

UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

**Élaboration d'un patch à base de polycaprolactone pour le traitement
de la myéloméningocèle**

THÈSE DE DOCTORAT
présentée par

Khaoula Benabdderrahmane

Laboratoire de Chimie Bioorganique, Biophysique et Biomatériaux pour la Santé,
UMR CNRS 7244,
OR Biomaterials Engineering and Surface Treatment

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE

soutenue le 20 septembre 2024 devant le jury d'examen constitué de :

WULFMAN Claudine, Professeure des Universités, Université de Paris, Rapportrice
ATTIK Nina, Ingénieure de recherche-HDR, Université Claude Bernard Lyon 1,
Rapportrice
STIRNEMANN Julien, Professeur des Universités, Université Paris Cité,
Examineur
NEDJAR Boumediene, Professeur des Universités, Université d'Évry Paris-Saclay,
Examineur
DEGOUTIN Stéphanie, Maître de conférences-HDR, Université de Lille,
Polytech'Lille, Examinatrice
FALENTIN-DAUDRE Céline, Maître de conférences-HDR, Université Sorbonne
Paris Nord, Directrice de thèse
RAMTANI Salah, Professeur des Universités, Université Sorbonne Paris Nord, Co-
directeur de thèse

Tables des matières

Introduction générale	2
Chapitre I : Étude bibliographique	5
Partie 1	6
1. Myéloméningocèle	6
1.1. Définition	6
1.2. Épidémiologie	7
1.3. Physiopathologie	8
1.4. Facteurs de risques	10
1.4.1. Facteurs génétiques	10
1.4.2. Facteurs environnementaux	10
1.4.3. Autres facteurs.....	11
1.5. Diagnostic anténatal	11
2. Approches thérapeutiques existantes et leurs limites	12
2.1. La chirurgie postnatale.....	12
2.2. La chirurgie prénatale	14
2.2.1. La chirurgie prénatale à utérus ouvert	14
2.2.2. La chirurgie prénatale par endoscopie.....	14
3. Les biomatériaux dans le traitement de la myéloméningocèle	16
3.1. Biomatériaux d'origine naturelle.....	17
3.2. Biomatériaux d'origine synthétique	18
3.2.1. Le silicone.....	18
3.2.2. Le polytétrafluoroéthylène.....	18
3.2.3. Les hydrogels thermosensibles à mémoire de forme.....	18
3.2.4. Les polyesters.....	19
3.3. L'ingénierie tissulaire.....	19
4. Conclusion	22
Partie 2	23
1. Généralités sur la polycaprolactone	23
2. Mise en forme de la polycaprolactone par électrofilage	27
2.1. Paramètres de la solution	30
2.2. Paramètres liés au procédé d'électrofilage	30

2.3. Paramètres ambiants.....	31
3. Techniques de modification de surface de la polycaprolactone.....	31
3.1. Traitement par plasma	31
3.2. Mélanges et copolymères à base de PCL	33
3.3. Traitement chimique	34
3.4. Revêtement de surface à base de protéines	35
3.5. Greffage de polymères bioactifs	36
4. Applications des membranes de PCL électrofilées pour la régénération tissulaire	38
4.1. Ingénierie tissulaire cardiaque	38
4.2. Ingénierie tissulaire vasculaire	39
4.3. Ingénierie du tissu osseux	41
4.4. Ingénierie du tissu cartilagineux	41
4.5. Ingénierie des tissus nerveux	42
4.6. Ingénierie tissulaire de la peau	44
5. Conclusion	46
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	48
1. Élaboration d'un patch imperméable	49
1.1. Techniques d'élaboration.....	49
1.1.1. Electrofilage	49
1.1.2. Spin coating	52
1.2. Méthodes d'élaboration du patch à double couche.....	53
2. Fonctionnalisation de surface	54
2.1. Face bioactive.....	54
2.1.1. Préparation du monomère styrène sulfonate de sodium.....	54
2.1.2. Fonctionnalisation de surface	55
2.2. Face antiadhésive.....	57
2.2.1. Choix du polyéthylène glycol	57
2.2.2. Greffage du PEG	58
3. Caractérisations Physico-chimiques.....	58
3.1. Microscopie électronique à balayage – spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie	58
3.2. Mesure de l'angle de contact.....	58

3.3.	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée	59
3.4.	Dosage colorimétrique au bleu de toluidine	60
3.5.	Calorimétrie différentielle à balayage	62
3.6.	Chromatographie d'exclusion stérique	63
4.	Etude des propriétés mécaniques	63
5.	Etude de la réponse biologique	67
5.1.	Préparations des échantillons	67
5.2.	Test de cytotoxicité	67
5.3.	Test de morphologie	69
6.	Etude de la dégradation du patch	70
6.1.	Choix d'un milieu modèle	70
6.2.	Étude de la stabilité du milieu de dégradation	71
6.3.	Protocole expérimental	72
7.	Étude comparative des colles chirurgicales	73
7.1.	Colles chirurgicales	73
7.2.	Protocole expérimental	74

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche pour le traitement de la myéloméningocèle 76

1.	Élaboration d'un patch imperméable à double couche	78
1.1.	Mise au point de la membrane électrofilée	78
1.1.1.	Optimisation des paramètres d'électrofilage	78
1.1.2.	Optimisation des paramètres d'électrofilage en utilisant l'acide acétique comme solvant	82
1.2.	Elaboration et caractérisation du patch à double couche	87
2.	Fonctionnalisation de surface	89
2.1.	Greffage du polyNaSS	89
2.1.1.	Dosage colorimétrique au bleu de toluidine	90
2.1.2.	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie	93
2.1.3.	Mesure de l'angle de contact	94
2.1.4.	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée	95
2.2.	Greffage du polyéthylène glycol	98
2.2.1.	Mesure de l'angle de contact	99

2.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée	100
2.2.3. Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie	102
2.2.4. Dosage au bleu de toluidine	102
3. Analyses thermiques	104
4. Chromatographie d'exclusion stérique	106
5. Étude de la réponse biologique	107
5.1. Test de cytotoxicité au MTT	107
5.2. Morphologie cellulaire	113
6. Étude des propriétés mécaniques des patchs	121
6.1. Influence de la fonctionnalisation de surface sur les propriétés mécaniques du patch	128
7. Conclusion	131
Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique	132
1. Étude de la stabilité du milieu	134
2. Étude de la dégradation <i>in vitro</i>	136
2.1. Caractérisation physico-chimique des patchs après dégradation	137
2.1.1. Calorimétrie différentielle à balayage	137
2.1.2. Microscopie électronique à balayage	144
2.1.3. Chromatographie à exclusion stérique	151

2.2.	Étude de la stabilité du greffage pendant la dégradation	158
2.2.1.	Dosage au bleu de toluidine	158
2.2.2.	Mesure de l'angle de contact	160
2.3.	Étude des propriétés mécaniques après dégradation.....	164
3.	Conclusion	170
Chapitre V : De l'<i>in vitro</i> à l'<i>in vivo</i> : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch		171
1.	Étude comparative des colles chirurgicales	173
2.	Optimisation des paramètres d'électrofilage pour des fibres alignées	177
3.	Conclusion	180
Conclusion générale et perspectives.....		182
Annexe		i
Références bibliographiques.....		iii

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de plusieurs types de spina bifida	6
Figure 2 : Prévalence des spinas bifidas nés en France de 1980 à 2012	7
Figure 3 : Prévalence de l'interruption de grossesse pour spina bifida en France de 1980 à 2012.....	8
Figure 4 : Neurulation et origine de la myéломéningocèle	9
Figure 5 : (A) vue transversale du cervelet attiré vers le bas formant une incurvation à concavité antérieure lui donnant un « aspect en banane » ; (B) vue transventriculaire montrant un festonnage des os frontaux du crâne du fœtus donnant un « aspect en citron »	12
Figure 6 : Technique de fermeture chirurgicale postnatale d'une myéломéningocèle	13
Figure 7 : Technique de chirurgie prénatale ouverte pour le spina bifida ouvert..	15
Figure 8 : Deux techniques de chirurgie par fœtoscopie : percutanée avec introduction du trocart à travers la peau, et assistée par laparotomie où la peau abdominale est incisée pour l'introduction des trocarts.....	16
Figure 9 : Les voies de synthèse de la PCL : par ROP et par condensation de l'acide 6-hydroxyhexanoïque	24
Figure 10 : Schéma de la voie de dégradation de la PCL et de son élimination de l'organisme par le cycle de l'acide citrique.....	26
Figure 11 : Représentation graphique de la dégradation complète de la PCL en fonction du temps	26
Figure 12 : Schéma du dispositif d'électrofilage avec le cône de Taylor	27
Figure 13 : Représentation schématique de la formation du cône de Taylor	28
Figure 14 : Vues microscopiques et macroscopiques des échafaudages de PCL dégradés par NaOH de 0 à 48 h.....	35
Figure 15 : Techniques de greffage covalent : « Grafting to » et « Grafting from »	36
Figure 16 : Coupes histologiques des échafaudages PCL/gélatine et collagène/poly (acide lactique-co-caprolactone) (PLCL) avec une coloration à l'hématoxyline et éosine à 6 semaines <i>in vivo</i>	40
Figure 17 : Schéma d'une coupe histologique de la peau	44
Figure 18 : Schéma de la démarche suivie dans ce travail pour le développement d'un patch pour le traitement de la myéломéningocèle	47
Figure 19 : Dispositif d'électrofilage du laboratoire BEST	50
Figure 20 : Elaboration de film par spin coating.....	52
Figure 21 : Méthodes d'élaboration du patch à double couche	53

Figure 22 : Structure chimique du styrène sulfonate de sodium	55
Figure 23 : Activation de surface par ozonation.....	56
Figure 24 : (A) Greffage aux UV avec une puissance de 160 mW/cm ² , (B) Patch maintenu sur une plaque en téflon pour exposer une seule face aux UV.....	56
Figure 25 : Structure chimique du polyéthylène glycol méthyl éther acrylate	57
Figure 26 : Mesure de l'angle de contact.....	59
Figure 27 : Complexation du BT avec les SO ₃ ⁻ du polyNaSS.....	60
Figure 28 : Exemple d'une courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration du dosage au BT.....	62
Figure 29 : Courbe contrainte-déformation	63
Figure 30 : Montage du test de traction uni-axiale.....	65
Figure 31 : Forme et dimensions de l'éprouvette H3	65
Figure 32 : Schéma du test de cytotoxicité au MTT.....	68
Figure 33 : Schéma du test de morphologie cellulaire	69
Figure 34 : Schéma représentatif du test de pelage en T (T-Peel).....	75
Figure 35 : Concept du patch à double couche pour le traitement de la myéloméningocèle.....	78
Figure 36 : Images au MEB des membranes électrofilées à différents ratios	80
Figure 37 : Membrane électrofilée avec une concentration de 10w%.....	81
Figure 38 : Membrane électrofilée avec une tension de 12kV	82
Figure 39 : Images au MEB des membranes électrofilées à différentes concentrations en utilisant l'acide acétique	83
Figure 40 : Images au MEB des membranes électrofilées à 9kV (A) et à 12kV (B) (les flèches montrent les fibres avec une forme irrégulière)	84
Figure 41 : (A) images au MEB des membranes électrofilées à 15kV, (B) histogramme de la distribution du diamètre des fibres des membranes électrofilées à 15kV	84
Figure 42 : Images au MEB des membranes électrofilées à différents débits d'injection de la solution	85
Figure 43 : Images au MEB des membranes électrofilées à 15 cm (A) et à 20 cm (B)	86
Figures 44 : Membrane électrofilée avec une concentration de 25w%, une tension de 9,5 kV, une distance de 15cm et un débit d'injection de 2 mL/h	87
Figure 45 : Images au MEB des patches à double couche élaborés par deux méthodes	88
Figure 46 : Filtre utilisé pour vérifier la perméabilité des patches	89

Figure 47 : Mécanisme de greffage du polyNaSS avec (a) et sans (b) activation de surface.....	90
Figure 48 : Taux de greffage du polyNaSS avec et sans activation de surface ...	91
Figure 49 : Membrane greffées par ozonation de 10 minutes après conditionnement, stérilisation et culture cellulaire.....	92
Figure 50 : Taux de greffage du polyNaSS avec ozonation de 5 et 10 minutes...	92
Figure 51 : Distribution des éléments sur une surface de PCL greffée avec ozonation	94
Figure 52 : Évaluation de l'hydrophilie des surfaces : (A) non greffées, (B) greffées au polyNaSS avec ozonation, (C) greffées au polyNaSS sans ozonation	95
Figure 53 : Spectre infrarouge de la polycaprolactone	96
Figure 54 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées, ozonées, exposées aux UV et non greffées en utilisant le mélange de solvant et non greffées en utilisant l'acide acétique.....	97
Figure 55 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées avec et sans activation de surface, ozonées, exposées aux UV et non greffées.....	98
Figure 56 : Échantillons greffés au PEG à 0,7 M pendant 1 heure (A) et 30 minutes (B), échantillons greffés au PEG à 0,25 pendant 1 heure avec (C) et sans ozonation (D)	99
Figure 57 : Mesure de l'angle de contact des surfaces non greffées et greffés au PEG avec et sans activation de surface.....	100
Figure 58 : (A) comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées au PEG et non greffés, (B) comparaison des spectres infrarouges des films de PCL et du PEG acrylate, (C) Comparaison des spectres infrarouges des granules de PCL et des films de PCL	101
Figure 59 : Taux de greffage du PEG avec et sans activation de surface par rapport au greffage du polyNaSS.....	103
Figure 60 : Coloration au bleu de toluidine de la face membrane greffée au polyNaSS (A) et de la face film greffée au PEG (B).....	103
Figure 61 : Analyses DSC des membranes électrofilées avec les pics endothermiques correspondants.....	105
Figure 62 : Analyses DSC des différentes conditions avec les pics endothermiques correspondants.....	106
Figure 63 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M ₁) avec et sans greffage.....	108
Figure 64 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M ₂) avec et sans greffage.....	108
Figure 65 : Comparaison des taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M ₁) et (M ₂).....	109

Figure 66 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M ₁) greffés au polyNaSS.....	110
Figure 67 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M ₂) greffés au polyNaSS en deux essais.....	111
Figure 68 : Viabilité cellulaire sur les patchs M ₁ après différents temps d'incubation (en absorbance).....	112
Figure 69 : Viabilité cellulaire sur les patchs M ₂ après différents temps d'incubation (en absorbance).....	112
Figure 70 : Mécanisme anti-protéique du polyéthylène glycol d'après Li <i>et al</i>	113
Figure 71 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces électrofilées du patch M ₁ , après différents temps d'incubation	114
Figure 72 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces électrofilées du patch M ₂ , après différents temps d'incubation	115
Figure 73 : Images au MEB de la forme des cellules après 24 heures, 3 jours et 7 jours	116
Figure 74 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces obtenues par spin coating du patch M ₁ , après différents temps d'incubation	117
Figure 75 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces obtenues par spin coating du patch M ₂ , après différents temps d'incubation (les flèches montrent les défauts d'élaboration et les plis).....	118
Figure 76 : Images de morphologie cellulaire sur des particules à surfaces lisses et rugueuses d'après Li <i>et al</i>	119
Figure 77 : Mécanisme de mécano-transduction cellulaire sur une surface rugueuse (A) et une matrice fibreuse (B) selon Sun et al.....	120
Figure 78 : Courbe contrainte-déformation de la membrane électrofilée, à une vitesse de 0,1mm/s.....	122
Figure 79 : Image au MEB de la membrane après déformation plastique	122
Figure 80 : Courbe contrainte-déformation du film M ₂ , à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.....	123
Figure 81 : Courbe contrainte-déformation du film M ₁ , à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.....	124
Figure 82 : Courbe contrainte-déformation des échantillons monocouches et bicouches à une vitesse de déformation de 0,1mm/s	125
Figure 83 : Courbe contrainte-déformation du patch M ₁ (A) et M ₂ (B) à différentes vitesses de déformation.....	127
Figure 84 : Courbes contrainte-déformation des échantillons avec et sans greffage, à une vitesse de déformation de 0,1mm/s	129
Figure 85 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes de PCL à J0 et à 2 mois dans le milieu modèle	135

Figure 86 : Images MEB des membranes de PCL à J0 et à 2 mois dans le milieu modèle.....	136
Figure 87 : Conditions de greffage testées pendant l'étude de dégradation	137
Figure 88 : Degré de cristallinité à différents temps de dégradation	139
Figure 89 : Température de fusion de la PCL à différents temps de dégradation	142
Figure 90 : Morphologies des fibres électrofilées non greffées, de 0 à 6 mois de dégradation.....	144
Figure 91 : Morphologies des fibres électrofilées greffées au polyNaSS avec ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches en jaune indiquent l'érosion de la surface des fibres	145
Figure 92 : Morphologies des fibres électrofilées greffées au polyNaSS sans ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation.....	146
Figure 93 : Illustration du processus de dégradation en surface (érosion) et en masse	147
Figure 94 : Morphologies des films non greffées de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches jaunes indiquent les défauts de surface liés à la présence de bulles d'air pendant l'élaboration	148
Figure 95 : Morphologies des films greffées au PEG avec ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches jaunes indiquent les craquelures après 6 mois de dégradation	149
Figure 96 : Morphologies des films greffées au PEG sans ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation.....	150
Figure 97 : Images MEB des films non greffés (NG) et greffés (G) dégradés à 37°C, pendant 24 semaines d'après Leroux <i>et al.</i>	150
Figure 98 : Évolution de la masse molaire en nombre (M_n) en fonction du temps de dégradation.....	152
Figure 99 : Évolution de la masse molaire en poids (M_w) en fonction du temps de dégradation.....	153
Figure 100 : Mécanisme de réaction de l'ozone avec la PCL d'après Dabasinskaite <i>et al.</i>	154
Figure 101 : Taux de greffage des échantillons greffés et non greffés, de J0 à 6 mois de dégradation.....	159
Figure 102 : Angle de contact des surfaces électrofilées, avec et sans greffage du polyNaSS, en fonction du temps de dégradation.....	161
Figure 103 : Patch greffé avec ozonation après 5 mois de dégradation sur lequel une délamination des couches supérieures est observée	162
Figure 104 : Angle de contact des surfaces de PCL, avec et sans greffage du PEG, en fonction du temps de dégradation	163

Figure 105 : Évolution du module de Young (E) en fonction du temps de dégradation	165
Figure 106 : Évolution de la contrainte maximale (σ_{max}) en fonction du temps de dégradation.....	166
Figure 107 : Courbes contrainte-déformation des différentes conditions à J0, 3 mois et 6 mois de dégradation	168
Figure 108 : Rupture différée des couches pendant l'essai de traction	169
Figure 109 : Schéma représentatif du test de pelage en T (T-Peel)	173
Figure 110 : Éprouvettes après essai de pelage, sur lesquelles un déchirement d'une couche est observée	174
Figure 111 : Essai de pelage en T à 4,23mm/s : résistance au pelage en fonction de la distance en utilisant de la Bioglue® sur faces électrofilées	175
Figure 112 : Conception du patch pour un meilleur collage	175
Figure 113 : Évaluation de la cicatrisation des plaies cutanées chez le rat implanté avec trois types d'échafaudages électrofilés	177
Figure 114 : Membranes électrofilées sur un cylindre rotatif	179
Figure 115 : La migration collective des cellules épithéliales d'après Vedula et al	181

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la polycaprolactone	23
Tableau 2 : Quelques exemples des effets des paramètres d'électrofilage sur le diamètre des fibres	29
Tableau 3 : Études sur les traitements par plasma des membranes de PCL.....	32
Tableau 4 : Paramètres d'électrofilage testés	51
Tableau 5 : Paramètres d'électrofilage testés en utilisant l'acide acétique comme solvant.....	51
Tableau 6 : Solutions de spin coating pour l'élaboration du patch à double couche	54
Tableau 7 : Tableau comparatif entre la composition du FBS et celle du liquide amniotique au cours du 3 ^{ème} trimestre de grossesse.....	70
Tableau 8 : Analyse élémentaire des surfaces de PCL greffées et non greffées au polyNaSS.....	93
Tableau 9 : Attribution des bandes FTIR de la polycaprolactone	95
Tableau 10 : Analyse élémentaire des surfaces de PCL greffées et non greffées au PEG.....	102
Tableau 11 : Température de fusion et degré de cristallinité des membranes électrofilées	104
Tableau 12 : Température de fusion et degré de cristallinité des différentes conditions	105
Tableau 13 : Masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I) des différentes conditions	107
Tableau 14 : Propriétés mécaniques des échantillons monocouches et bicouches	128
Tableau 15 : Propriétés mécaniques des patches avec et sans greffage	130
Tableau 16 : Attribution des bandes FTIR de la polycaprolactone à J0 et après 2 mois dans le milieu modèle.....	135
Tableau 17 : Degré de cristallinité des échantillons de PCL avec et sans greffage, à différents temps de dégradation.	140
Tableau 18 : Température de fusion des échantillons de PCL avec et sans greffage, à différents temps de dégradation	143
Tableau 19 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation	155
Tableau 20 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation.....	156

Tableau 21 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation 157

Listes des abréviations

AFTN : Anomalies de fermeture du tube neural
ASTM: American Society for Testing Materials
AuNPs: Nanoparticules d'or
BEST: Biomaterials Engineering and Surface Treatment
bFGF : Facteur de croissance basique des fibroblastes
BT : Bleu de toluidine
CCM : Chitosane carboxyméthylque
DCM : Dichlorométhane
DG : Degré de greffage
DMEM: Dulbecco's Modify Eagle Medium
DMF: Diméthylformamide
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DSC: Differential Scanning Calorimetry
EDX : Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
FAK: Focal Adhesion Kinase
FBS: Fetal Bovine Serum
FDA : Food and Drug Administration
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier AC
I_p : Indice de polydispersité
ISO: International Organization for Standardization
KGN: kartogénine
MEB : Microscope électronique à balayage
MMC : Myéloméningocèle
M_n : Masse molaire en nombre
MOMS : Management of Myelomeningocele Study
M_w : Masse molaire en poids
NaAlg : Alginate de sodium

nHA : Nano-hydroxyapatite
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCL : Polycaprolactone
PEG : Polyéthylène glycol
PG : Polypropylène glycol
PGA : Acide polyglycolique
PGS : Poly (sébacate de glycérol)
PHSU : Poly (serinol hexaméthylène) d'urée
PLA : Acide polylactique
PMAA : Poly (acide méthacrylique)
PNIPAAm : Poly (N-isopropylacrylamide)
PolyNaSS : Poly (styrène sulfonate) de sodium
PPy : Polypyrrole
PTFE : Polytétrafluoroéthylène
PVA: Alcool polyvinylique
ROP: Ring Opening Polymerization
SA : Semaine d'aménorrhée
SEC : Chromatographie à exclusion stérique
Tf : Température de fusion
Tg : Température de transition vitreuse
THF : Tétrahydrofurane
UV : Ultra-violet

Introduction générale

Introduction générale :

Les avancées de la chirurgie prénatale a permis d'améliorer la prise en charge des anomalies congénitales, en offrant de nouvelles possibilités de traitement des malformations autrefois associées à un mauvais pronostic. Cette prise en charge précoce est devenue possible grâce à l'amélioration des techniques de diagnostic anténatal, ainsi que la compréhension de la physiopathologie des malformations congénitales. La myéloméningocèle comptent parmi les anomalies dont la prise en charge précoce limite les troubles neurologiques associés.

Causée par la non-fermeture du tube neural pendant l'embryogenèse, la myéloméningocèle est caractérisée par l'exposition de la moelle épinière et des méninges à l'environnement intra-utérin. Elle est souvent associée à des anomalies cérébrales telles que la malformation de Chiari II, mais aussi à des troubles moteurs et sphinctériens, qui résultent de la destruction progressive du tissu médullaire par le liquide amniotique.

L'introduction de la réparation prénatale de la myéloméningocèle a donc permis de grandes avancées dans la prise en charge de cette dernière. Plusieurs auteurs suggèrent que les lésions neurologiques dues à l'exposition de la moelle épinière étaient un processus progressif qui commence dès les premières semaines de la gestation. Cette hypothèse a été confirmée par une amélioration significative des résultats neurologiques après la chirurgie prénatale à utérus ouvert, par rapport à la chirurgie postnatale traditionnelle. Cependant, cette technique a été associée à de nombreuses complications materno-fœtales, ce qui a conduit à la mise au point d'une technique moins invasive, par foétoscopie, dans le but d'améliorer d'avantage le pronostic et de réduire les complications associées à la chirurgie à utérus ouvert.

Toutefois, bien que moins invasive, la réparation par foétoscopie reste complexe et ne peut être effectuée qu'après kératinisation de la peau. Ainsi, l'utilisation des patchs est apparue comme une alternative prometteuse, car ils permettent d'espérer une couverture précoce du défaut pour protéger la moelle épinière, de réduire la durée de l'intervention chirurgicale et dans le meilleur des cas, d'offrir un support à la régénération tissulaire pour la fermeture du défaut.

Introduction générale

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse, en s'appuyant sur l'expertise du laboratoire BEST dans l'élaboration et la fonctionnalisation des biomatériaux, avec l'objectif de développer un patch à base de polycaprolactone, qui répond aux exigences de la réparation *in utero* de la myéломéningocèle. Il s'agit dans un premier temps de développer une technique d'élaboration d'un patch biodégradable et imperméable pour empêcher le passage du liquide amniotique, ainsi que la fuite du liquide céphalo-rachidien. Nous nous intéressons par la suite à la fonctionnalisation de la surface du patch pour moduler la réponse cellulaire à son contact, et à l'étude de ses propriétés mécaniques. Enfin, nous analysons les résultats de la dégradation du patch dans un milieu simulant le liquide amniotique, afin de comprendre son mécanisme et de prédire le comportement du patch *in vivo*.

Ces travaux seront présentés comme suit :

Chapitre I : ce chapitre est divisé en deux parties. Il sera dédié, premièrement, à la compréhension du contexte par un état de l'art sur la myéломéningocèle, sa prise en charge et les nouvelles approches proposées. La deuxième partie sera consacrée à une étude bibliographique sur le biomatériau et la technique choisie pour l'élaboration du patch.

Chapitre II : ce chapitre présente le matériel et les méthodes expérimentales utilisés pour mener à bien ce travail. Il comprend les techniques d'élaboration du patch, de fonctionnalisation, de caractérisations physico-chimiques, les protocoles expérimentaux des essais mécaniques et biologiques ainsi que le protocole de l'étude de dégradation.

Chapitre III : nous présentons, dans ce chapitre, les interprétations et les discussions des résultats de l'élaboration du patch, de sa fonctionnalisation, de ses caractérisations physico-chimiques, de l'étude de la réponse biologique à son contact ainsi que les résultats des essais mécaniques.

Chapitre IV : le quatrième chapitre est consacré à l'interprétation et à la discussion des résultats des caractérisations physico-chimiques et mécaniques, après la dégradation du patch dans le milieu modèle.

Introduction générale

Chapitre V : dans cette partie, nous analysons les premiers résultats de l'étude comparative des colles, ainsi que l'optimisation des paramètres d'électrofilage pour l'obtention de fibres alignées dans une perspective d'essais *in vivo* et de l'amélioration de la réponse cellulaire.

Chapitre I : Étude bibliographique

Partie 1 :

1. Myéломéningocèle :

1.1. Définition :

La myéломéningocèle (MMC), ou spina bifida ouvert, est une anomalie congénitale de la moelle épinière en rapport avec un défaut de fermeture du tube neural. Elle est caractérisée par l'extériorisation de la moelle épinière et des méninges à travers des arcs vertébraux ouverts (Figure 1) [1,2,3].

Cliniquement, la MMC se présente comme une lésion kystique avec une placode neurale exposée au sommet [1]. Cette exposition a pour conséquence : des paralysies sensitivomotrices d'importance variable des membres inférieurs ainsi qu'une altération des fonctions intestinales et urinaires [1,4,5,6].

Les patients atteints de myéломéningocèle peuvent également présenter des lésions concomitantes de la moelle épinière, telles que la diastématomyélie et l'hydromyélie ; et des anomalies structurelles du cerveau, telles que la malformation d'Arnold Chiari II associée à une hydrocéphalie [1,2,7].

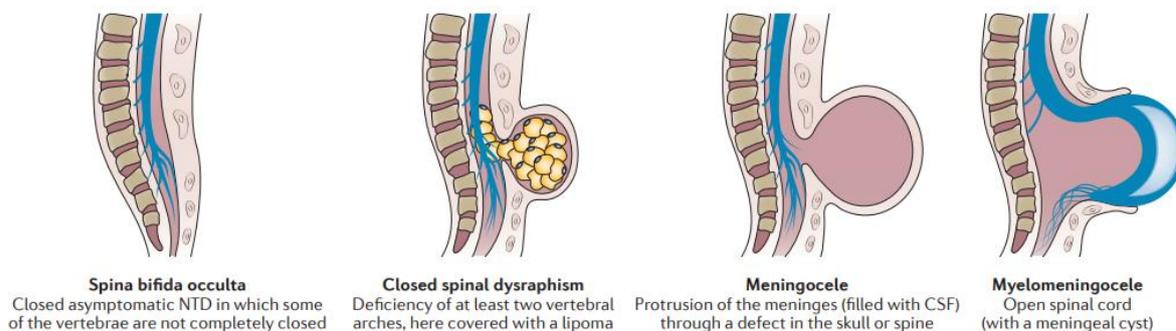


Figure 1 : Représentation schématique de plusieurs types de spina bifida [8].

1.2. Épidémiologie :

Les données épidémiologiques disponibles ne permettent pas actuellement de distinguer les différents types de dysraphisme [9]. Néanmoins, la MMC est la forme la plus fréquente avec une prévalence mondiale de 0,24 à 8,67 cas pour 10 000 naissances vivantes [1,9].

Selon les données d'EUROCAT (European Platform on Rare Disease Registration), le nombre des naissances vivantes avec un spina bifida en France a diminué jusqu'à moins de 0,5 pour 10 000 naissances en 1999. Ce chiffre a évolué à partir des années 2000 avec un pic en 2005 et une tendance à la hausse depuis 2011 (Figure 2) [10,11].

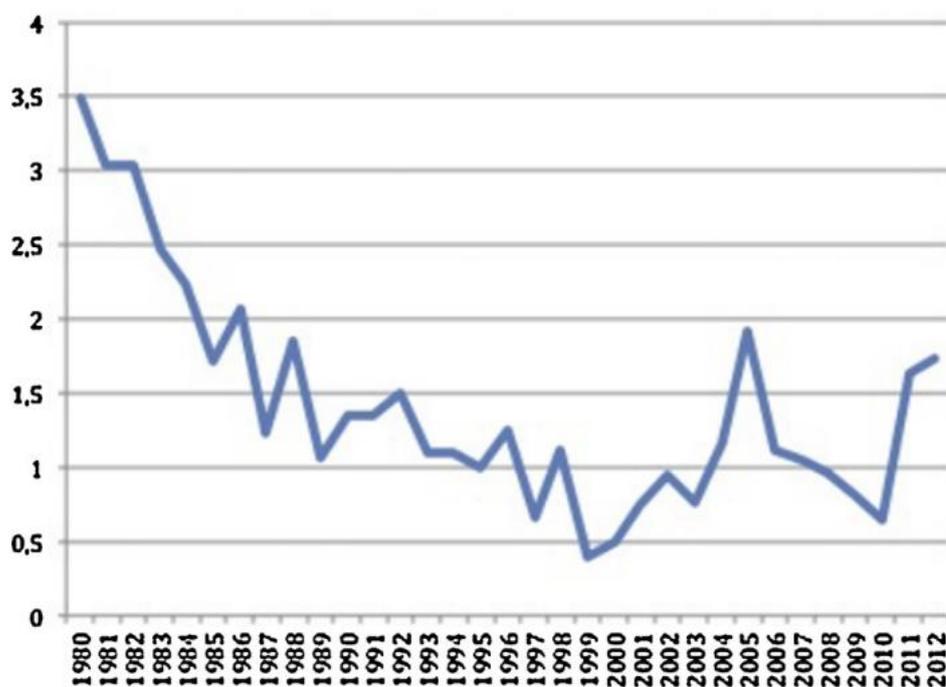


Figure 2 : Prévalence des spinas bifidas nés en France de 1980 à 2012, à l'axe des ordonnées : la prévalence est exprimée en nombre de cas pour 10 000 naissances [10, 11].

Le nombre d'enfants diagnostiqués d'un spina bifida a connu également une augmentation constante depuis les années 80 avec l'une des principales raisons : l'amélioration des techniques de diagnostic anténatal, notamment par échographie dès

le premier trimestre [10,12]. Par conséquent, la prévalence d'interruption de grossesse a augmenté sur la même période jusqu'au début des années 2000 où on observe une tendance à la baisse (Figure 3). Le refus d'interruption de grossesse semble être motivé par différents facteurs, notamment d'ordre socioculturel, tels que des considérations éthiques ou religieuses [10].

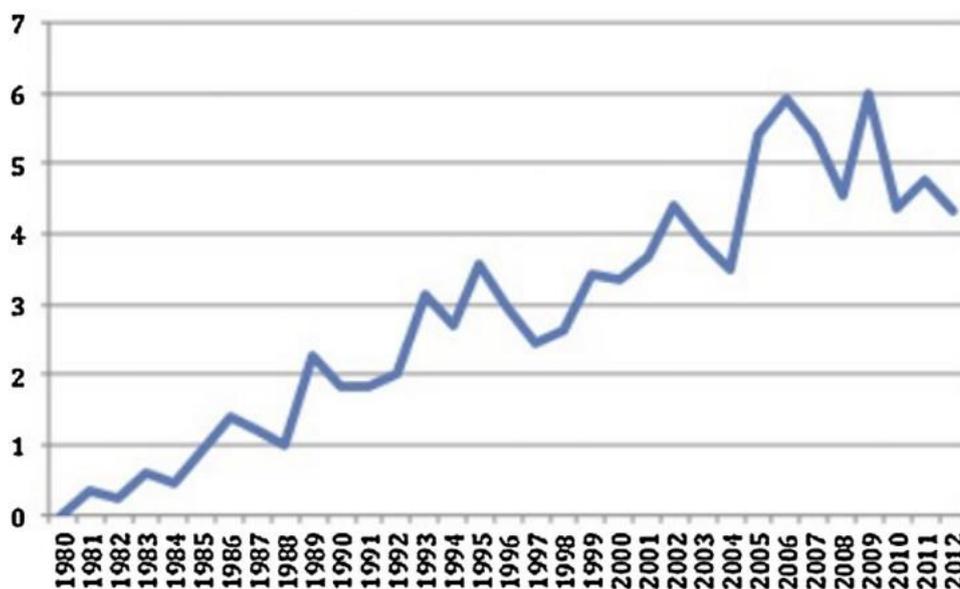


Figure 3 : Prévalence de l'interruption de grossesse pour le spina bifida en France de 1980 à 2012, à l'axe des ordonnées : la prévalence est exprimée en nombre de cas pour 10 000 naissances [10, 11].

1.3. Physiopathologie :

Le développement normal de la moelle épinière, au cours de l'embryogénèse, se fait en trois stades : la gastrulation, la neurulation primaire et la neurulation secondaire.

Au cours du premier stade, la plaque neurale se forme lorsque l'endoderme et l'ectoderme forment un disque embryonnaire bilaminaire. Avec la division cellulaire rapide du disque embryonnaire, ce dernier se transforme en disque trilaminaire avec la formation du mésoderme. Enfin, la notocorde interagit avec l'ectoderme pour former le neuroectoderme et la plaque neurale, qui commence sur la ligne médiane, puis progresse vers le crâne et la partie caudale. Au cours de la neurulation primaire (Figure 4), les plis neuraux apparaissent avec une petite dépression centrale appelée sillon neural. Les plis neuraux vont ensuite fusionner progressivement pour transformer la

Chapitre I : Étude bibliographique

plaque neurale en tube neural. La neurulation primaire se termine par la fermeture des extrémités crânienne et caudale du tube neural. Tout défaut de fermeture du tube neural caudal se traduit par l'exposition de tissu neural appelé placode. La présence d'une placode neurale et d'un revêtement méningé est généralement associée à la myéloméningocèle [13, 14].

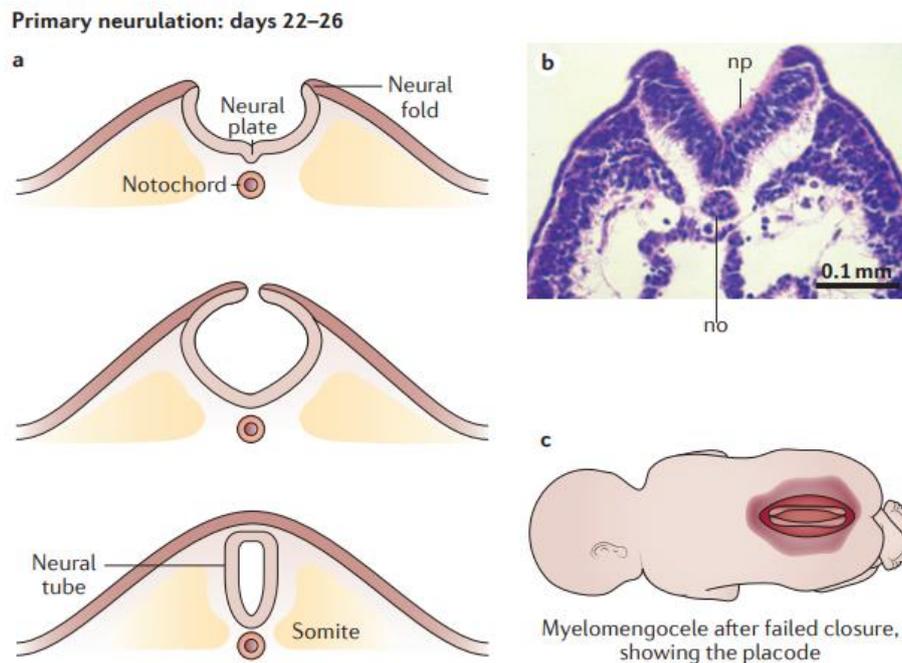


Figure 4 : Neurulation et origine de la myéloméningocèle : **(a)** coupes transversales montrant le processus de neurulation primaire, qui implique la flexion de la plaque neurale, la convergence des plis neuraux et la fermeture du tube neural ; **(b)** coupe histologique des plis neuraux spinaux ouverts d'un embryon humain non atteint, montrant la fermeture du tube neural pendant la neurulation primaire ; **(c)** absence de fermeture du sillon neural dans la région rachidienne basse au cours de la quatrième semaine de gestation entraînant une myéloméningocèle [8].

1.4. Facteurs de risques :

1.4.1. Facteurs génétiques :

Bien que les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) (dont la MMC) soient généralement isolées, elles sont parfois associées à des anomalies chromosomiques, le plus souvent la trisomie 18, ou à des troubles monogéniques mendéliens. Ces formes syndromiques d'AFTN sont généralement reconnaissables à la présence d'autres anomalies congénitales structurales [15]. Les facteurs génétiques contribuant sont encore mal compris, mais comprennent des gènes impliqués dans la voie de l'acide folique, dans le métabolisme fœtal et maternel et des gènes codant plusieurs aspects du contrôle embryologique, tels que la polarité cellulaire plane et la ciliogenèse [16, 17].

1.4.2. Facteurs environnementaux :

L'étiologie de la myéloméningocèle est souvent multifactorielle, et comprend des facteurs génétiques et environnementaux dont l'identification permet de proposer des actions de prévention.

1.4.2.1. Acide folique :

Les constatations d'une carence en acide folique (vitamine B9) chez un groupe de femmes ayant des enfants atteints d'AFTN ont permis de mettre en évidence une relation entre la survenue de ces anomalies et un déficit en acide folique [17]. De plus, une étude multicentrique, randomisée, en double aveugle sur l'effet de l'acide folique [18] a démontré que la prise péri-conceptionnelle de folates réduit le risque d'AFTN. Ces résultats ont conduit certains pays, dont le Canada, les États unis et le Royaume Unis, à définir une politique de prévention par supplémentation en acide foliques avant et pendant la grossesse.

1.4.2.2. Médicaments tératogènes :

Les antiépileptiques constituent la classe de médicaments la plus associée à la survenue des AFTN. Les traitements les plus souvent incriminés pour leur effet

tératogène sont l'acide valproïque et la carbamazépine, décrits comme des antagonistes de l'acide folique [9]. Toutefois, l'épilepsie non contrôlée présente également un risque pour la mère et le fœtus [19]. De ce fait, une consultation pré-conceptionnelle avec un neurologue est indispensable pour évaluer l'intérêt du traitement antiépileptique afin d'envisager son changement, son arrêt ou une réduction de la posologie [20]. Il est également conseillé aux femmes sous antiépileptiques, envisageant ou risquant une grossesse, de recourir à une supplémentation en acide folique [19].

1.4.3. Autres facteurs :

Parmi les associations épidémiologiques bien décrites, on retrouve : les changements saisonniers, les origines ethniques, le statut socio-économique, qui semblent toutes, d'une manière ou d'une autre, refléter les interactions complexes entre les gènes et l'environnement [17].

1.5. Diagnostic anténatal :

Le diagnostic de la myéloméningocèle est possible dès le premier trimestre de grossesse. Il est généralement recommandé aux patientes à haut risque de faire une amniosynthèse pour la détection des taux élevés d'alpha-foetoprotéine, souvent associés à l'anencéphalie et à la myéloméningocèle [8]. Cependant, l'échographie reste l'examen de choix pour le dépistage des anomalies au cours du deuxième trimestre. Cette technique permet de détecter les signes caractéristiques de la MMC à savoir : des extensions kystiques, des lésions vertébrales ou des distorsions [21]. De plus, les signes de malformation d'Arnold Chiari sont également décelables par échographie tels que les signes de la banane et du citron. Le signe de la banane se manifeste par l'allongement, la compression et le déplacement vers le bas des hémisphères cérébelleux, donnant à la fosse postérieure une forme de banane (Figure 5A). En revanche, le signe du citron se réfère à une convexité et une indentation anormale des os frontaux, corrélées à une ventriculomégalie (augmentation de la taille des ventricules cérébraux) (Figure 5B) [13, 22].

Enfin, le recours à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut être également envisagé pour confirmer le diagnostic de la MMC [13].

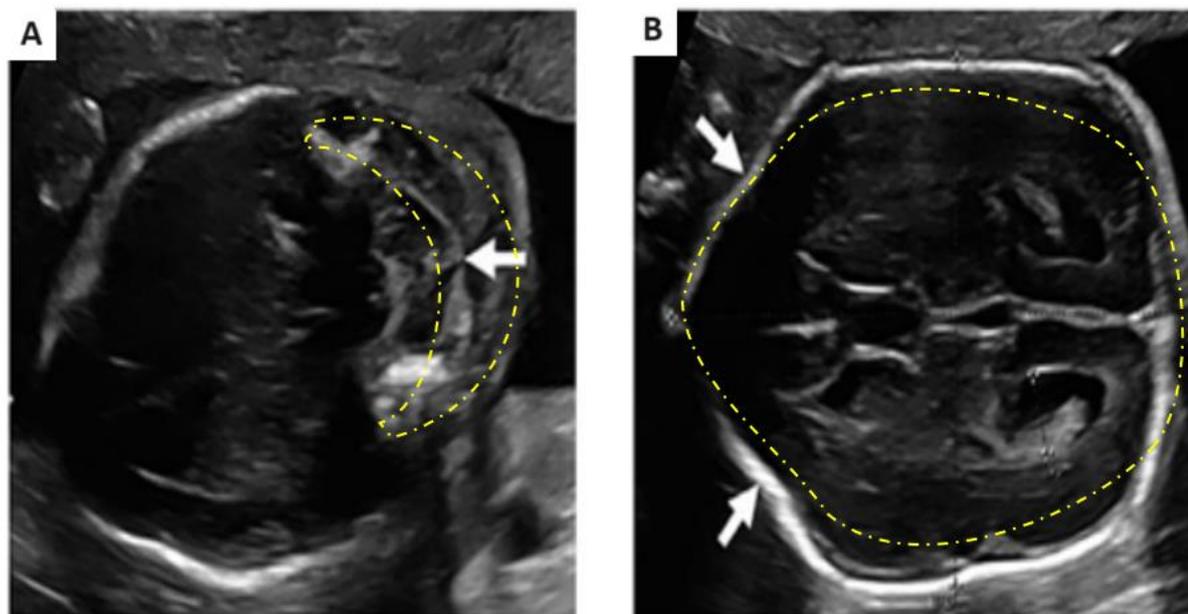


Figure 5 : (A) vue transversale du cervelet attiré vers le bas formant une incurvation à concavité antérieure lui donnant un « aspect en banane » ; (B) vue transventriculaire montrant un festonnage des os frontaux du crâne du fœtus donnant un « aspect en citron » [23].

2. Approches thérapeutiques existantes et leurs limites :

La gestion de la myéломéningocèle requiert une approche pluridisciplinaire. Ses objectifs sont de prévenir les complications, d'améliorer la fonction et de promouvoir le bien-être général du patient. Les personnes atteintes de MMC et leurs familles doivent recevoir une éducation appropriée pour gérer efficacement la maladie [1].

2.1. La chirurgie postnatale :

La prise en charge postnatale de la MMC implique traditionnellement une intervention chirurgicale dans les 48 heures suivant la naissance. Cette intervention vise à protéger la moelle épinière exposée, à prévenir l'infection et à traiter l'hydrocéphalie par une

Chapitre I : Étude bibliographique

dérivation ventriculo-péritonéale [24]. Les données expérimentales et cliniques suggèrent que la plupart des troubles neurologiques se développent pendant la gestation, à la suite d'un traumatisme continu et progressif de la moelle épinière par le liquide amniotique. Par conséquent, une intervention plus précoce, impliquant une chirurgie fœtale, permettra de prévenir le déclin neurologique progressif qui se produit au fil du temps [25,26].

