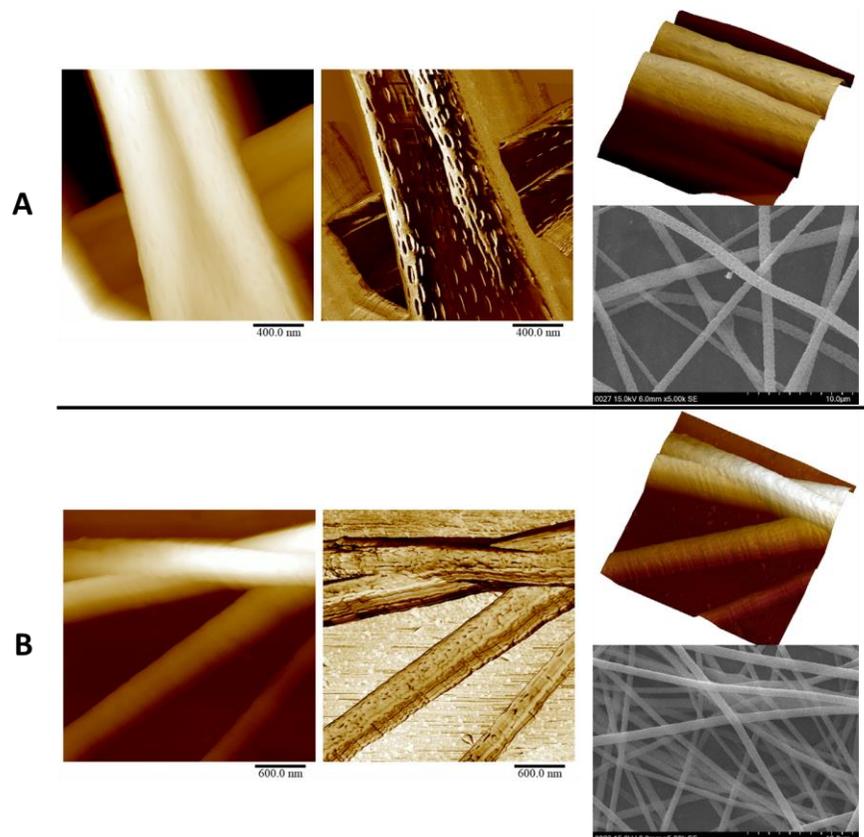
Annexe 6

Image MEB des nanofibres coaxiales de PCL/PAMPS après traitement thermique à 80°C puis immergées dans l'eau



Annexe 7

Images AFM et MEB de nanofibres de PLA obtenues par electrospinning d'une solution à 12% de PLA dans un mélange DCM/acétonitrile: (A) avant traitement thermique ; (B) après traitement thermique à 100°C pendant 1 h.



Résumé

La réfection de hernie abdominale représente la deuxième opération chirurgicale dans le monde avec plus de 20 millions d'opérations par an. Cependant, dans plus de 50% des opérations intra-abdominales, des adhérences post-opératoires sont observées et entraînent des douleurs importantes pour les patients. De plus, des infections ont lieu dans 1% des cas de chirurgie intra-abdominale ce qui nécessite un retrait de l'implant. Pour ces raisons, des solutions thérapeutiques sont nécessaires pour prévenir les adhérences ainsi que les infections mais aussi limiter la nécessité d'une étape chirurgicale supplémentaire.

L'électrospinning a démontré un grand intérêt dans le domaine des biomatériaux textiles en raison de la structure poreuse et des diamètres nanométriques des fibres obtenues. En parallèle, le traitement plasma froid peut être utilisé pour activer et greffer la surface de ces nanofibres avec des molécules fonctionnelles présentant, par exemple, des propriétés antibactériennes ou anticoagulantes. Dans ce contexte, notre stratégie est de développer des implants en polypropylène, couvert de nanofibres électrofilées de polycaprolactone (PCL) et fonctionnalisées par l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique (AMPS) (activité anticoagulante attendue) ou le 2-(tert-butylaminoéthyle) (TBAEMA) (activité antibactérienne attendue). Deux voies ont été étudiées : (i) la copolymérisation greffante de l'AMPS ou TBAEMA sur les nanofibres de PCL induite par plasma froid et (ii) l'électrospinning coaxial de façon à obtenir des nanofibres cœur/peau (PCL/PAMPS ou PCL/PTBAEMA).

Pour la première voie, les conditions d'électrospinning de la PCL, ont été optimisées ainsi que la copolymérisation greffante de l'AMPS ou du TBAEMA par plasma froid sur les nanofibres de PCL, de façon à obtenir des nanofibres cytocompatibles riches en groupes SO_3H ou en amines quaternaires à la surface. Les caractérisations physico-chimiques (FTIR, SEM, TEM, TGA...) et structurales (MEB, EDX) ont confirmé la distribution de chaque monomère à la surface des nanofibres. Pour la seconde voie, les conditions d'électrospinning seul (PAMPS et PTBAEMA) et coaxial (PCL/PAMPS et PCL/PTBAEMA) ont été optimisées et la caractérisation par MET des nanofibres obtenues par électrospinning coaxial a confirmé la structure cœur-peau. Les évaluations biologiques *in vitro* des implants fonctionnalisés ont révélé des résultats prometteurs pour la limitation des complications post-opératoires.

Abstract

Abdominal hernia repair constitutes the second surgical act in the world with more than 20 million cases per year. However, in more than 50% of all intra-abdominal operations, postoperative adhesions occur and result in important pain for patients. In addition, infections occur in 1% of each intra-abdominal surgery which lead to the need of the implant removal. Therefore, therapeutic solutions are required to prevent both adhesions and infections but also to limit the need for a second surgical step.

Electrospinning shows great interest in biomedical textiles field due to the porous and nanometer diameter range structure of the obtained fibers. In parallel, cold plasma treatment can be used to activate and graft their surface with functional molecules, exhibiting for example antibacterial or anticoagulant properties. In this context, our strategy is to develop polypropylene implants, coated with polycaprolactone (PCL) electrospun nanofibers and functionalized by 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid (AMPS) (expected anticoagulant activity) or tert-butylaminoethyl methacrylate (TBAEMA) (expected antibacterial activity). Two pathways were investigated: (i) graft-copolymerization of AMPS or TBAEMA onto PCL nanofibers induced by cold plasma and (ii) coaxial electrospinning in order to obtain core/sheath (PCL/PAMPS or PCL/PTBAEMA) nanofibers.

For the first pathway, the electrospinning conditions of PCL were optimized as well as the graft-copolymerization of AMPS or TBAEMA onto PCL nanofibers induced by cold plasma, in order to obtain cytocompatible nanofibers rich in SO_3H or quaternary amine groups at the surface. Physico-chemical (FTIR, SEM, TEM, TGA...) and structural (SEM, EDX) characterization confirmed the distribution of each monomer onto nanofibers surface. For the second pathway, simple and coaxial electrospinning conditions of PAMPS, PTBAEMA and PCL/PAMPS, PCL/PTBAEMA respectively were optimized. The characterization by TEM of nanofibers obtained by coaxial electrospinning confirmed the core/shell structure.

In vitro biological assays revealed promising results for limitation of post-operative complications.