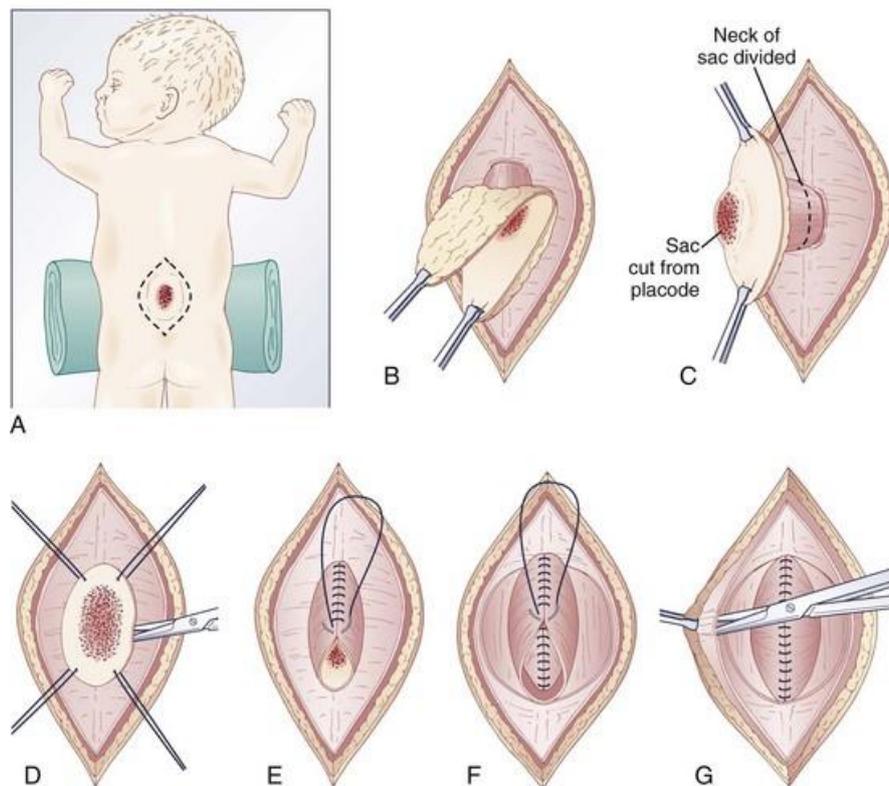


Figure 6 : Technique de fermeture chirurgicale postnatale d'une myéломéningocèle : (A) une incision elliptique est pratiquée juste à l'extérieur de la zone épithéliale ; (B) l'incision se situe au niveau du fascia lombodorsal avec décollement de la peau ; (C) le sac dural est d'abord incisé à sa base, la peau est excisée de la placode, ce qui permet de remettre la placode dans le canal rachidien ; (D) la dure-mère éversée est réfléchiée médialement pour couvrir la placode ; (E) la couche durale est fermée avec une suture ; (F) le fascia est incisé jusqu'au muscle et réfléchi médialement pour créer la

deuxième couche de fermeture ; (**G**) La peau est décollée pour permettre la fermeture [27].

2.2. La chirurgie prénatale :

2.2.1. La chirurgie prénatale à utérus ouvert :

L'indication de la chirurgie prénatale de la myéloméningocèle repose sur l'hypothèse d'une atteinte tissulaire en deux temps « two hit hypothesis » [28]. Cette hypothèse stipule que les anomalies de fermeture du tube neural permettent à une moelle épinière, relativement saine, d'être secondairement altérée par une exposition au liquide amniotique. Ainsi, le but d'une fermeture chirurgicale précoce sera d'empêcher cette destruction secondaire [2].

La réparation prénatale de la myéloméningocèle par hystérotomie (chirurgie à utérus ouvert) a été réalisée pour la première fois en 1997, puis en 2003 sur plus de 200 fœtus [2]. Un essai contrôlé randomisé (MOMS : Management of Myelomeningocele Study) a démontré que la chirurgie prénatale, pratiquée avant 26 semaines d'aménorrhée (SA), a permis de diminuer le risque de décès ou la nécessité d'une dérivation ventriculo-péritonéale avant l'âge de 12 mois. D'autres améliorations ont été également rapportées, telles qu'une réduction de la malformation de Chiari ou encore l'amélioration de la fonction motrice.

Cependant, cette technique présente plusieurs risques materno-fœtaux liés à la nature même de l'intervention. L'étude d'Adzick *et al.* a montré une augmentation du risque de rupture prématurée des membranes, de la mort fœtale ou néonatale et d'accouchement prématuré [29].

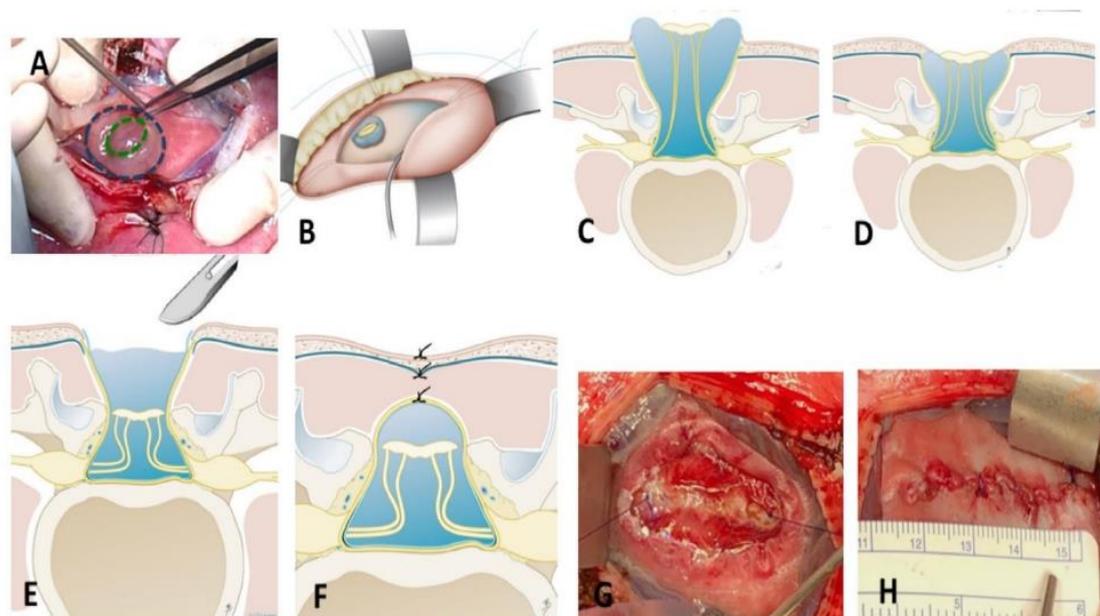


Figure 7 : Technique de chirurgie prénatale ouverte pour le spina bifida ouvert : **(A et B)** hystérotomie et exposition d'une myéloméningocèle chez un fœtus de 25 semaines et sa représentation schématique ; **(C)** myéloméningocèle ; **(D)** myéloschisis ; **(E)** incision cutanée circonférentielle au niveau de la ligne de jonction (ligne bleue) et dissection de la zone épithélio-séreuse résiduelle de la placode (ligne verte) pour obtenir une désolidarisation complète de la placode neurale ; **(F)** fermeture anatomique en deux ou trois couches ; **(G)** fermeture des lambeaux myofasciaux ; **(H)** fermeture de la peau [30].

2.2.2. La chirurgie prénatale par endoscopie :

Pour atténuer les risques materno-fœtaux liés à la chirurgie à utérus ouvert, des approches endoscopiques mini-invasives ont été proposées par plusieurs centres de chirurgie fœtale [31]. La mise au point de ces techniques chez l'homme a été précédée par des expériences sur des modèles animaux afin de démontrer leur faisabilité, leur innocuité et leurs bénéfices neurologiques [32, 33]. En effet, les travaux de Kohl *et al.* et Pedreira *et al.* ont démontré que plusieurs techniques de fœtoscopies donnent des résultats prometteurs, similaires à ceux de l'étude MOMS, avec une réduction de la morbidité maternelle et de la mortalité fœtale [32, 34].

Chapitre I : Étude bibliographique

Actuellement, la chirurgie fœtale endoscopique peut être assistée par une laparotomie et une extériorisation de l'utérus, ou réalisée directement par voie percutanée. Toutefois, ces techniques présentent également des inconvénients tels la prématurité et la complexité de la technique chirurgicale [35].

En France, les interventions *in utero* des MMC sont assurées par deux équipes : le service de médecine fœtale de l'hôpital Armand Trousseau, dirigé par le professeur Jean-Marie Jouannic, et le service de médecine fœtale de l'hôpital Necker-Enfants malades, dirigé par le professeur Yves Ville [9].

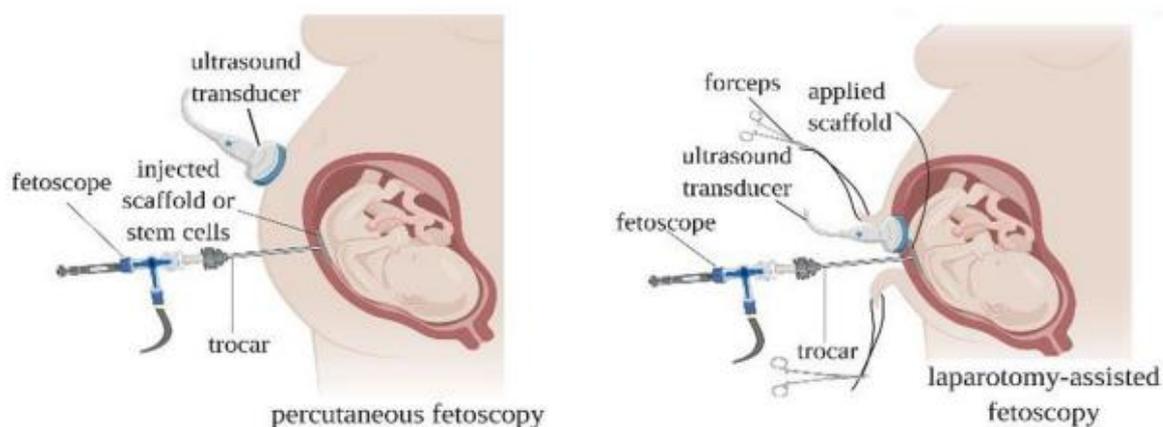


Figure 8 : Deux techniques de chirurgie par fœtoscopie : percutanée avec introduction du trocart à travers la peau, et assistée par laparotomie où la peau abdominale est incisée pour l'introduction des trocarts [36].

3. Les biomatériaux dans le traitement de la myéloméningocèle :

L'utilisation des biomatériaux comme alternative à la fermeture chirurgicale de la MMC suscite beaucoup d'intérêts et permet d'espérer une couverture précoce du défaut. En effet, selon l'hypothèse de Watanabe *et al.* une intervention précoce, peu après le diagnostic de la MMC (entre 15 et 18 SA), peut améliorer davantage le pronostic. Ils suggèrent que le recours aux techniques d'ingénierie tissulaire est nécessaire pour assurer cette couverture, étant donné que la fermeture chirurgicale n'est pas possible à ce stade [37]. L'objectif de l'utilisation d'un biomatériau serait donc de protéger le

Chapitre I : Étude bibliographique

tissu médullaire de l'environnement intra-utérin, d'éviter les fuites du liquide céphalo-rachidien, de constituer un support pour la prolifération cellulaire et de réduire la durée de l'intervention chirurgicale.

Les patches sont élaborés à partir de biomatériaux d'origine naturelle ou synthétique. Ils doivent répondre à un cahier de charge imposé par le contexte pathologique et la complexité de l'intervention, à savoir :

- Une absence de toxicité pour le fœtus et le tissu médullaire ;
- Un patch imperméable et biodégradable ;
- Une face externe propice à la prolifération cellulaire ;
- Une face interne antiadhésive pour éviter son accolement à la moelle épinière ;
- Des propriétés mécaniques permettant sa manipulation lors de l'intervention et sa résistance à la croissance et aux mouvements du fœtus.

3.1. Biomateriaux d'origine naturelle :

Depuis plusieurs années, différents patches d'origine naturelle ont été proposés pour la réparation de la MMC. Ils ont montré des résultats prometteurs notamment dans la couverture du défaut et l'amélioration des fonctions neurologiques. Par exemple, l'utilisation du collagène, du derme et du péricarde d'origine bovine a permis d'apporter une couverture satisfaisante tout en empêchant l'accolement des patches à la moelle épinière [38]. Cependant, certains problèmes liés à l'utilisation de ces matériaux ont été observés, tels que le risque de transmission des maladies et des réactions immunitaires indésirables [39].

Des patches en biocellulose ont été également utilisés dans la réparation fœtoscopique de la MMC, démontrant une inversion de la hernie cérébrale postérieure (malformation de Chiari) et une amélioration de la fonction neurologique sans complications ultérieures [40].

Bien que les patches d'origine naturelle semblent offrir des perspectives intéressantes, ils ne sont pas encore parfaitement adaptés à la réparation de la MMC, car en plus des problèmes cités précédemment, ces patches présentent aussi de faibles propriétés mécaniques pouvant compromettre le succès de l'intervention.

3.2. Biomatériaux d'origine synthétique :

3.2.1. Le silicone :

Le recours à des matériaux synthétiques dans le cadre de la MMC a été rapporté pour la première fois en 1971, avec l'utilisation d'un patch tissé en poly(téréphtalate d'éthylène) (Dacron) recouvert de silicone [41]. Ce patch a permis une couverture étanche du défaut sans adhésion à la moelle épinière. Plus tard, dans un essai *in vivo* chez la brebis, Fontecha *et al.* ont démontré que l'utilisation *in utero* du Silastic, un adhésif médical en silicone, permettait d'améliorer les fonctions neurologiques avec une fermeture presque complète du défaut et une réduction de la malformation de Chiari [42]. Il est important de noter, qu'en termes de faisabilité chirurgicale, le temps moyen nécessaire pour obtenir une couverture fœtale était d'environ 7 minutes [39]. Cependant, l'utilisation des silicones reste limitée en raison de leur nature non-biodégradable, ce qui peut nécessiter une seconde intervention chirurgicale pour retirer le patch.

3.2.2. Le polytétrafluoroéthylène :

En raison de ses propriétés antiadhésives, le polytétrafluoroéthylène (PTFE) a été considéré par Park *et al.* comme un matériau de choix pour prévenir les attachements au tissu médullaire [43]. Semblablement au silicone, son utilisation a montré des résultats prometteurs avec une couverture étanche du défaut. Cependant, des études de suivi à long terme ont révélé qu'environ 28 % des patients ayant reçu un traitement prénatal, par la pose d'un patch en PTFE, nécessitaient une reprise de la fermeture du défaut en postnatal ou une dérivation ventriculo-péritonéale [44]. L'inconvénient majeur est également lié à sa nature non-biodégradable, nécessitant le retrait ultérieur du patch.

3.2.3. Les hydrogels thermosensibles à mémoire de forme :

Les hydrogels thermosensibles sont des réseaux de polymères qui ont comme caractéristique de passer d'un état liquide à un état de gel en réponse à des changements de température [39]. Leur utilisation pour la réparation de la MMC a été introduite pour la première fois par Bardill *et al.* qui ont développé un hydrogel

injectable à base de poly(sérinol hexaméthylène) d'urée et de poly(N-isopropylacrylamide) (PHSU-PNIPAAm). Cet hydrogel se présente comme un liquide à température ambiante qui forme rapidement un échafaudage solide et stable dans des conditions physiologiques (à 37°C) [45]. Ainsi, le matériau peut être injecté sur le défaut à l'aide d'une aiguille de faible calibre, ce qui permettra de réduire considérablement la durée de l'intervention et les risques liés à son caractère invasif [39]. Cependant, l'application directe du gel sur le défaut peut entraîner son accolement à la moelle épinière.

3.2.4. Les polyesters :

Le retrait des patches synthétiques peut engendrer des complications secondaires ainsi qu'une charge émotionnelle et financière pour les patients. C'est pourquoi, le recours à des matériaux biodégradables constitue la solution idéale pour éviter d'autres interventions après la pose du patch. Pour relever ce défi, les chercheurs se sont tournés vers les polyesters, tels que l'acide polylactique (PLA) et la polycaprolactone (PCL).

Les travaux de Saadai *et al.* ont montré que la fermeture du défaut avec des nanofibres alignées de PLA est techniquement faisable sans signe de réaction inflammatoire ou de fibrose [46]. Cependant, cette étude n'a rapporté aucun effet sur la réduction de la malformation de Chiari.

La facilité de mise en œuvre des polyesters, leur confère des propriétés très variées qui peuvent être adaptées à l'application. Par exemple, les travaux de Tatu *et al.* ont montré que la modification du ratio PLA:PCL permettait d'adapter la température de transition vitreuse à une température proche à celle du corps, afin de bénéficier des propriétés de mémoire de forme. Cette propriété devrait permettre de réduire la durée de l'intervention, car le patch peut être enroulé pour son insertion dans le trocart puis retrouver sa forme initiale une fois implanté [47].

3.3. L'ingénierie tissulaire :

Durant la dernière décennie, l'ingénierie tissulaire est apparue comme une solution innovante pour le traitement de la MMC. Celle-ci a pour objectif de créer une barrière

physique protégeant la moelle épinière de l'environnement intra-utérin, mais aussi de tenter de régénérer le tissu médullaire pour améliorer davantage les fonctions neurologiques. Cette approche consiste à intégrer des cellules et/ou des facteurs de croissance dans un échafaudage composé d'un matériau biodégradable (scaffold). La plupart des stratégies utilisent des cellules souches, notamment des cellules souches de la crête neurale et des cellules souches mésenchymateuses dérivées du placenta ou de la moelle osseuse. Ces cellules ont étéensemencées sur différents types d'échafaudage, fabriqués à partir de matériaux naturels tels que des hydrogels de collagène, de gélatine ou de chitosane, ou des matériaux synthétiques tels que la polycaprolactone et le polypropylène glycol (PG) [39]. Par exemple, la libération du facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), à partir d'un échafaudage en gélatine, a permis d'améliorer la vascularisation dans un modèle de MMC induite chez le rat, cet échafaudage a permis également d'inhiber les lésions du tissu médullaire et d'inverser la hernie cérébrale postérieure chez la brebis [48, 49].

Wang *et al.* ont montré que l'ajout des cellules stromales mésenchymateuses dérivées du placenta sur un hydrogel de collagène, a permis d'améliorer la fonction motrice et la quantité de neurones par rapport à l'échafaudage seul [50]. En plus, ces cellules ont permis également l'amélioration de la viabilité fœtale et de la fonction motrice lorsqu'elles étaient intégrées à une matrice extracellulaire d'origine porcine [51].

Les cellules souches osseuses et neurales ont également montré des résultats prometteurs. En effet, en utilisant un échafaudage de gélatine porcine et de chitosane, l'ajout de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse a été associée à la régénération des neurones et à la diminution de la taille du défaut, dans un modèle de MMC induite par l'acide rétinoïque chez le rat [52]. De plus, les travaux de Saadai *et al.* ont démontré que l'utilisation des cellules souches de la crête neurale, sur un patch nanofibreux en PCL/PG, a permis une transplantation réussie des cellules au niveau de la moelle épinière [53].

Enfin, l'utilisation des patches, comme vecteur d'agents bioactifs, semble être une approche très intéressante dans la réparation de la MMC. Cependant, plusieurs aspects peuvent être discutés notamment la nécessité d'essais cliniques comparatifs

Chapitre I : Étude bibliographique

aux techniques existantes, ainsi que la réévaluation des coûts associés à l'ingénierie tissulaire, qui restent relativement élevés.

4. Conclusion :

Bien que les stratégies citées précédemment semblent prometteuses dans le traitement de la MMC, aucun des patches développés jusqu'à présent n'est considéré comme parfait pour cette application. Ainsi, notre objectif sera d'élaborer un patch imperméable et biodégradable conçu pour une réparation par fœtoscopie. Pour ce faire, nous pensons que ce patch doit présenter deux faces différentes : une externe poreuse, propice à la prolifération cellulaire, élaborée par électrofilage, une technique qui permet d'obtenir un réseau de fibres capables de reproduire les caractéristiques morphologiques de la matrice extracellulaire ; et une face interne antiadhésive pour éviter son accolement à la moelle épinière. La polycaprolactone a été choisie pour relever ce défi, en raison de ses propriétés physico-chimiques très intéressantes et sa biocompatibilité. Dans la partie suivante, le choix du matériau et de la technique d'élaboration sera justifié par une présentation de la PCL, de ses propriétés et de sa mise en forme par électrofilage.

Partie 2 :

1. Généralités sur la polycaprolactone :

La polycaprolactone est un polyester biodégradable, thermoplastique et semi-cristallin avec une température de transition vitreuse (Tg) de -60°C et une température de fusion (Tf) basse allant de 59° à 64°C (tableau 1). La PCL est l'un des polymères synthétiques les plus faciles à mettre en forme et à manipuler, en raison de sa faible température de fusion et de ses propriétés viscoélastiques [54, 55].

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la polycaprolactone.

Propriétés	Valeurs et descriptions	Références
Masse molaire en nombre (g/mol)	3000 à 80 000	[56]
Densité (g/cm)	1,11	[57, 58]
Température de transition vitreuse (Tg) (°C)	-60	[54, 55]
Température de fusion (Tf) (°C)	59 à 64	[54, 55]
Groupes caractéristiques par FTIR	-CH ₂ (2943 cm ⁻¹), -CH ₂ (2866 cm ⁻¹), C=O (1722 cm ⁻¹), C-O et C-C (1293 cm ⁻¹), C-O-C (1239 cm ⁻¹)	[56]
Cristallinité (%)	67	[57, 59]
Solubilité	<ul style="list-style-type: none"> - Très soluble : Chloroforme, dichlorométhane, tétrachlorométhane, toluène, cyclohexanone, 2-nitropropane ; cyclohexanone, pyridine, dichlorobenzène, toluène. - Partiellement soluble : acétone, 2-butanone, acétate d'éthyle, diméthylformamide, dichloroéthane, acétophénone. - Insoluble : eau, éthanol, diméthylsulfoxyde, éther de pétrole, éther diéthylique, acétonitrile, nitrométhane. 	[56, 57]
Résistance à la traction (MPa)	25-43	[60]
Module d'élasticité (MPa)	330-360	[60]

Deux principales méthodes sont utilisées pour synthétiser la polycaprolactone : la polycondensation de l'acide 6-hydroxyhexanoïque et la polymérisation par ouverture du cycle de la ϵ -caprolactone (ϵ CL) (ROP : Ring Opening Polymerization) (Figure 9). Cette dernière est souvent privilégiée car elle permet d'obtenir des polymères avec une masse molaire élevée et une faible polydispersité. Cette approche implique quatre mécanismes distincts selon le catalyseur utilisé : anionique, cationique, activé par monomère et coordination-insertion [61, 62].

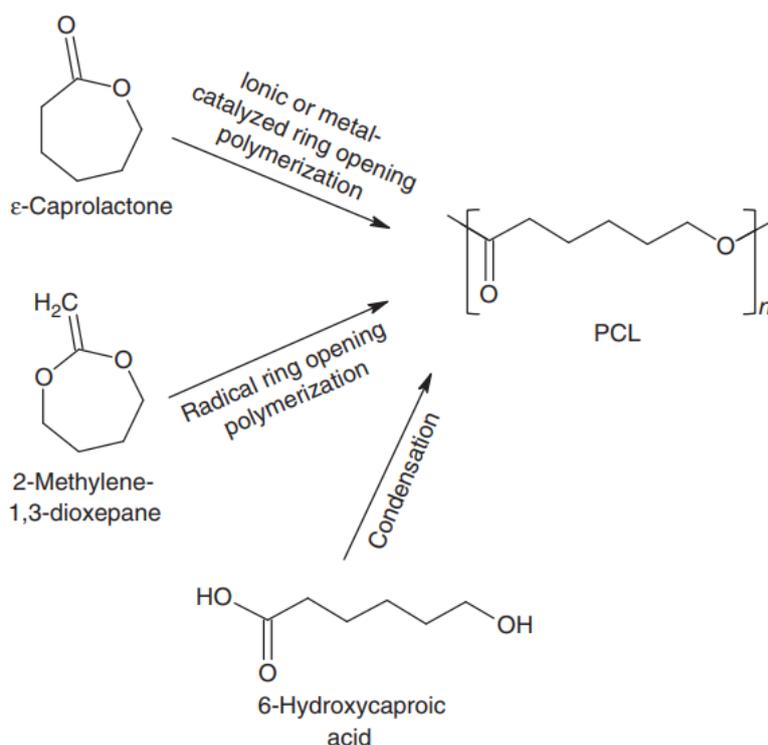


Figure 9 : Les voies de synthèse de la PCL : par ROP et par condensation de l'acide 6-hydroxyhexanoïque [62]

Chapitre I : Étude bibliographique

En fonction de la masse molaire, du taux de cristallinité et des conditions de dégradation, la PCL se dégrade en plusieurs mois, voire plusieurs années. Cette dégradation peut se produire selon deux voies principales : la voie hydrolytique et la voie enzymatique [62].

La dégradation hydrolytique commence par la diffusion de l'eau, suivie d'une scission hydrolytique des liaisons ester dans la phase amorphe, puis dans les domaines cristallins. Elle est auto-catalysée par les acides carboxyliques formés par l'hydrolyse, mais peut également être catalysée par des enzymes.

Bien que la dégradation hydrolytique reste dominante, une grande variété d'enzymes, à savoir les estérases et les lipases, peuvent également participer à la dégradation de la PCL. En général, l'hydrolyse enzymatique se déroule selon un mécanisme en quatre étapes à savoir : l'adsorption de l'enzyme à la surface du polymère ; la formation d'un complexe de transition entre le polymère et l'enzyme ; la scission spécifique de la chaîne du polymère et l'interaction supplémentaire entre le complexe polymère-enzyme adsorbé et d'autres parties du polymère.

La biodégradation de la PCL s'effectue en surface ou en masse. Ces deux mécanismes se produisent souvent simultanément notamment sur les membranes électrofilées. L'érosion de surface se produit lorsque la vitesse d'érosion dépasse la vitesse de diffusion de l'eau dans la masse du polymère et inversement pour la dégradation en masse. Ainsi, des taux de dégradation plus élevés sont observés lorsque la surface de la PCL est rendue hydrophile par modification de surface [54, 62].

Enfin, les produits de dégradation sont soit métabolisés *via* le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs), ou éliminés directement par voie rénale (Figure 10) [54].

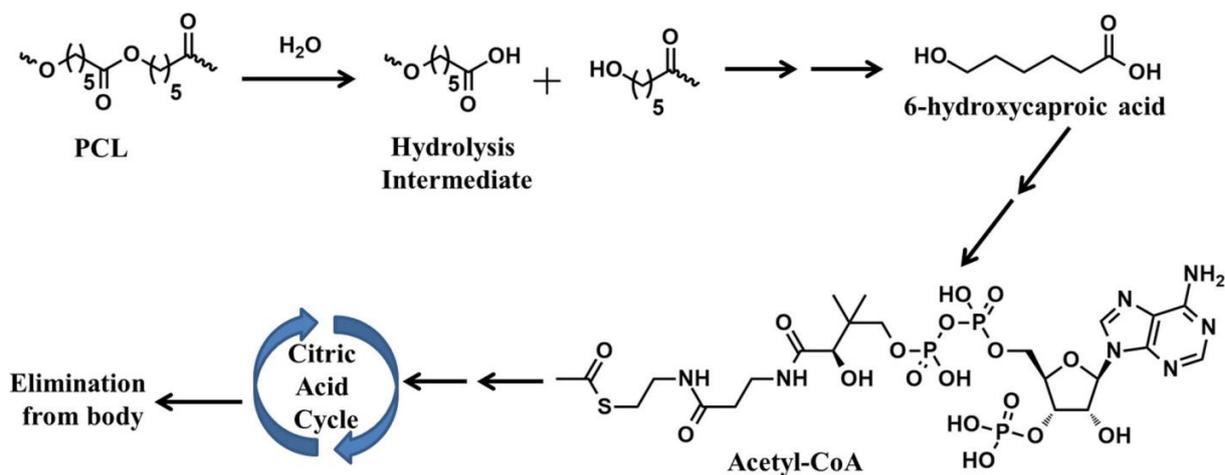


Figure 10 : Schéma de la voie de dégradation de la PCL et de son élimination de l'organisme par le cycle de l'acide citrique [54].

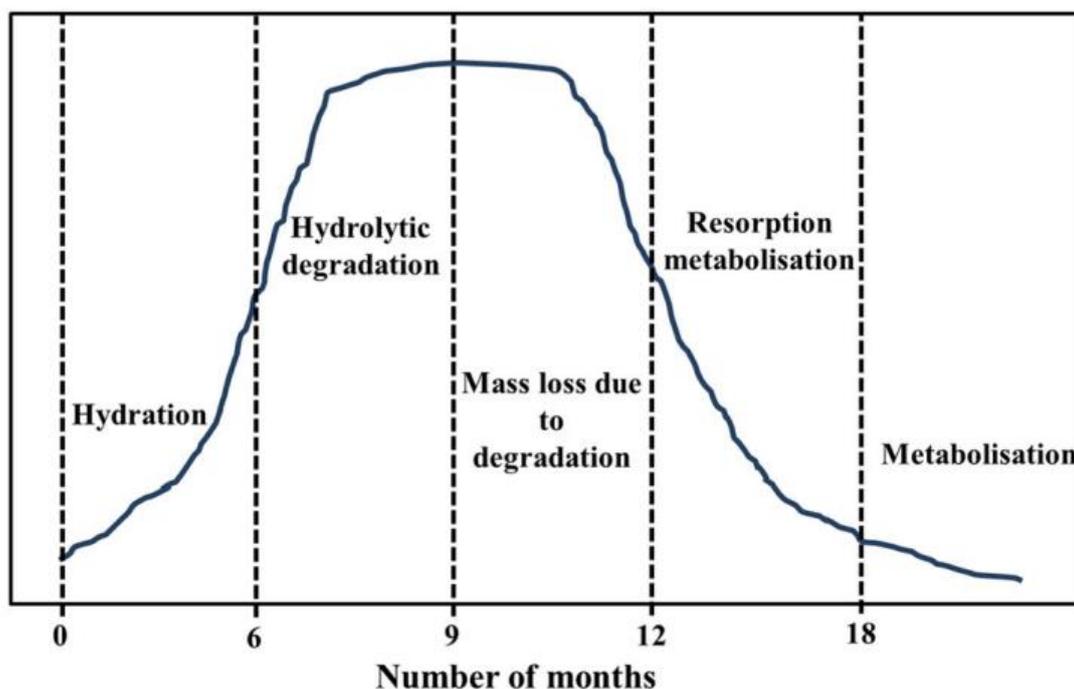


Figure 11 : Représentation graphique de la dégradation complète de la PCL en fonction du temps [54].

Les propriétés mécaniques de la PCL dépendent de la méthode de fabrication, de la morphologie et de la porosité. Par exemple, en raison de la présence de pores dans la structure, les membranes électrofilées de PCL ont une résistance à la traction et un module d'élasticité inférieurs à ceux de la PCL non poreuse, dont la résistance à la traction est d'environ 25-43 MPa et le module d'élasticité d'environ 330-360 MPa [60].

2. Mise en forme de la polycaprolactone par électrofilage :

L'électrofilage, ou electrospinning, est une technique de mise en forme permettant de produire des fibres dont le diamètre varie de quelques nanomètres à quelques micromètres [56]. Cette méthode est très utilisée pour la fabrication des échafaudages et des patches, car elle permet de reproduire la morphologie et les caractéristiques de la matrice extracellulaire.

Le dispositif d'électrofilage comprend (Figure 12) : un pousse seringue, une aiguille métallique, une alimentation électrique à haute tension, un collecteur conducteur fixe ou rotatif.

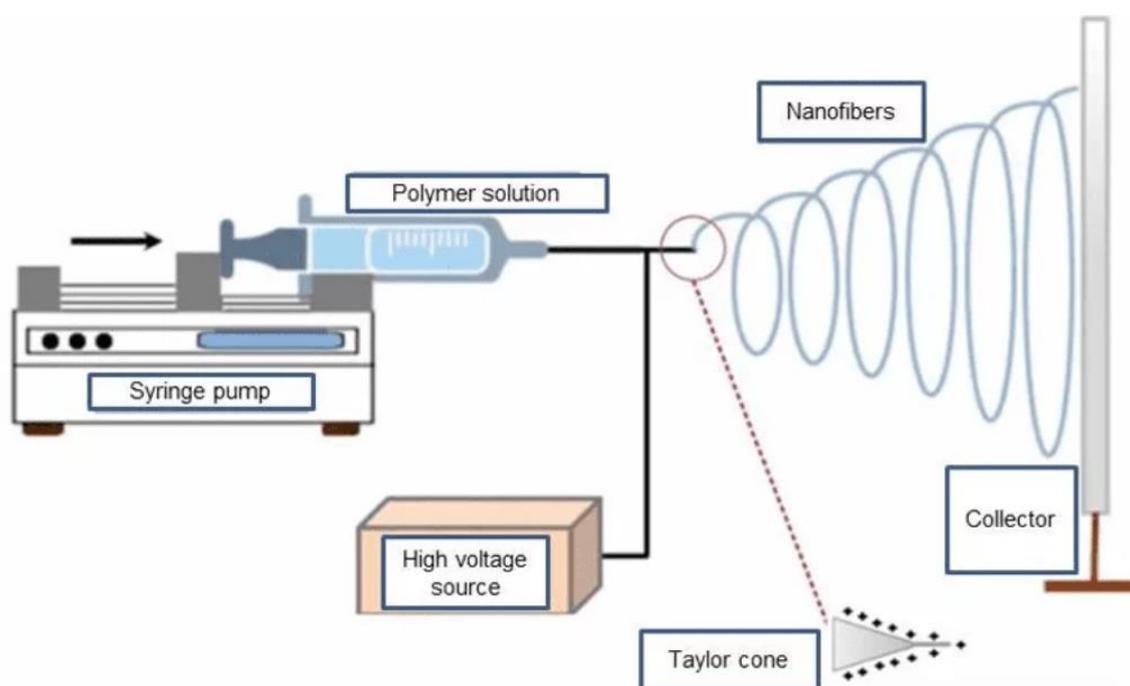


Figure 12 : Schéma du dispositif d'électrofilage avec le cône de Taylor. [63]

Par exemple, pour élaborer une membrane électrofilée, une solution de polymère (ou un polymère fondu) est injectée à travers une aiguille reliée à une source de haute tension. En appliquant des tensions élevées, la tension superficielle de la gouttelette est surmontée, provoquant ainsi l'étirement de la gouttelette (cône de Taylor) et la formation d'un jet (Figure 13) [64]. Lorsque le jet se déplace dans l'air, le solvant s'évapore, laissant derrière lui une fibre de polymère chargée qui se dépose de manière aléatoire sur le collecteur. Des fibres continues sont ainsi déposées pour former une membrane non tissée. L'électrofilage entraîne généralement un jet unique et continu [65]. Cependant, la ramification du jet en plusieurs petits jets a également été observée dans certaines conditions et pour certains types de polymère, y compris La PCL. En effet, Yarin *et al.* ont montré qu'il existe des branches de jet secondaires et tertiaires pendant l'électrofilage de la PCL, solubilisée dans l'acétone. Dans ce contexte, la taille finale des fibres est déterminée principalement par le nombre de jets secondaires formés [66].

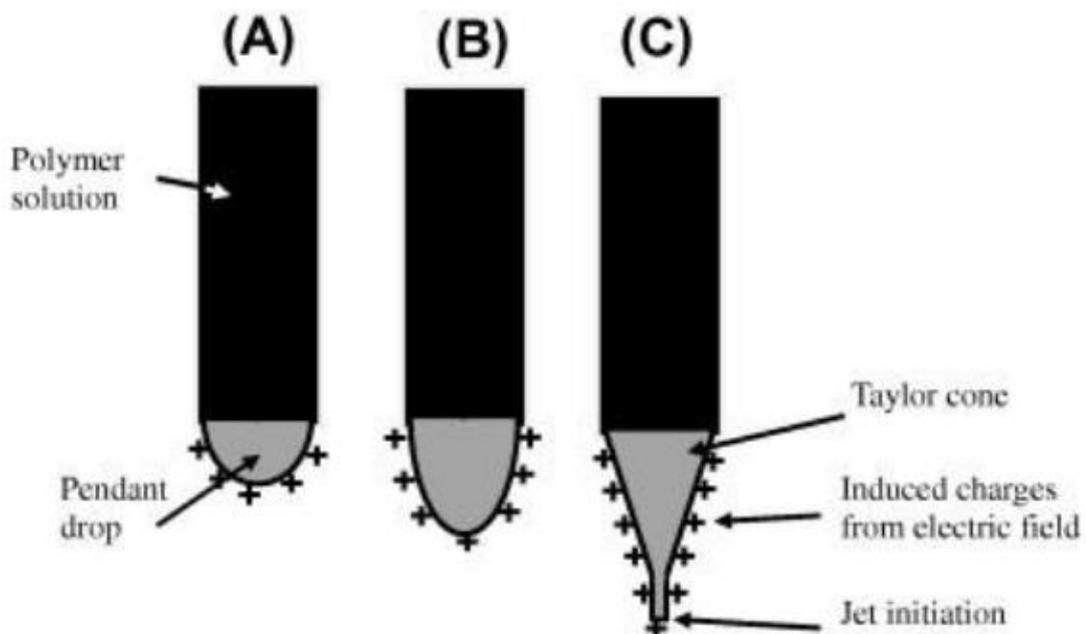


Figure 13: Représentation schématique de la formation du cône de Taylor : (A) induction de charges de surface dans la solution de polymère sous l'effet du champ électrique ; (B) allongement de la goutte pendante ; (C) déformation de la goutte pendante en forme de cône de Taylor et formation du jet [67] .

Chapitre I : Étude bibliographique

La morphologie et le diamètre des fibres dépendent de plusieurs paramètres [64] (tableau 2), qui sont généralement classés en trois catégories :

- Paramètres de la solution tels que la viscosité, la concentration du polymère, la conductivité électrique et la tension superficielle de la solution.
- Paramètres liés au procédé tels que la tension appliquée, le débit, la distance entre l'aiguille et le collecteur, le type de collecteur.
- Paramètres ambiants tels que la température et l'humidité.

Tableau 2 : Quelques exemples des effets des paramètres d'électrofilage sur le diamètre des fibres [56].

Paramètres	Effets
Tension appliquée	↓ - augmentation du diamètre des fibres, ↑ - diminution du diamètre des fibres
Débit	↓ - diminution du diamètre des fibres, ↑ - augmentation du diamètre des fibres
Distance aiguille -collecteur	↓ - diminution du diamètre des fibres, ↑ - augmentation du diamètre des fibres
Diamètre de l'aiguille	↑ - augmentation du diamètre des fibres
Viscosité de la solution	↓ - formation de perles, ↑ - augmentation du diamètre des fibres.
Conductivité de la solution	↑ - fibres uniformes sans perles, diminution du diamètre des fibres.
Humidité et température	↑ température - ↓ viscosité, ↑ humidité - apparition de pores circulaires sur les fibres.

2.1. Paramètres de la solution :

Les paramètres de la solution ont une influence sur le diamètre des fibres et la formation de perles. Par exemple, l'étude de Lee *et al.* a montré qu'une conductivité élevée permet un étirage plus important des fibres et par conséquent, une diminution de leur diamètre. Ceci a été démontré par l'ajout du diméthylformamide (DMF) à une solution de PCL et de dichlorométhane (DCM). Les résultats ont montré que l'ajout d'un solvant ayant une constante diélectrique plus élevée que celle du DCM a permis de stabiliser le jet et de créer des fibres plus fines et sans défauts [68].

La viscosité de la solution affecte également le diamètre des fibres [64]. Par exemple, une faible viscosité entraîne la formation de perles sur les fibres tandis qu'une viscosité élevée se traduit généralement par un diamètre de fibre plus important. Celle-ci est proportionnelle à la concentration du polymère. Par conséquent, une concentration élevée se traduira par une augmentation du diamètre des fibres [69].

2.2. Paramètres liés au procédé d'électrofilage :

La tension appliquée durant l'électrofilage est parmi les facteurs les plus importants. En général, une tension électrique élevée éjecte une grande quantité de solution de polymère, ce qui se traduit par un diamètre de fibre plus important [70]. Cependant, certaines études ont montré que le diamètre n'était pas influencé par la tension appliquée ou qu'il diminuait avec l'augmentation de la tension [71, 72]. En effet, une tension élevée augmente la force de répulsion électrostatique sur le jet, ce qui favorise la ramification et donc la formation de fibres plus fines [66].

Le débit d'alimentation de la solution peut également affecter la morphologie des fibres électrofilées. Une vitesse d'alimentation élevée conduit à une augmentation du diamètre des fibres [73]. Cependant, certaines études ont montré que le débit affecte la formation de perles plutôt que le diamètre des fibres [74]. Lorsque le débit dépasse une valeur critique, le taux d'afflux de la solution vers la pointe de l'aiguille dépasse la vitesse de l'étirement des fibres, ce qui conduit à la formation de perles.

La distance entre l'aiguille et le collecteur permet aussi de contrôler la taille des fibres. En effet, une grande distance va permettre d'augmenter le temps d'évaporation du solvant et de réduire la taille des fibres. En revanche, au-delà d'un certain seuil, le diamètre de la fibre peut à nouveau augmenter en raison de l'atténuation du champ électrique [75, 76].

2.3. Paramètres ambiants :

Les paramètres ambiants tels que la température et l'humidité jouent un rôle direct dans la détermination de la morphologie des fibres et de leur taille, ou indirect en influençant les autres paramètres d'électrofilage. Par exemple, une température élevée a un effet sur la viscosité et sur la vitesse d'évaporation du solvant qui à leur tour affectent la taille des fibres.

Par ailleurs, un taux d'humidité élevé peut provoquer l'apparition de pores à la surface des fibres par séparation de phase. De plus, l'eau créée par condensation peut se mélanger au solvant, dans le cas d'un polymère hydrophile, ce qui peut ralentir la formation des fibres et augmenter leur diamètre [74, 76].

3. Techniques de modification de surface de la polycaprolactone :

Pour surmonter les limitations de la PCL, plusieurs techniques de modification de surface sont proposées dont l'objectif principal est d'améliorer les propriétés biologiques de la PCL, en réduisant l'hydrophobie de la surface.

3.1. Traitement par plasma :

Le traitement par plasma permet d'introduire de nouveaux groupes fonctionnels à la surface du matériau, sans modifier ses propriétés intrinsèques. Ces groupes fonctionnels dépendent du type du gaz utilisé dans cette technique, à savoir : l'air, l'O₂, le N₂, l'Ar, l'He ou le NH₃ [77].

Plusieurs études ont comparé l'effet des traitements par plasma sur les propriétés biologiques des membranes de PCL, Les résultats ont montré que de traitement permettait d'améliorer la mouillabilité de surface, et par conséquent, d'observer une meilleure prolifération cellulaire sur les membranes traitées. Le tableau 3 résume les différentes études réalisées sur les traitements par plasma des membranes de PCL.

Tableau 3 : Études sur les traitements par plasma des membranes de PCL.

Traitement par Plasma	Observations	Références
Plasma atmosphérique (air)	<ul style="list-style-type: none"> - Création de groupes carboxyles pour le greffage covalent de la gélatine sur la surface. - Meilleure réponse cellulaire sur les membranes greffées par rapport aux membranes non greffées. 	Safaeijavan <i>et al.</i> [78]
Plasma froid d'hélium et d'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> - Création de groupes fonctionnels CH à la surface des fibres traitées par plasma froid d'hélium et diminution de l'angle de contact jusqu'à 20°. - Une meilleure prolifération fibroblastique sur ces membranes par rapport aux non traitées et à celles traitées par plasma d'oxygène dont l'angle de contact était de 0°. 	Atyabi <i>et al.</i> [79]
Plasma radiofréquence à basse pression (Ar et O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> - Greffage de l'acide acrylique. - Les membranes présentaient une meilleure mouillabilité de surface et une teneur en oxygène plus élevée par rapport aux membranes non traités, - Amélioration de la réponse biologique au contact de ces membranes. 	Ko <i>et al.</i> [80]
Plasma atmosphérique et par décharge à barrière diélectrique (DBD)	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement de la solution de PCL avant électrofilage par plasma atmosphérique. - Absence de perles sur les fibres traitées. 	Asadian <i>et al.</i> [81]

	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'angle de contact sur les membranes traitées par DBD. - Étalement plus important des cellules sur les surfaces doublement traitées par rapport aux surfaces non traitées et traitées par plasma atmosphérique seul et par DBD seul. 	
Plasma d'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement par plasma d'oxygène de PCL recouverte de polypyrrole (PPy). - Absence de cytotoxicité et meilleure adhésion et prolifération cellulaire par rapport aux surfaces non traitées. 	Shafei <i>et al.</i> [82]
Plasma radiofréquence à basse pression (NH ₃ et O ₂)	<ul style="list-style-type: none"> - Création de groupes fonctionnels contenant de l'azote et de l'oxygène à la surface des membranes. - Amélioration de la réponse biologique au contact des membranes traitées. 	Yan <i>et al.</i> [83]

3.2. Mélanges et copolymères à base de PCL :

La compatibilité de la PCL avec de nombreux polymères permet d'améliorer ses propriétés biologiques grâce aux avantages apportés par les autres matériaux, le plus souvent d'origine naturelle. Par exemple, un mélange PCL/gélatine permet d'améliorer la réponse biologique grâce à la présence de la gélatine, tout en gardant les propriétés mécaniques intéressantes de la PCL. Ces techniques de mélange et de copolymérisation permettent de surmonter les limites de la PCL et du matériau ajouté [77, 84].

Plusieurs auteurs se sont intéressés à étudier l'effet de l'ajout de polymères ou de molécules naturels sur la réponse biologique des membranes en PCL. Par exemple, les travaux d'Adeli-sardou *et al.* ont permis d'évaluer le rôle des nanofibres électrofilées contenant de la lawsone (une naphthoquinone naturelle) dans la régénération de la peau. Ces membranes ont permis une augmentation de l'adhésion et de la prolifération des cellules, ainsi qu'une libération prolongée de la lawsone sur

Chapitre I : Étude bibliographique

une période de 20 jours. Ils ont montré également, par des essais *in vivo*, que ces membranes ont amélioré la cicatrisation en augmentant la vitesse de réépithélialisation de la plaie [85].

Par ailleurs, l'étude de Hagvall *et al.* a permis de déterminer les caractéristiques des membranes hybrides composées de PCL et de protéines naturelles, dont le collagène, l'élastine et la gélatine. Les membranes de PCL/gélatine ont montré une plus grande résistance à la traction que les structures en PCL/collagène/élastine. Les deux membranes ont permis également une adhésion cellulaire à leur surface. Cependant, la migration cellulaire n'a été observée que sur les membranes de PCL/gélatine [86].

D'autres études se sont intéressées également à l'électrofilage de copolymères de PCL, telles que l'étude de Valizadeh *et al.* qui a évalué la réponse biologique au contact d'un copolymère PCL/polyéthylène glycol (PEG) électrofilé. L'ajout du PEG a permis d'améliorer l'hydrophilie et de diminuer l'immunogénicité des membranes [87].

3.3. Traitement chimique :

Le traitement chimique le plus courant est l'utilisation d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH). Des études ont montré que le traitement par NaOH entraîne des modifications chimiques et morphologiques à la surface des fibres électrofilées. En effet, cette approche génère des groupes hydroxyles à la surface et une modification de la chaîne latérale par la création de groupes carboxylates ($-\text{COO}^-$), ce qui permet de diminuer l'hydrophobie de la PCL en raison de leur polarité [88]. En revanche, ce traitement entraîne des érosions à la surface des fibres qui apparaissent comme des petites piqures (Figure 14) [89]. Cette approche a également été utilisée par Oyane *et al.* comme étape intermédiaire pour produire des nanofibres de PCL recouvertes d'apatite, afin de stimuler la différenciation des ostéoblastes [90].

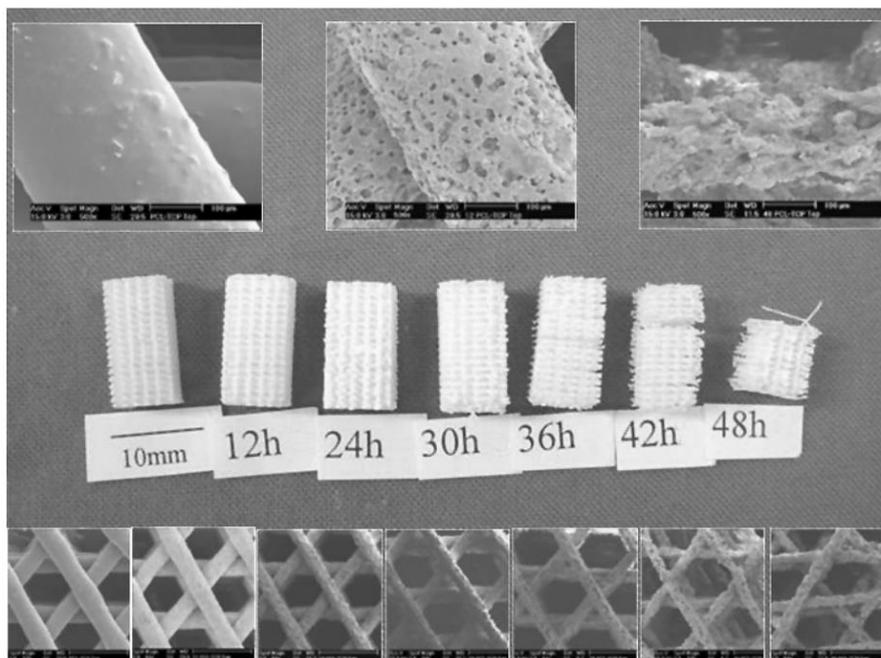


Figure 14 : Vues microscopiques et macroscopiques des échafaudages de PCL dégradés par NaOH de 0 à 48 h : des érosions de surface apparaissent à partir de 12h (Image MEB en haut et au milieu) [89].

3.4. Revêtement de surface à base de protéines :

L'adsorption de protéines est une étape importante qui conditionne les interactions entre les cellules et le matériau [91]. Plusieurs auteurs se sont tournés vers l'utilisation de protéines à la surface des biomatériaux afin d'améliorer la réponse biologique. Ces revêtements peuvent être réalisés par adsorption physique ou par immobilisation de la protéine grâce à un greffage covalent. Parmi les protéines les plus utilisées, on retrouve la laminine, la gélatine, le collagène, la vitronectine et la fibronectine [92]. Ces protéines interagissent avec les cellules en fournissant des signaux et des ligands d'adhésion pour interagir avec le matériau. Par exemple, la laminine a été adsorbée sur la surface des fibres de PCL pour favoriser l'excroissance des neurites [93]. En revanche, il est indispensable d'établir des liaisons chimiques, telles que des liaisons amides, afin d'immobiliser des protéines à la surface d'un matériau, comme des facteurs de croissance ou des peptides (par exemple le peptide RGD de la fibronectine). L'étude de Ma *et al.* a montré que le greffage de la gélatine sur des fibres en PCL pouvait être réalisé sur une surface préalablement traitée par plasma, afin de créer des groupes COOH à leur surface. Ce greffage a permis d'améliorer l'étalement et la prolifération des cellules endothéliales et de contrôler leur orientation [94].

Le greffage de polymères hydrophiles à la surface des biomatériaux peut également être envisagé pour immobiliser des protéines, car il permet de fournir à la fois une hydrophilie et des fonctionnalités réactives pour conjuguer le peptide ou la protéine d'intérêt [88].

3.5. Greffage de polymères bioactifs :

Le greffage est une technique de modification de surface qui permet l'introduction de molécules ou de polymères à la surface grâce à des liaisons chimiques covalentes. Il existe principalement deux méthodes de greffage, à savoir : une méthode directe à partir de la surface activée, appelée « Grafting from », et une méthode indirecte à partir d'une molécule ancre fixée préalablement à la surface, appelée « Grafting to ». Comme pour les méthodes citées précédemment, l'objectif du greffage est d'immobiliser une molécule ou un polymère bioactif pour améliorer la biocompatibilité de la PCL tout en préservant ses propriétés intrinsèques. De plus, cette technique assure la stabilité à long terme des polymères greffés grâce à ses liaisons covalentes.

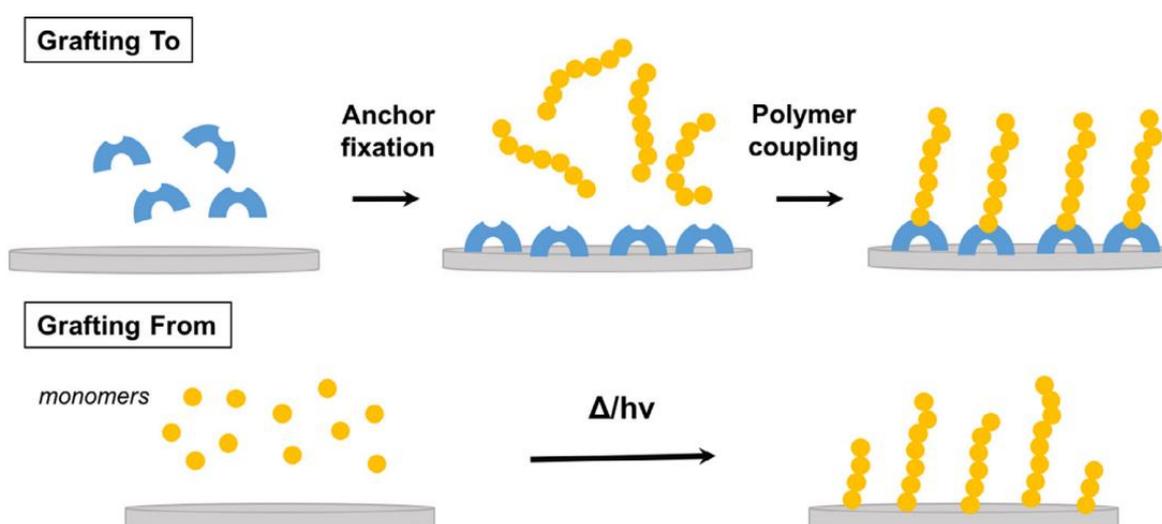


Figure 15 : Techniques de greffage covalent : « Grafting to » et « Grafting from » [95].

Zhu *et al.* ont étudié l'effet du greffage du poly(acide méthacrylique) (PMAA) sur l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales. Ce greffage a été réalisé sous irradiations UV avec une immobilisation de la gélatine grâce à un agent de condensation, qui permet d'accélérer la réaction entre les COOH du PMAA et les NH₂ de la gélatine. La présence du PMAA et de la gélatine à la surface des membranes de PCL a permis d'améliorer son hydrophilie, et par conséquent, de favoriser la prolifération cellulaire par rapport aux surfaces non greffées [96].

Des études antérieures de l'équipe BEST ont montré que le greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium (polyNaSS) sur des membranes de PCL pouvait favoriser l'adhésion et la prolifération des fibroblastes [97]. La fonction anionique du polyNaSS lui permet d'interagir avec les protéines extracellulaires impliquées dans le mécanisme d'adhésion cellulaire, telles que la fibronectine. Le greffage a été optimisé en utilisant la technique du "Grafting from".

De Plus, des essais *in vitro* et *in vivo*, réalisés par Maurice *et al.*, ont montré que le greffage du polyNaSS sur des surfaces en PCL permettait également de favoriser la différenciation et la prolifération des pré-ostéoblastes, et une meilleure ostéointégration par rapport aux surfaces non greffées [98].

Les travaux de Gross *et al.* ont montré aussi que la libération du gène SOX9 et du facteur de croissance TGF- β , à travers des vecteurs adéno-associé recombinant, est meilleure sur des surfaces de PCL greffées par du polyNaSS. Ces surfaces permettaient la différenciation des chondrocytes à partir de cellules de la moelle osseuse [99].

Enfin, l'utilisation du polyNaSS a montré également des effets antibactériens lorsqu'il a été greffé sur des surfaces en titane [100]. En effet, la présence du polyNaSS a

permis une modification de la conformation des protéines plasmatiques et matricielles empêchant ainsi la reconnaissance des sites d'adhésion par les bactéries.

4. Applications des membranes de PCL électrofilées pour la régénération tissulaire :

4.1. Ingénierie tissulaire cardiaque :

Après un infarctus du myocarde, la régénération du tissu cardiaque endommagé est indispensable pour rétablir les fonctions cardiaques. Plusieurs études se sont intéressées à l'élaboration d'un patch de régénération tissulaire, pour rétablir la structure et le fonctionnement des tissus lésés. Ces patches sont généralement élaborés par électrofilage car la structure fibreuse, avec des dimensions de pores variables, favorise la migration et la prolifération cellulaire, la vascularisation ainsi que l'échange de nutriments et d'oxygène [77,101].

Aghdam *et al.* se sont intéressés à l'étude de la différenciation et de la prolifération des cellules progénitrices cardiaques sur des membranes de PCL. Ils ont évalué l'adhérence et la prolifération cellulaire sur des patches électrofilés en PCL et acide polyglycolique (PGA). Les résultats ont montré que l'hydrophilie, la porosité et les propriétés mécaniques des membranes PCL/PGA ont été améliorées par rapport à la PCL seule. Cependant, ils ont observé qu'au-delà de 50 % de teneur en PGA, la prolifération des cellules progénitrices cardiaques diminuait [102].

Les propriétés électriques des patches sont également importantes pour la régénération du tissu cardiaque. Elles peuvent être améliorées par l'ajout de nanomatériaux comme le graphène et l'oxyde de graphène réduit. Par exemple, Hitscherich *et al.* ont étudié l'effet de l'incorporation du graphène sur la prolifération des cellules cardiaques. La stimulation électrique offerte par les nanoparticules de graphène a permis d'améliorer la conductivité des membranes de PCL et de favoriser l'adhésion des cardiomyocytes, avec une contraction spontanée des cellules [103].

4.2. Ingénierie tissulaire vasculaire :

Les substituts vasculaires synthétiques, développés par l'ingénierie tissulaire est une solution prometteuse lorsque les substituts autologues ne sont pas disponibles pour réaliser un pontage vasculaire. Les biomatériaux utilisés pour concevoir un greffon vasculaire doivent posséder des caractéristiques physiques et biomécaniques adaptés à l'application. Ainsi, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des membranes de PCL pour la régénération du tissu vasculaire en raison de sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés mécaniques intéressantes. Par exemple, les travaux de Bertram *et al.* ont montré que l'utilisation des membranes de PCL/collagène permettait la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales progénitrices [104].

De même, Fu *et al.* ont élaboré des échafaudages vasculaires électrostatiques à base de PCL/gélatine et de collagène/poly (acide lactique-co-caprolactone) (PLCL). Les résultats ont montré que les échafaudages collagène/PLCL forment des tissus relativement homogènes ressemblant à des vaisseaux, par rapport aux échafaudages gélatine/PCL (Figure 16). Les deux échafaudages présentent les propriétés mécaniques requises. D'autres auteurs ont également étudié l'ajout du collagène aux membranes de PCL pour modifier la mouillabilité de la surface et améliorer l'adhérence des cellules musculaires lisses de l'artère coronaire. Il a été observé que les échafaudages PCL/collagène étaient plus hydrophiles grâce à la présence du groupe amide à leur surface, ce qui permettait également de favoriser l'attachement et la prolifération des cellules [77, 105].

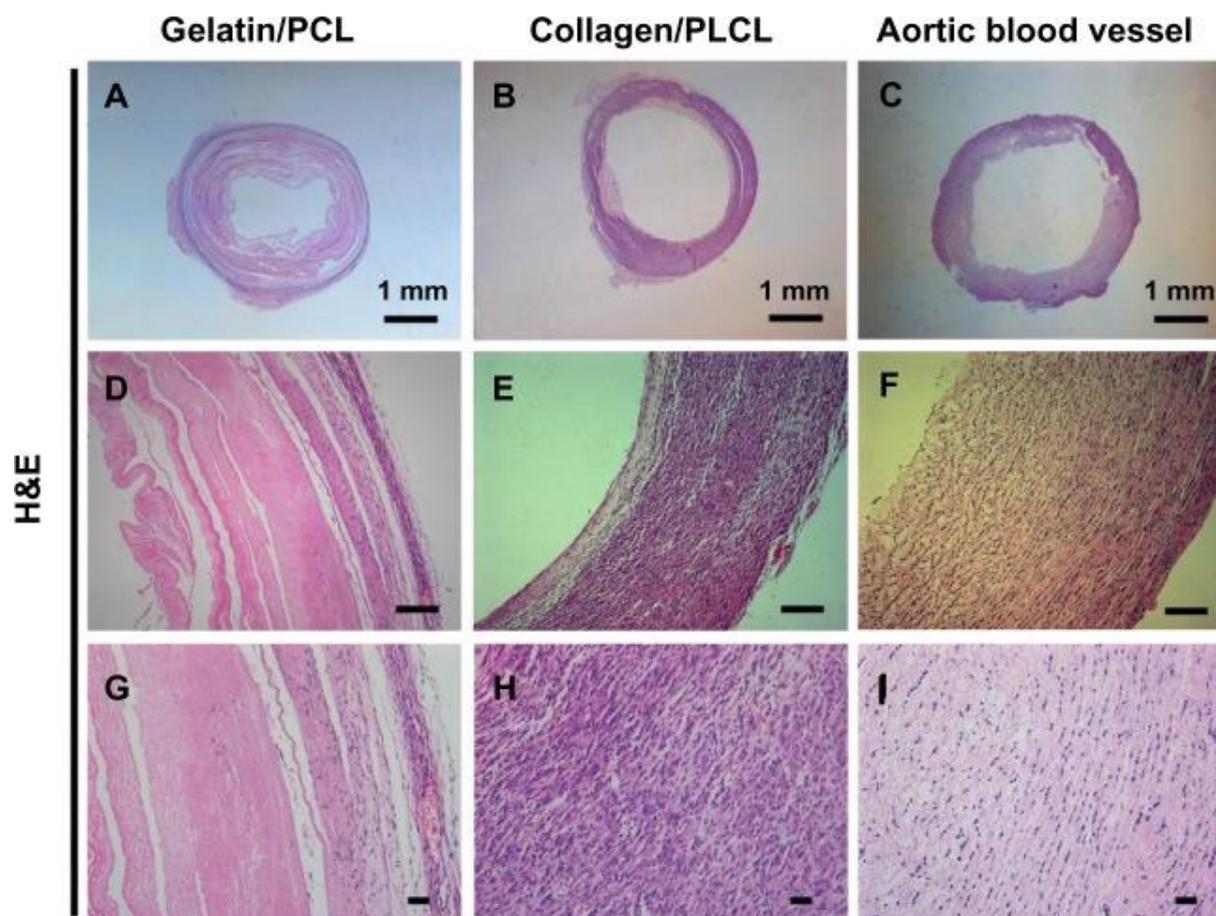


Figure 16 : Coupes histologiques des échafaudages PCL/gélatine et collagène/poly (acide lactique-co-caprolactone) (PLCL) avec une coloration à l'hématoxyline et éosine à 6 semaines *in vivo* : (A, D et G) la formation du tissu semble hétérogène avec des parties d'échafaudage non dégradées. (B, E et H) des structures tissulaires relativement homogènes ressemblant à des vaisseaux. (C, F et I) un vaisseau sanguin aortique d'origine porcine a été utilisé comme contrôle positif [105].

L'électrofilage coaxial permet d'électrofiler simultanément deux solutions de polymères à l'aide d'une seule filière. Les fibres ainsi élaborées présentent une morphologie cœur/coquille, ce qui permet de combiner les propriétés des deux polymères. De nombreuses études se sont intéressées à la fabrication de greffons vasculaires structurés en cœur/coquille à base de PCL. Par exemple, Duan *et al.* ont évalué des fibres cœur/coquille à base de PCL et de collagène pour la régénération du tissu vasculaire. Il a été observé que ces échafaudages permettaient une meilleure adhésion cellulaire avec de meilleures propriétés mécaniques que le collagène seul [106].

4.3. Ingénierie du tissu osseux :

La régénération osseuse par ingénierie tissulaire est une méthode prometteuse pour combler les défauts osseux et rétablir le bon fonctionnement des articulations. La PCL est un biomatériau à dégradation lente, qui peut assurer une résistance mécanique adéquate jusqu'à la régénération osseuse. Il existe plusieurs études sur la synthèse et l'évaluation de mélanges et de nano-composites à base de PCL pour fabriquer des greffons osseux. Par exemple, Chong *et al.* ont élaboré des échafaudages nanofibreux à base de PCL et de PCL/nano-hydroxyapatite (PCL/nHA). Les résultats ont montré que les échafaudages PCL/nHA sont plus hydrophiles, grâce aux groupes OH présents à leur surface, par l'ajout des nHA. En plus de l'hydrophilie, la surface spécifique élevée et la porosité de ces membranes, ont également permis d'améliorer l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes [107].

En outre, la structure de l'échafaudage peut influencer le comportement de dégradation de la PCL. Pattanashetti *et al.* ont élaboré des échafaudages de PCL et d'un mélange d'alcool polyvinylique et d'alginate de sodium (PVA:NaAlg). Ils ont comparé des membranes monocouches de PCL, des membranes de PCL/PVA:NaAlg à double couche et de PCL/PVA:NaAlg/PCL à triple couche. Les études de biodégradation *in vitro* ont révélé que le taux de dégradation diminuait pour les membranes multicouches. De plus, les essais mécaniques ont permis d'observer de meilleures propriétés mécaniques pour des membranes à triple couche par rapport aux membranes de PCL. Ils observent également une amélioration de la prolifération des ostéoblastes sur les membranes multicouches [108].

4.4. Ingénierie du tissu cartilagineux :

L'ingénierie tissulaire constitue l'une des voies les plus prometteuses pour réparer le tissu cartilagineux, connu pour sa faible capacité de régénération. Cependant, Il est très difficile de concevoir un échafaudage parfait pour réparer le tissu cartilagineux. Récemment, un groupe de recherche a décrit l'effet de l'incorporation de molécules bioactives sur les propriétés biologiques des échafaudages. Ils ont étudié l'adéquation des échafaudages nanofibreux de PCL et de poly (sébacate de glycérol) (PGS),

chargés de kartogénine (KGN), pour la régénération du cartilage. L'étude de la réponse biologique a révélé que les échafaudages chargés de KGN présentaient une meilleure adhésion cellulaire et une meilleure prolifération que les échafaudages PGS/PCL et PCL seul [109].

Les stratégies de modification de surface ont également été utilisées dans l'ingénierie du tissu cartilagineux. Par exemple, Alemi *et al.* ont utilisé le plasma atmosphérique froid pour modifier les caractéristiques de surface des échafaudages électrofilés de PCL/chitosane et PCL/chitosane carboxyméthylrique (CCM), afin d'améliorer l'adhésion et la prolifération des cellules. Les échafaudages PCL/CCM traités au plasma d'hélium ont fourni une surface adéquate pour l'adhésion et la différenciation des cellules. Les cellules se sont répandues dans tout l'échafaudage PCL/CCM, ce qui a été attribué à l'amélioration de l'hydrophilie des échantillons traités au plasma par rapport aux échafaudages non traités [110].

4.5. Ingénierie des tissus nerveux :

Comme pour le cartilage, le tissu nerveux présente des capacités de régénération très limitées. Cette régénération constitue un véritable défi, car le système nerveux humain ne génère pas assez de nouveaux neurones et ne remplace pas les cellules mortes après une lésion ou une maladie neurodégénérative. Le recours à l'ingénierie tissulaire est donc indispensable pour tenter de réparer le tissu nerveux.

Plusieurs auteurs ont étudié les membranes électrofilées pour la régénération du tissu nerveux, en raison de leurs caractéristiques morphologiques idéales pour la prolifération des cellules nerveuses. Bolaina-Lorenzo *et al.* ont élaboré des échafaudages de PCL/chitosane pour la réparation des nerfs périphériques. Les résultats ont montré une meilleure adhésion et prolifération des cellules de Schwann sur l'échafaudage PCL avec 5% de chitosane [111].

La biofonctionnalisation des membranes de PCL a également été utilisée pour favoriser les interactions cellule-cellule et cellule-matériau dans l'ingénierie du tissu nerveux. Ghasemi-Mobarakeh *et al.* ont étudié l'effet des techniques de modification

de surface sur la prolifération cellulaire. Ils ont comparé des membranes traitées par ajout de Matrigel (M-PCL) et par greffage du Matrigel (G-PCL). Les résultats ont montré qu'il n'existe pas de différence de mouillabilité de surface entre les membranes de PCL et de M-PCL, par conséquent, le taux de prolifération cellulaire était identique pour les deux membranes. En revanche, ce taux de prolifération était plus élevé pour les membranes de G-PCL, ce qui semble être lié à l'immobilisation réussie du Matrigel en surface par le greffage covalent, comparé à la physisorption du Matrigel dans le cas des membranes M-PCL [112].

Parmi les caractéristiques des échafaudages en ingénierie du tissu nerveux, on retrouve principalement : la flexibilité, la signalisation biochimique et électrochimique et l'alignement des fibres, qui doivent servir de vecteur. L'étude de Xie *et al.*, a permis de comparer des membranes de PCL/PPy avec des fibres alignées et des fibres déposées aléatoirement. Ils ont montré que la migration des cellules nerveuses était plus importante sur les fibres alignées [113]. Dans une étude similaire, Ghasemi-Mobarakeh *et al.* ont comparé des échafaudages PCL/gélatine à fibres alignées et aléatoires pour étudier l'excroissance des neurites. Il a été observé que la teneur en gélatine influençait la viabilité des cellules et que la prolifération cellulaire était meilleure sur les fibres alignées que sur les fibres aléatoires [114].

Les polymères conducteurs sont notamment étudiés pour la régénération du tissu nerveux en raison de leurs propriétés électriques, qui devraient permettre la signalisation des cellules nerveuses et faciliter la reconstruction des connexions neuronales. Les propriétés électriques de la PCL peuvent être modifiées par incorporation de nanoparticules organiques et inorganiques. Sadari *et al.* ont évalué l'effet de l'incorporation de nanoparticules d'or (AuNPs) dans des membranes PCL/chitosane, sur la prolifération des cellules de Schwann. Les résultats ont montré que les AuNPs modifiaient la conductivité des membranes et augmentait le taux de prolifération cellulaires en présence du chitosane. Ils ont montré également que l'incorporation des AuNPS dans les membranes ne présentait aucune cytotoxicité [115].

4.6. Ingénierie tissulaire de la peau :

Afin d'éviter les complications associées aux autogreffes et d'accélérer la cicatrisation des plaies cutanées, les chercheurs se sont tournés vers les biomatériaux pour la régénération guidée de la peau. L'objectif principal de l'ingénierie tissulaire de la peau est de reconstruire de restaurer les fonctions des trois couches : hypoderme, derme et épiderme (Figure 17).

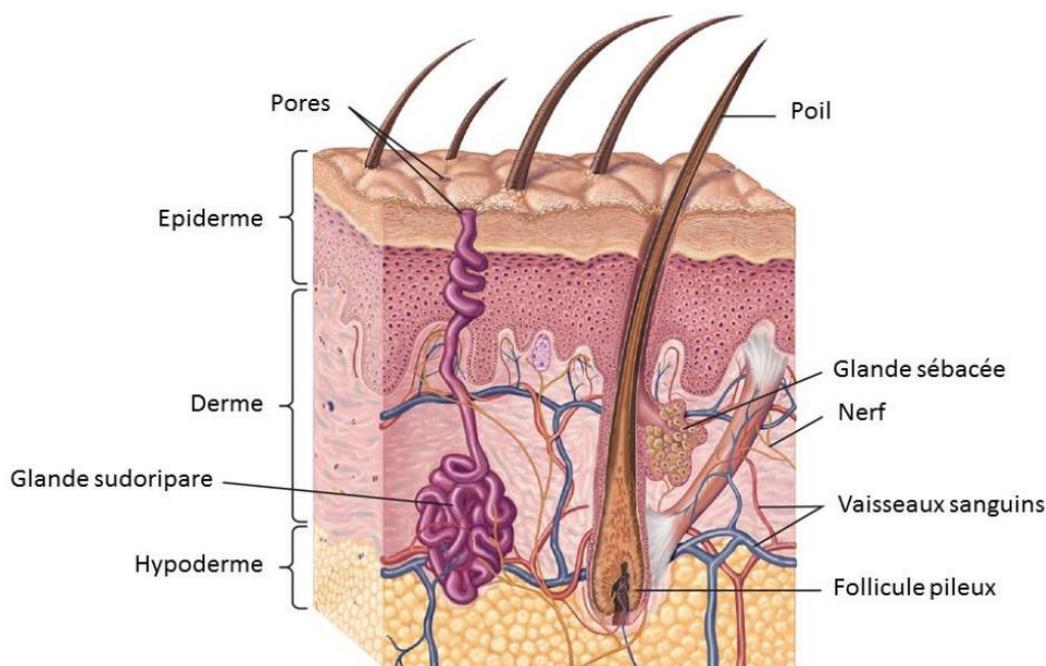


Figure 17 : Schéma d'une coupe histologique de la peau [116].

Généralement, les biomatériaux utilisés pour la régénération de la peau sont de nature poreuse tels que les membranes électrofilées. Il a également été observé qu'en dehors de la fonctionnalité de la surface, la topographie de la surface est également l'un des principaux facteurs de promotion de la prolifération cellulaire dans les échafaudages. Dans une étude de Sharif *et al.*, l'adhésion et la multiplication des cellules se sont avérées plus élevées et plus uniformes sur les membranes PCL/collagène par rapport à la PCL seule. Cela a été attribué à la topographie de surface et à la mouillabilité améliorée du réseau nanofibreux [117].

Zahedi *et al.* ont élaboré une membrane par électrofilage coaxial de poly(oxide d'éthylène)/aloe vera en tant que noyau et de PCL/chitosane/kératine en tant que matériau de la coquille. La présence d'aloe vera favorise l'adhésion, l'infiltration et la prolifération des cellules. La viabilité cellulaire était supérieure à 80 % pour les nanofibres structurées en cœur et en coquille avec une prolifération uniforme des cellules [118]. De même, Zarekhalili *et al.* ont fabriqué des membranes hybrides PVA/gomme adragante/PCL à l'aide d'une technique d'électrofilage à deux buses. Ils ont observé que la présence de PVA et de la gomme dans les membranes hybrides a permis d'améliorer la mouillabilité ainsi que l'adhésion et la prolifération cellulaire [119].

Le réseau fibreux, obtenu par électrofilage, offre la possibilité d'incorporer des composants bioactifs tels que des nanoparticules, des facteurs de croissance, des agents anti-inflammatoires, des antimicrobiens et des médicaments pour optimiser la cicatrisation de la peau [77]. Les travaux de Salehi *et al.* ont montré que l'utilisation des membranes de PCL/gélatine contenant de la cannelle comme agent bioactif, permettait d'accélérer la cicatrisation, grâce aux propriétés anti-inflammatoire et antibactérienne de la cannelle. De plus, les membranes de PCL jouent un rôle de barrière physique pour empêcher la pénétration des microbes et prévenir les infections [120].

5. Conclusion :

Face aux défis que pose le traitement de la myéломéningocèle, l'utilisation des biomatériaux apparaît comme une solution prometteuse pour intervenir plutôt dans la gestation, et prévenir les troubles causés par la destruction progressive du tissu médullaire. Ces biomatériaux doivent être biocompatibles, biodégradables pour éviter des interventions ultérieures et mécaniquement résistants pour maintenir une barrière protectrice entre la moelle épinière et l'environnement intra-utérin.

L'analyse des données issues de la littérature nous a permis de nous conforter dans notre choix d'utiliser la polycaprolactone pour l'élaboration de notre patch. En effet, parmi les polyesters biodégradables, la PCL se distingue en raison de sa biodégradabilité adaptée à une utilisation intra-utérine, ses propriétés physico-chimiques et viscoélastiques qui facilite sa mise en œuvre ainsi que sa compatibilité avec plusieurs matériaux qui permet de moduler ses propriétés biologiques et mécaniques.

De plus, nous avons pu voir que l'utilisation des membranes de PCL électrofilées a montré des résultats prometteurs en ingénierie tissulaire, notamment pour la régénération de la peau. Ces membranes offrent une surface propice à la prolifération cellulaire grâce au réseau de fibres, qui reproduit les caractéristiques de la matrice extracellulaire. Ainsi, nous proposons, dans ce travail, l'élaboration d'un patch par électrofilage, une technique simple et versatile qui nous permettra de répondre à un des points les plus importants du cahier des charges cité précédemment, à savoir la fermeture du défaut par couverture tissulaire.

Pour moduler la réponse biologique au contact du patch, nous nous appuyerons sur l'expertise du laboratoire BEST, qui a développé une technique de modification de surface simple et adaptée à plusieurs types de biomatériaux. Cette technique nous permettra de greffer de manière covalente un polymère bioactif ou antiadhésif afin de répondre aux exigences du patch décrites précédemment (Figure 18).

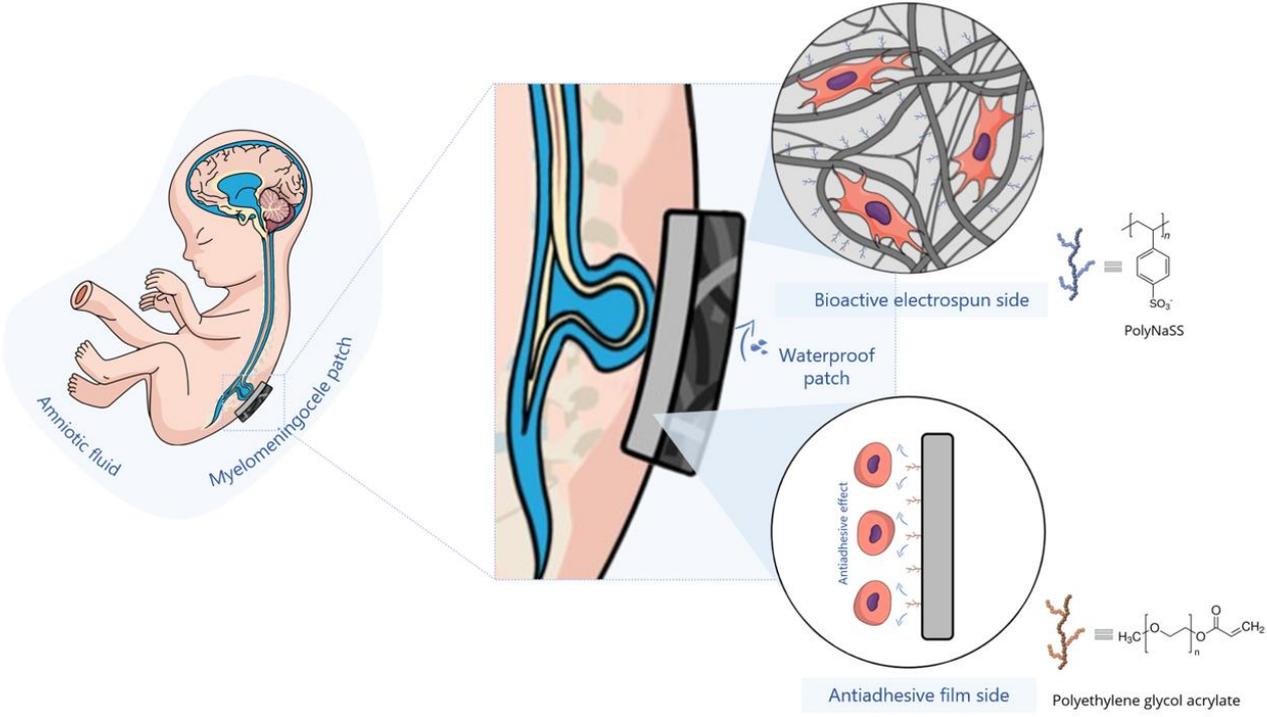


Figure 18 : Schéma de la démarche suivie dans ce travail pour le développement d'un patch pour le traitement de la myéloméningocèle.

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. **Élaboration d'un patch imperméable :**

1.1. **Techniques d'élaboration :**

Pour obtenir un patch imperméable aux liquides, nous proposons d'élaborer une membrane à double couche : une couche interne pleine, fabriquée par spin coating, pour s'opposer au passage des liquides ; et une couche externe poreuse obtenue par électrofilage pour la couverture tissulaire.

Comme cité précédemment, la polycaprolactone a été choisie pour l'élaboration des deux couches. Celle-ci se présente sous forme de granules obtenus auprès de Sigma Aldrich avec une masse molaire en nombre de 80 000 g. Mol⁻¹.

1.1.1. **Électrofilage :**

L'électrofilage a été réalisé à l'aide d'un dispositif développé au sein du laboratoire selon une configuration horizontale (Figure 19). Ce dispositif est constitué d'un pousse seringue, d'une alimentation à haute tension allant jusqu'à 60 kV et d'un collecteur en aluminium fixe, rotatif à basse vitesse par un disque tournant ou rotatif à grande vitesse au moyen d'un cylindre.

Le système est isolé dans une boîte à gant qui permet de contrôler la température, celle-ci a été maintenue à 25°C pendant les différents essais avec un temps d'électrofilage fixé à 2 heures.

Les solutions de PCL ont été préparées à température ambiante et maintenues sous agitation pendant une nuit.

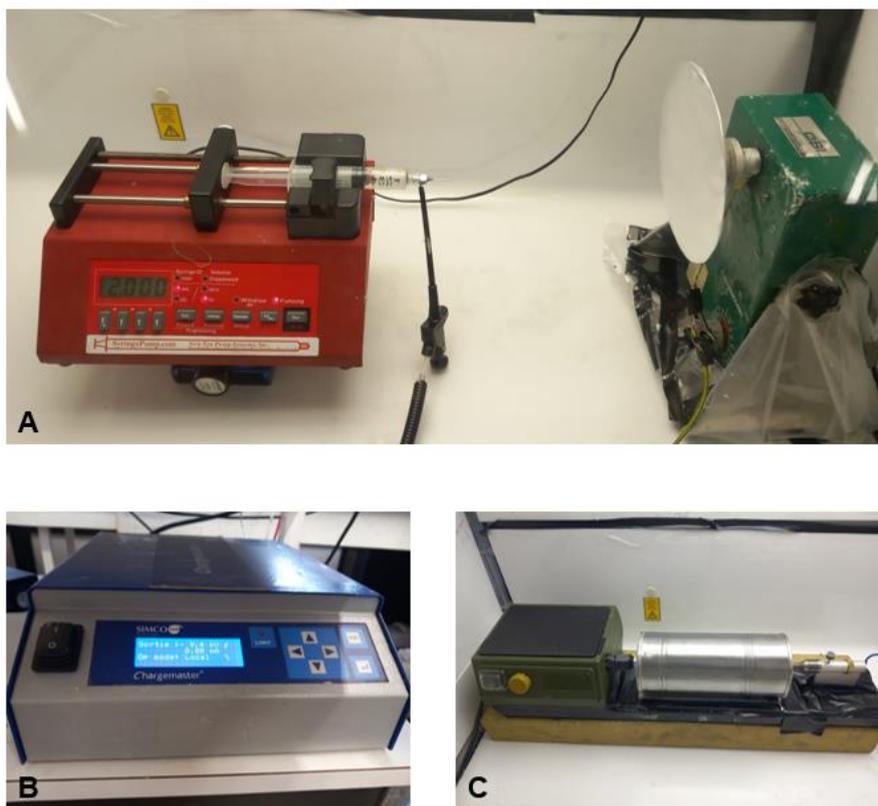


Figure 19 : Dispositif d'électrofilage du laboratoire BEST : **(A)** Pousse seringue et collecteur rotatif à basse vitesse (disque), **(B)** génératrice à haute tension, **(C)** collecteur rotatif à grande vitesse (cylindre).

1.1.1.1. Optimisation des paramètres d'électrofilage :

Les paramètres d'électrofilage ont été optimisés afin d'obtenir des fibres homogènes avec le plus faible diamètre possible. Pour ce faire, nous avons pris comme références les travaux réalisés précédemment au laboratoire BEST par Amokrane *et al.* [121] et des essais de la littérature à travers les travaux de Lowery *et al.* et de Ferreira *et al.* [122,123].

Dans un premier temps, la PCL a été solubilisée dans un mélange de dichlorométhane, chloroforme et de diméthylformamide avec des ratios allant de 1:1 à 5:1 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3 : \text{DMF}$). Nous avons fait varier également la concentration, la tension appliquée et la distance entre l'aiguille et le collecteur, en fixant à chaque étape les paramètres

Chapitre II : Matériels et méthodes

retenus aux étapes précédentes. Le tableau 4 résume les différents essais réalisés avec ce mélange de solvant.

Tableau 4 : Paramètres d'électrofilage testés :

Paramètres	Valeurs
Ratios de solvants (CH ₂ Cl ₂ +CHCl ₃ : DMF)	1 :1 ; 2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1
Concentrations (w%)	10 ; 15
Tension (kV)	9,5 ; 12
Distance (cm)	15
Débit (ml/h)	2
Diamètre de l'aiguille (mm)	0,9 (20G)
Température (°C)	25
Temps d'électrofilage (heures)	2

En raison de la toxicité élevée des solvants décrits précédemment, nous avons réalisé des essais d'électrofilage de la PCL en utilisant l'acide acétique, un solvant classé par la FDA (Food and Drug Administration) comme étant à faible potentiel toxique pour une utilisation médicale [123].

Les paramètres ont été également optimisés en faisant varier la concentration, la tension appliquée, la distance ainsi que le débit d'injection de la solution (tableau 5).

Tableau 5 : Paramètres d'électrofilage testés en utilisant l'acide acétique comme solvant :

Paramètres	Valeurs
Concentrations (w%)	10 ;15 ; 20 ; 25
Tension (kV)	6 ; 9 ; 12 ; 15
Distance (cm)	10 ;15 ;20 ; 25
Débit (ml/h)	0,3 ; 0,5 ; 1 ; 1,5
Diamètre de l'aiguille (mm)	0,9 (20G)
Température (°C)	25
Temps d'électrofilage (heures)	2

Enfin, pour obtenir des fibres alignées, nous avons utilisé un collecteur cylindrique à différentes vitesses allant de $1337,33 \pm 15,53$ tours/minute à $4182,33 \pm 32,01$ tours/minute, mesurées à l'aide d'un tachymètre sans contact à visée laser.

1.1.2. Spin coating :

Le spin coating, ou l'enduction par centrifugation, est un procédé qui permet de déposer uniformément une fine couche de matériau ou de revêtement sur un substrat qui tourne à vitesse élevée (Figure 20). Généralement, la solution est déposée au centre du substrat pour permettre un étalement uniforme. Plusieurs paramètres peuvent affecter l'épaisseur de la couche déposée, à savoir : le type de solvant, la viscosité, la concentration ainsi que la vitesse de centrifugation [124].

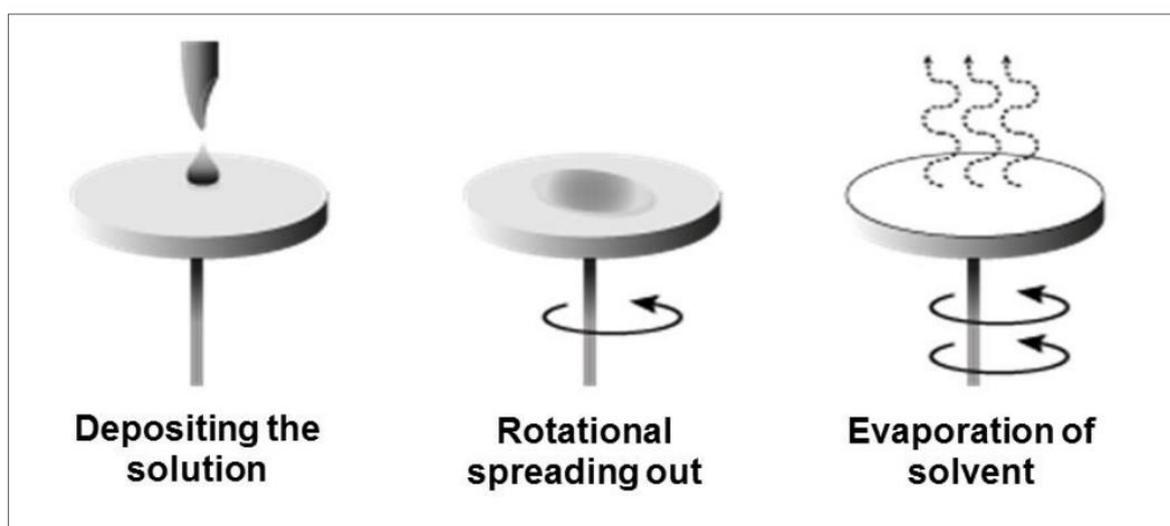


Figure 20 : Elaboration de film par spin coating [121].

L'élaboration de la couche interne du patch a été réalisée par spin coating (SPIN150-v3 SPS) à 550 tours/minute pendant 10 secondes, à partir de deux solutions, pour deux méthodes différentes : une solution de PCL similaire à celle retenue pour l'électrofilage, et une solution de PCL dans l'acétone, qui permet une solubilisation partielle de la PCL (cf partie 1.2 tableau 6).

1.2. Méthodes d'élaboration du patch à double couche :

Le patch à double couche a été élaboré par deux méthodes :

- La première méthode (Figure 21a) consiste à déposer un film de PCL par spin coating sur le collecteur, et procéder par la suite à l'électrofilage sur ce film avant qu'il sèche. La solution de spin coating est similaire à celle de l'électrofilage afin de garantir la cohésion des deux couches et de maintenir la conductivité du film pendant l'électrofilage (tableau 6). Un collecteur rotatif, sous forme d'un disque tournant, a été utilisé pour assurer une distribution égale des fibres électrofilées sur le film.
- La deuxième méthode (Figure 21b) consiste à déposer un film de PCL sur une boîte de Petri en verre, puis de poser par la suite une membrane électrofilée sur ce film avant séchage. La solution de spin coating utilisée permet de solubiliser partiellement la PCL afin d'éviter que la membrane électrofilée ne soit complètement solubilisée une fois déposée sur le film (tableau 6).

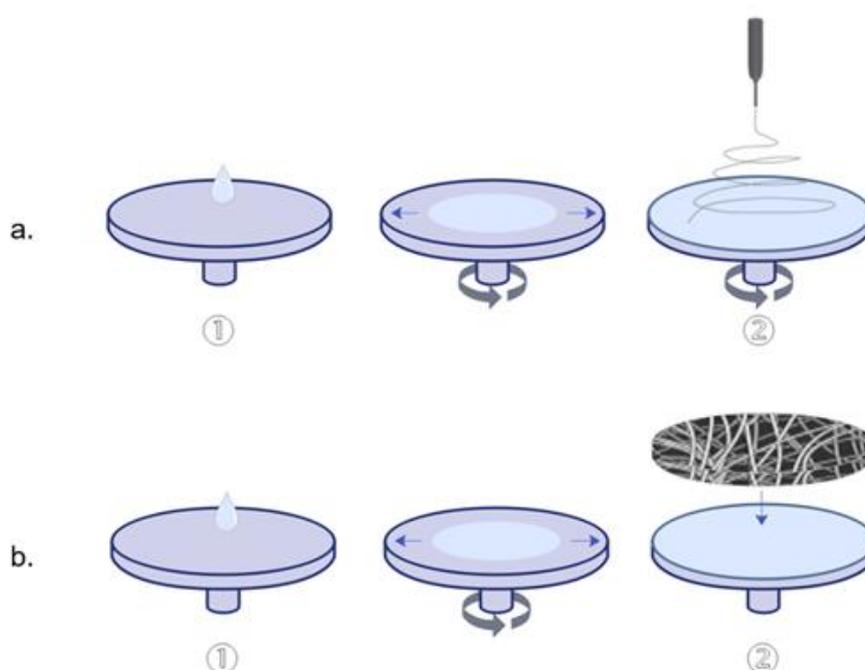


Figure 21 : Méthodes d'élaboration du patch à double couche : **(a)** : spin coating de la solution de PCL sur le collecteur (même solution de l'électrofilage) (1), électrofilage sur le film de spin coating avant séchage (2) ; **(b)** : spin coating de

la solution de PCL sur un support (PCL solubilisée dans l'acétone) (1), pose d'une membrane électrofilée sur le film de spin coating avant séchage (2).

Tableau 6 : Solutions de spin coating pour l'élaboration du patch à double couche.

	Concentration	Solvants
Méthode 1 : solution de spin coating	-15 w% -25w%	- Chloroforme + Dichlorométhane : DMF (3:1) - Acide acétique
Méthode 2 : solution de spin coating	20w%	- Acétone

2. Fonctionnalisation de surface :

2.1. Face bioactive :

2.1.1. Préparation du monomère styrène sulfonate de sodium :

Le monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS, Sigma Aldrich) (Figure 22) est purifié par recristallisation. Cette technique nous permet de séparer le NaSS de l'inhibiteur de polymérisation en se basant sur la différence de solubilité dans un solvant à chaud et à froid. Le protocole consiste à dissoudre le NaSS dans un mélange d'éthanol et d'eau (90/10) (volume/volume), à 70°C et sous agitation. Après une nuit, la solution est filtrée à chaud puis placée à 4°C pendant 12 heures pour permettre la cristallisation du NaSS. Les cristaux sont récupérés par filtration et séchés dans une étuve à 50°C, avant d'être stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

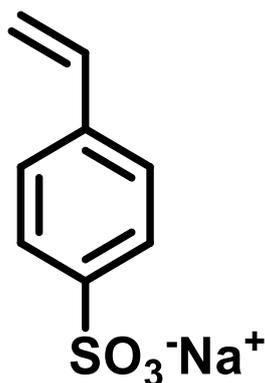


Figure 22 : Structure chimique du styrène sulfonate de sodium.

2.1.2. Fonctionnalisation de surface :

Le greffage du poly(styrène sulfonate de sodium) (polyNaSS) a été réalisé par polymérisation radicalaire initiée à partir de la surface (Grafting from) avec ou sans activation préalable.

2.1.2.1. Greffage avec activation de surface :

L'étape d'activation de surface par ozonation va permettre de créer des espèces réactives à la surfaces telles que des hydroxyles et des hydroperoxydes pour amorcer la polymérisation.

Les échantillons de PCL sont ozonés à 30°C dans de l'eau distillée, sous agitation pendant 5 ,10 et 20 minutes. L'ozone est produit par un générateur d'ozone (Ozonair BMT 802 N) avec une pression de 0,5 bars et un débit d'oxygène de 0,6 L.min⁻¹.

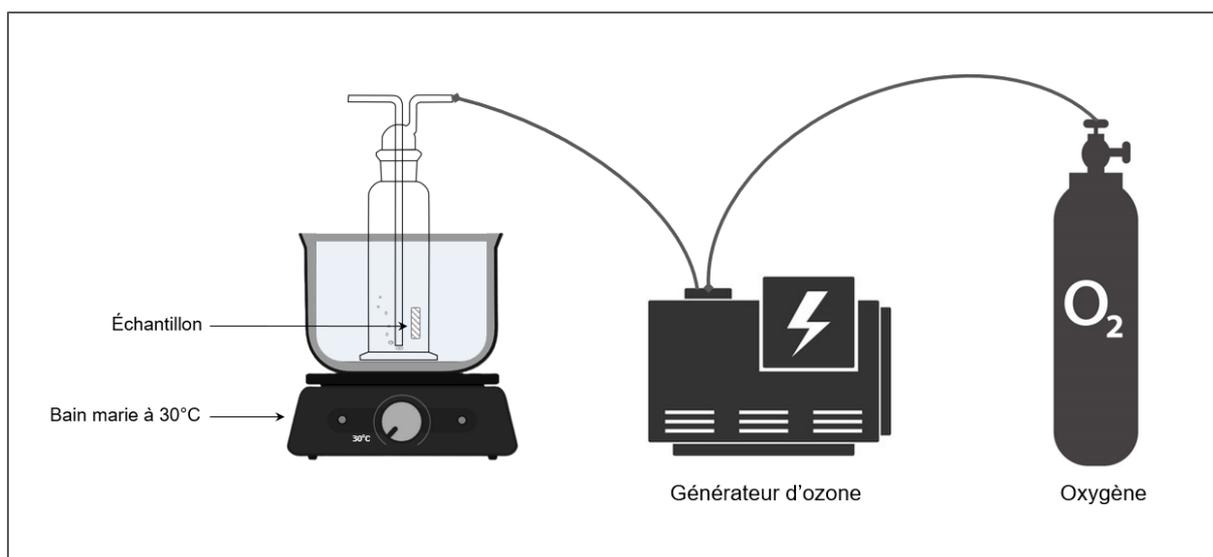


Figure 23 : Activation de la surface par ozonation.

Après ozonation, les échantillons sont transférés dans un réacteur contenant une solution de NaSS à 0,7 M dégazée pendant 30 minutes. Ils sont ensuite irradiés sous UV (Lampe LED, 365nm, Omnicure) à 160mW/cm² pendant 1 heure, sous agitation et à température ambiante.

Pour greffer une seule face, le patch a été placé sur une plaque de téflon où seule la face concernée est exposée aux UV.

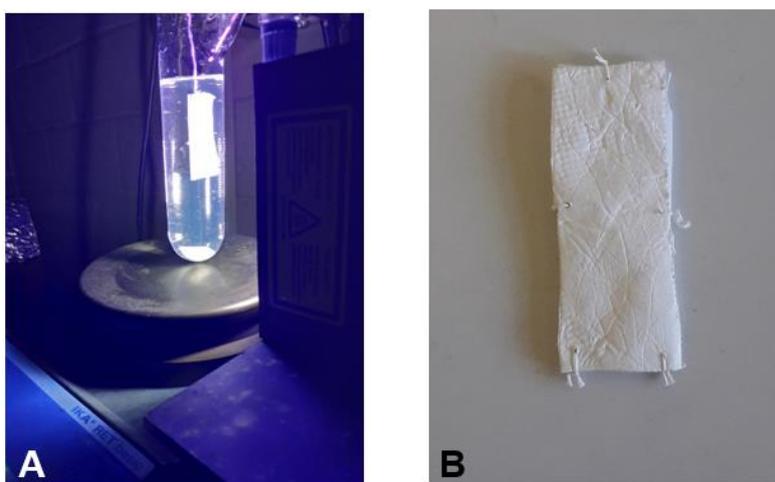


Figure 24 : (A) Greffage aux UV avec une puissance de 160 mW/cm², (B) Patch maintenu sur une plaque en téflon pour exposer une seule face aux UV.

2.1.2.2. Greffage sans activation de surface :

Les échantillons sont directement placés dans une solution de NaSS à 0,7 M, et exposés aux UV à 160mW/cm² pendant 1 heure, sous agitation et à température ambiante.

Après greffage, les échantillons sont lavés pendant 48h dans de l'eau distillée en changeant les milieux toutes les 3 heures. Ils sont ensuite séchés dans une étuve à 37°C avant d'être caractérisés.

2.2. Face antiadhésive :

2.2.1. Choix du polyéthylène glycol :

Pour obtenir une face antiadhésive, le polyéthylène glycol a été choisi pour ses propriétés antiadhésives bien décrites dans la littérature notamment pour des revêtements antiadhésifs des patches abdominaux, gynécologiques et ophtalmologiques [125, 126, 127].

Dans notre étude, nous avons utilisé le polyéthylène glycol méthyl éther acrylate (PEG) (Sigma Aldrich) avec une masse molaire en nombre de 480 g. Mol⁻¹ et dont la structure chimique est représentée dans la figure 25.

Le PEG a été préalablement purifié à l'aide d'une colonne en utilisant l'oxyde d'aluminium (Fisher Scientific).

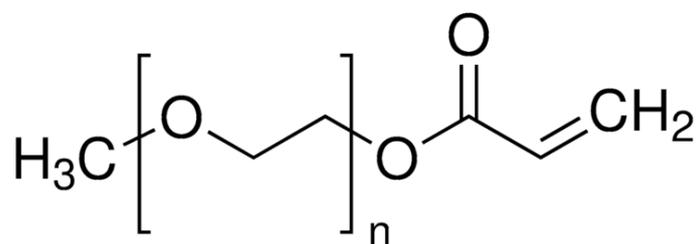


Figure 25 : Structure chimique du polyéthylène glycol méthyl éther acrylate.

2.2.2. Greffage du PEG :

Les échantillons ont été immergés dans une solution de PEG à 0,25 M, dégazée pendant 30 minutes. Le greffage a été réalisé sous UV à 160mW/cm² pendant 30, 45 et 60 minutes, avec et sans activation préalable de la surface par ozonation.

3. Caractérisations Physico-chimiques :

3.1. Microscopie électronique à balayage – spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie :

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de caractérisation qui permet l'observation des caractéristiques à l'échelle micro ou nanométriques des matériaux. L'acquisition des images est basée sur le principe des interactions électrons-matières, en faisant interagir un faisceau d'électrons à haute énergie avec les atomes de la surface des échantillons, dans des conditions de vide. La morphologie des fibres et des films de PCL a été observée grâce à un MEB Hitachi TM3000 avec une tension d'accélération allant de 5 à 15kV. L'analyse MEB a été couplée à une spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX, Oxford instruments) afin d'identifier les éléments chimiques présents à la surface ainsi que leur répartition (Mapping).

Les images obtenues nous a permis également de déterminer le diamètre moyen des fibres par la mesure de 50 diamètres avec le logiciel Image J (V1.53t, National Institute of Health, USA).

Pour l'observation des échantillons humides après culture cellulaire, une platine Peltier a été utilisée pour contrôler la température des échantillons.

3.2. Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact nous permet d'évaluer la mouillabilité de la surface, en mesurant l'angle de la tangente du profil d'une goutte de liquide avec la surface sur laquelle elle est déposée. L'angle de contact (θ) est donc une grandeur physico-chimique résultante des différentes interactions entre le liquide et l'échantillon, qui permet de déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface. Il dépend de la tension de surface liquide-gaz (γ) et des tensions interfaciales solide-liquide (γ_{SL}) et

solide-gaz (γ_{SG}) (Figure 26). Ainsi, l'équilibre des trois phases nous permet de déterminer l'angle de contact grâce à l'équation de Young :

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma \cos\theta = 0$$



$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma}$$

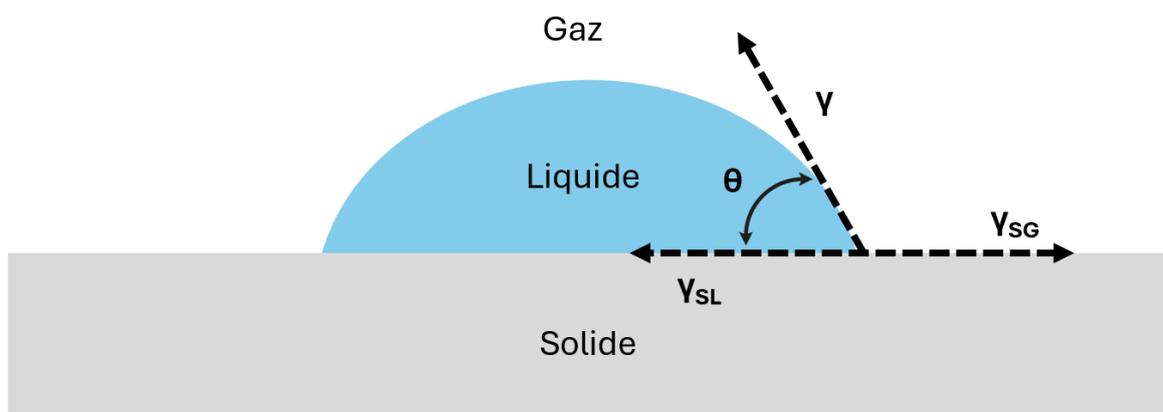


Figure 26 : Mesure de l'angle de contact.

Dans notre étude, la mouillabilité des surfaces a été évaluée en utilisant un appareil de mesure DSA10 et le logiciel Drop shape analysis de KRUSS GmbH. La mesure est réalisée après dépôt d'une goutte d'eau de $2\mu\text{L}$ sur la surface de la PCL et une prise d'image 10 secondes après le dépôt.

3.3. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode d'analyse structurale qui permet d'identifier les liaisons chimiques présentes dans nos échantillons. Elle est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau, qui permet des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques lorsque

la longueur d'onde du faisceau avoisine l'énergie de vibration des molécules. Ainsi, le FTIR permet d'obtenir un spectre caractéristique de bandes que nous pouvons analyser à travers des bases de données issues de la littérature, afin d'identifier les liaisons chimiques présentes à la surface.

Dans notre étude, les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectromètre Perkin Elmer Spectrum Two doté d'un module d'atténuation de transmission, avec une gamme spectrale qui s'étend de 500 à 4000 cm^{-1} et une résolution de 4 cm^{-1} . Un total de 16 scans a été acquis pour chaque surface.

3.4. Dosage colorimétrique au bleu de toluidine

Le dosage au bleu de toluidine (BT) est une technique de caractérisation colorimétrique qui repose sur la complexation d'une molécule chromophore (BT), *via* son groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$, avec des groupements anioniques présents à la surface, tels que des SO_3^- ou des COO^- . On considère, selon l'hypothèse d'Ikada *et al.*, qu'une mole de BT se complexe avec une mole du groupement anionique [128].

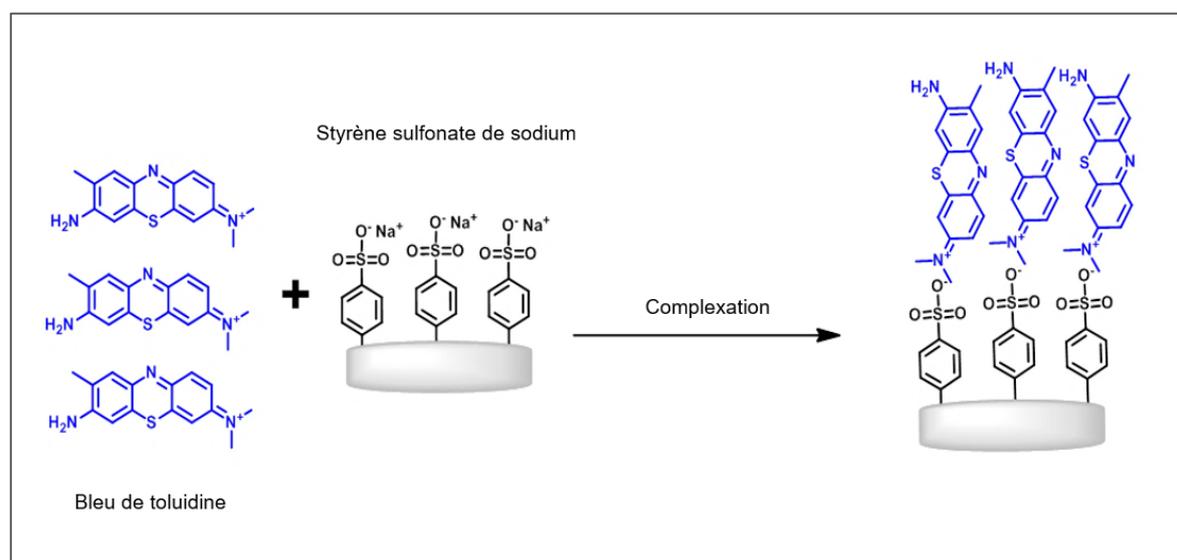


Figure 27 : Complexation du BT avec les SO_3^- du polyNaSS.

Les échantillons de PCL greffés et témoins sont immergés dans une solution de BT (à pH 10) à 30°C pendant 6 heures, sous agitation et à l'abri de la lumière. Cette étape va permettre la complexation du BT aux groupements anioniques présents à la surface

Chapitre II : Matériels et méthodes

de la PCL. Les échantillons sont ensuite rincés abondamment avec une solution de NaOH à 1.10^{-3} M afin d'éliminer le BT non complexé. Enfin, les molécules de BT sont décomplexées dans une solution d'acide acétique à 50% (v/v) pendant 24h et sous agitation. On mesure par la suite l'absorbance (A) des solutions obtenues à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer lambda 25, afin d'obtenir le nombre de mole du BT décomplexé en utilisant loi de Beer Lambert :

$$n = \frac{A \times V}{\epsilon \times l} \quad \text{et} \quad DG = \frac{n(\text{BT})}{m}$$

Où :

A : Absorbance

V : Volume d'acide acétique à 50% (L)

ϵ : Coefficient d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

l : longueur de la cuve (cm)

m : masse de l'échantillon (g)

DG : Degré de Greffage qui correspond au nombre de mole par la masse de l'échantillon ($mol. g^{-1}$)

Une courbe d'étalonnage a permis de déterminer la valeur d' ϵ , en utilisant la loi de Beer Lambert. Pour cela, plusieurs solutions de BT, à différentes concentrations, ont été diluées dans un volume identique d'une solution d'acide acétique à 50% (v /v). Les absorbances (A) des solutions ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 633nm. La pente de la droite permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire ϵ de la solution de BT qui est de l'ordre de $47000 L.mol^{-1}cm^{-1}$ (Figure 28).

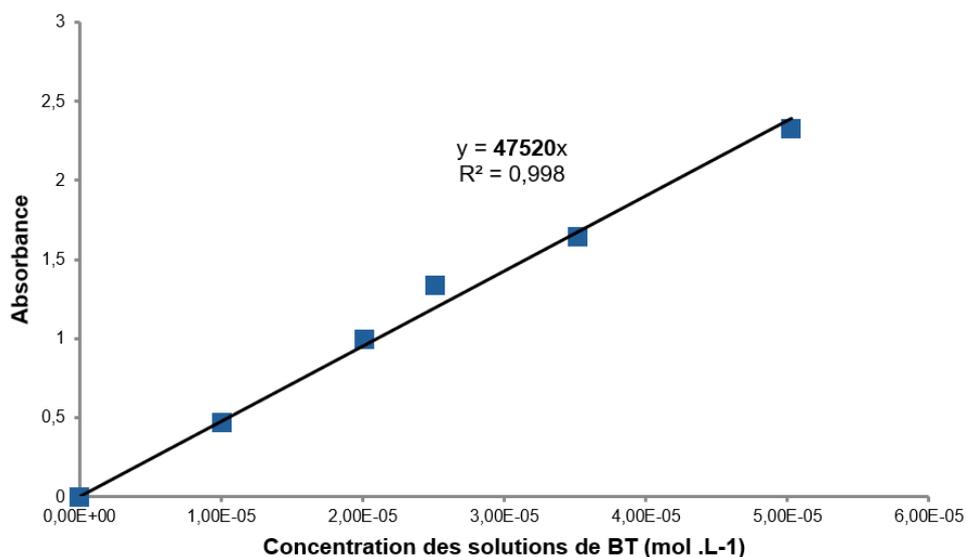


Figure 28 : Exemple d'une courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la concentration du dosage au BT.

3.5. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour Differential Scanning Calorimetry) est une méthode de caractérisation qui permet d'étudier les propriétés thermiques d'un matériau, en mesurant la chaleur produite ou absorbée lors de sa transformation par rapport à une référence. Cette méthode permet de déterminer la température à laquelle les transitions de phase surviennent, telle que la température de transition vitreuse, la température de fusion et de cristallisation.

Pour les polymères semi-cristallins, la DSC permet de déterminer le taux de cristallinité à partir de l'enthalpie de fusion, obtenue par l'intégration du flux thermique lors du pic de fusion. Le rapport entre l'enthalpie de fusion de l'échantillon et celle d'un matériau purement cristallin permet de calculer le taux de cristallinité en pourcentage selon la formule suivante :

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{f_0}} \times 100$$

Où :

ΔH_f : Enthalpie de fusion de l'échantillon.

ΔH_{f0} : Enthalpie de fusion de la PCL 100% cristalline ($\Delta H_f^0 = 139,5 \text{ J. g}^{-1}$) [129].

Dans notre étude, trois échantillons de chaque condition ont été analysés avec un calorimètre Perkin Elmer DSC 8000. Chaque échantillon a été soumis à un cycle de chauffage de 0 à 100°C avec une vitesse de chauffage constante de 10°C/min, sous une atmosphère d'azote.

3.6. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique est une méthode qui permet de séparer les molécules en fonction de leur masse et de leur structure, à travers une phase dite stationnaire. Cette phase est constituée d'un gel poreux dont la dimension des pores est proche de la taille des molécules à séparer. En fonction de leur taille, les molécules vont soit passer à travers les pores du gel, ou seront exclues par le volume externe du gel. Ainsi, les grosses molécules, dont le diamètre est supérieur à celui des pores, seront élués en premier, tandis que les petites molécules vont traverser tout le gel et seront éluées plus tardivement.

Nous utilisons cette technique pour déterminer la masse molaire en nombre (M_n) et en poids (M_w) de la PCL ainsi que l'indice de polydispersité (I_p), notamment après les différents temps de dégradation. Pour cette étude, les échantillons de PCL ont été solubilisés dans le tétrahydrofurane (THF) et les solutions ont été filtrées à travers des membranes d'acétate de cellulose. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un instrument Shimadzu Prominence et d'un logiciel LCsolution GPC, après étalonnage avec du polyméthacrylate de méthyle de masses molaires connues.

4. Etude des propriétés mécaniques :

Les propriétés mécaniques des patches de PCL ont été étudiées en réalisant des essais de traction uni-axiale. Ces essais consistent à soumettre une éprouvette à un effort de traction dans une seule direction et à une vitesse de sollicitation constante jusqu'à la rupture. La contrainte (σ) et la déformation (ϵ) du matériau qui en résulte permettent d'obtenir une courbe de traction, à partir de laquelle on peut déterminer les

caractéristiques mécaniques des échantillons, à savoir : le module d'élasticité ou module d'Young (E), la contrainte à la rupture (σ_{\max}) et la déformation maximale (ϵ_{\max}) (Figure 29).

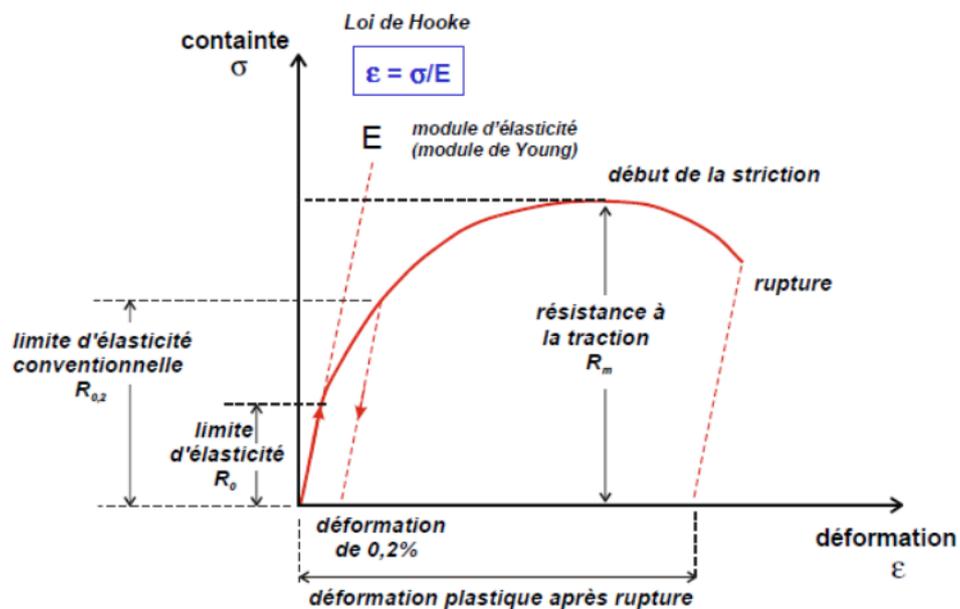


Figure 29 : Courbe contrainte-déformation [130].

Les tests ont été réalisés sur un banc d'essais de traction uni-axiale conçu au laboratoire BEST. Il est composé d'un vérin électrique d'une capacité de charge de 600 daN, d'un capteur de forces de 10 daN et de deux mâchoires de traction auto-serrantes (Figure 30).

Chapitre II : Matériels et méthodes

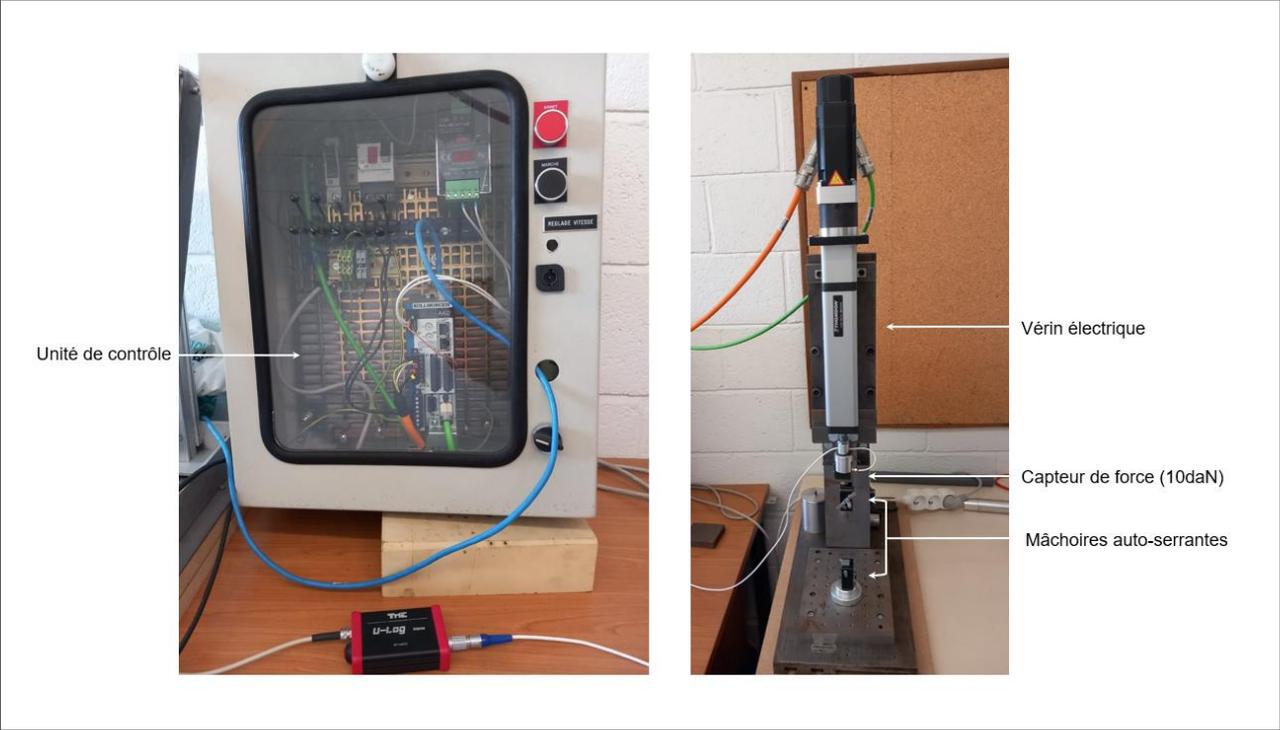


Figure 30 : Montage du test de traction uni-axiale.

Les échantillons ont été découpés en éprouvettes normalisées de type H3 dont les dimensions et la forme sont représentés dans la figure 31. L'épaisseur de ces éprouvettes a été mesurée sur des images MEB en utilisant le logiciel ImageJ.

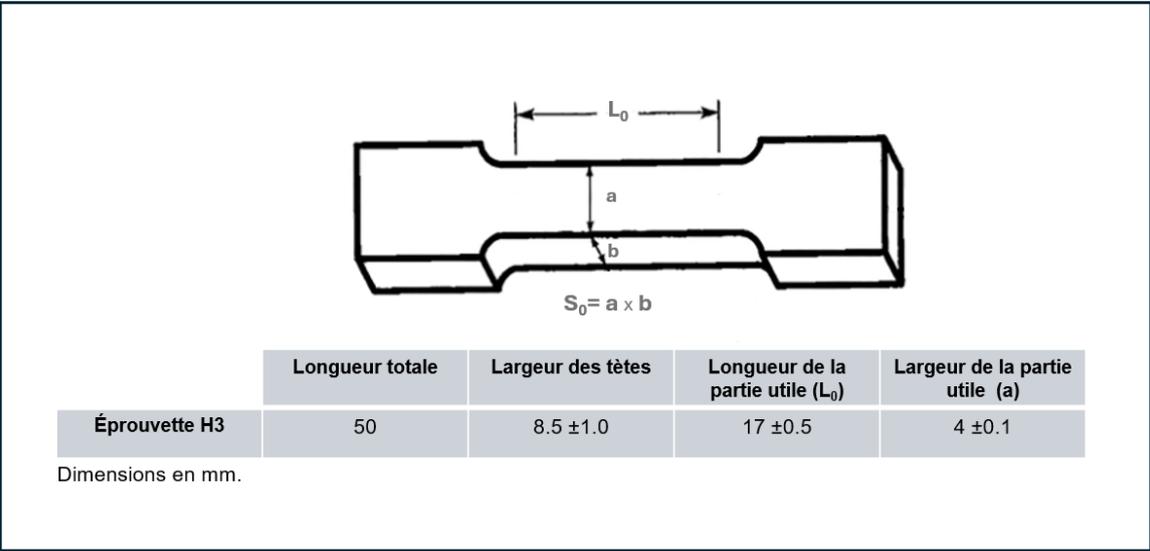


Figure 31 : Forme et dimensions de l'éprouvette H3.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Pour réaliser l'essai de traction, l'éprouvette a été fixée par les deux mâchoires auto-serrantes dont l'une est mobile dans le sens de la traction. Le déplacement du vérin fournit une force de traction F variable dont l'action s'exerce jusqu'à la rupture de l'éprouvette ou la fin de la course du vérin. Nous avons testé deux vitesses différentes : 0,1 et 10 mm.s⁻¹ à température ambiante. Les données ont été enregistrées par un logiciel d'acquisition, qui nous permet d'enregistrer la force en fonction du temps que nous avons convertit par la suite en contrainte en fonction de la déformation selon les formules suivantes :

$$\sigma = \frac{F}{S_0}$$

Et :

$$\varepsilon = \frac{V \times t}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Où :

σ : La contrainte exprimée en MPa.

F : La force exprimée en N.

S_0 : Section initiale de la partie utile de l'éprouvette en mm².

ε : La déformation.

V : La vitesse de traction en mm/s ;

t : Le temps en secondes ;

ΔL : Le déplacement ou l'allongement de la partie utile de l'éprouvette en mm ;

L_0 : La longueur initiale de la partie utile de l'éprouvette en mm.

Le module d'Young a été déterminé à partir de la région de déformation élastique de la courbe contrainte-déformation en calculant la pente.

5. Etude de la réponse biologique :

5.1. Préparations des échantillons :

Avant d'être au contact des cellules, les échantillons ont été lavés à l'eau ultra pure et conditionnés pendant 3 heures dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) à pH physiologique. Ces lavages permettent d'éliminer les impuretés superficielles et équilibrer les surfaces au pH physiologique.

Les échantillons ont été ensuite stérilisés par exposition aux rayonnements UV (30 W, 254nm) pendant 15 minutes, sur chaque face, avant d'être conditionnés dans du milieu de culture cellulaire DMEM (Dulbecco's Modify Eagle Medium) (Sigma Aldrich) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1% L-glutamine et 1% pénicilline et streptomycine à 37 °C pendant 12 heures, afin d'équilibrer les surfaces en ions et en protéines.

5.2. Test de cytotoxicité

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyl tetrazolium) (Thermo Fisher), qui permet de quantifier les cellules vivantes au contact des surfaces de PCL greffées et non greffées, afin d'évaluer d'éventuels effets cytotoxiques de la PCL, du polyNaSS et du PEG. À cette fin, la culture cellulaire a été réalisée avec des fibroblastes de souris L929 incubées sur les surfaces des échantillons pendant 24 heures, 3 jours et 7 jours, avec une densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml. La culture a été maintenue dans un milieu DMEM supplémenté (10% FBS, 1% glutamine, 1% pénicilline et streptomycine) à 37 °C et dans un air humidifié contenant 5% de CO₂.

Dans ce test, l'activité mitochondriale est évaluée grâce au réactif tétrazolium de couleur jaune, qui est réduit en formazan, de couleur violette, par des enzymes oxydoréductases des cellules vivantes. La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Figure 32).

Pour cela, les cellules attachées à la surface des échantillons ont été incubées dans une solution de MTT pendant 4 heures à 37 °C. Les précipités de formazan formés sont dissous dans du DMSO, afin de mesurer par la suite l'absorbance à 540 nm par

spectroscopie UV-visible (ELx800, BioTek) et de déterminer ainsi la quantité des cellules vivantes.

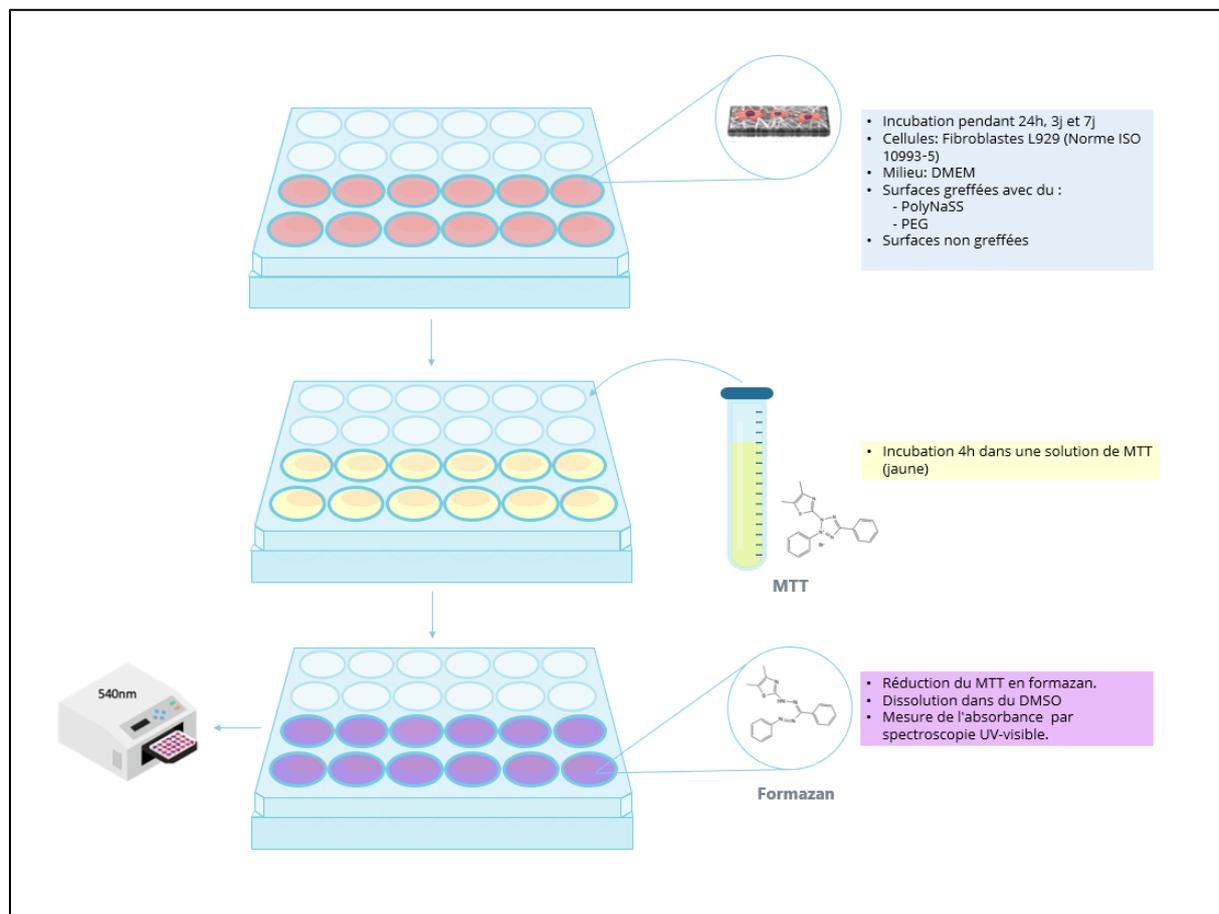


Figure 32 : Schéma du test de cytotoxicité au MTT.

Les absorbances (A_s) obtenues nous permettent de calculer le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au puits de contrôle (A_c), qui correspond à des cellules incubées sur des puits vides sans échantillons. La formule prend en considération le blanc (A_b) (sans formazan) qui doit être soustrait des absorbances :

$$viabilité\ cellulaire\ \% = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

Le test MTT nous permet également d'évaluer la prolifération cellulaire, en comparant le nombre des cellules dans chaque condition, et pour les différents temps d'incubation cités ci-dessus.

5.3. Test de morphologie :

Pour évaluer l'affinité des cellules pour les surfaces de nos échantillons, un test de morphologie cellulaire a été réalisé avec des fibroblastes de souris L929 incubées sur les surfaces pendant 24 heures, 3 jours et 7 jours dans du DMEM (37°C, 5% de CO₂). Après chaque temps, le milieu est retiré et les surfaces sont rincées trois fois au PBS. Les cellules adhérentes sont fixées avec du formaldéhyde 4% pendant 30 minutes et lavées trois fois au PBS et à l'eau ultrapure. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C pour une analyse ultérieure au MEB couplé à une platine Peltier.

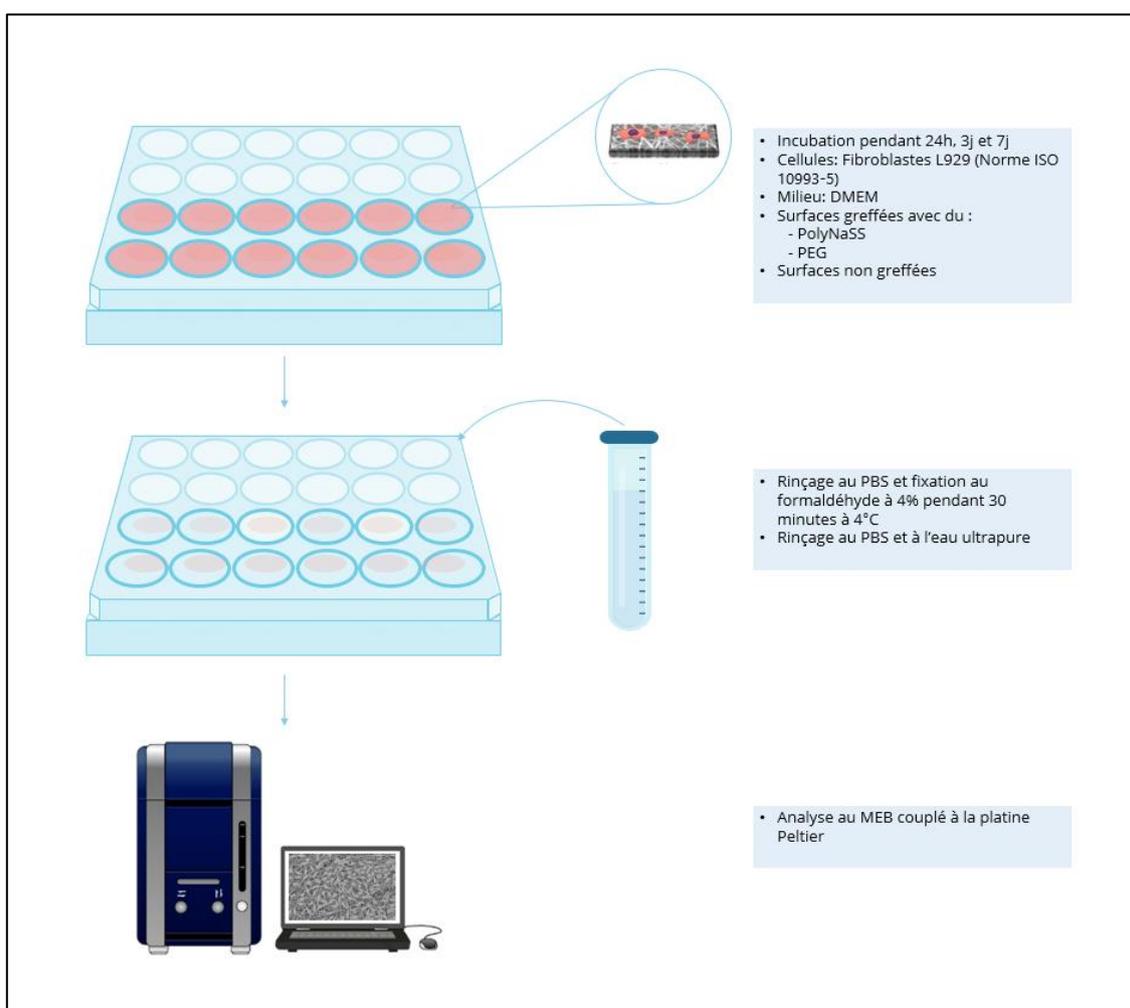


Figure 33 : Schéma du test de morphologie cellulaire.

6. Etude de la dégradation du patch :

6.1. Choix d'un milieu modèle :

Afin de comprendre les mécanismes de dégradation du patch après implantation, nous avons réalisé une étude de dégradation *in vitro* de six mois dans des conditions proches de celle rencontrées en milieu intra-utérin. Pour cela, nous avons choisi un milieu modèle de composition proche à celle du liquide amniotique, car, après implantation, le patch va interagir en premier avec le liquide amniotique (pH 7,1 – 7,3) [131] qui est constitué de 98% d'eau mais aussi de protéines, d'enzymes, de lipides, d'hormones et de minéraux [132]. Le choix s'est porté sur l'utilisation du sérum de veau foetal (ou sérum foetal bovin, FBS) (Gibco) dont la composition est comparée à celle du liquide amniotique dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Tableau comparatif entre la composition du FBS et celle du liquide amniotique au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse.

	FBS	Liquide amniotique*
Glucose (mg/ml)	1,28 ± 0,05 [133]**	17,94 ± 13,53 [134]
Totale protéines (mg/ml)	0,36 ± 0,01 [133]	4,87 ± 2,08 [132]
Albumine (mg/ml)	0,27 ± 0,02 [133]	0,002 ± 0,001 [134]
Bilirubine totale (µg/ml)	0,12 ± 0,01 [133]	1,3 ± 0,75 [132]
Bilirubine directe (µg/ml)	0,61 ± 0,04 [133]	0,66± 0,39 [132]
Urée (mg/ml)	0,16± 0,01 [135]	0,32 ± 0,12 [134]
Acide urique (µg/ml)	0,15 ± 0,01 [133]	0.8 ± 0.3 [134]
Créatinine (µg/ml)	0,27 ± 0,01 [133]	18,3 ± 4,2 [134]
Cholestérol (µg/ml)	361 ± 5 [133]	15,47 ± 7,73 [132]
Lactate-déshydrogénase (LDH) (U/L)	1025,0 ± 30,8 [133]	17,60 ± 18,02 [132]
Phosphatase alcaline (UI/L)	211.,4 ± 22,0 [133]	19.80 ± 18.14 [132]
Aspartate aminotransférase AST (UI/L)	42,1 ± 2,7 [133]	8,40 ± 4,28 [132]
Alanine aminotransférase (ALT) (UI/L)	773 ± 24 [133]	0,80 ± 0,70 [132]

Chapitre II : Matériels et méthodes

Sodium (Na ⁺) (mmol/L)	137,21 ± 1,4 [136] ***	129,90 ± 11,65 [132]
Potassium (K ⁺) (mmol/L)	10,71 ± 1,4 [136]	3,80 ± 0,41 [132]
Calcium (Ca ²⁺) (mmol/L)	3,9 ± 0,2 [133]	1,42 ± 0,26 [132]
Chlorure (Cl ⁻) (mmol/L)	103,50 ± 1,2 [136]	106,18 ± 7,82 [132]
Phosphore inorganique (P _i) (mg/dL)	10,3 ± 0,3 [133]	1,83 ± 0,81 [134]
pH	6,8 – 8,1 (25°C) **	7,1-7,3 [131]

*Valeurs prises au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse.

**FBS commercial de la marque Gibco.

*** Les auteurs ont calculé la moyenne des taux, retrouvés dans trois marques différentes, pour chaque paramètre (Gibco, Biowest, Waltham).

Pour ajuster les taux des différents paramètres cités ci-dessus, notamment les taux d'enzymes, nous avons choisi de diluer le FBS au 10^{ème}, ce qui nous a permis également d'augmenter le volume du milieu pour effectuer des changements réguliers (une fois par semaine). Nous avons également ajusté le taux de l'urée à ceux retrouvés à la fin de la gestation.

En outre, les travaux de Fortunato *et al.* et Maymon *et al.* ont montré que les collagénases interstitielles peuvent être présentes dans le liquide amniotique et sont souvent associées à la rupture prématurée des membranes (RPDM ou PROM en anglais) [137, 138]. Nous avons donc ajouté de la collagénase type 1 selon un taux moyen de 0,13 mg/L, retrouvé chez les patientes à terme sans travail et sans RDPM [138].

Enfin, pour éviter les contaminations, nous avons ajouté l'azote de sodium, qui est un agent biocide utilisé pour la conservation des fluides biologiques. Nous avons adapté la concentration à 50mM, à partir de laquelle un effet bactéricide a été observé, notamment sur des bactéries à gram négatifs [139, 140]. Le milieu a été préparé avec une eau stérilisée par autoclave, et l'ajout de l'urée, de la collagénase et de l'azote de sodium a été effectué après filtration (filtre à 0,2µm).

6.2. Étude de la stabilité du milieu de dégradation :

Pour étudier la stabilité du milieu dans le temps, nous avons réalisés des tests avec des membranes de PCL non greffées dans un milieu de dégradation avec et sans

azoture de sodium pendant deux mois et à 37°C. Ces tests nous ont permis de détecter une éventuelle contamination bactérienne ou fongique, ou un effet de l'azoture de sodium sur les membranes de PCL.

6.3. Protocole expérimental :

L'étude de dégradation a été réalisée avec des échantillons à double couche de 10mm de diamètre et des éprouvettes H3, greffés et non greffés selon les méthodes de greffage décrites précédemment. Au total, sept conditions ont été testées pour évaluer l'effet du greffage sur le mécanisme de dégradation, en étudiant, ensemble et séparément, les greffages du polyNaSS et du PEG, avec et sans activation de surface :

- Greffage de polyNaSS avec ozonation sur une seule face (couche électrofilée).
- Greffage de polyNaSS sans ozonation sur une seule face (couche électrofilée).
- Greffage du PEG avec ozonation sur une seule face (couche obtenue par spin-coating).
- Greffage du PEG sans ozonation sur une seule face (couche obtenue par spin-coating).
- Greffage sur les deux faces du polyNaSS et du PEG avec ozonation.
- Greffage sur les deux faces de polyNaSS et du PEG sans ozonation.
- Echantillons non greffés.

Les échantillons ont été stérilisés aux UV (30 W, 254nm) pendant 15 min, sur chaque face, et les piluliers ont été stérilisés par autoclave.

L'étude a été réalisée à 37°C avec un suivi à 15 jours, puis tous les mois pendant 6 mois. Après chaque temps, les échantillons ont été lavés pendant 48 heures, séchés pendant 12h et ensuite caractérisés au MEB, par DSC, par SEC, par la mesure de l'angle de contact, par dosage au bleu de toluidine ainsi que par des tests de traction uni-axiale.

7. Étude comparative des colles chirurgicales :

Afin de proposer une méthode de collage du patch, notamment pour des futurs tests *in vivo* chez l'animal, nous avons testé plusieurs colles chirurgicales fournies par l'hôpital Necker-Enfants malades. Il s'agit de colles utilisées comme hémostatiques ou des « sealants » sur des sutures pour éviter la fuite du liquide céphalo-rachidien par exemple. Il existe plusieurs types de colles chirurgicales classées en fonction de leur composition en colles d'origine naturelle ou synthétique, nous trouvons principalement :

- Les colles à base de protéines humaines ou animales
- Les colles à base de protéines et d'aldéhydes.
- Les cyanoacrylates.
- Les colles au polyéthylène glycol.

7.1. Colles chirurgicales :

Nous avons testé des colles d'origine naturelle et synthétique commercialisées en France à l'exception de Duraseal[®], une colle à base de polyéthylène glycol, qui n'est plus commercialisée mais qui était disponible au laboratoire.

7.1.1. TISSEEL[®] :

TISSEEL[®] est une colle chirurgicale qui est constituée de fibrinogène et de la thrombine sous forme de deux solutions. Il s'agit de deux protéines du sang qui jouent un rôle important dans la coagulation. Le mélange des deux solutions permet la formation d'un caillot sanguin très semblable au caillot formé lors de la coagulation du sang. Cette colle est utilisée comme une matrice hémostatique mais aussi comme colle tissulaire pour améliorer la cicatrisation des plaies ou renforcer les sutures.

7.1.2. Floseal[®] :

FLOSEAL[®] est une colle hémostatique constituée d'un mélange de granules de gélatine bovine et de thrombine humaine qui forment une matrice pour assurer une hémostase rapide. Elle est utilisée comme agent hémostatique dans les procédures chirurgicales.

7.1.3. Bioglue® :

Parmi les colles les plus utilisées en chirurgie vasculaire, on retrouve la Bioglue® qui est composée d'albumine bovine et de glutaraldéhyde, présentée sous forme d'une seringue à double réservoir qui permet d'effectuer le mélange au niveau de l'applicateur. Elle est utilisée comme adjuvant hémostatique mais aussi comme adhésif pour coller les tissus et renforcer les sutures chirurgicales.

7.1.4. Duraseal® :

Duraseal® un système de scellement chirurgical (« sealant ») composé de deux solutions : une solution de polyéthylène glycol et une solution de trilycine. Ce « sealant » est utilisé en complément des méthodes standards de réparation durale, telles que les sutures, pour assurer une fermeture étanche.

7.2. Protocole expérimental :

Pour mesurer l'efficacité de ces colles, nous avons mis au point un test de pelage selon la norme ASTM D1876-08(2015) e1. Cet essai permet de déterminer la résistance au pelage d'une colle, en mesurant la force de pelage d'un assemblage de deux matériaux flexibles. Le test est réalisé sur une machine de traction avec deux éprouvettes rectangulaires collées l'une sur l'autre, et fixées sur les mâchoires auto-serrantes par les extrémités libres donnant une forme caractéristique en « T » (Figure 34).

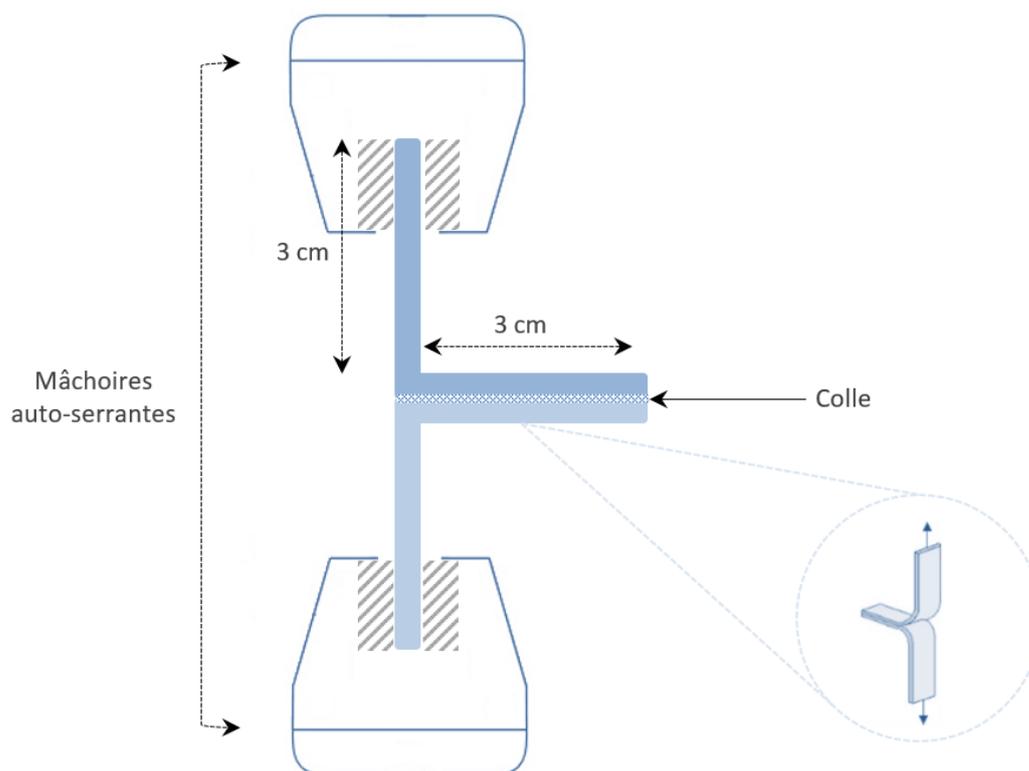


Figure 34 : Schéma représentatif du test de pelage en T (T-Peel).

Nous avons utilisé des éprouvettes de 1,5 cm de largeur et de 6 cm de longueur avec un collage sur 3 cm et une vitesse de traction de 4,23 mm/s (norme ASTM D1876). La résistance au pelage est déterminée sur une longueur spécifiée de la ligne de collage après le pic initial.

Toutes les études, précédemment décrites, ont été réalisées en triplicata en utilisant trois échantillons par conditions et par temps.

**Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et
caractérisation du patch à double couche pour le
traitement de la myéломéningocèle**

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche pour le traitement de la myéloméningocèle

Ce troisième chapitre est consacré dans, un premier temps, à l'élaboration du patch à double couche à travers l'optimisation des paramètres d'électrofilage et la mise en forme du patch par deux méthodes différentes, dont l'objectif est d'obtenir un patch imperméable aux liquides. Nous présentons par la suite les techniques de fonctionnalisation pour obtenir des surfaces bioactives et antiadhésives, ainsi que les résultats des caractérisations physico-chimiques du patch avec et sans greffage. Ensuite, les résultats de viabilité cellulaire et de la morphologie cellulaire seront présentés pour évaluer la cytotoxicité de la PCL et de la PCL fonctionnalisée ainsi que le comportement des cellules à leur contact. Enfin, une dernière partie sera consacrée aux résultats de l'étude des propriétés mécaniques du patch.

1. Élaboration d'un patch imperméable à double couche :

La présente étude vise à développer un patch imperméable pour le traitement de la myéloméningocèle, afin d'éliminer le risque du transfert des fluides et de protéger la moelle épinière. Pour cela, nous procédons, dans un premier temps, à l'optimisation des paramètres d'électrofilage pour obtenir une couche externe, fibreuse propice à la prolifération cellulaire (Figure 35). Cette étape sera suivie par l'élaboration du patch à double couche par deux méthodes différentes, pour la création d'une barrière étanche à travers la couche pleine obtenue par spin coating.

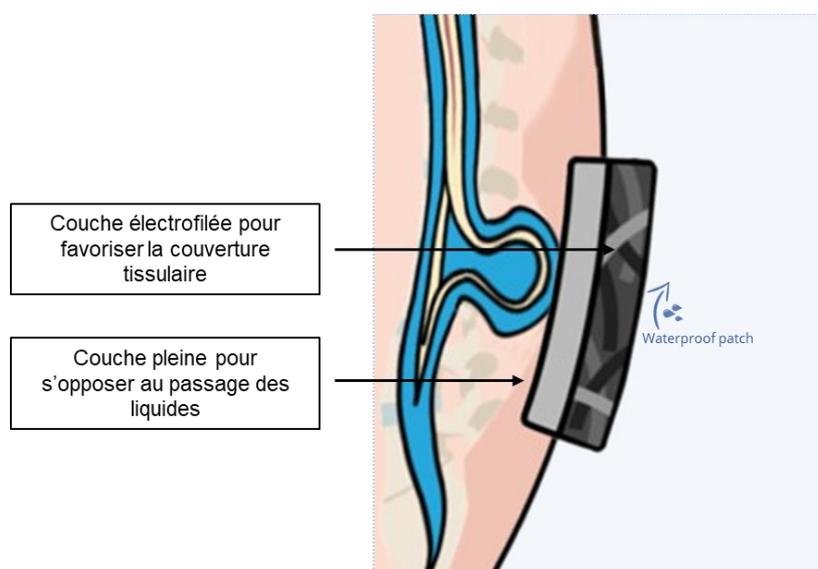


Figure 35 : Concept du patch à double couche pour le traitement de la myéloméningocèle

1.1. Mise au point de la membrane électrofilée :

1.1.1. Optimisation des paramètres d'électrofilage :

Dans le but d'obtenir des fibres homogènes et sans défaut, nous avons fait varier les paramètres jugés importants pour contrôler la taille et la morphologie des fibres électrofilées. Dans un premier temps, nous avons évalué un système de solvant très bien décrit dans la littérature mais qui possède une toxicité élevée. Comme décrit précédemment, le choix du solvant a été fait à partir des travaux réalisés au laboratoire

BEST, avec l'ajout du dichlorométhane en raison de sa constante diélectrique et de sa volatilité plus élevée par rapport au chloroforme.

Nous avons commencé par faire varier le ratio du mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3$: DMF en préparant des solutions à une concentration de 15w%. L'électrofilage a été réalisé avec une tension de 9,5kV, un débit de 2mL/h et une distance de 15 cm.

Les premiers résultats ont montré que seuls les ratios 3 :1 et 4 :1 ont permis d'obtenir des membranes sans défauts (Figure 36, B et C). L'analyse au MEB permet d'observer des fibres homogènes et sans défauts pour le ratio de 3 :1 avec un diamètre moyen de $0,868 \pm 0,229 \mu\text{m}$ et une distribution de diamètres allant de 0,433 à 1,752 μm (Figure 36, F).

De plus, les résultats ont montré qu'une diminution de la proportion du DMF dans la solution, avec un ratio de 5 :1 (Figure 36, D), permettait une augmentation de la taille des fibres, ce qui semble être liée à la diminution de la conductivité de la solution, telle que décrite par Pal *et al.* [141]. L'augmentation du diamètre des fibres a été également observée dans le cas contraire, avec une teneur en DMF élevée, notamment dans la solution avec un ratio de 2 :1 (Figure 36, A), ce qui peut être associé à une viscosité élevée. En effet, l'augmentation de la viscosité entraîne une baisse de la densité nette de charge (quantité de charge électrique par unité d'espace), ce qui réduit la force de répulsion pour étirer les fibres [69].

De même, nous avons observé une augmentation de la viscosité de la solution lorsque la teneur en DMF était de 50 % (1 :1), ce qui a rendu difficile d'injecter la solution d'électrofilage et par conséquent d'empêcher la formation des fibres.

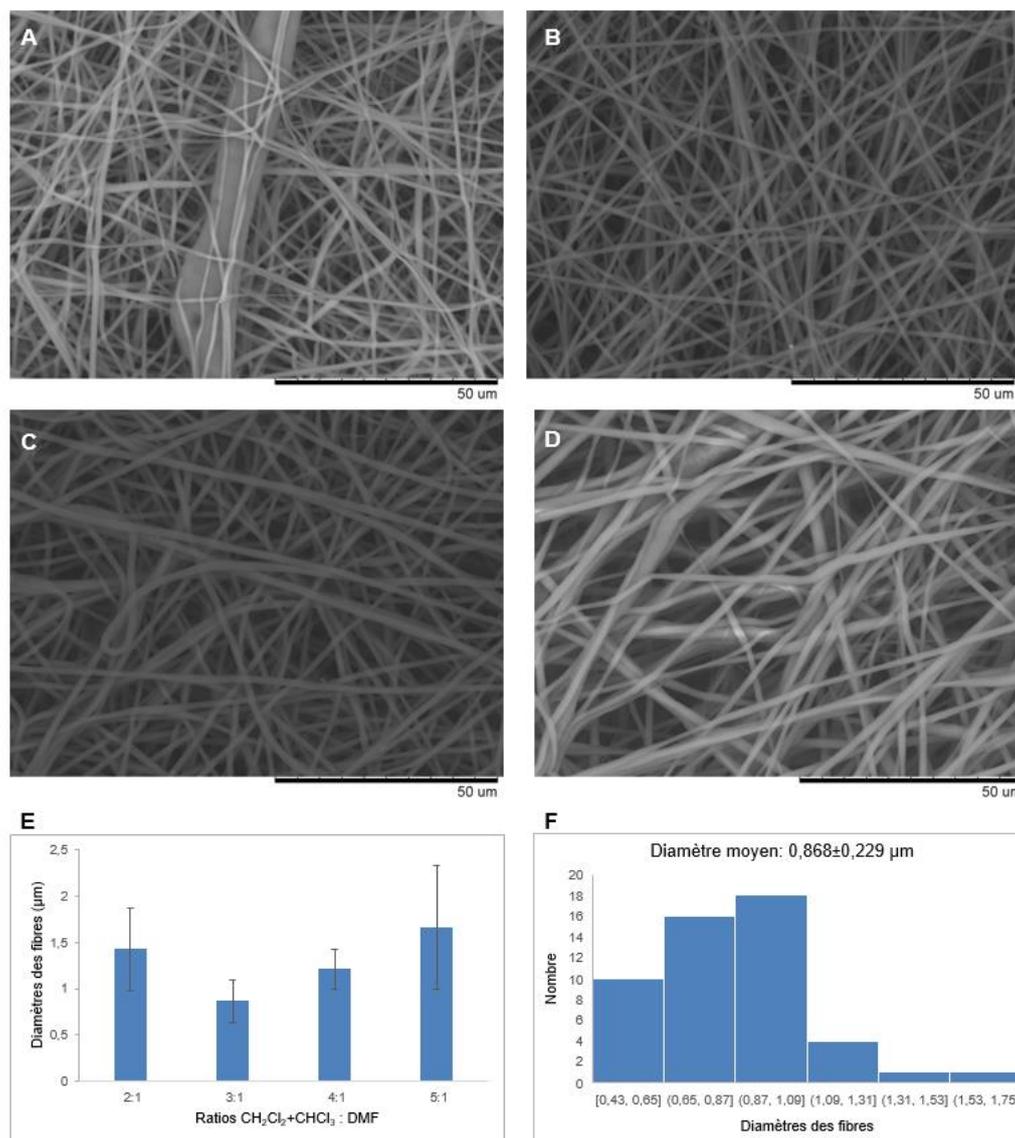


Figure 36 : Images au MEB des membranes électrofilées à différents ratios : **(A)** ratio 2 :1, **(B)** ratio 3 :1, **(C)** ratio 4 :1, **(D)** ratio 5 :1, **(E)** diamètres des fibres électrofilées en fonction du ratio de solvants, **(F)** histogramme de la distribution du diamètre des fibres du ratio 3 :1.

Pour obtenir des fibres de plus faible diamètre, nous avons diminué la viscosité de la solution, en réduisant la concentration à 10w% et en gardant le même système de solvant avec un ratio de 3 :1. La tension a été maintenue à 9,5 kV, le débit à 2mL/h et la distance à 15 cm. Les images au MEB montrent la formation de fibres de très faible diamètre ($0,343 \pm 0,156 \mu\text{m}$), par rapport au précédent essai, mais avec la présence de perles (Figure 37). Ces résultats rejoignent l'étude de Fong *et al.* qui ont montré qu'une solution moins visqueuse et riche en solvant permet la formation de perles à cause

d'une tension de surface élevée, qui transforme le jet en gouttelettes. Ceci est expliqué par l'instabilité de Rayleigh induite par la tension de surface qui contraint un liquide à prendre une surface plus petite en formant une sphère (goutte). Ce phénomène peut être annulé par les forces viscoélastiques du jet, qui lui permettent de résister à cette instabilité et former des fibres lisses [69].

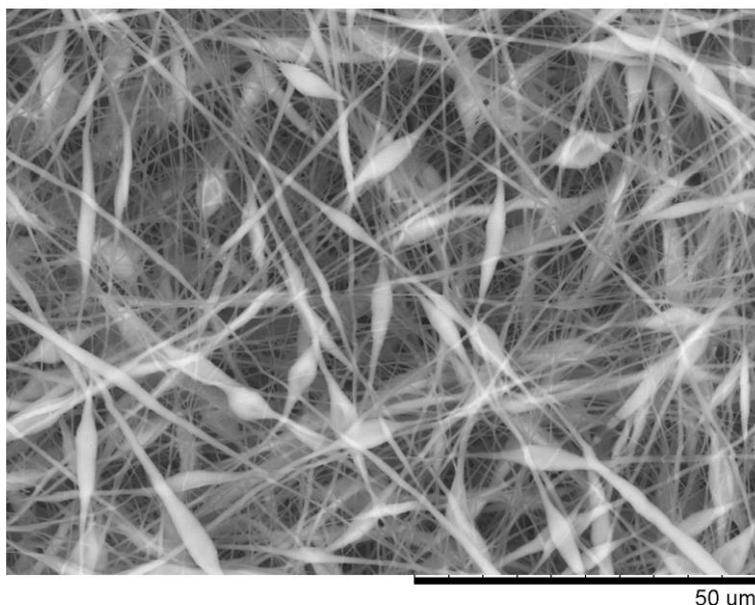


Figure 37 : Membrane électrofilée avec une concentration de 10w%.

D'autre part, la tension appliquée peut avoir un effet sur le diamètre des fibres formées. Nous avons donc augmenté la tension à 12kV dans le but de diminuer la taille des fibres. Les images au MEB permettent d'observer des fibres de diamètre très variés allant de 2,01 μm à 0,25 μm (Figure 38). La formation des fibres de faible diamètre est probablement associée à la ramification du jet sous l'action des forces répulsives élevées.

De plus, nous observons des coudures sur quelques fibres déposées (en forme de boucle), considérées comme des artefacts qui sont dus au flambage des fibres lors de l'impact sur le collecteur [142]. Ces fibres en boucle peuvent modifier les propriétés mécaniques des membranes électrofilées, en se comportant comme des nanoressorts [143].

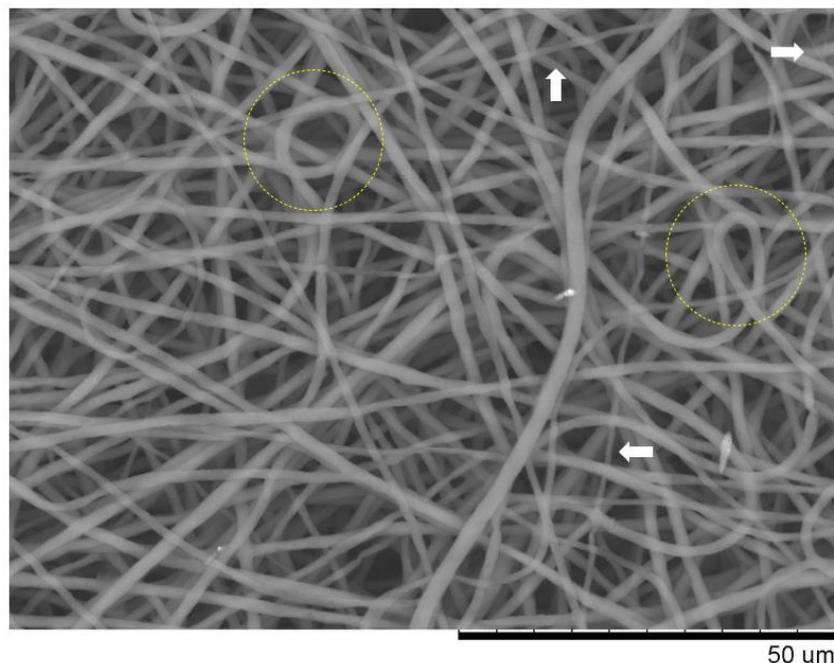


Figure 38 : Membrane électrofilée avec une tension de 12kV.

1.1.2. Optimisation des paramètres d'électrofilage en utilisant l'acide acétique comme solvant :

La toxicité du système de solvant utilisé nous contraint de choisir un solvant à faible toxicité, reconnu par la FDA. Ainsi, dans un second temps nous avons changé de solvant et optimiser les paramètres d'électrofilage dans le but d'obtenir des fibres sans défauts. Nous avons pris comme référence les travaux de Ferreira *et al.* qui ont réussi à produire des fibres sans défauts et d'un diamètre moyen de $1,36 \pm 0,33 \mu\text{m}$, en utilisant uniquement l'acide acétique sans l'ajout d'un autre solvant pour améliorer la conductivité de la solution d'électrofilage [123].

D'abord, nous avons étudié l'effet de la variation de la concentration sur l'électrofilage de la PCL, en allant d'une concentration à 10w% jusqu'à 25w% avec une tension de 6kV, un débit de 0,3 mL/h et une distance de 10cm [123]. Comme décrit précédemment, la concentration à 10w% a permis d'obtenir une solution à faible viscosité qui ne permettait pas de stabiliser le jet et de former des fibres (Figure 39, A). À l'inverse, une concentration élevée à 25w% nous a permis d'obtenir des fibres homogènes et sans défauts avec un diamètre moyen de $1,19 \pm 0,46 \mu\text{m}$ (Figure 39, D).

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

Nous observons également des fibres sans défauts pour les concentrations à 15 et 20w%. Toutefois, les images au MEB ont permis d'observer l'apparition de fibres de faible diamètre probablement par ramification du jet, mais aussi des dépôts de très grand diamètre sous forme d'une goutte étirée (Figure 39, B et C). Ainsi, pour les expériences suivantes, nous avons fixé la concentration à 25w%.

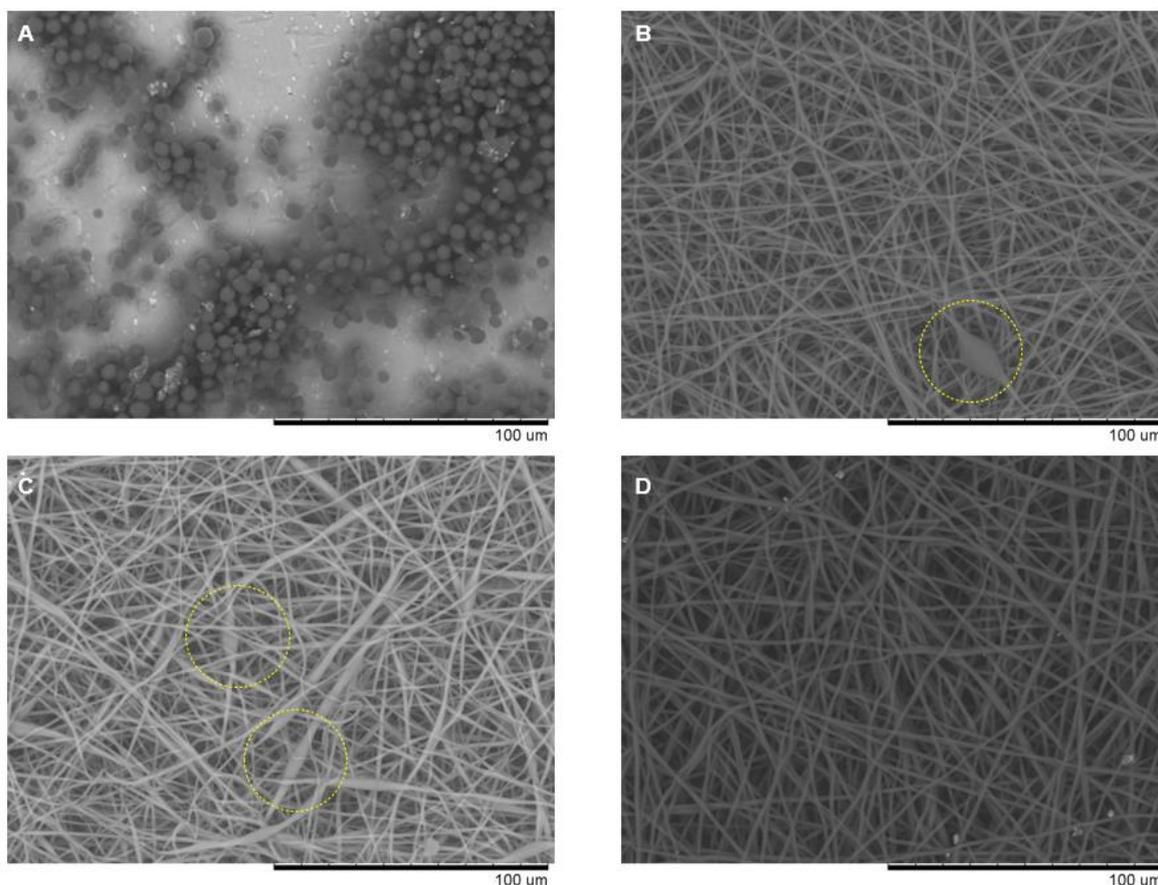


Figure 39 : Images au MEB des membranes électrofilées à différentes concentrations en utilisant l'acide acétique : (A) 10w%, (B) 15w%, (C) 20w%, (D) 25w% (en jaune : les fibres sous forme d'une goutte étirée).

La variation de la tension permet d'observer l'apparition de fibres de très faibles diamètres associées à la ramification du jet en augmentant la tension à 9, à 12 puis à 15kV. Les fibres obtenues avec une tension de 9 et 12kV présentent une forme irrégulière et sont moins étirées, avec un diamètre qui rétrécit donnant un aspect d'un fil qui se dilate à température élevée (Figure 40). Nous observons également des

coudures de fibres avec une tension à 12kV. La tension de 15kV a permis de produire des fibres sans défauts avec un diamètre moyen de $1,24\pm 0,57\ \mu\text{m}$ (Figure 41).

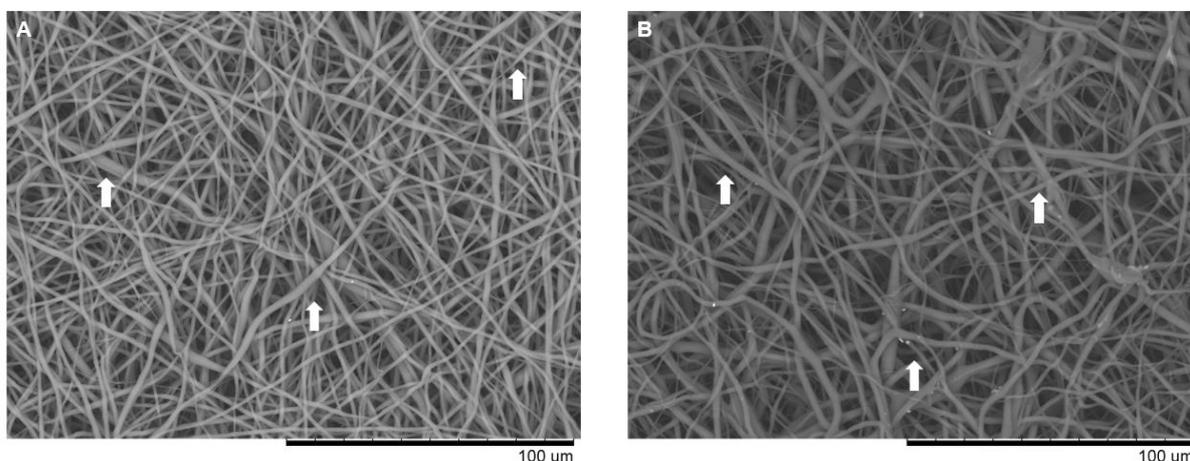


Figure 40 : Images au MEB des membranes électrofilées à 9kV (A) et à 12kV (B) (les flèches montrent les fibres avec une forme irrégulière).

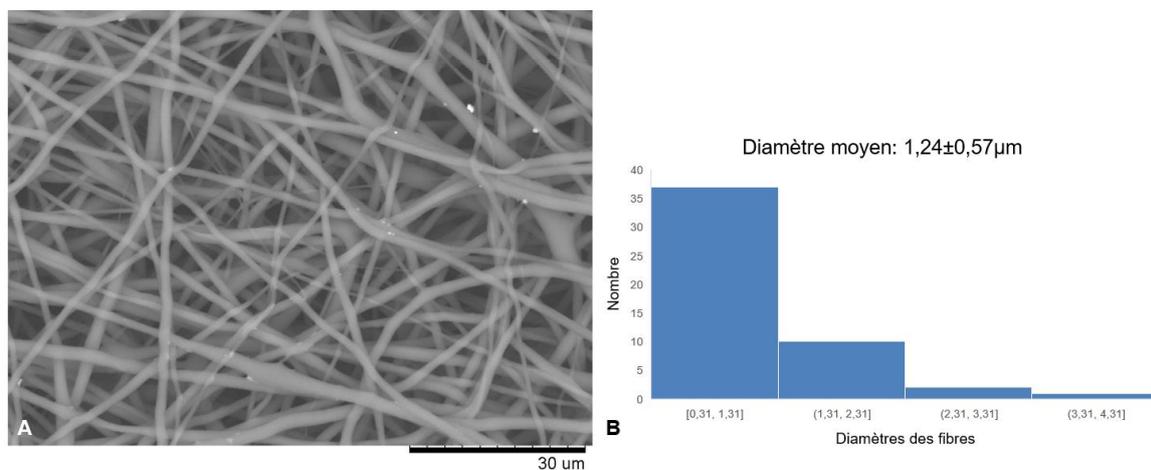


Figure 41 : (A) images au MEB des membranes électrofilées à 15kV, (B) histogramme de la distribution du diamètre des fibres des membranes électrofilées à 15kV.

Dans les expériences qui ont suivies, nous avons augmenté le débit de la solution, dans le but d'obtenir des membranes plus épaisses en 2 heures d'électrofilage. Par conséquent, une tension de 15kV a été choisie pour la suite des expériences, afin d'augmenter les charges répulsives et de contrer l'instabilité du jet qui peut se produire avec un haut débit d'injection.

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

L'augmentation du débit d'injection a été accompagnée par un nombre élevé des fibres en boucle (Figure 42), notamment avec un débit de 0,5 mL/h. De plus, nous observons une variation de l'épaisseur des membranes allant de $17,66 \pm 0,70 \mu\text{m}$ avec un débit de 0,3 mL/h à $46,61 \pm 3,82 \mu\text{m}$ avec un débit de 1,5 mL/h. Une augmentation du diamètre des fibres a été également observée ($1,46 \pm 0,61 \mu\text{m}$ pour 1,5 mL/h). Selon Zagram *et al.*, celle-ci est proportionnelle au volume de la goutte et du diamètre initial du jet d'électrofilage [144,145]. Pour les essais qui ont suivi, un débit de 1,5 ml/h a été retenu.

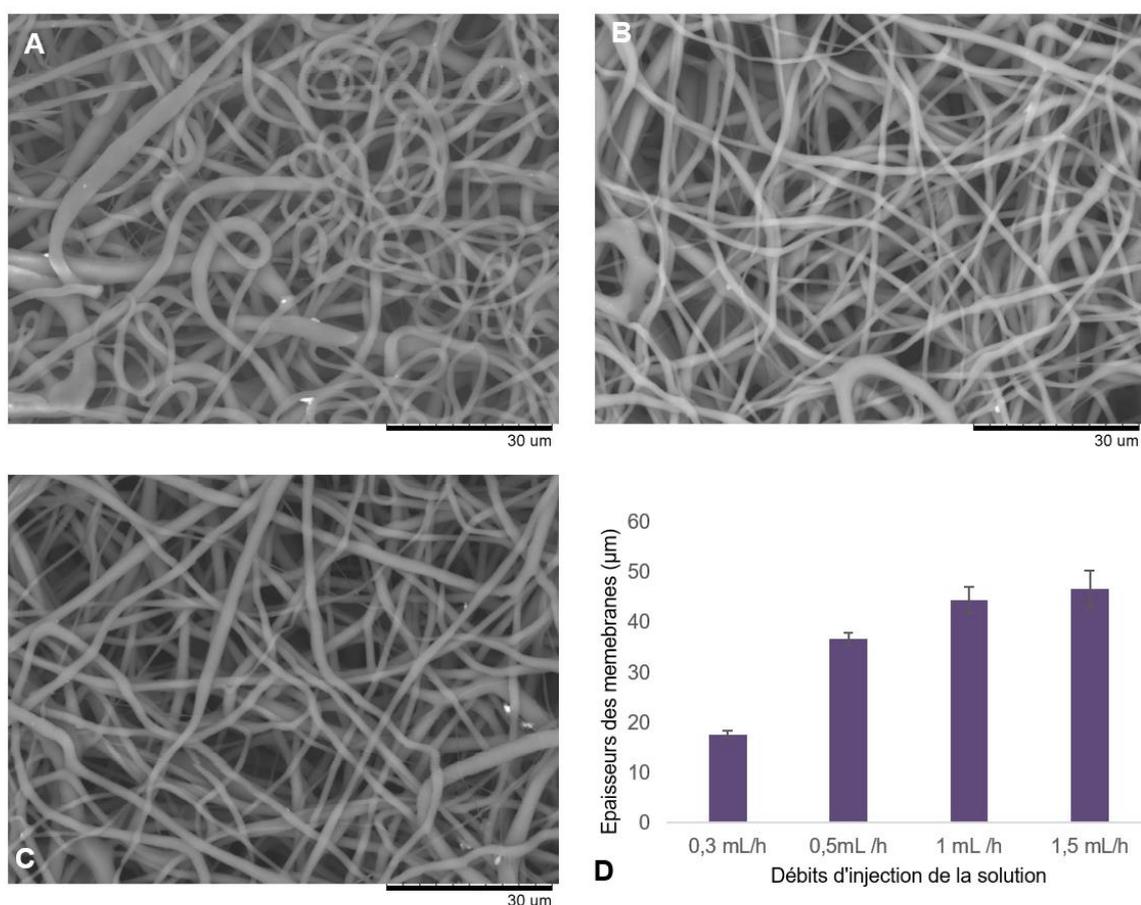


Figure 42 : Images au MEB des membranes électrofilées à différents débits d'injection de la solution : (A) 0,5 mL/h, (B) 1 mL/h, (C) 1,5 mL/h, (D) épaisseur des membranes électrofilées en fonction du débit d'injection de la solution.

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

La distance entre l'aiguille et le collecteur est l'un des paramètres les plus importants dans le processus d'électrofilage, en raison de son effet sur l'intensité du champ électrique, sur le temps d'évaporation et sur la trajectoire du jet. Dans notre étude, l'augmentation de la distance à 15 et 20 cm est proportionnelle à la taille des fibres (Figure 43), ce qui peut être associée à l'atténuation de l'intensité du champ électrique. En augmentant la distance à 25 cm, nous avons obtenu une membrane très fine, difficile à prélever pour des caractérisations au MEB.

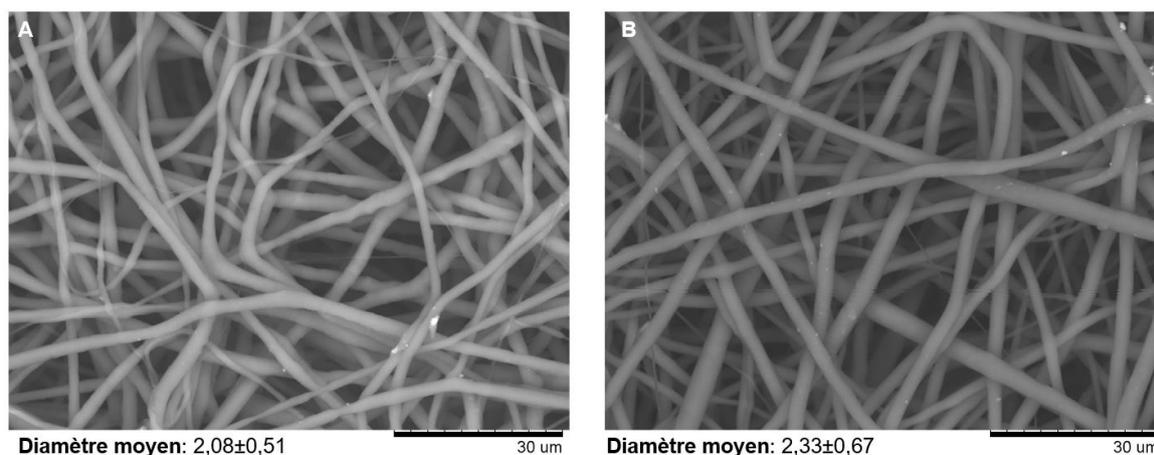
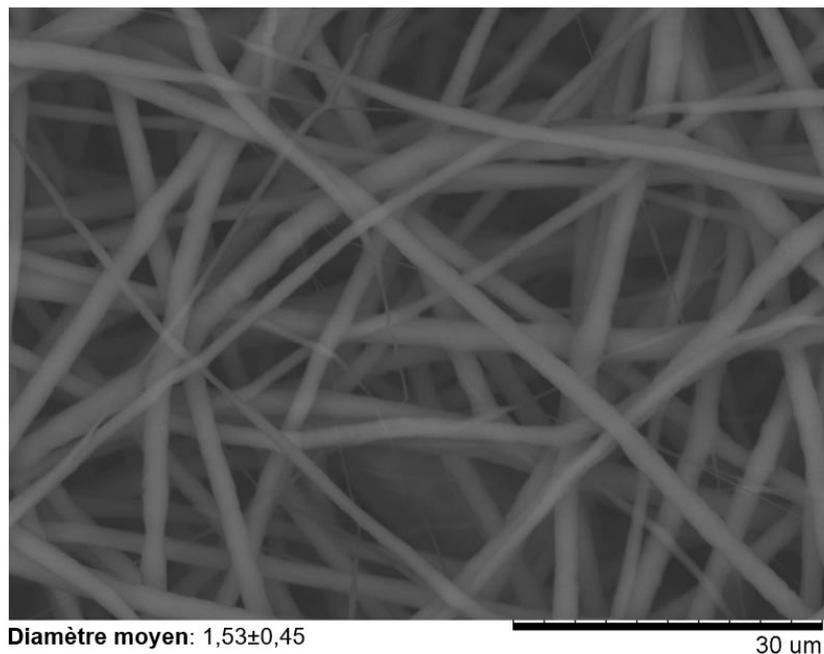


Figure 43 : Images au MEB des membranes électrofilées à 15 cm (A) et à 20 cm (B).

Enfin, nous avons également testé l'électrofilage de la PCL dans l'acide acétique en utilisant les paramètres retenus lors des premières expériences, à savoir : une tension de 9,5kV, une distance de 15 cm et un débit de 2mL/h, tout en gardant la concentration à 25w%. Les images au MEB montrent des fibres sans défauts avec un diamètre moyen $1,52 \pm 0,45$ μm (Figure 44). Ainsi, ces paramètres ont été retenus pour la suite des expériences.



Figures 44 : Membrane électrofilée avec une concentration de 25w%, une tension de 9,5 kV, une distance de 15cm et un débit d'injection de 2mL/h.

1.2. Élaboration et Caractérisation du patch à double couche :

Pour l'élaboration du patch à double couche, nous avons utilisé deux méthodes différentes, à savoir :

- L'enduction par centrifugation (spin coating sur le collecteur) d'une solution de PCL identique à celle de l'électrofilage, puis électrofilage sur le film obtenu avant séchage.
- L'enduction par centrifugation d'une solution de PCL dans l'acétone sur une boîte de pétri, suivie de la pose d'une membrane électrofilée sur ce film avant séchage.

Les patches obtenus ont été caractérisés au MEB, notamment par des images de coupes transversales. Les images montrent que les deux méthodes ont permis d'avoir une cohésion entre le film et la membrane électrofilée.

De plus, nous observons que la face film obtenue avec la première méthode (M_1) présente des rugosités de surface (Figure 45, B), qui semblent être associées à la

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

rugosité de surface du support (feuille en aluminium), mais aussi au dépôt des premières fibres par électrofilage lors de l'élaboration du patch.

Pour cette méthode, seuls les paramètres d'électrofilage, retenues avec le système à trois solvants ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3$: DMF), ont permis la fabrication du patch. En effet, le jet d'électrofilage sur une solution de PCL dissoute dans l'acide acétique était constamment dévié vers les autres parties du collecteur, ce qui peut être lié à la faible conductivité de la solution.

La deuxième méthode (M_2) a permis d'obtenir une face film lisse (Figure 45, E), grâce au support en verre utilisé et l'étalement de la solution par la pression exercée en posant la membrane dessus.

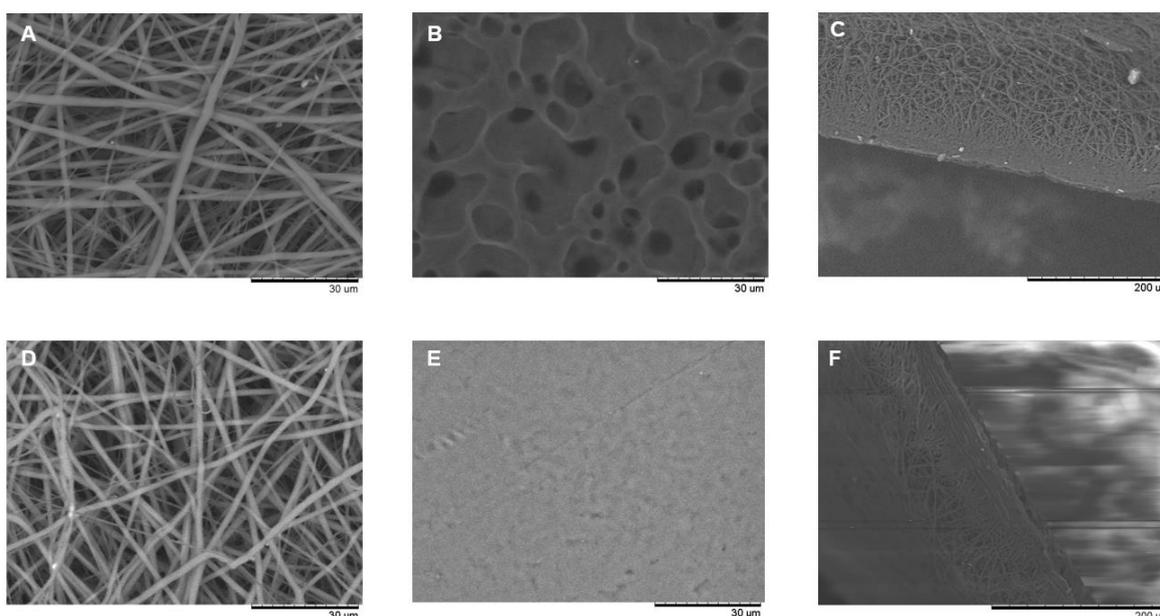


Figure 45 : Images au MEB des patches à double couche élaborés par deux méthodes : (A) face membrane électrofilée du patch M_1 , (B) face film obtenue par spin coating du patch M_1 (surface rugueuse), (C) coupe en épaisseur du patch M_1 montrant la cohésion entre les deux couches, (D) face membrane électrofilée du patch M_2 , (E) face film obtenu par spin coating du patch M_2 (surface lisse), (F) coupe en épaisseur du patch M_1 montrant la cohésion entre les deux couches.

À travers les images MEB, nous pouvons en déduire que la couche pleine va empêcher le passage des liquides. Toutefois, nous avons testé la perméabilité des deux patches, grâce à un filtre métallique et une seringue remplie d'eau (Figure 46).

À faible pression, un blocage a été ressenti empêchant le passage de l'eau par rapport à une membrane électrofilée à une seule couche. Lorsque nous exerçons une pression importante, l'eau passe sur les bords du filtre et ne traverse pas le patch. Ainsi, les deux méthodes ont permis d'obtenir un patch imperméable aux liquides, qui permet de répondre à un point important du cahier de charge pour le traitement de la myéloméningocèle.

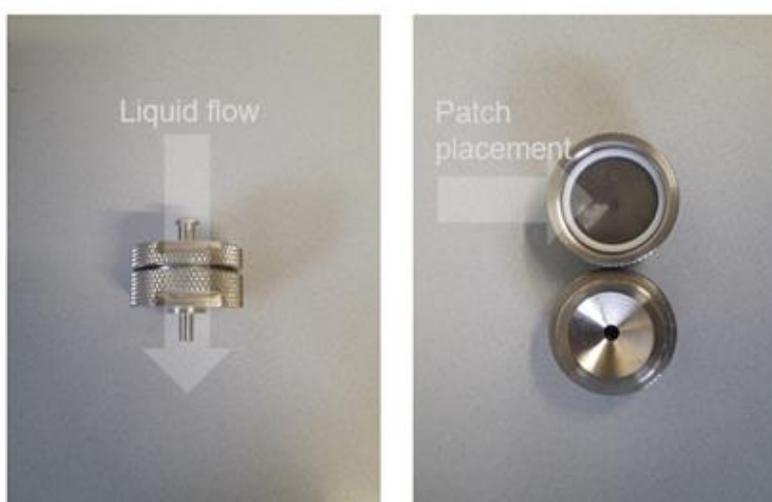


Figure 46 : Filtre utilisé pour vérifier la perméabilité des patches.

2. Fonctionnalisation de surface :

2.1. Greffage du polyNaSS :

Le greffage du polyNaSS vise à améliorer la réponse biologique au contact de la face externe électrofilée, destinée à mimer la matrice extracellulaire. Tel que décrit précédemment, le polyNaSS possède des propriétés bioactives qui peuvent améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire.

Ce greffage a été optimisé en utilisant la technique du "Grafting from". Dans cette méthode, des radicaux libres sont créés à la surface de la PCL avec ou sans activation préalable. L'immersion des échantillons de PCL dans une solution aqueuse de NaSS à 0,7M et leur irradiation aux UV induisent la décomposition des radicaux et initient la

polymérisation radicalaire du NaSS à la surface (Figure 47). Des tests d'activation de surface ont été réalisés dans un premier temps avec une étape d'ozonation de 10 et 20 minutes, en se basant sur les travaux antérieurs du laboratoire BEST [97, 146].

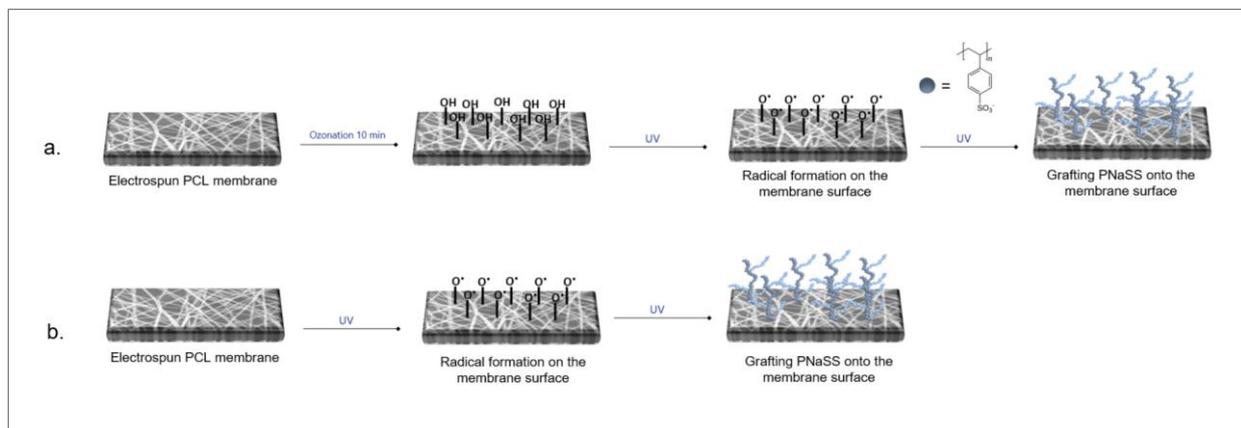


Figure 47 : Mécanisme de greffage du polyNaSS avec (a) et sans (b) activation de surface.

2.1.1. Dosage colorimétrique au bleu de toluidine :

Le dosage colorimétrique a permis de déterminer la quantité du polyNaSS greffé sur la surface. Les échantillons non greffés, exposés aux UV et ozonés ont été choisis comme témoins, car leurs taux de greffage correspondent à une adsorption non spécifique du BT sur leurs surfaces. Les taux de greffage sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ en raison de la porosité des membranes greffées.

Les résultats montrent un taux de greffage élevé pour les échantillons greffés comparé aux témoins, avec des taux moyens de $62,29 \pm 11,68 \mu\text{mol/g}$ pour le greffage avec 10 minutes d'ozonation, $26,78 \pm 10,82 \mu\text{mol/g}$ pour le greffage avec 20 minutes d'ozonation et $21,94 \pm 8,01 \mu\text{mol/g}$ pour le greffage direct au UV sans étape d'ozonation, ce qui confirme la complexation du BT avec les fonctions SO_3^- du polyNaSS (Figure 48). Les taux de greffage du polyNaSS sont similaires entre les deux patch (M_1 et M_2) (cf. Annexe I pour M_2)

Nous observons également un taux de greffage élevé des échantillons greffés avec 10 minutes d'ozonation par rapport aux greffés directement aux UV. Ceci peut être expliqué par la création d'une quantité importante de radicaux libres sur les surfaces ozonées qui permettent par la suite d'initier la polymérisation radicalaire. Cependant,

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

une baisse de taux de greffage a été observée en activant la surface pendant 20 minutes, ce qui peut être associé à une érosion de surface initiée par l'ozonation et aggravée par l'irradiation aux UV.

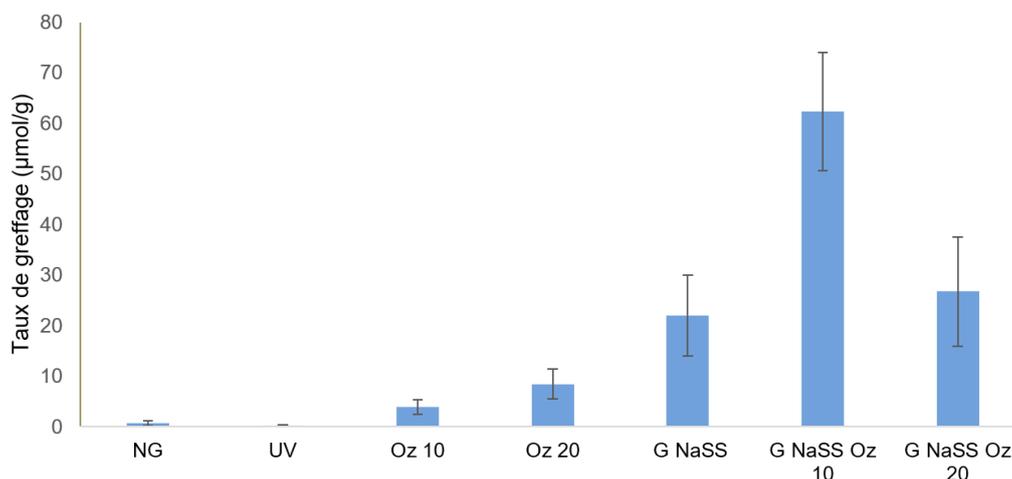


Figure 48 : Taux de greffage du polyNaSS avec et sans activation de surface.

Après stérilisation et conditionnement pour réaliser les premiers tests de morphologie cellulaire, une dégradation des fibres a été observée sur les échantillons greffés par ozonation (Figure 49). C'est pourquoi, nous avons effectué par la suite des greffages en réduisant le temps d'exposition à l'ozone avec une activation de surface de 5 minutes. Les résultats ont montré un taux de greffage de $89,65 \pm 19,43$ (Figure 50), ce qui confirme qu'un temps réduit d'ozonation permet de créer des groupes réactifs en surface afin d'initier la polymérisation, sans affecter la surface de l'échantillon. Ce temps d'ozonation a été retenu pour la suite des expériences.

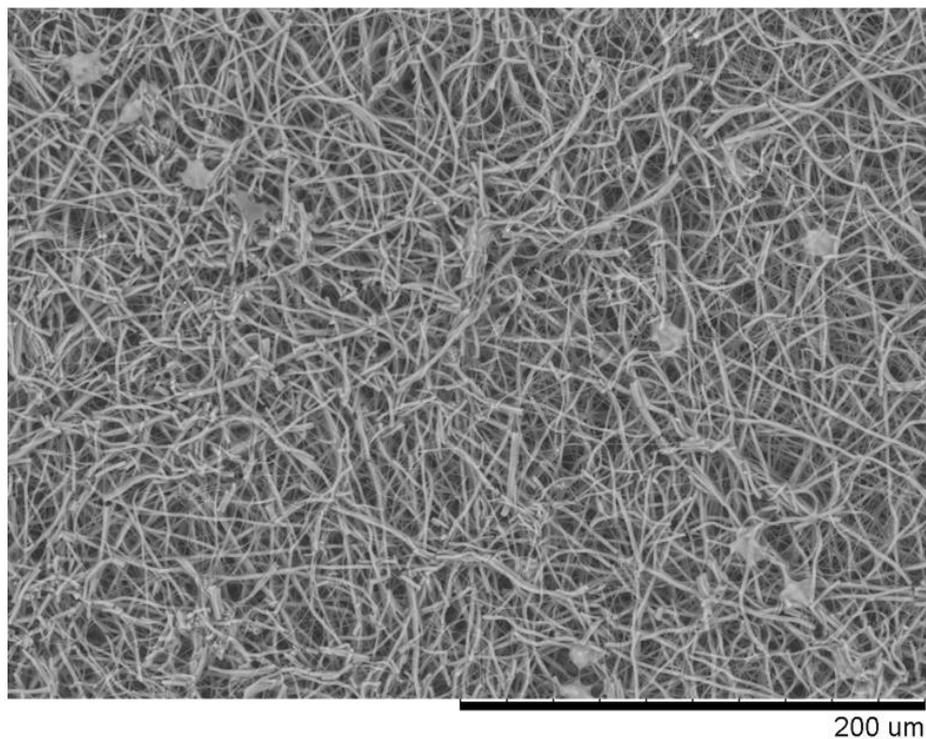


Figure 49 : Membrane greffée par ozonation de 10 minutes après conditionnement, stérilisation et culture cellulaire.

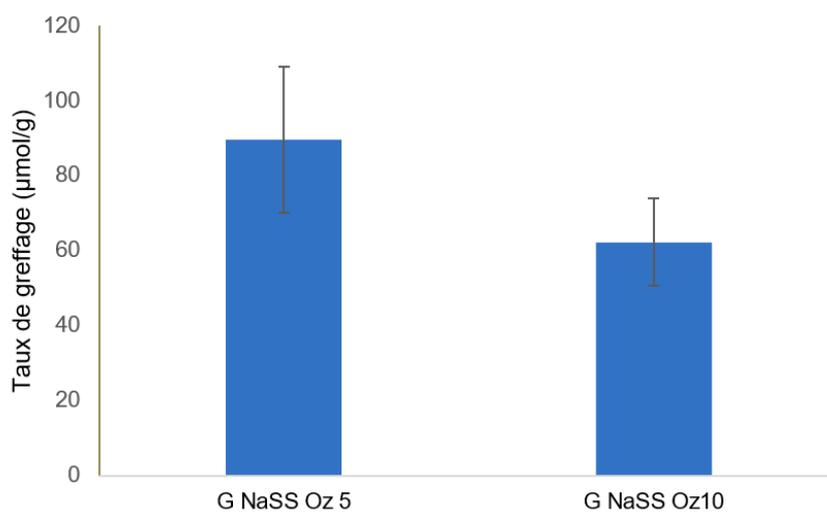


Figure 50 : Taux de greffage du polyNaSS avec ozonation de 5 et 10 minutes.

2.1.2. Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie :

L'analyse élémentaire des surfaces greffées a été réalisée par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX). Les résultats ont révélé la présence d'un taux de soufre et de sodium caractéristiques du NaSS (Tableau 8). Des taux moyens de $0,48 \pm 0,01\%$ de soufre et de $0,46 \pm 0,07\%$ de sodium ont été enregistrés sur les faces des membranes greffées avec ozonation par rapport aux surfaces non greffées, où aucun taux de soufre ou de sodium n'a été enregistré. Toutefois, ce taux reste très faible sur les faces membranes greffées directement aux UV, ce qui rejoint les résultats observés au dosage colorimétrique.

Tableau 8 : Analyse élémentaire des surfaces de PCL greffées et non greffées au polyNaSS.

	C (%at.)	O (%at.)	S (%at.)	Na (%at.)
PCL non greffée	$83,10 \pm 0,80$	$16,89 \pm 0,80$	-	-
PCL greffée avec ozonation	$81,67 \pm 2,14$	$17,39 \pm 2,05$	$0,48 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,07$
PCL greffée sans ozonation	$80,52 \pm 1,61$	$19,42 \pm 1,58$	$0,07 \pm 0,01$	-

Les cartographies élémentaires EDX ont montré une distribution homogène des différents éléments chimiques, à savoir le carbone, l'oxygène, le soufre et le sodium, ce qui montre que le greffage est homogène sur la surface de la PCL greffée avec ozonation (Figure 51).

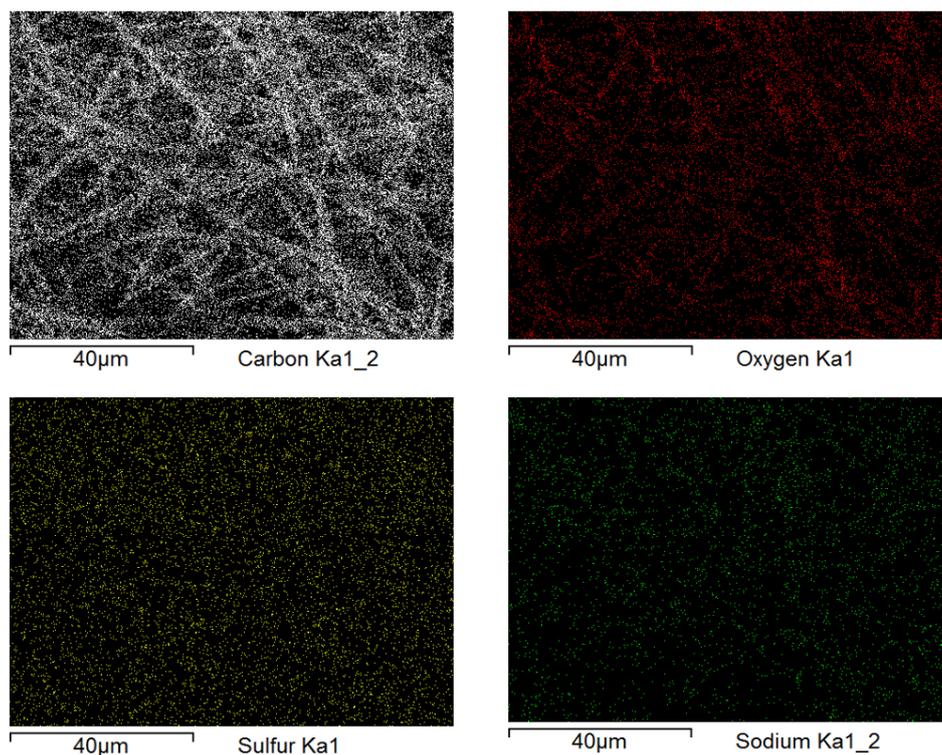


Figure 51 : Distribution des éléments sur une surface de PCL greffée avec ozonation.

2.1.3. Mesure de l'angle de contact :

La présence du polyNaSS sur les échantillons greffés peut être confirmée par la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau. En effet, la présence des groupements polaires, tels que du SO_3^- , en surface permettent d'interagir avec les molécules d'eau par des liaisons hydrogène [147], ce qui se traduit par une diminution de l'angle de contact (surface hydrophile).

Les résultats ont montré une amélioration de la mouillabilité des surfaces greffées avec et sans ozonation, par absorption complète de la goutte d'eau déposée, ce qui suggère la présence des groupement SO_3^- sur la surface des fibres (Figure 52).

Nous observons également une vitesse d'absorption plus élevée sur les échantillons greffés avec ozonation, qui est quasi instantanée comparés aux échantillons greffés sans ozonation, sur lesquels la goutte s'absorbe au bout de quelques secondes, sans dépasser les 10 secondes avant la prise d'image (vidéo).

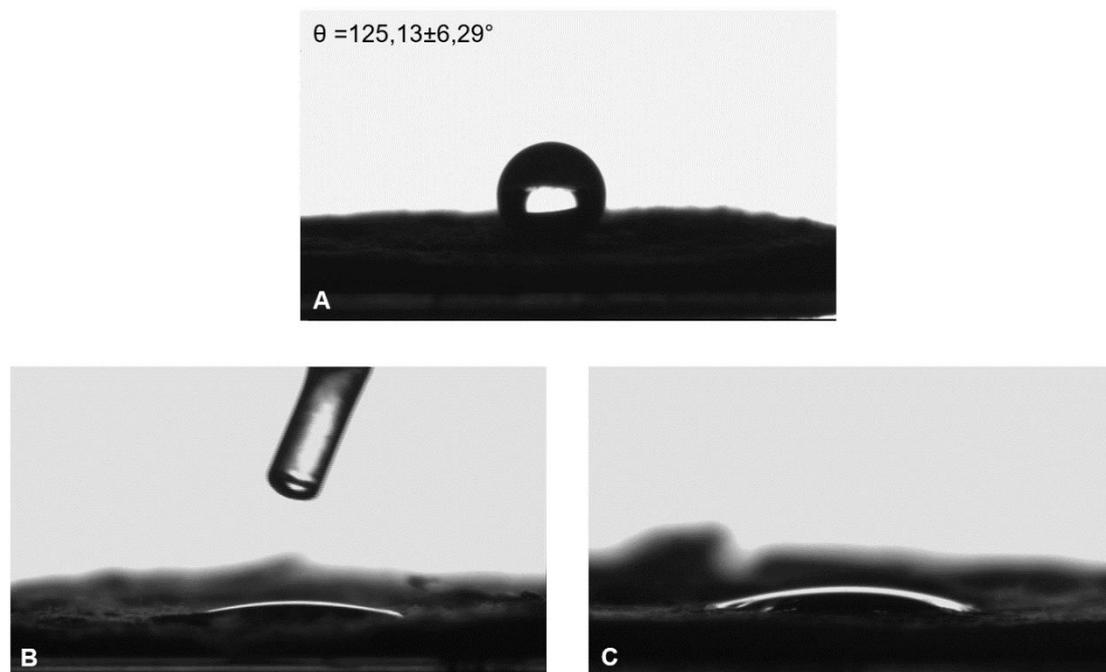


Figure 52 : Évaluation de l'hydrophilie des surfaces : (A) non greffées, (B) greffées au polyNaSS avec ozonation, (C) greffées au polyNaSS sans ozonation.

2.1.4. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée :

L'analyse des spectres infrarouges des membranes électrofilées révèle la présence des bandes caractéristiques de la polycaprolactone représentées dans le tableau 9 et figure 53.

Tableau 9 : Attribution des bandes FTIR de la polycaprolactone.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution [148, 149]
2940,8	CH ₂ : élongation asymétrique
2864	CH ₂ : élongation asymétrique
1725	C=O : élongation
1291,3	C-O, C-C : élongation
1238,8	C-O-C : élongation asymétrique
1185,9	C-O-C : élongation symétrique
1166	C-O, C-C : élongation

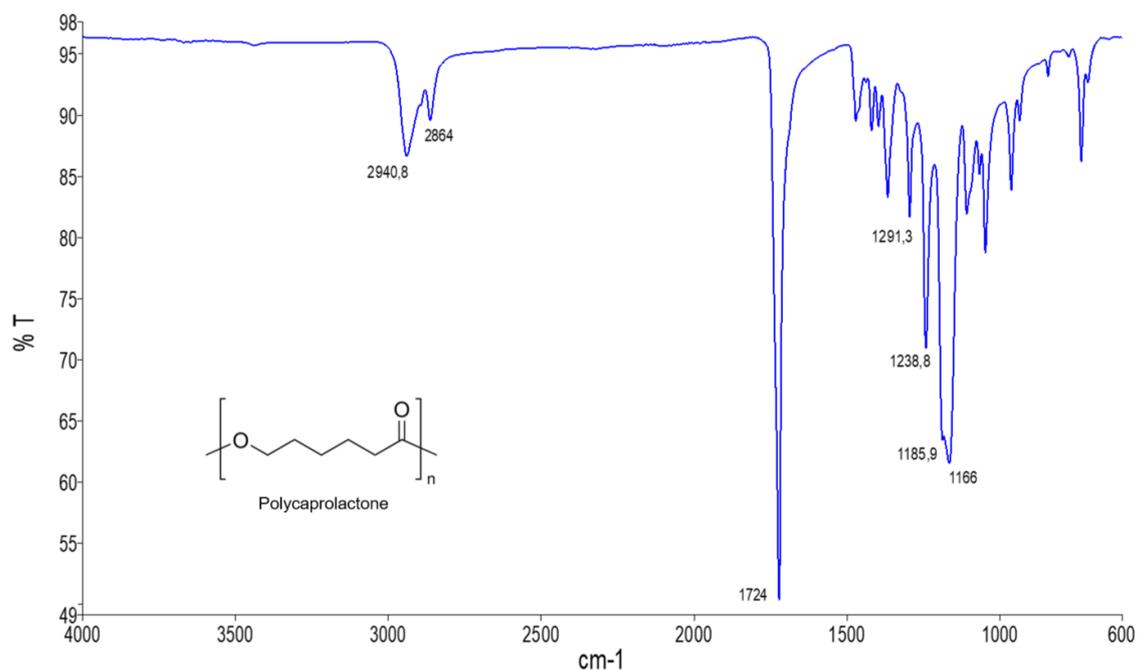


Figure 53 : Spectre infrarouge de la polycaprolactone.

Cependant, nous observons l'apparition d'une bande de faible intensité à 1538,5 cm⁻¹ sur les surfaces électrofilées avec le système à trois solvants (CH₂Cl₂+CHCl₃ : DMF) (Figure 54). Nous constatons que celle-ci n'apparaît pas sur les spectres des échantillons exposés aux UV, ozonés et greffés qui ont été lavés pendant au moins 24h, ou sur les membranes élaborées avec de l'acide acétique. La présence de cette bande semble être liée aux résidus de solvants, notamment ceux du DMF sur lequel nous pouvons retrouver cette bande caractéristique de l'élongation de la liaison =C-N, qui se situe, selon Saldyka *et al.* entre 1506,4 et 1566 cm⁻¹, et à 1502 cm⁻¹ selon Venkata *et al.* [150,151].

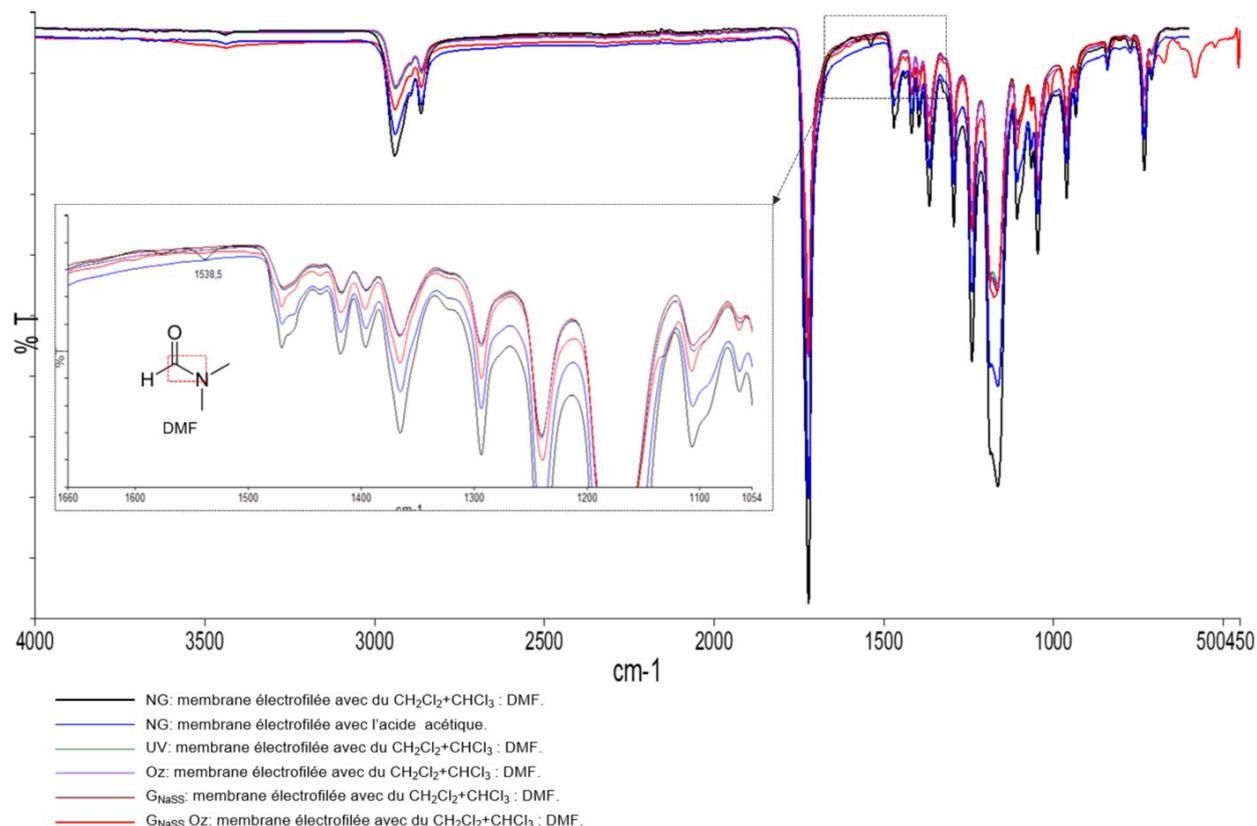


Figure 54 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées, ozonées, exposées aux UV et non greffées en utilisant le mélange de solvant et non greffées en utilisant l'acide acétique.

Les spectres des surfaces greffées avec ozonation ont montré l'apparition de deux bandes caractéristiques de la liaison C=C du cycle aromatique du polyNaSS à 1009 cm⁻¹ et à 672,36 cm⁻¹ [152] (Figure 55), avec une augmentation de l'intensité de la bande caractéristique de la liaison C-O-C, ce qui semble être associé au greffage à partir des radicaux créés par ozonation. Néanmoins, comme pour l'analyse à l'EDX, ces bandes n'apparaissent pas sur les spectres des échantillons greffés sans activation de surface, probablement à cause de la faible quantité de polyNaSS greffée en surface, mais aussi de la forte contribution des liaisons chimiques de la PCL, empêchant ainsi de détecter la présence du polyNaSS.

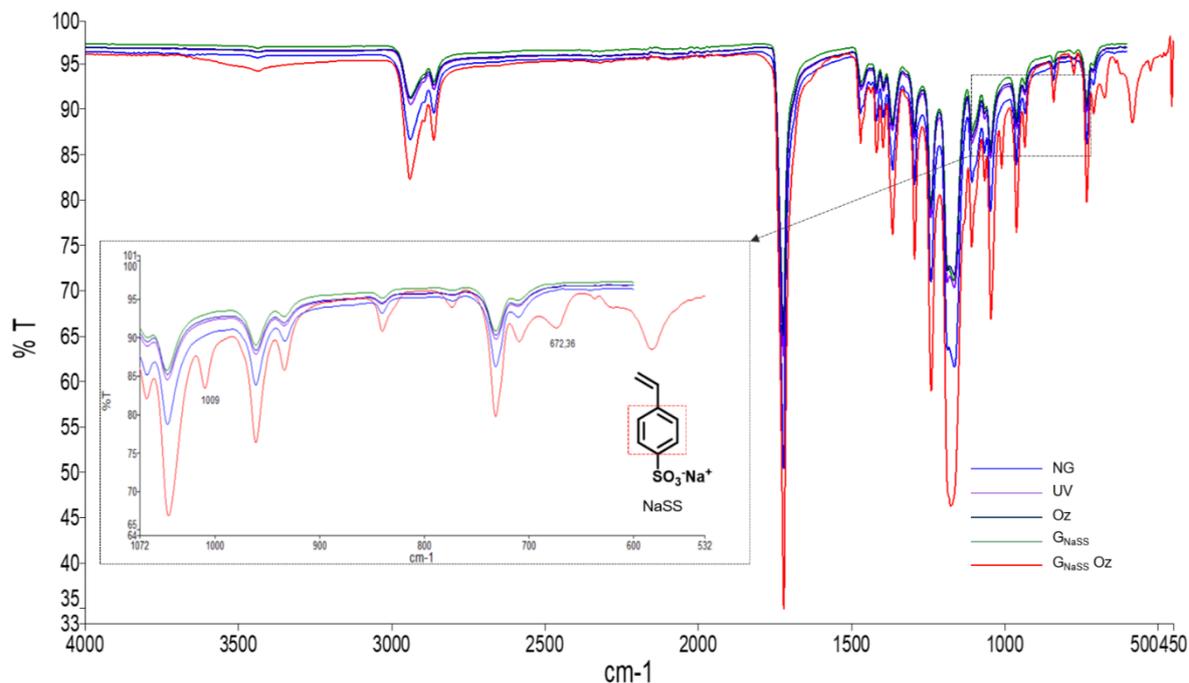


Figure 55 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées avec et sans activation de surface, ozonées, exposées aux UV et non greffées.

2.2. Greffage du polyéthylène glycol :

Afin d'éviter l'accolement du patch à la moelle épinière, nous avons choisi de fonctionnaliser la surface interne avec du polyéthylène glycol afin, de bénéficier de ses propriétés antiadhésives. Le greffage a été optimisé en utilisant la technique du "Grafting from" avec ou sans activation préalable. Dans un premier temps, nous avons utilisé les mêmes paramètres que pour le greffage du NaSS, à savoir : une concentration de 0,7 M et un temps de greffage d'une heure, avec et sans ozonation de 5 minutes.

Pour le greffage avec ozonation, nous avons observé un durcissement des échantillons avec une perte de la structure en double couche, notamment de la face électrofilée (Figure 56, A, B et C). La diminution du temps de greffage à 30 minutes n'a pas empêché d'obtenir les mêmes résultats. Nous avons donc diminué la concentration jusqu'à 0,25 M, ce qui nous a permis de conserver la structure du patch.

Des résultats similaires ont été observés après le greffage du PEG sans ozonation (Figure 56, D). Toutefois, la conservation de la structure était également possible à

0,25 M pendant 45 minutes, ce qui nous a permis de comparer les deux temps de greffage (30 et 45 minutes).

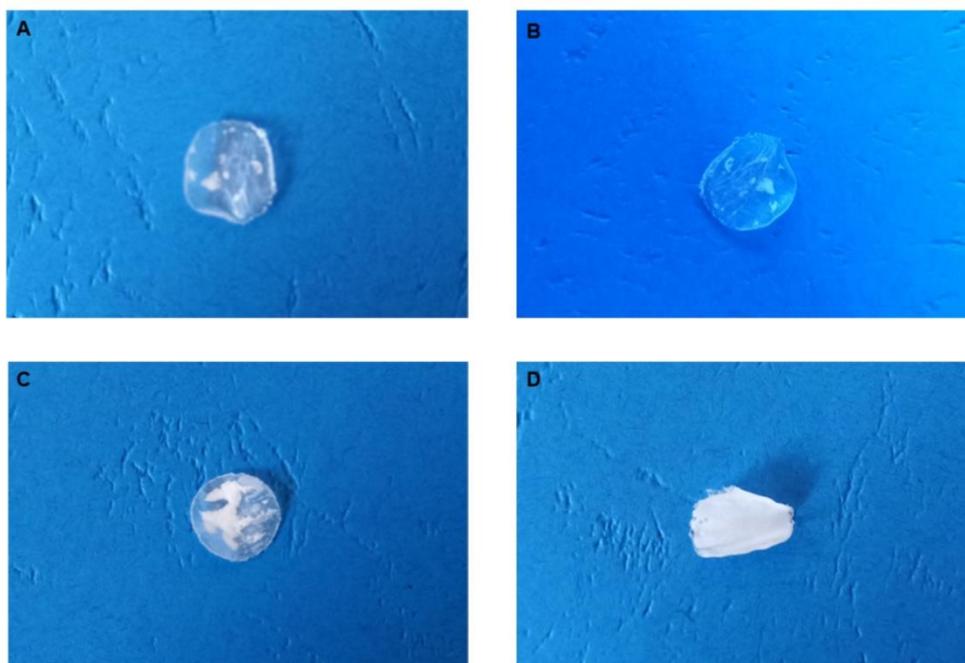


Figure 56 : Échantillons greffés au PEG à 0,7 M pendant 1 heure (A) et 30 minutes (B), échantillons greffés au PEG à 0,25 pendant 1 heure avec (C) et sans ozonation (D).

2.2.1. Mesure de l'angle de contact :

La présence du PEG sur la face interne des échantillons peut être confirmée par la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau, en raison du caractère hydrophile du PEG. Les résultats ont montré une diminution de l'angle de contact jusqu'à $37,1 \pm 4,7^\circ$ pour les surfaces greffées avec ozonation et jusqu'à $49,2 \pm 7,9^\circ$ pour les surfaces greffées sans ozonation pendant 45 minutes (Figure 57).

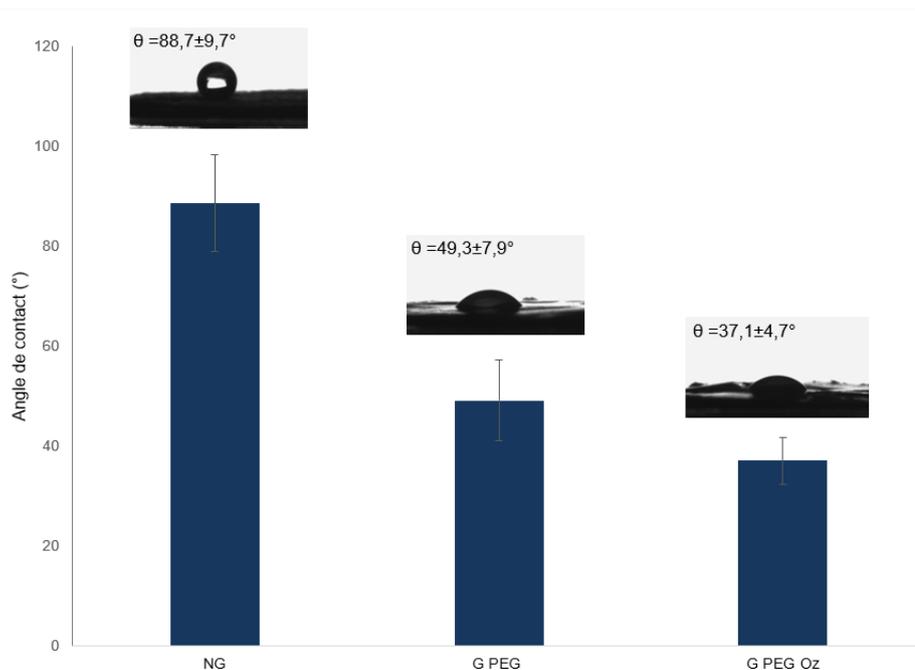


Figure 57 : Mesure de l'angle de contact des surfaces non greffées (NG) et greffées au PEG avec (G PEG) et sans activation (G PEG Oz) de surface.

2.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée :

L'analyse des spectres infrarouges ne permet pas de révéler la présence du PEG sur la surface des films (Figure 58, A). En effet, les spectres de la PCL non greffée et du PEG acrylate se superposent avec plusieurs bandes en commun, à l'exception des bandes de vibrations des liaisons C=C de l'acrylate qui apparaissent à 1634 cm^{-1} et $986,36 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 58, B). Nous constatons également la présence d'une bande caractéristique à $3669,5 \text{ cm}^{-1}$ de la liaison OH sur les films de PCL et sur les granules de PCL avant mise en forme (Figure 58, C), qui peut être liée à la présence de l'eau retenue après conservation à 4°C .

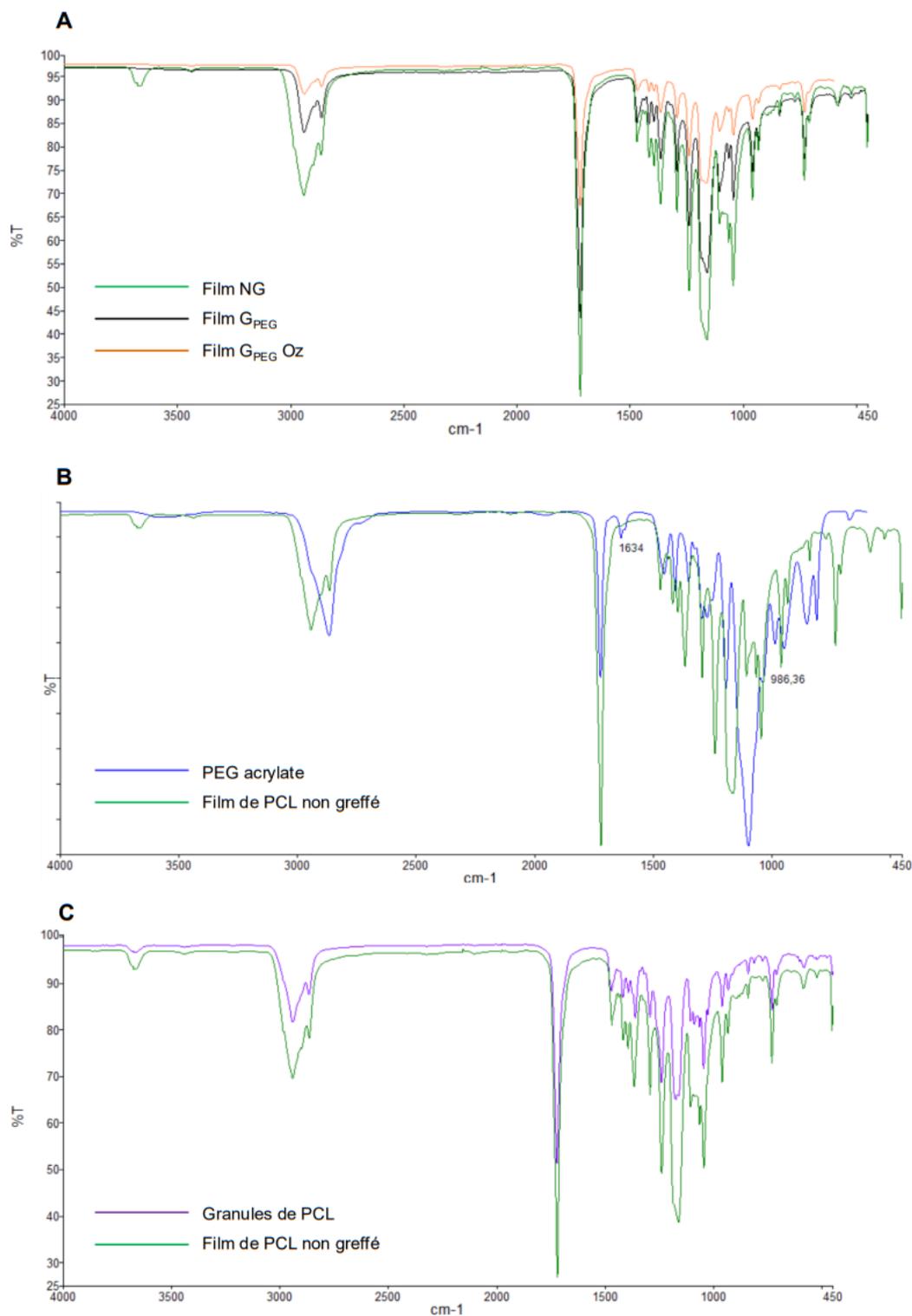


Figure 58 : (A) comparaison des spectres infrarouges des membranes greffées au PEG et non greffées, (B) comparaison des spectres infrarouges des films de PCL et du PEG acrylate, (C) Comparaison des spectres infrarouges des granules de PCL et des films de PCL.

2.2.3. Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie :

De même, l'analyse à l'EDX ne permet pas de détecter la présence du PEG sur la surface de la PCL qui présente les mêmes éléments dans sa structure, à savoir : le carbone et l'oxygène. La présence en faible quantité du PEG à la surface n'a aucun impact sur le changement de pourcentage des éléments suscités (Tableau 10).

Tableau 10 : Analyse élémentaire des surfaces de PCL greffées et non greffées au PEG.

	C (%at.)	O (%at.)
PCL non greffée	80,41±2,57	19,58±2,58
PCL greffée avec ozonation	79,01±0,43	20,72±0,45
PCL greffée sans ozonation	79,33±0,09	20,59±0,06

2.2.4. Dosage au bleu de toluidine :

Le dosage au bleu de toluidine ne montre pas des taux de greffage élevés, en raison de l'adsorption non spécifique du BT à la surface des échantillons greffés avec du PEG, qui ne possède pas de groupements anioniques capables de complexer avec le BT (Figure 59).

Nous pouvons en déduire que le greffage aux UV, à l'aide de la plaque opaque en téflon, nous permet de fonctionnaliser que les faces exposées, et nous donne ainsi la possibilité de greffer, sur chaque face, un polymère différent (Figure 60). La plaque en téflon permet de fournir un support pour exposer une seule face, et de créer une barrière pour empêcher l'irradiation de la deuxième face.

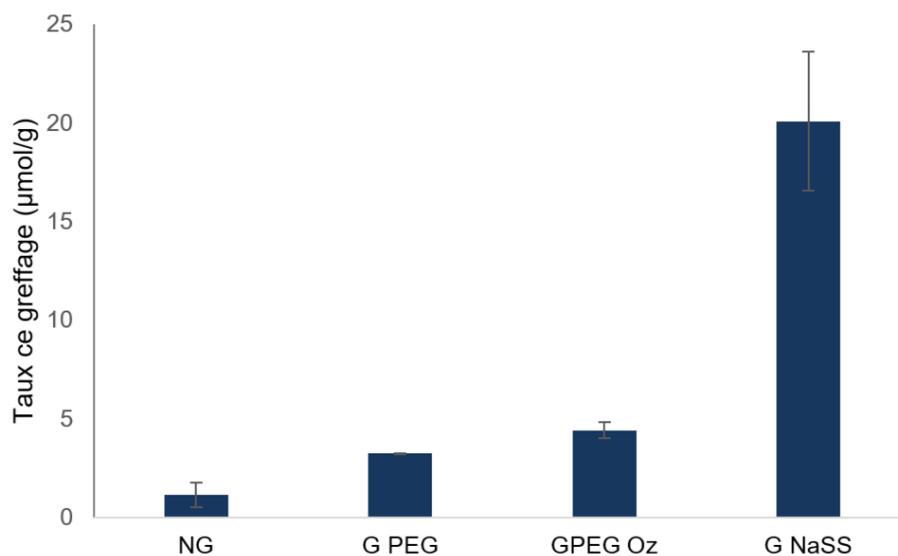


Figure 59 : Taux de greffage du PEG avec et sans activation de surface par rapport au greffage du polyNaSS.

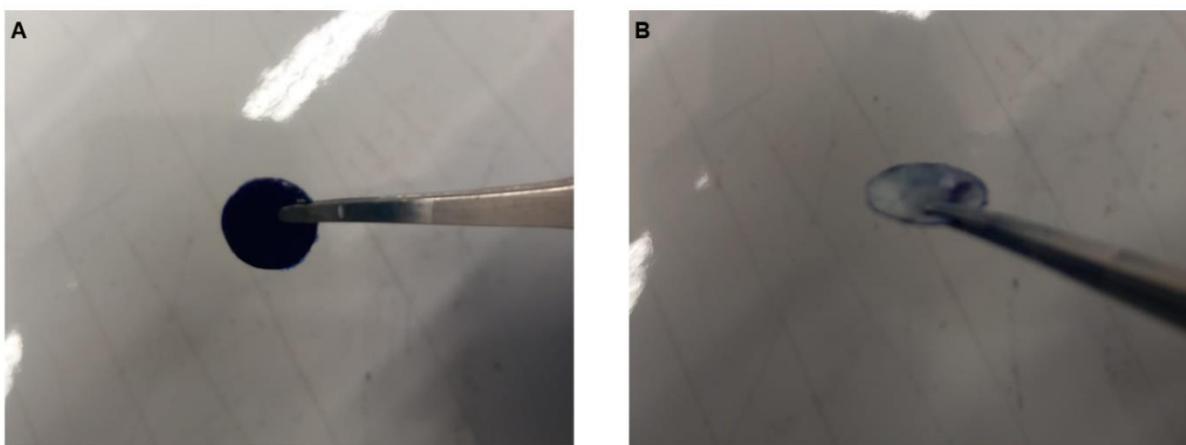


Figure 60 : Coloration au bleu de toluidine de la face membrane greffée au polyNaSS (A) et de la face film greffée au PEG (B).

3. Analyses thermiques :

Pour étudier l'impact du greffage sur les propriétés intrinsèques du patch, nous avons réalisé une analyse thermique par calorimétrie différentielle à balayage. Cette analyse nous a permis de déterminer la température de fusion (T_f) et de calculer le degré de cristallinité des différentes conditions, à savoir : des patchs greffés au polyNaSS sur une seule face avec et sans ozonation, des patchs greffés au PEG sur une seule face avec et sans ozonation et des patchs greffés sur les deux faces (polyNaSS et PEG) avec et sans ozonation.

Avant de comparer les différentes conditions entre elles, nous avons déterminé la température de fusion des membranes électrofilées avec le système à trois solvants ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3$: DMF) et avec de l'acide acétique, sans la couche obtenue par spin coating (Tableau 11). Une légère augmentation de la température de fusion a été observée avec les membranes électrofilées en utilisant de l'acide acétique, probablement due à la concentration du polymère avant l'électrofilage, qui était de 25w% par rapport à 15w% en utilisant le système à trois solvants. En effet, selon l'étude de Ramazani *et al.*, une concentration élevée de la PCL, avant électrofilage, permettait d'observer des températures de fusion élevée [153]. Ils ont également montré que le degré de cristallinité de la PCL électrofilée ne dépend pas de la concentration du polymère, mais plutôt de la température de l'électrofilage et celle de la conservation après la mise en forme. Ces résultats rejoignent ceux de notre étude, dans laquelle nous n'observons pas de différence du degré de cristallinité entre les deux membranes, élaborées et conservées dans les mêmes conditions.

Tableau 11 : Température de fusion et degré de cristallinité des membranes électrofilées.

Membranes électrofilées	T_f (°C)	χ (%)
Avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3$: DMF	$60,17 \pm 0,40$	$22,44 \pm 1,14$
Avec l'acide acétique	$63,08 \pm 0,79$	$22,42 \pm 0,95$
Granules de PCL	$62,3 \pm 0,4$	$25,32 \pm 2,07$

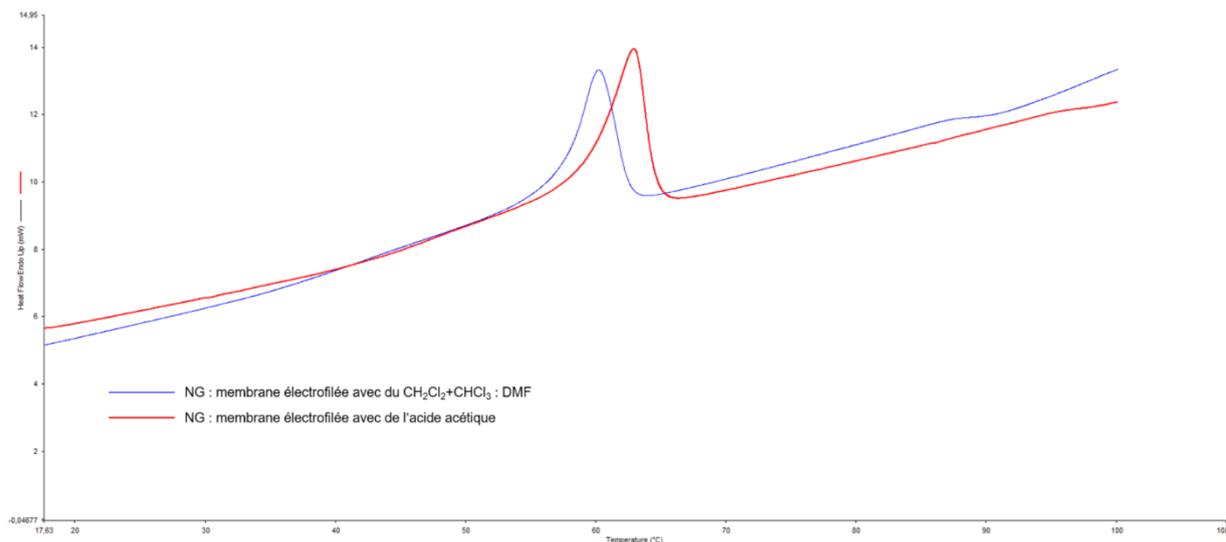


Figure 61 : Analyses DSC des membranes électrofilées avec les pics endothermiques correspondants.

Par rapport à la membrane électrofilée en monocouche, le patch à double couche présente un degré de cristallinité élevé ($33,42 \pm 6,14$ % pour les échantillons non greffés, tableau 12) grâce à la contribution des lamelles cristallines du film de PCL.

Par ailleurs, le greffage du polyNaSS et du PEG augmente légèrement la température de fusion (différence non significative, $p=0,11$), mais ne semble pas modifier le degré de cristallinité de la PCL (différence non significative, $p=0,97$) (Tableau 12). Ceci peut être associé à la présence de composés aromatiques ou de longues chaînes latérales qui, selon Balani *et al.*, peuvent restreindre la flexibilité de la chaîne polymère, nécessitant ainsi une énergie plus élevée pour observer une transition de phase [154].

Tableau 12 : Température de fusion et degré de cristallinité des différentes conditions.

Échantillons	T_f (°C)	χ (%)
Non greffés	$61,26 \pm 0,52$	$33,42 \pm 6,14$
Greffés NaSS	$62,98 \pm 0,98$	$31,92 \pm 5,85$
Greffés NaSS Oz	$63,74 \pm 1,59$	$34,30 \pm 6,23$
Greffés PEG	$63,06 \pm 1,54$	$34,00 \pm 3,00$
Greffés PEG Oz	$61,83 \pm 0,35$	$32,75 \pm 9,38$
Greffés NaSS/PEG	$61,48 \pm 0,21$	$36,60 \pm 7,38$
Greffés NaSS/PEG Oz	$62,31 \pm 1,39$	$35,57 \pm 0,97$

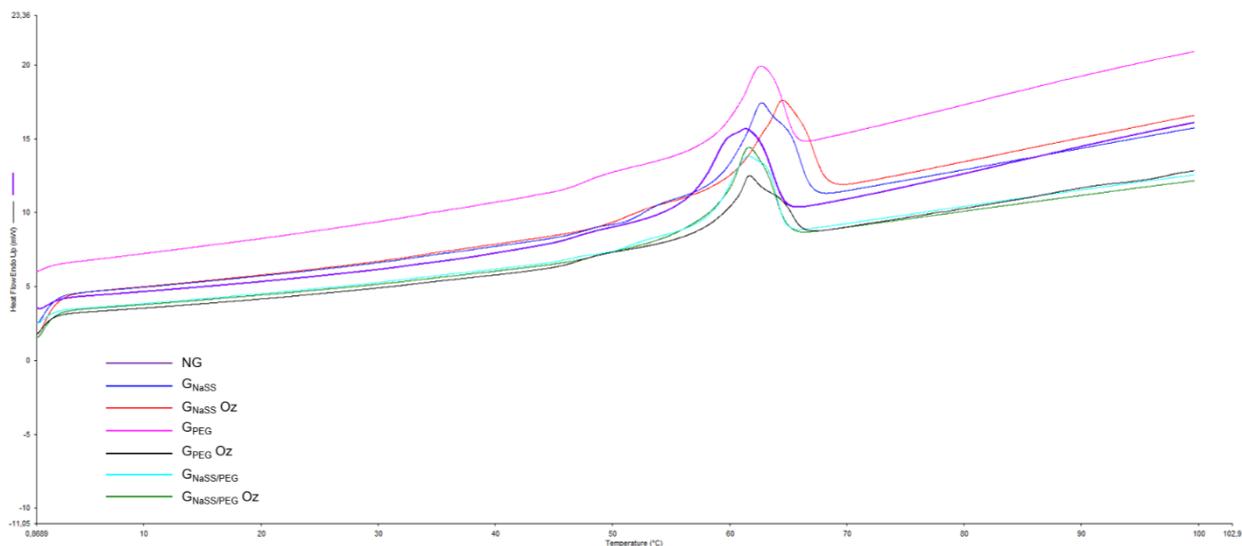


Figure 62 : Analyses DSC des différentes conditions avec les pics endothermiques correspondants.

4. Chromatographie d'exclusion stérique :

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique nous a permis de déterminer la masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire moyenne en poids (M_w) ainsi que l'indice de polydispersité ($I=M_w/M_n$), afin d'étudier l'impact du greffage sur la PCL (Tableau 13). L'analyse statistique nous révèle qu'il n'existe aucune différence significative entre les différentes conditions, avec des p-value pour M_n , M_w et I , respectivement de 0,33, 0,52 et 0,14. Toutefois, une tendance à la diminution de la masse molaire peut être observée sur les échantillons greffés pendant 1 heure avec ozonation et les échantillons exposés au UV sur les deux faces.

Tableau 13 : Masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des différentes conditions.

Échantillons	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	I_p
Non greffés	151 065 ± 1 1321	178 487 ± 7 512	1,18 ± 0,04
Greffés NaSS	143 503 ± 9 274	174 047 ± 5 961	1,21 ± 0,04
Greffés NaSS Oz	142 834 ± 5 496	174 162 ± 4 402	1,22 ± 0,02
Greffés PEG	150 003 ± 9 635	178 182 ± 7 209	1,19 ± 0,03
Greffés PEG Oz	147 722 ± 5 248	177 249 ± 4 651	1,20 ± 0,01
Greffés NaSS/PEG	138 520 ± 1 920	170 405 ± 848	1,23 ± 0,01
Greffés NaSS/PEG Oz	139 576 ± 6 196	173 246 ± 4 330	1,24 ± 0,03

Enfin, nous pouvons en conclure que le greffage du polyNaSS et du PEG, avec ou sans ozonation de 5 minutes, ne semble pas avoir un impact sur les propriétés intrinsèques des patches.

5. Étude de la réponse biologique :

5.1. Test de cytotoxicité au MTT :

Dans le but d'évaluer l'activité biologique au contact des patches greffés, notamment au polyNaSS, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité pendant 24 heures, mais aussi pendant 3 et 7 jours pour tenter d'identifier la tendance de prolifération cellulaire au contact des différentes surfaces. Les tests ont été réalisés sur les surfaces greffées et non greffées, avec une comparaison entre les surfaces fibreuses, rugueuses et lisses. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives pour un $p < 0,05$ grâce à une analyse de la variance (ANOVA).

Après 24 heures d'incubation, les résultats montrent que toutes les conditions présentent un pourcentage de viabilité cellulaire qui dépasse les 70%, un seuil exigé par la norme ISO 10993-5 pour considérer un dispositif médical comme étant non cytotoxique (Figure 63 et 64). Ces résultats confirment la non-cytotoxicité de la PCL, du polyNaSS et du PEG.

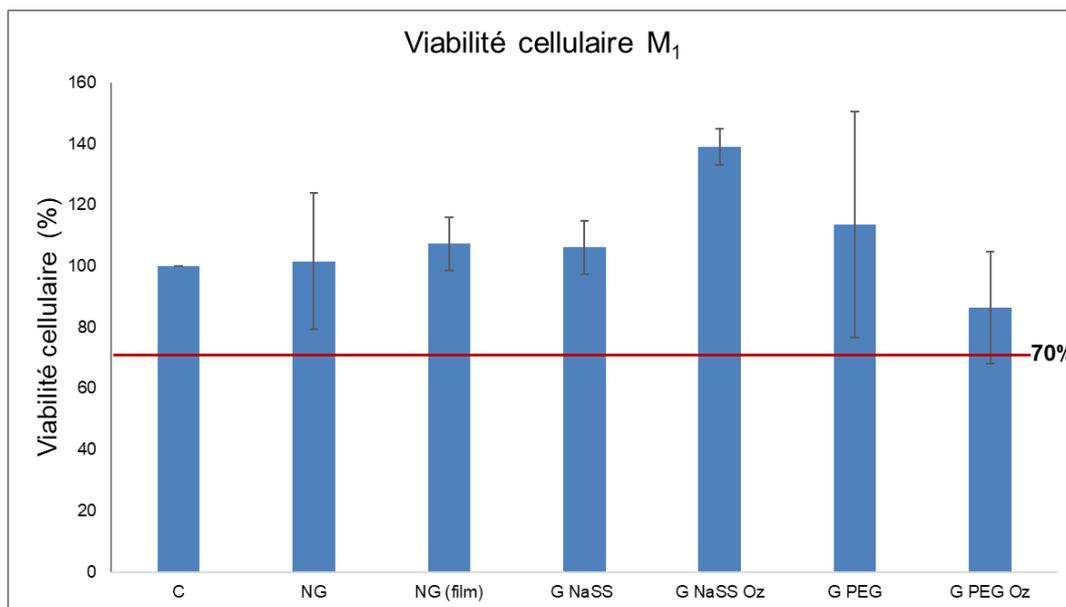


Figure 63 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patches (M_1) avec et sans greffage.

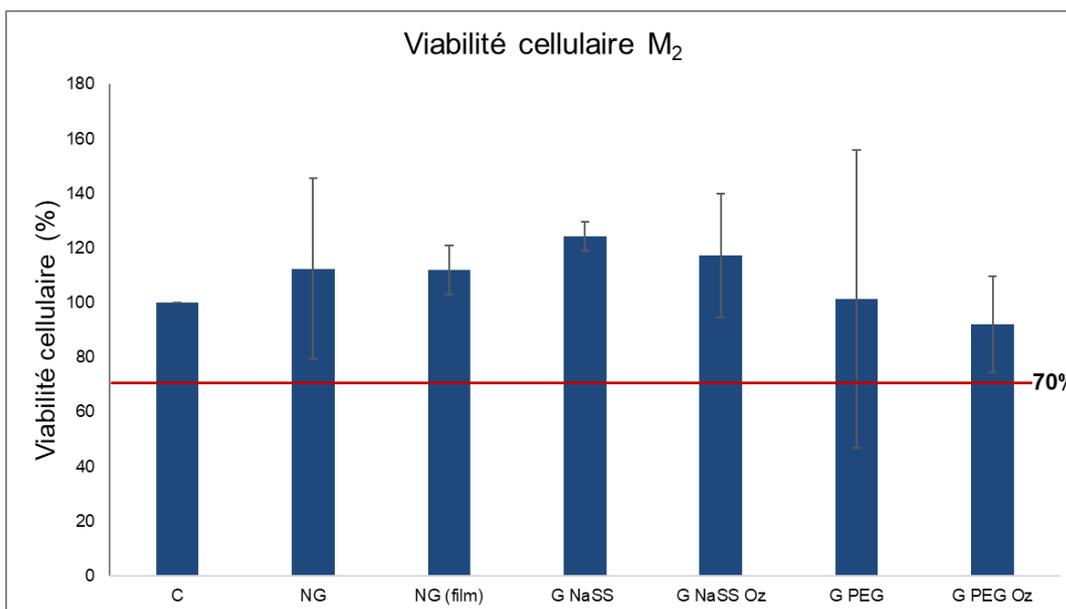


Figure 64 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patches (M_2) avec et sans greffage.

En outre, il n'existe pas de différence significative ($p=0,67 > 0,05$) entre les deux membranes électrofilées M_1 et M_2 , et entre les membranes et les puits de contrôle ($p=0,47 > 0,05$) (Figure 65). Ces résultats montrent que les deux méthodes permettent

d'obtenir des membranes non cytotoxiques pour les fibroblastes, et que les possibles résidus de solvant, cités précédemment, semblent être éliminés par les différentes étapes de lavage et de conditionnement pour la culture cellulaire.

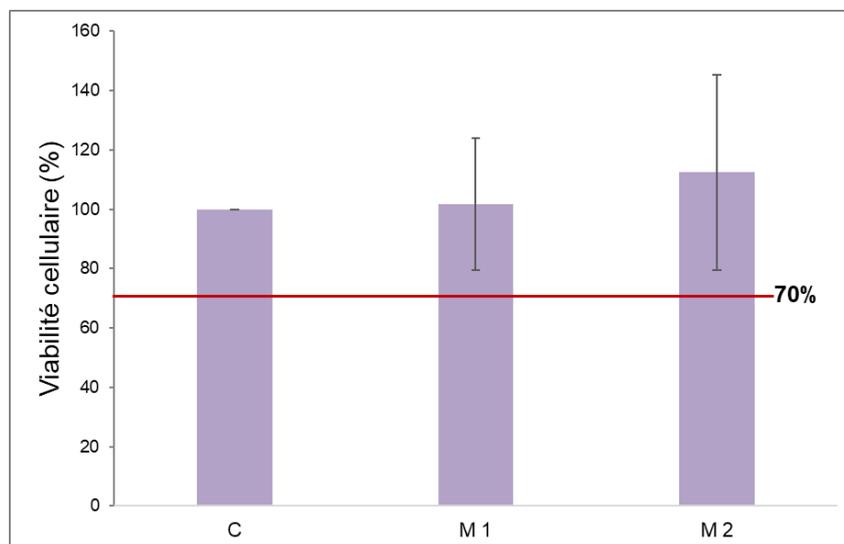


Figure 65 : Comparaison des taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patches (M₁) et (M₂).

Pour évaluer la bioactivité du polyNaSS, nous avons comparé les pourcentages de viabilité cellulaire sur les surfaces greffées avec (G NaSS Oz) et sans ozonation (G NaSS) et sur les surfaces non greffées (NG) et les puits de contrôle (C).

Pour le premier type de membrane (M₁), nous observons un taux de viabilité cellulaire plus élevé pour les surfaces greffées avec ozonation, avec une différence significative comparé aux surfaces greffées sans ozonation ($p=5,8.10^{-8}$) ainsi qu'aux surfaces non greffées ($p=0,0002$) et les puits de contrôle ($p=8,13.10^{-13}$) (Figure 66). Ces résultats révèlent que la présence du polyNaSS, en quantité suffisante, semble avoir un effet sur l'adhésion des cellules à la surface et peut accélérer la régénération tissulaire. En effet, l'étude de Felgueiras *et al.* montre que la présence du polyNaSS sur la surface du titane permet de favoriser l'attachement des cellules en modulant la conformation de la fibronectine, une protéine matricielle impliquée dans le mécanisme d'adhérence cellulaire [155].

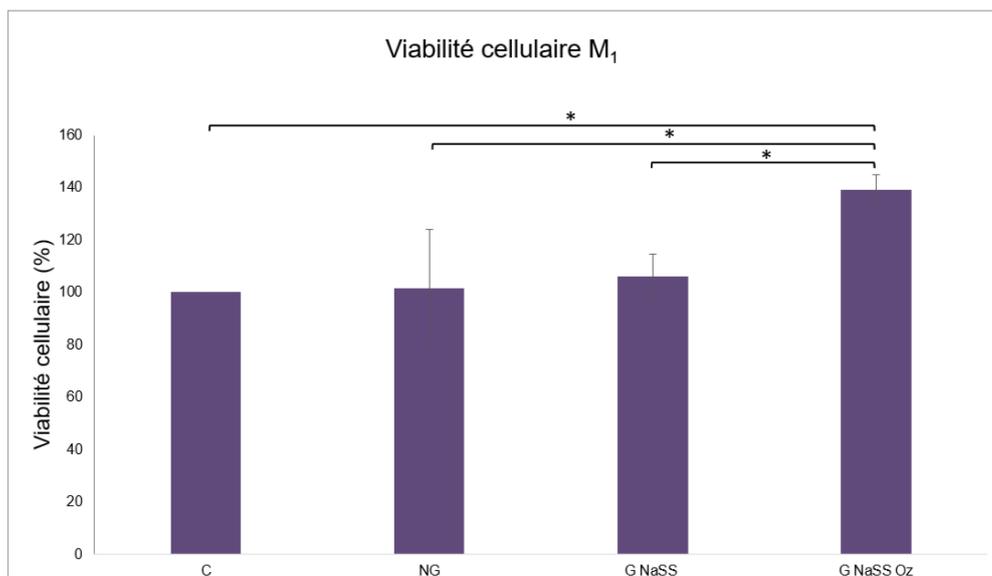


Figure 66 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M_1) greffés au polyNaSS.

Pour le deuxième type de membrane (M_2), nous avons obtenu deux résultats différents (Figure 67, A et B) : au premier essai, nous observons une différence significative entre les échantillons greffés avec ozonation et les échantillons greffés sans ozonation ($p=0,006$), non greffés ($p=2,47.10^{-8}$) et les puits de contrôle ($p=7,43.10^{-10}$). Quant au deuxième essai, une différence non significative entre les trois conditions est observée (G NaSS Oz, G NaSS et NG), à l'exception des puits de contrôle ($p=0,03$), ce qui peut être associé à un faible taux de polyNaSS par échec du greffage, à une erreur de manipulation ou encore à la dissolution incomplète du formazan, car à la fin des test MTT, les membranes électrofilées retiennent une quantité importante de formazan qui n'est pas dissoute dans le DMSO.

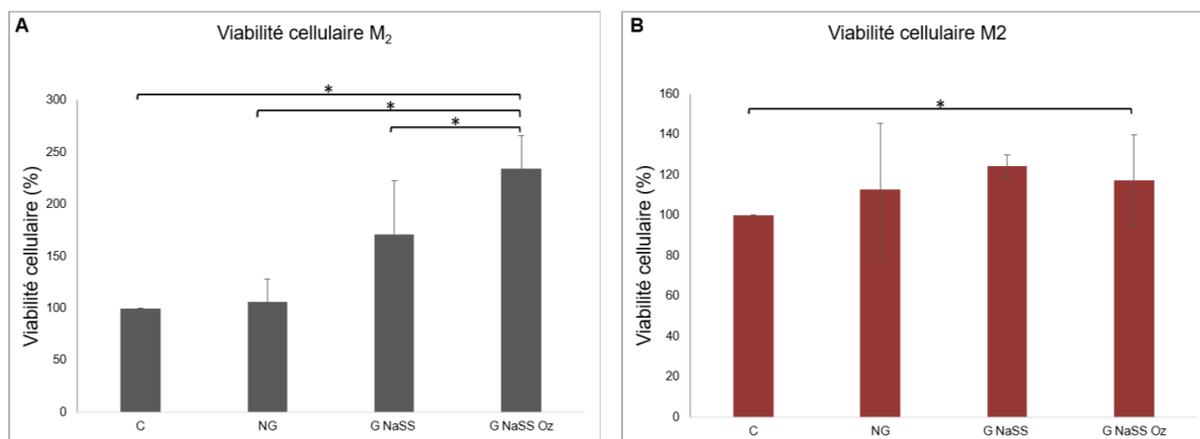


Figure 67 : Taux de viabilité cellulaire des fibroblastes L929 sur les patchs (M₂) greffés au polyNaSS en deux essais : **(A)** au premier essai : une différence significative est observée ($p < 0,05$) entre les différentes conditions, **(B)** au deuxième essai : aucune différence significative n'est observée entre les échantillons greffés avec et sans ozonation et non greffés ($p > 0,05$).

La comparaison entre les différents temps d'incubation (Figure 68 et 69) nous permet d'observer une augmentation du nombre de cellules, au bout de 3 et 7 jours, sur les surfaces greffées ou non au polyNaSS. Toutefois, après 3 jours, une diminution du taux de viabilité cellulaire peut être observée sur les surfaces greffées au PEG par rapport aux puits de contrôle, probablement en raison de l'effet antiadhésif du PEG. En effet, selon Lensen *et al.*, il est difficile d'évaluer la cytotoxicité du PEG en raison de la faible quantité de cellules qui restent attachées à la surface et qui ne permettant pas de réaliser un test quantitatif. Ils proposent ainsi un test de cytotoxicité indirect, où les cellules sont incubées dans un milieu qui a été au contact du matériau, avec comme témoins un milieu contenant du DMSO [156].

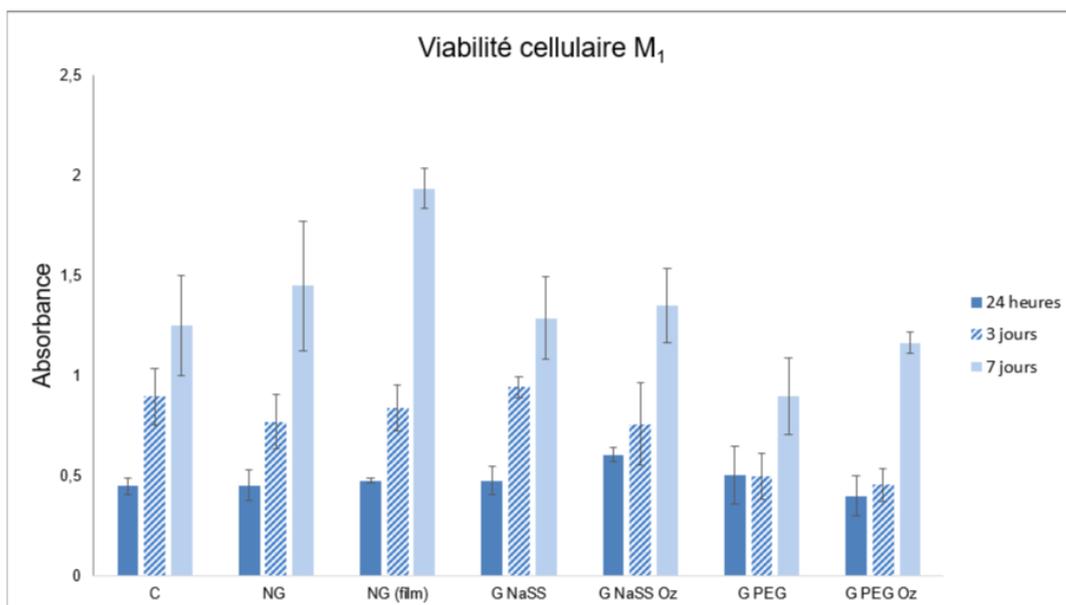


Figure 68 : Viabilité cellulaire sur les patches M₁ après différents temps d'incubation (en absorbance).

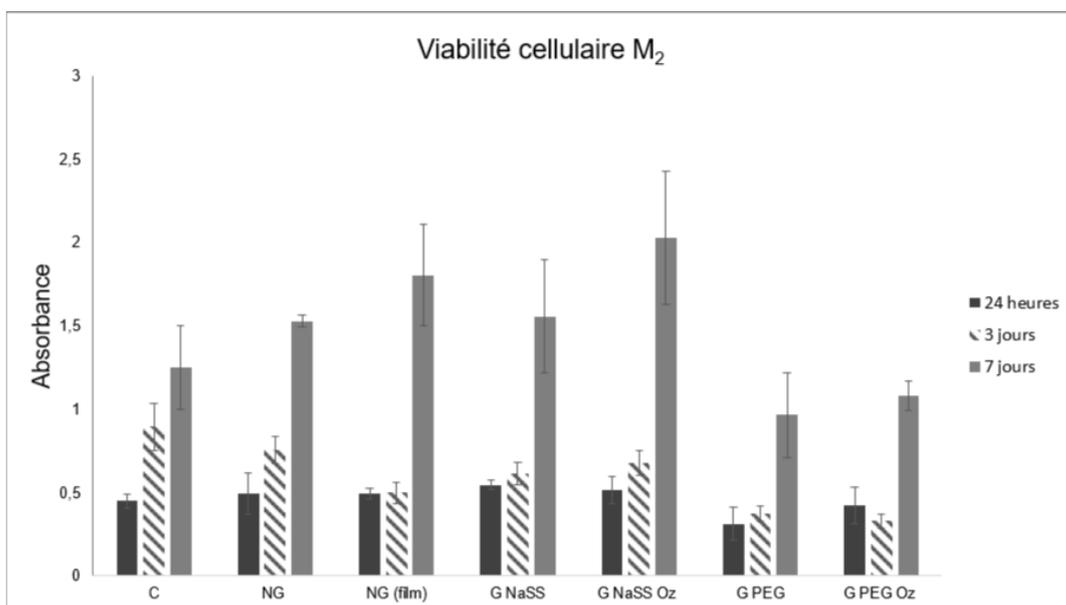


Figure 69 : Viabilité cellulaire sur les patches M₂ après différents temps d'incubation (en absorbance).

Le mécanisme d'anti-adhésion cellulaire du PEG est souvent décrit comme étant un mécanisme anti-protéique, qui a pour effet d'empêcher la reconnaissance des sites d'adhérence par les cellules, notamment *via* les intégrines. Selon Li *et al.* [157], le PEG présente toutes les caractéristiques de résistance à l'adsorption protéiques décrites par Ostuni *et al.*, à savoir : l'hydrophilie, la capacité de former des liaisons hydrogènes et la neutralité électrique [158]. Ainsi, les chaînes de PEG greffées sur la surface vont interagir avec un nombre important de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes, ce qui aboutit à la formation d'une couche hydratée à la surface du matériau. Cette couche peut empêcher l'adsorption des protéines qui ont besoin d'interagir à leur tour avec des molécules d'eau en formant des liaisons hydrogène, à travers leur propre couche hydratée [159]. En outre, du fait que le PEG forme des chaînes de polymères hydratés et possède un volume exclu relativement important, ses chaînes sont comprimées et leur interaction est limitée avec les protéines (Figure 70). De point de vue énergétique, il existe un état instable avec une entropie réduite, où les chaînes du PEG produisent un effet répulsif pour éviter l'adsorption des protéines [157].

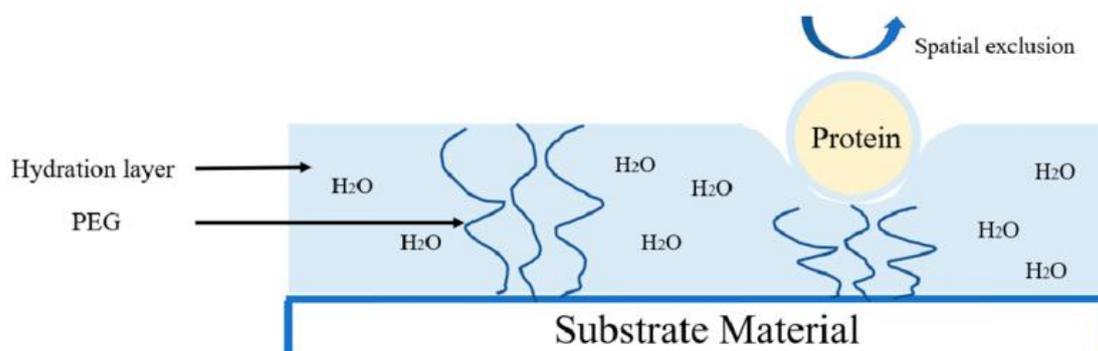


Figure 70 : Mécanisme anti-protéique du polyéthylène glycol d'après Li *et al.* [157].

5.2. Morphologie cellulaire :

L'étude de la morphologie cellulaire porte sur la taille et la forme des cellules sur les échantillons afin d'évaluer la biocompatibilité ainsi que la bioactivité de ces derniers. Bien que ce test soit qualitatif, nous pouvons constater, à travers les images MEB, qu'après 24 heures et 3 jours, les fibroblastes sont mieux répartis et plus abondants sur les membranes greffées, notamment avec activation de la surface (Figure 71 et

72). Nous observons également qu'à 24 heures, les cellules ont une forme sphérique, puis une forme allongée au fur et à mesure qu'elles s'étalent et s'attachent aux fibres électrofilées (Figure 73). Au bout de 7 jours, les surfaces sont quasi recouvertes de cellules, ce qui confirme que le réseau de fibres, qu'il soit greffé ou non, offre un environnement favorable à l'attachement et à la prolifération des cellules en mimant la matrice extracellulaire. Comme décrit précédemment, le polyNaSS peut donc avoir un effet accélérateur de la régénération tissulaire.

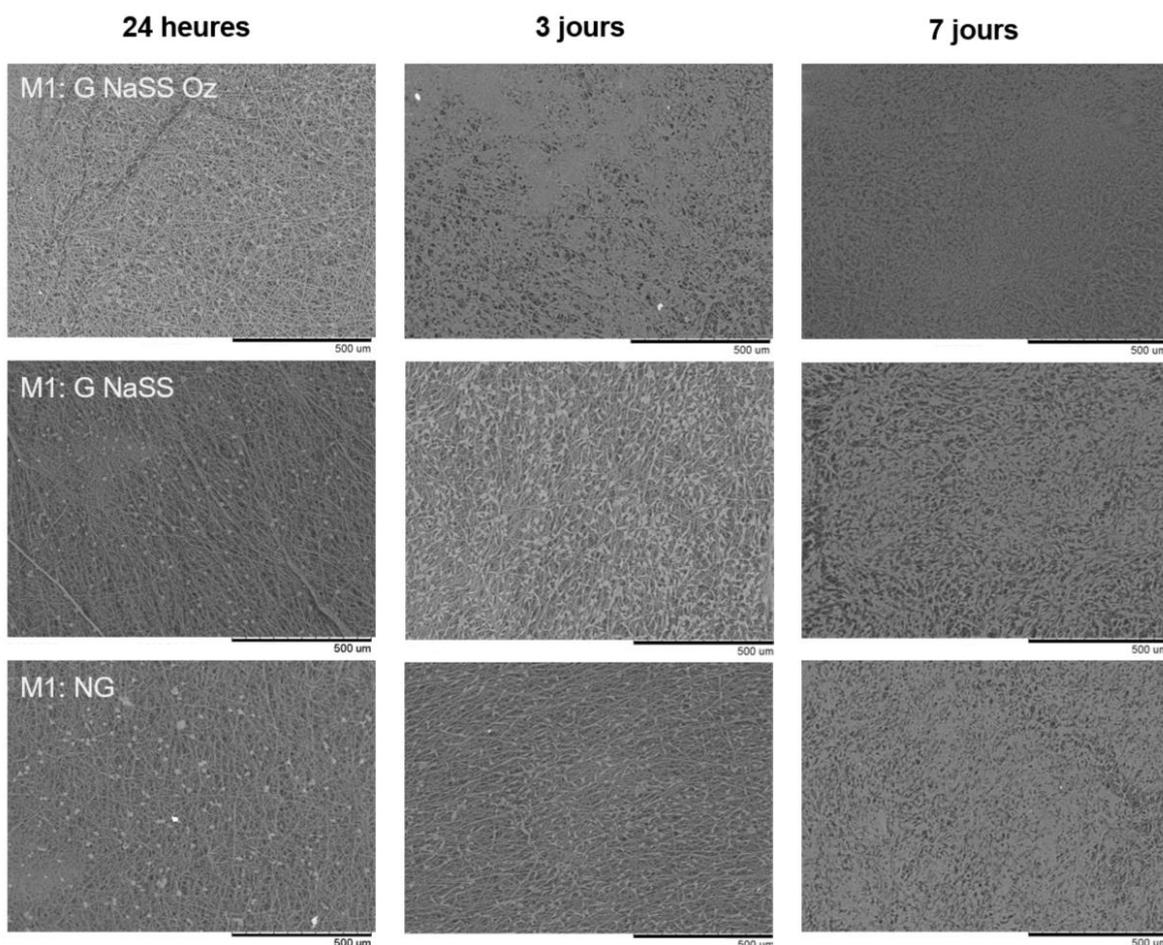


Figure 71 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces électrofilées du patch M₁, après différents temps d'incubation.

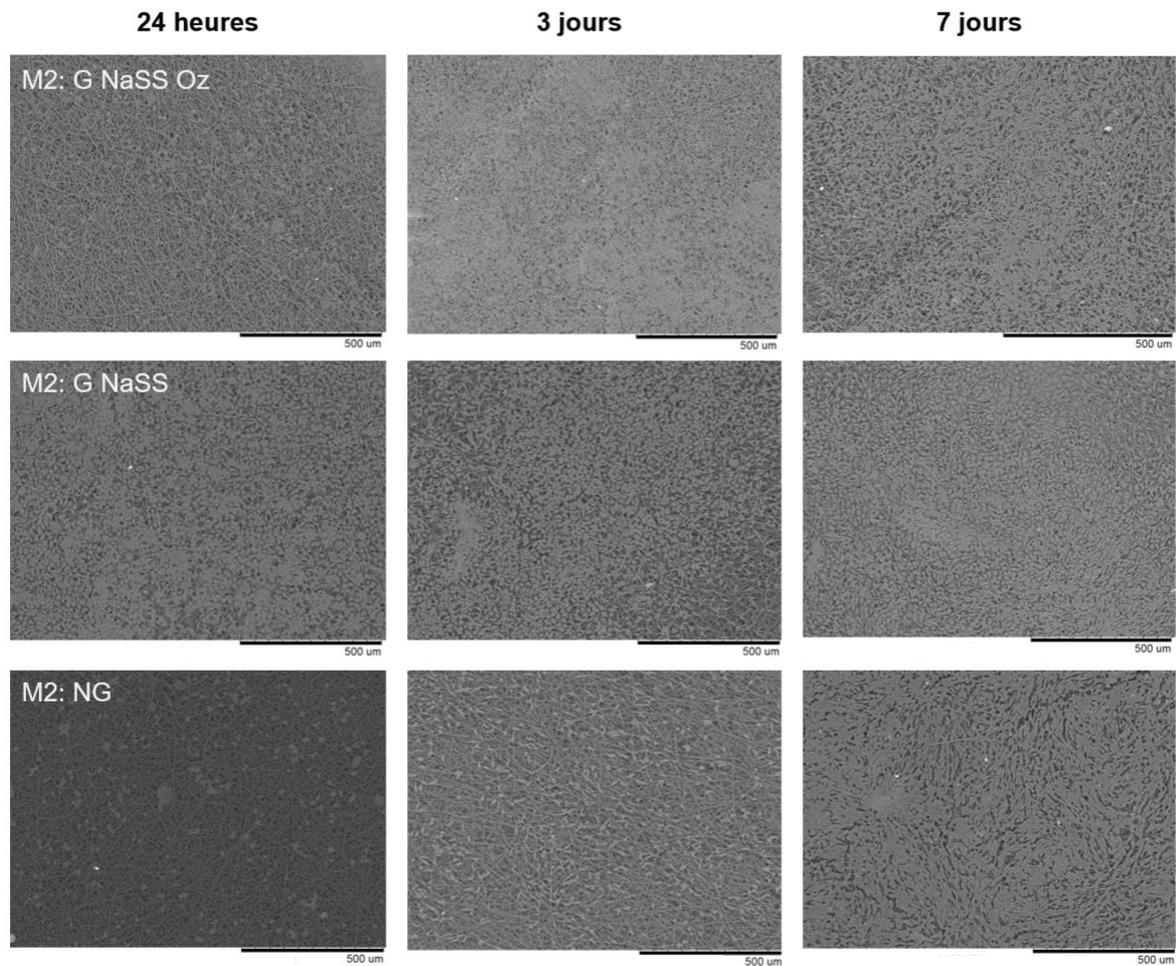


Figure 72 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces électrofilées du patch M₂, après différents temps d'incubation.

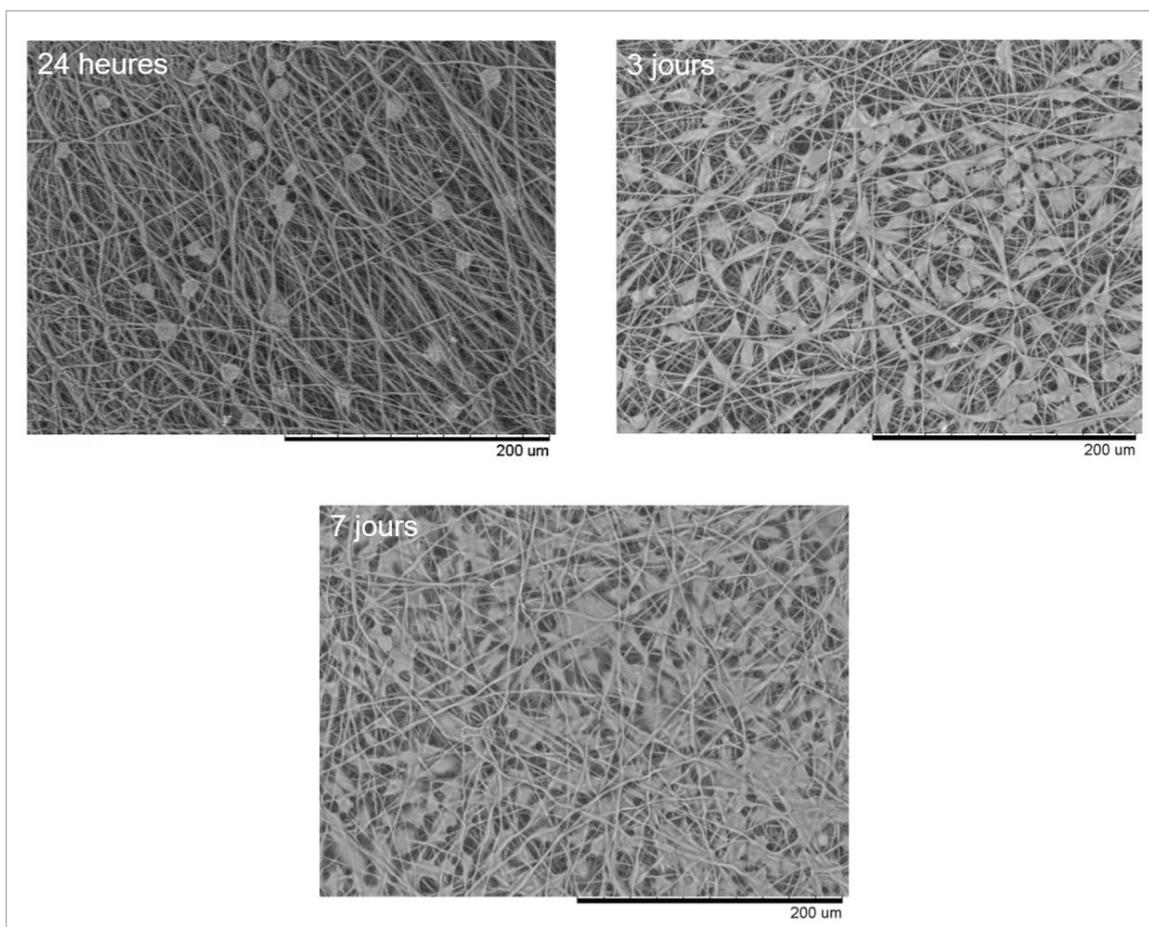


Figure 73 : Images au MEB de la forme des cellules après 24 heures, 3 jours et 7 jours.

Pour la face film obtenue par la première méthode d'élaboration (M_1), la rugosité de surface semble offrir un substrat propice pour l'attachement et la prolifération des cellules, bien qu'elles semblent être moins nombreuses que sur les faces électrofilées. Ceci est particulièrement observé sur les surfaces greffées au PEG, où les cellules ne sont pas réparties sur toute la surface mais se regroupent en amas sur quelques zones, probablement non greffées (Figure 74).

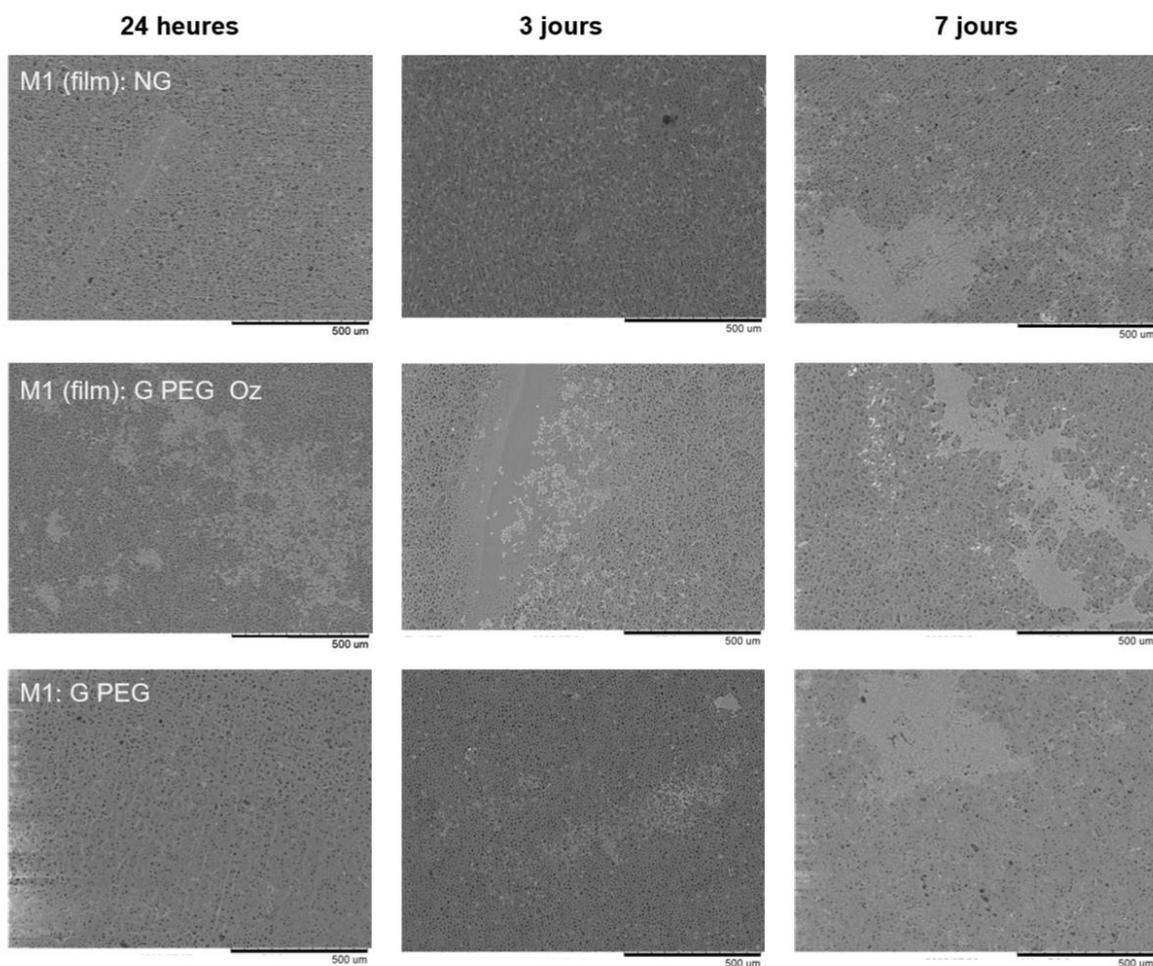


Figure 74 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces obtenues par spin coating du patch M₁, après différents temps d'incubation.

En ce qui concerne la face élaborée par la deuxième méthode (M₂), sa surface lisse, décrite précédemment, présente moins de cellules avec un regroupement que sur les rugosités liées aux défauts d'élaboration et aux plis (Figure 75). La surface lisse semble avoir un effet antiadhésif, qu'elle soit greffée ou non avec du PEG. Ces résultats sont en accord avec ceux de Li M. *et al.*, qui décrivent une meilleure adhérence et couverture cellulaire sur des particules présentant une surface rugueuse comparé aux particules lisses, sur lesquelles les cellules s'attachent que sur les bords avec un ancrage partiel [160] (Figure 76).

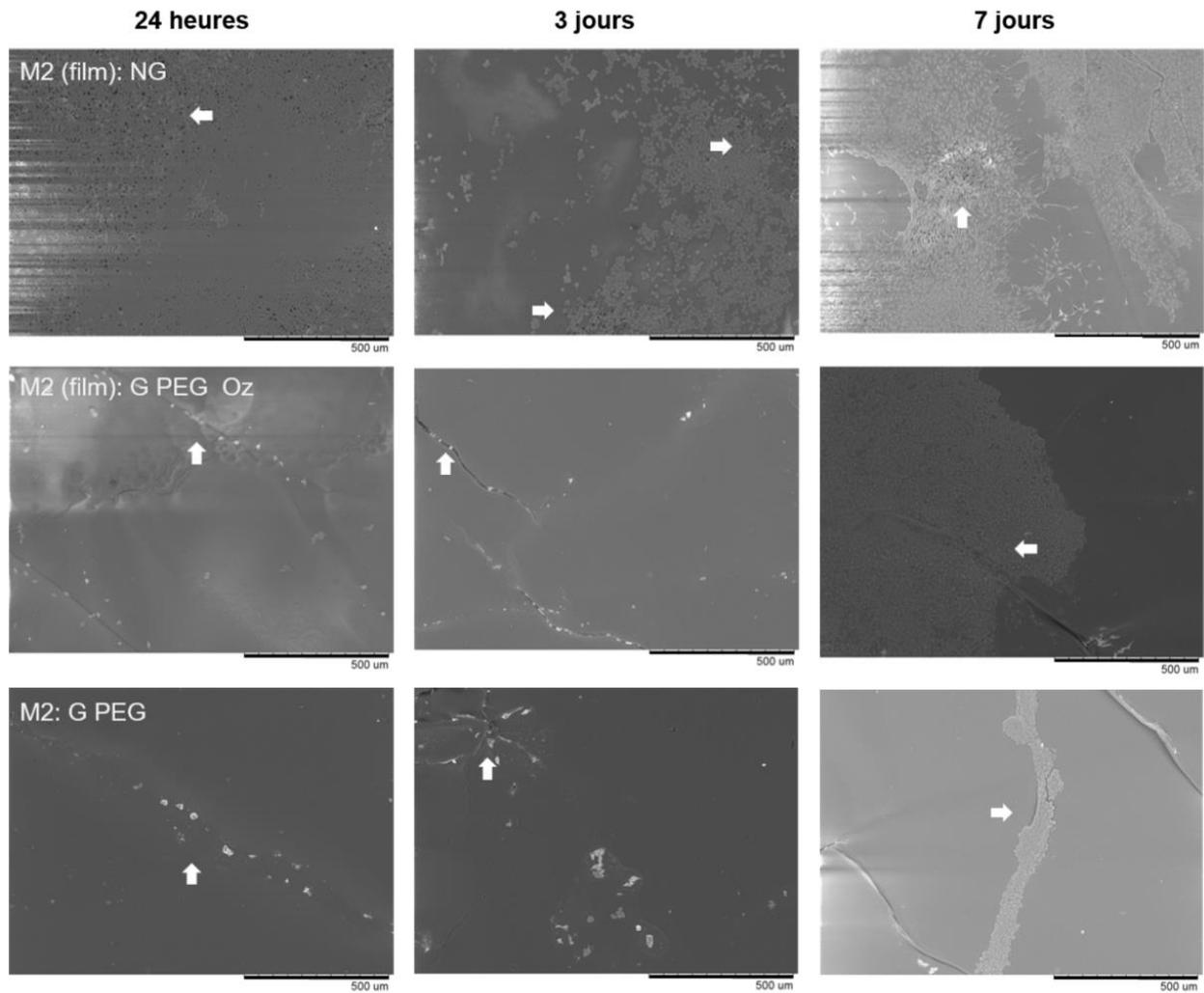


Figure 75 : Images au MEB de la morphologie des fibroblastes sur les surfaces obtenues par spin coating du patch M₂, après différents temps d'incubation (les flèches montrent les défauts d'élaboration et les plis).

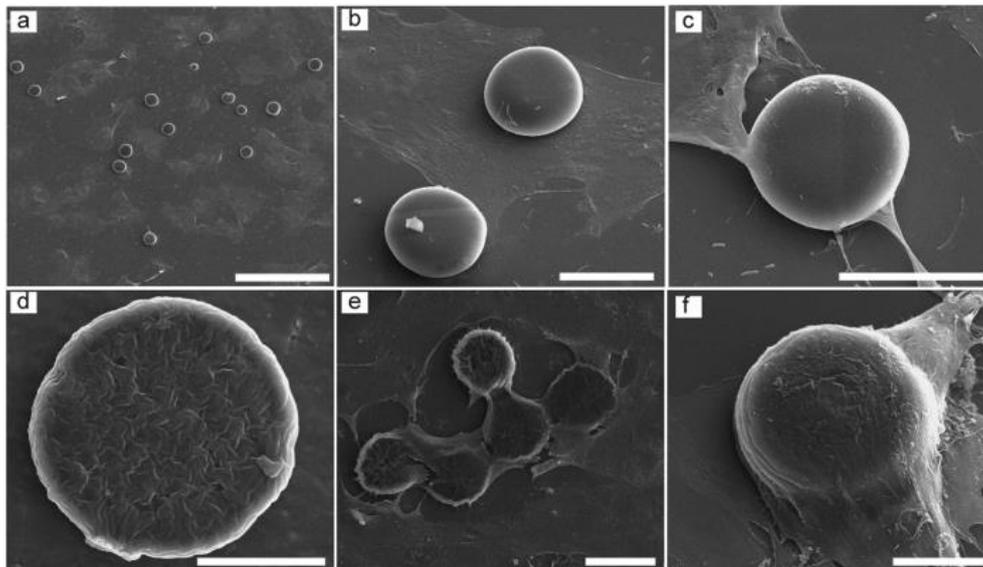


Figure 76 : Images de morphologie cellulaire sur des particules à surfaces lisses et rugueuses d'après Li *et al.* : **(a,b)** étalement des cellules sur le substrat en ignorant les surfaces lisses, **(c)** attachement des cellules sur les bords des particules lisses, **(d)** état de surface des particules à surface rugueuse avant l'incubation des cellules, **(e)** attachement des cellules sur les surfaces rugueuses après 3 jours d'incubation, **(f)** couverture des surfaces rugueuses par les cellules. Les échelles sont de 300 μm **(a)**, 40 μm **(b, c, e)**, 20 μm **(d, f)** [160].

Ainsi, il serait possible de moduler l'interaction cellule-matériau avec des modifications physiques de la surface. En effet, pour les cellules dépendantes de l'ancrage telles que les fibroblastes, plusieurs études ont décrit que la rugosité de surface améliore l'adhérence et la prolifération de ces cellules [161, 162, 163]. Cependant, il est difficile de définir la relation entre la rugosité et le comportement cellulaire en raison de la diversité des cellules étudiées et des différences en ce qui concerne la mesure de la rugosité. Selon Bigerelle *et al.* la caractérisation de la rugosité doit être réalisée à l'échelle de la cellule pour comprendre la relation rugosité-comportement cellulaire [161, 163].

L'étude de Sun *et al.*, définie cette relation par un mécanisme de transduction cellulaire en réponse à des stimuli provenant de la rugosité de surface, on parle alors d'une mécano-réponse cellulaire, mais aussi d'une adaptation de la surface rugueuse à la force de traction cellulaire, qui ensemble vont initier les voies de mécano-transduction

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

(Figure 77A) [164]. De même, l'auteur définit les interactions cellule-fibre et l'intérêt de mimer la matrice extracellulaire par la force de traction cellulaire (Figure 77B), qui déforme les fibres et les attire vers la région d'étalement. Ainsi, le réseau de fibres déformé génère une contre-force aux points d'adhésion des cellules qui, par conséquent, va activer la mécano-transduction à travers la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK), aboutissant à la transmission de signaux régulateurs pour la migration, la survie et la prolifération cellulaire [164, 165].

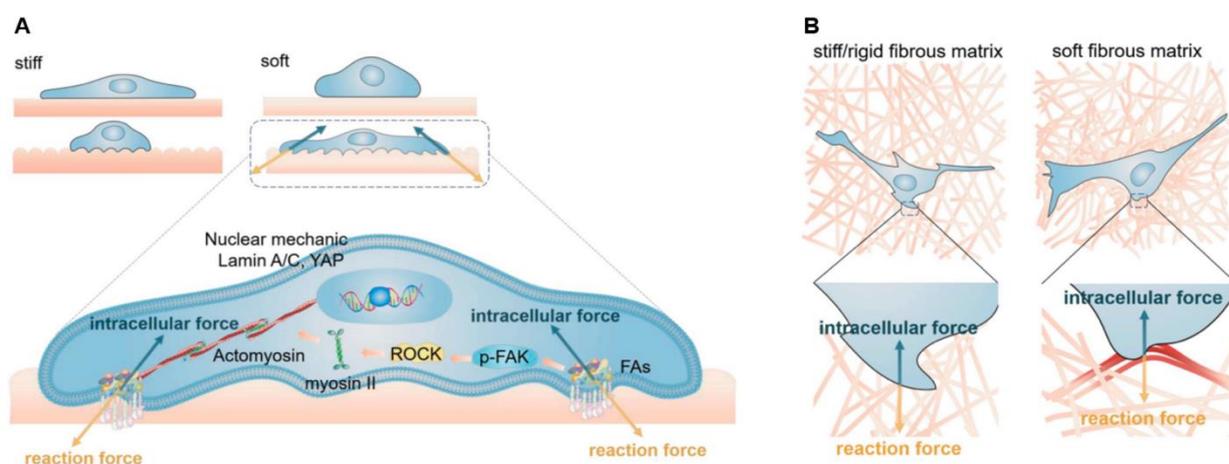


Figure 77 : Mécanisme de mécano-transduction cellulaire sur une surface rugueuse **(A)** et une matrice fibreuse **(B)** selon Sun *et al.* [164].

Enfin, Il semblerait que la surface lisse sans greffage peut prévenir la formation d'un tissu cicatriciel ou l'attachement du patch à la moelle épinière. Cependant, le greffage du PEG peut s'avérer nécessaire pour diminuer l'immunogénicité du patch.

6. Étude des propriétés mécaniques des patches :

L'essai de traction uni-axiale nous a permis d'étudier les propriétés mécaniques des patches ainsi que l'influence de la fonctionnalisation de surface sur les propriétés intrinsèques de la PCL.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des essais de traction sur des éprouvettes bicouches non greffées et des éprouvettes monocouches avec des membranes électrofilées et des films obtenus par spin coating selon les deux méthodes, décrites précédemment. Ces essais nous ont permis de comparer le comportement global des couches ensemble et séparément pour les deux types de patches.

Le comportement mécanique des membranes électrofilées a été étudié à travers la courbe contrainte-déformation obtenue après un essai à 0,1 mm/s et représentée dans la figure 78. À partir de cette courbe, nous pouvons distinguer trois phases différentes dans le comportement de la membrane, telles que décrites par Khennoussi *et al.* et Gnaba *et al.* [166, 167] :

- Une première partie linéaire associée à l'orientation des fibres dans la direction de la force appliquée. La pente de la droite nous a permis de calculer le module de l'élasticité de la membrane qui était de $8,95 \pm 2,43$ MPa.
- Une seconde partie caractérisée par l'étirement des fibres, qui se retrouvent limitées dans leurs mouvements. Les entremêlements des fibres assurent le maintien du réseau de fibres électrofilées et procurent une rigidité au matériau.
- Une troisième partie correspondant à l'apparition des premiers phénomènes de rupture, plus ou moins rapide, avec une contrainte maximale de $5,71 \pm 0,38$ MPa et une déformation dépassant les 250%.

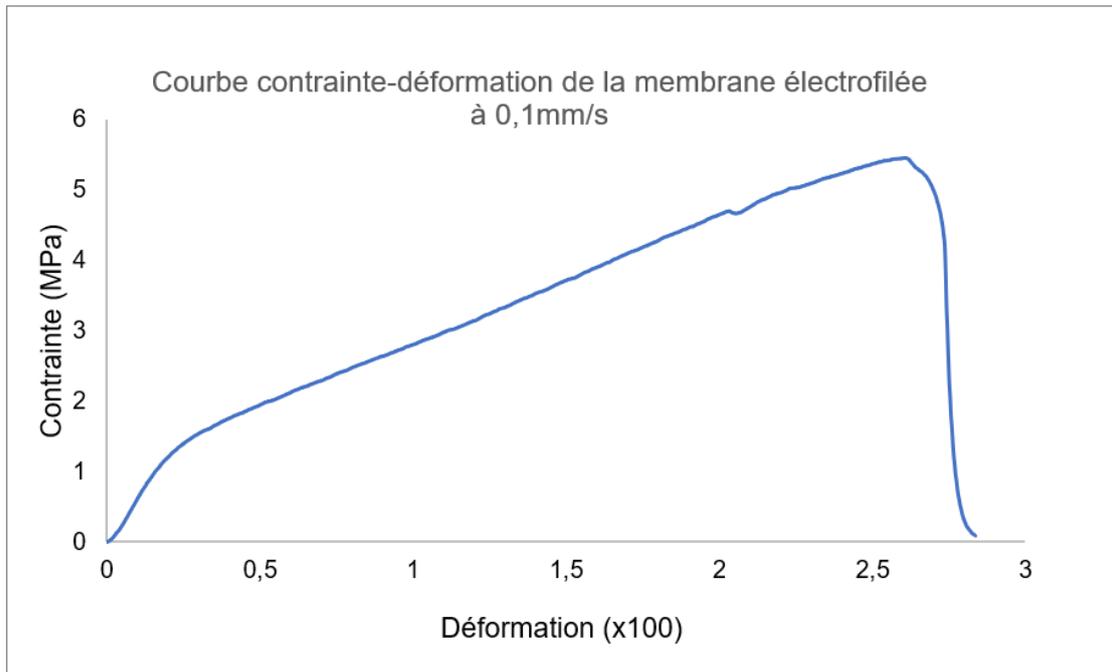


Figure 78 : Courbe contrainte-déformation de la membrane électrofilée, à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.

L'image au microscope électronique à balayage (Figure 79) permet d'observer la réorientation des fibres dans le sens de traction après déformation plastique sans rupture.

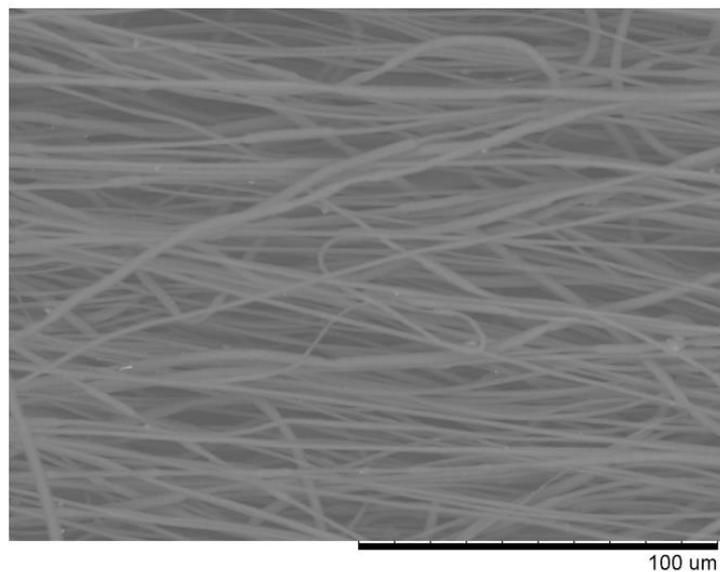


Figure 79 : Image au MEB de la membrane après déformation plastique.

En ce qui concerne le film obtenu par spin coating en utilisant l'acétone, sa courbe contrainte-déformation (Figure 80) comporte également une partie élastique linéaire, qui s'écarte par la suite non linéairement de la pente élastique pour atteindre un pic puis une faible décroissance avant d'atteindre la partie plastique en formant un palier. Ce dernier est limité par un seuil d'écoulement haut (contrainte d'écoulement) à partir duquel le matériau commence à se déformer, avec la réduction de sa section qui se propage jusqu'au seuil d'écoulement bas (contrainte de saturation). À partir de ce dernier, la charge est quasi constante jusqu'à la rupture [168, 1769, 170]. Ce comportement est souvent observé sur les polymères thermoplastiques lorsque les essais sont réalisés à température ambiante. Il est associé à une réorganisation moléculaire qui permettent au film de s'étirer. Cet étirage peut entraîner une modification de la structure du polymère par un alignement des chaînes et une réorientation des lamelles cristallines qui s'interpénètrent, augmentant ainsi la cohésion au sein de la structure [171]. Par conséquent, le film présente un module de Young élevé allant jusqu'à $78,63 \pm 20,95$ MPa avec une contrainte maximale de $12,88 \pm 0,48$ MPa et une déformation de plus de 250% limitée par la course du vérin.

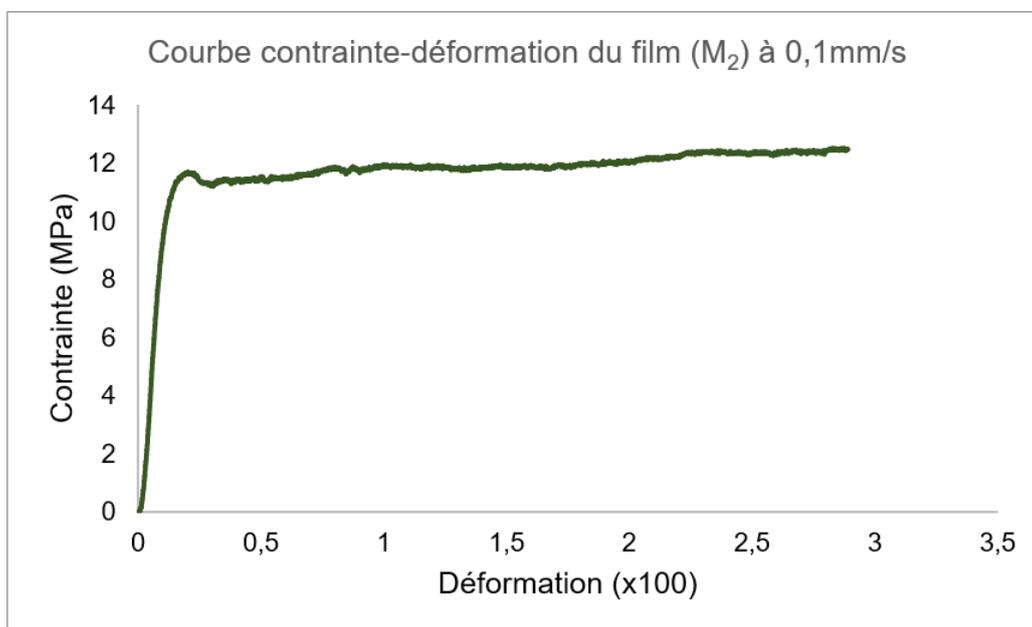


Figure 80 : Courbe contrainte-déformation du film M_2 , à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.

Toutefois, ce comportement n'est pas observé sur le film obtenu par l'utilisation du mélange à trois solvants, qui suit une courbe de traction avec une limite d'élasticité sans palier (Figure 81). Ceci est probablement lié à une différence de cristallinité entre les deux films et à la taille des sphérolites. En effet, l'étude de Bessel *et al.* a montré que la polymérisation du caprolactame à haute température a permis d'obtenir des sphérolites de taille importante et d'observer, par conséquent, un comportement mécanique différent avec une transition progressive entre la partie élastique et plastique [172].

Tel qu'observé précédemment, le film présente un module de Young élevé par rapport à la structure fibreuse, allant jusqu'à $85,26 \pm 6,01$ MPa avec une contrainte maximale de $17,15 \pm 9,17$ MPa et un allongement de plus de 200%.

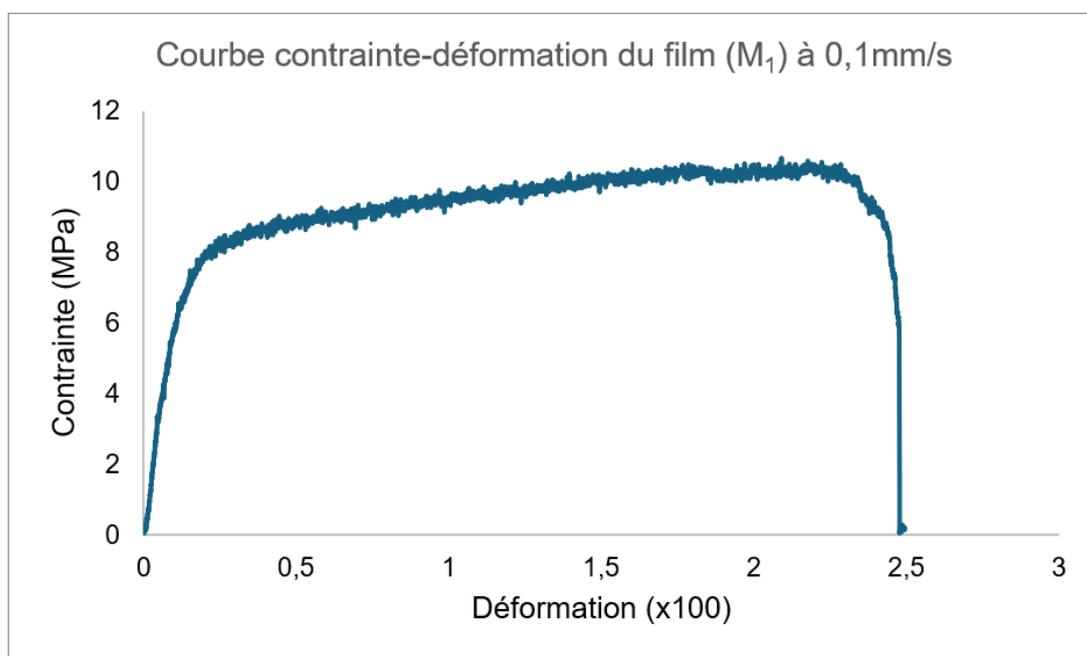


Figure 81 : Courbe contrainte-déformation du film M₁, à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.

En comparant les couches séparées avec le patch, nous pouvons observer à travers la figure 82 que les courbes contrainte-déformation des patches à double couche présentent une allure similaire à celle des films obtenus par spin coating, notamment pour le patch M₂, où nous observons une superposition des courbes sur la partie élastique. Nous pouvons en déduire que le comportement mécanique des patches à

double couche est régi en grande partie par celui de la couche pleine obtenue par spin coating.

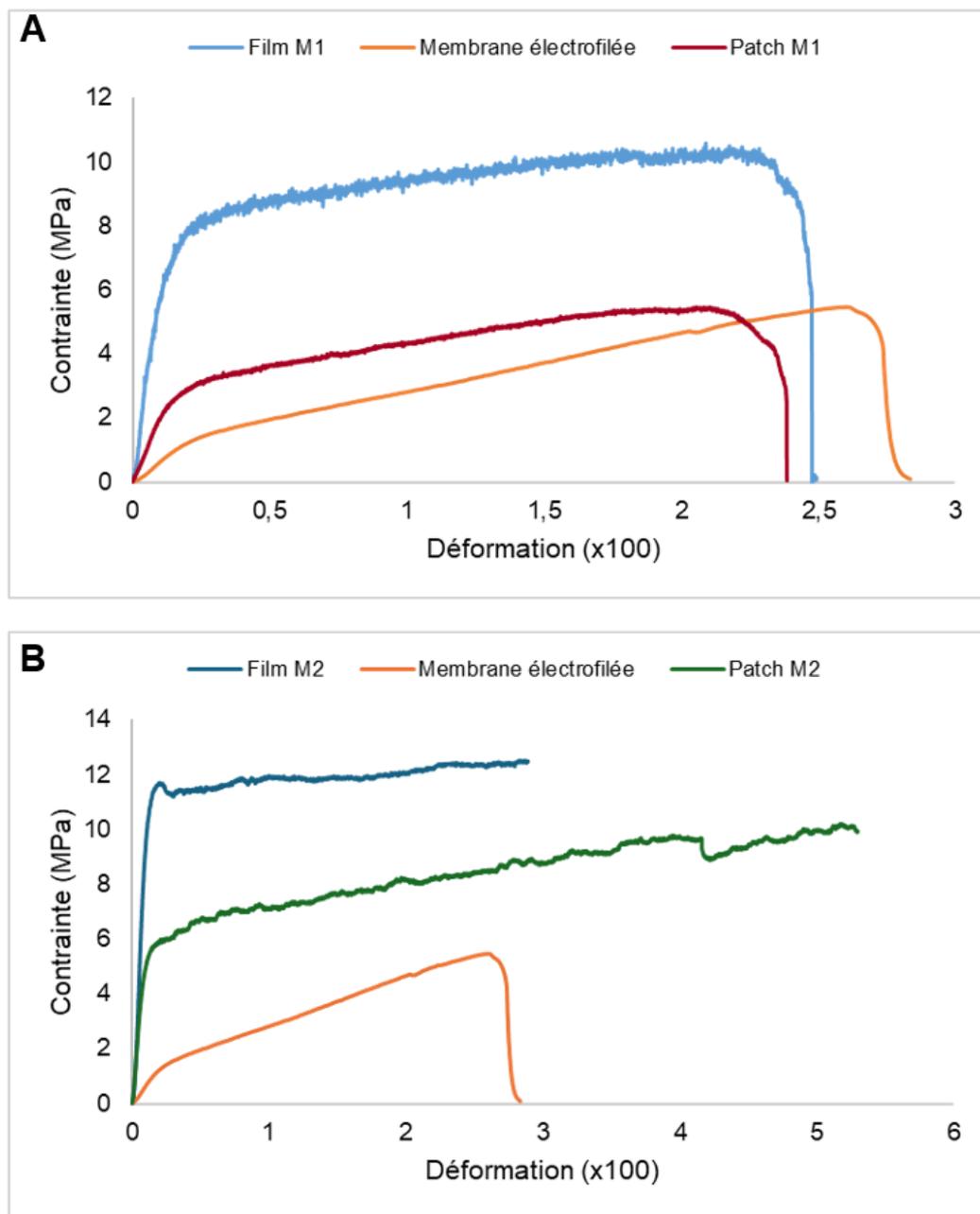


Figure 82 : Courbe contrainte-déformation des échantillons monocouches et bicouches à une vitesse de déformation de 0,1mm/s : (A) méthode d'élaboration M₁, (B) méthode d'élaboration M₂.

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

Pour le patch M₁, la déformation élastique atteint les 25% avec un module de Young de 19,32±1,49 MPa. Au-delà de la limite élastique, nous observons une déformation plastique irréversible dépassant les 200% avec une contrainte maximale de 5,41±0,04 MPa.

En ce qui concerne la vitesse de déformation, celle-ci ne semble pas avoir une influence sur le comportement mécanique du patch M₁. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature [173, 174], le passage à une vitesse de déformation à 10 mm/s n'augmentent pas la limite d'élasticité, le module de Young ni la contrainte maximale. Cependant, nous pouvons observer une augmentation de l'allongement à la rupture (Figure 83A).

Pour le patch M₂, la zone de déformation élastique s'étend jusqu'à 10% avec un module de Young de 62,5±4,5 MPa, une contrainte maximale de 11,01±1,53 MPa et un allongement de plus de 500% limité par la course du vérin. Une vitesse de déformation élevée semble augmenter la limite d'élasticité ainsi que la contrainte maximale (Figure 83B). En effet, à une vitesse de sollicitation élevée, les chaînes polymères auront moins de temps pour s'organiser ce qui limite leur mobilité et augmente la contrainte d'écoulement [175, 176].

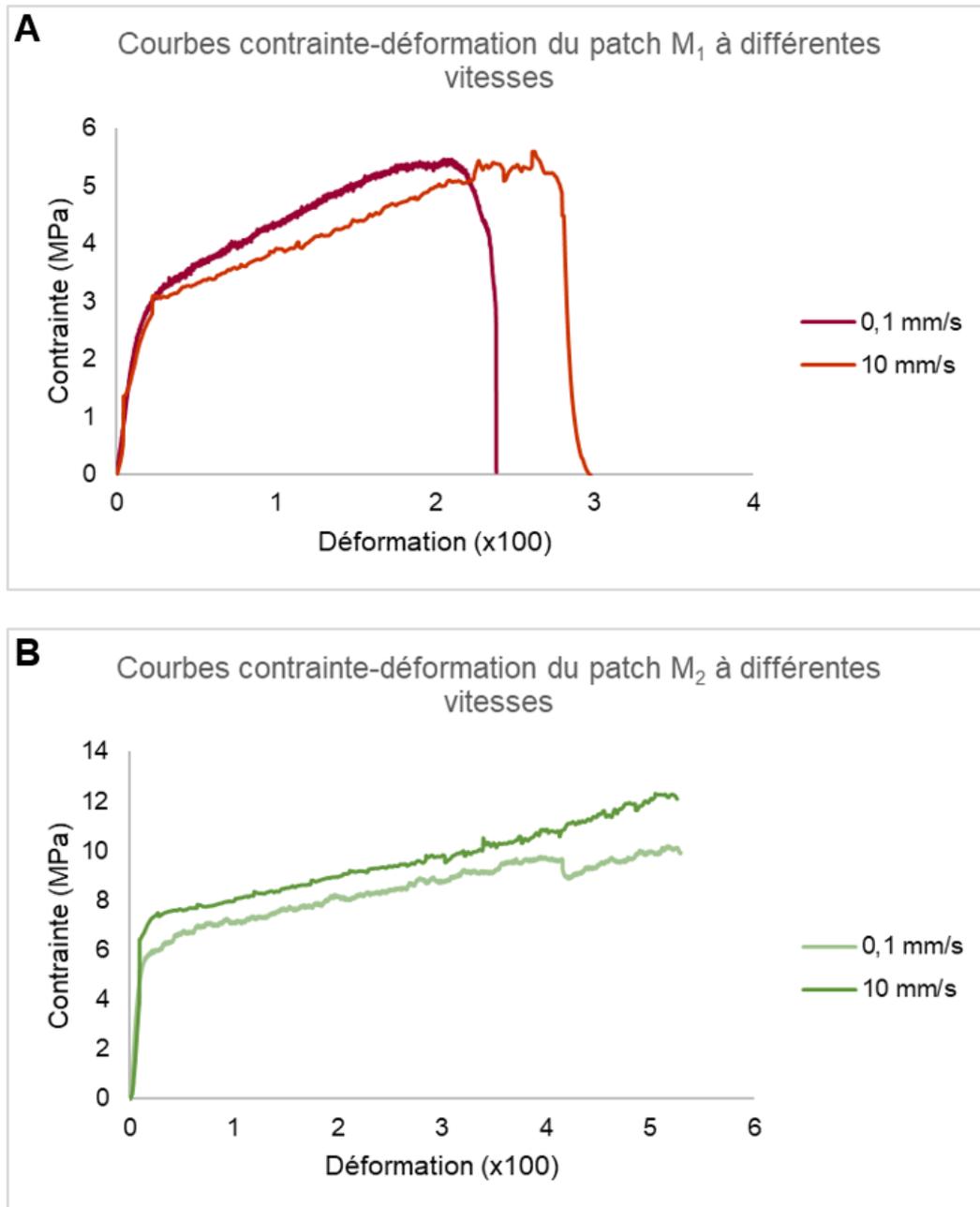


Figure 83 : Courbe contrainte-déformation du patch M₁ (A) et M₂ (B) à différentes vitesses de déformation.

Toutefois, pour la couverture de la lésion, il est difficile de définir les propriétés mécaniques idéales du patch. De manière générale, un dispositif médical possède des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu remplacé ou régénéré. Ainsi, pour suivre la croissance et permettre une couverture épithéliale, le patch doit avoir des propriétés similaires à celle de la peau qui a un comportement viscoélastique avec un

module de Young compris entre 0,06 MPa et 4 MPa, en fonction de sa localisation dans le corps [177, 178].

Tableau 14 : Propriétés mécaniques des échantillons monocouches et bicouches.

Échantillons	Module de Young (MPa)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)
Membrane électrofilée	8,95±2,43	5,71±0,38	> 250
Film (CH ₂ Cl ₂ +CHCl ₃ : DMF) (M ₁)	85,26±6,01	17,15±9,17	> 200
Film (acétone) (M ₂)	78,63±20,95	12,88±0,48	> 250
Patch (M ₁)	19,32±1,49	5,41±0,04	> 200
Patch (M ₂)	62,5±4,5	11,01±1,53	> 500

Enfin, en se basant sur ces résultats et ceux décrits précédemment, nous avons retenu le patch M₂ pour les études suivantes. La méthode d'élaboration M₂ a permis d'obtenir un patch avec des propriétés mécaniques intéressantes ainsi qu'une surface lisse antiadhésive. De plus, cette méthode permet de contrôler l'épaisseur du patch et d'utiliser l'acide acétique pour l'électrofilage de la couche externe.

6.1. Influence de la fonctionnalisation de surface sur les propriétés mécaniques du patch :

Pour étudier l'effet du greffage sur les propriétés mécaniques du patch M₂, nous avons comparé les courbes contrainte-déformation des différentes conditions de greffage avec celle du patch non greffé, à une vitesse de 0,1 mm/s (Figure 84). Les valeurs du module de Young, de la contrainte maximale et de la déformation maximale sont présentées dans le tableau 15.

D'abord, nous pouvons observer une superposition de toutes les courbes sur la partie élastique avec une pente qui semble similaire, permettant d'en déduire que le greffage n'a pas d'impact sur le module d'élasticité du patch. De plus, nous constatons qu'il n'existe pas de différence sur le comportement global du patch après fonctionnalisation, à l'exception du patch greffé au polyNaSS sans ozonation où nous

Chapitre III : Élaboration, fonctionnalisation et caractérisation du patch à double couche

observons une diminution de l'allongement à la rupture, de la limite d'élasticité et de la contrainte maximale. Toutefois, cette différence n'est pas observée sur les patchs greffés sans ozonation sur les deux faces.

Pour les différentes comparaisons, nous avons pris des courbes individuelles représentatives du comportement le plus observé. Ainsi, une analyse statistique avec un nombre d'échantillons plus important est nécessaire pour comparer les valeurs du module de Young et de la contrainte maximale.

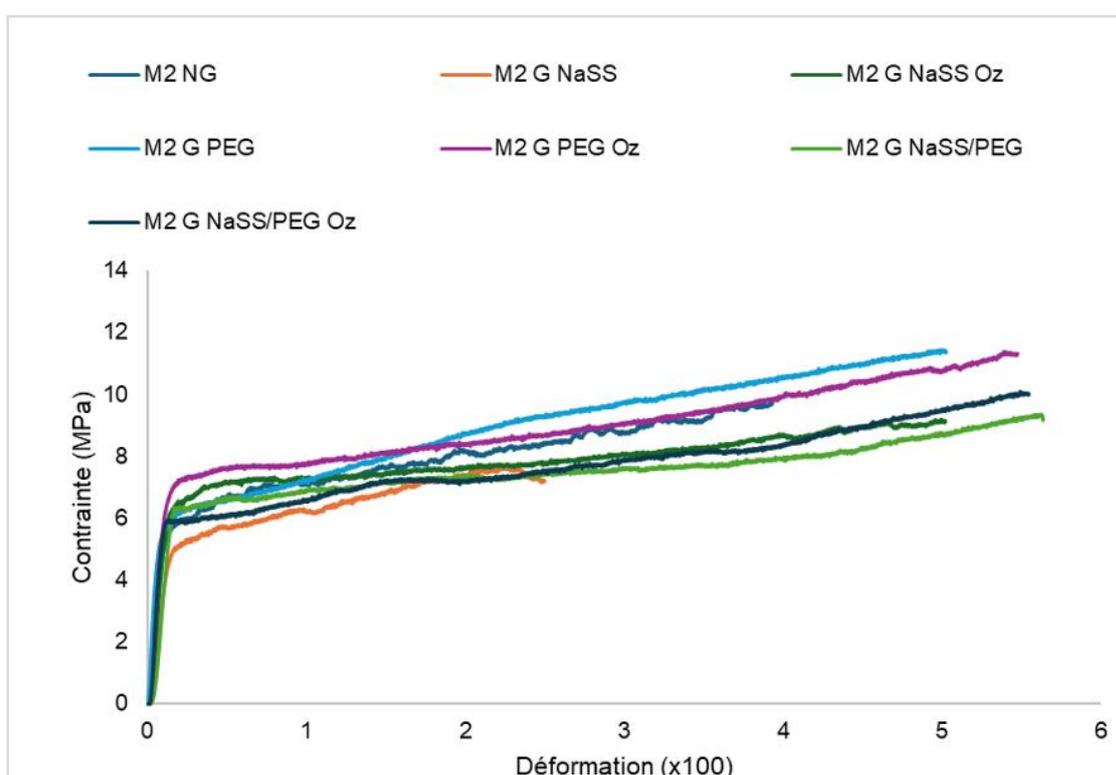


Figure 84 : Courbes contrainte-déformation des échantillons avec et sans greffage, à une vitesse de déformation de 0,1mm/s.

Tableau 15 : Propriétés mécaniques des patches avec et sans greffage.

Échantillons	Module de Young (MPa)	Contrainte maximale (MPa)	Déformation maximale (%)
Non greffés	62,5±4,5	11,01±1,53	> 400
Greffés NaSS	52,07±1,16	8,59±1,47	> 250
Greffés NaSS Oz	69,09±0,66	10,17±1,57	> 500
Greffés PEG	86,75±6,57	10,28±1,24	> 500
Greffés PEG Oz	58,34±0,71	11,18±0,12	> 550
Greffés NaSS/PEG	67,43±10,66	7,58±0,14	> 550
Greffés NaSS/PEG Oz	76,91±16,52	10,46±0,03	> 550

7. Conclusion :

Nous avons vu pu montrer, à travers ce chapitre, que la conception d'un patch à double couche permettra de fournir une couverture étanche grâce à sa couche interne. Ce patch s'est révélé non cytotoxique et a permis d'offrir une face externe bioactive, grâce aux techniques de fonctionnalisation de surface développées au laboratoire BEST. En effet, le greffage du polyNaSS, avec ou sans ozonation, semble accélérer l'adhésion des cellules et favoriser leur prolifération. Le greffage sans activation de surface permettra ainsi de supprimer une étape intermédiaire, susceptible d'altérer la surface de la PCL.

Bien que les deux patchs soient imperméables aux liquides, celui obtenu par la deuxième méthode (M₂) présente l'avantage d'être facile à élaborer, d'avoir une surface lisse antiadhésive qui évitera une étape supplémentaire de fonctionnalisation et de posséder de bonnes propriétés mécaniques. Ce patch a été donc retenu pour étudier l'impact de la dégradation par hydrolyse sur ses propriétés physico-chimiques et mécaniques.

Chapitre VI : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Ce chapitre vise à étudier la dégradation du patch dans un milieu simulant le liquide amniotique, afin de comprendre ses mécanismes et prédire le comportement du patch *in vivo*. Nous présentons dans un premier temps l'étude de la stabilité du milieu choisi au cours du temps, ainsi que l'effet de l'ajout de l'azoture de sodium sur la PCL. Ensuite, les résultats des caractérisations physico-chimiques seront présentés pour évaluer la cinétique de dégradation, et identifier l'influence de la fonctionnalisation de surface sur la progression de l'hydrolyse de la PCL. Enfin, une dernière partie sera consacrée aux résultats de l'étude des propriétés mécaniques du patch après dégradation.

1. Étude de la stabilité du milieu :

Avant de commencer l'étude de la dégradation, nous avons évalué la stabilité du milieu pendant deux mois, afin de détecter une éventuelle contamination ou un effet de l'azoture de sodium sur la PCL.

Dans la difficulté de se procurer du liquide amniotique, le milieu choisi (FBS) nous permet de se rapprocher des conditions physiologiques sans changement de composition, car le prélèvement du liquide amniotique peut se faire à différentes périodes de gestation et chez différentes patientes, ce qui rend difficile de contrôler sa composition. De plus, le liquide amniotique peut contenir des cellules qui peuvent proliférer, lorsque les conditions le permettent, ou mourir par nécrose cellulaire favorisant ainsi une contamination du milieu.

Après deux mois à 37°C, aucune contamination visible à l'œil nu n'a été détectée. De plus, les échantillons de PCL semblent inchangés avec des spectres infrarouges qui se superposent sans l'apparition de nouvelles bandes, à l'exception d'un épaulement détecté à 1640,7 cm⁻¹ après 2 mois (Figures 85 et Tableau 16). Celle-ci peut correspondre à la liaison amide primaire N-H qui peut être liée à la présence de protéines non éliminées de la surface pendant les lavages. En effet, selon Di Meo *et al.*, la bande caractéristique de la liaison amide se situe autour de 1640-1615 cm⁻¹, lorsque la teneur en feuillets β est dominante dans la structure de la protéine, et autour de 1665-1635 cm⁻¹, lorsque la structure hélicoïdale α est dominante [179].

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

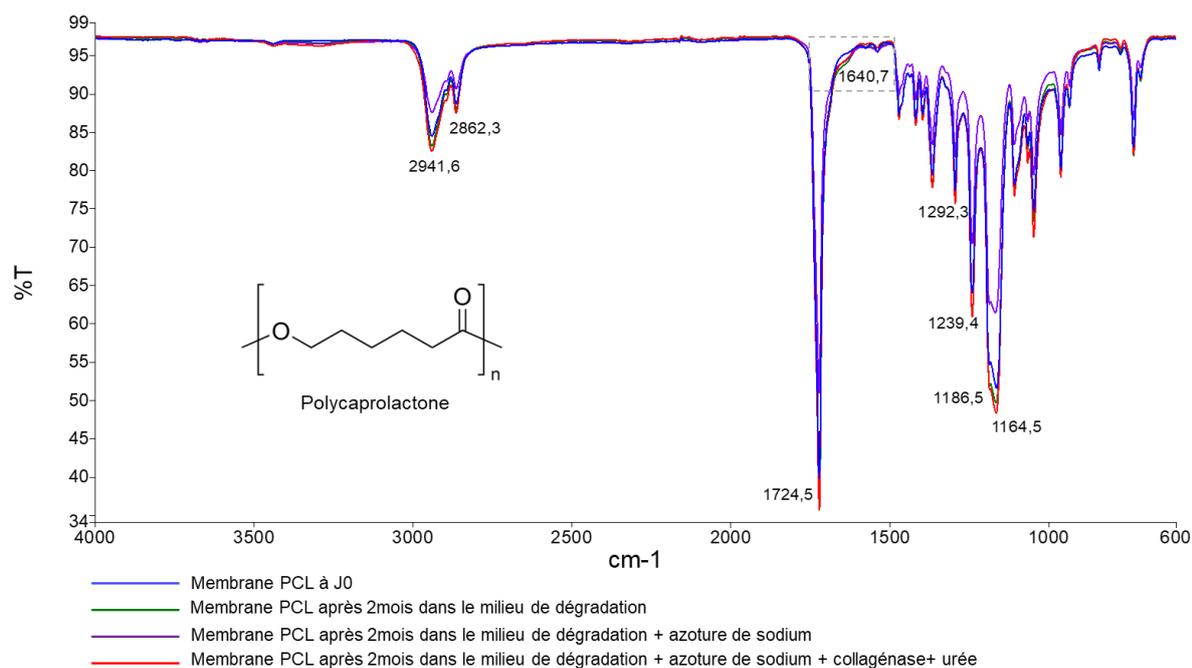


Figure 85 : Comparaison des spectres infrarouges des membranes de PCL à J0, après 2 mois dans du FBS dilué (milieu de dégradation), après 2 mois dans le milieu avec l'ajout de l'azoture de sodium et après 2 mois dans le milieu avec l'ajout de l'azoture de sodium, de la collagénase et de l'urée.

Tableau 16 : Attribution des bandes FTIR de la polycaprolactone à J0 et après 2 mois dans le milieu modèle.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution [148, 149]
2941,6	CH ₂ : élongation asymétrique
2862,3	CH ₂ : élongation asymétrique
1724,5	C=O : élongation
1292,3	C-O, C-C : élongation
1239,4	C-O-C : élongation asymétrique
1186,5	C-O-C : élongation symétrique
1164,5	C-O, C-C : élongation

Les images au MEB ne montrent pas de différence entre les échantillons à J0 et ceux immergés dans le milieu seul ou avec l'ajout de l'urée, de la collagénase et de l'azoture de sodium après deux mois (Figure 86).

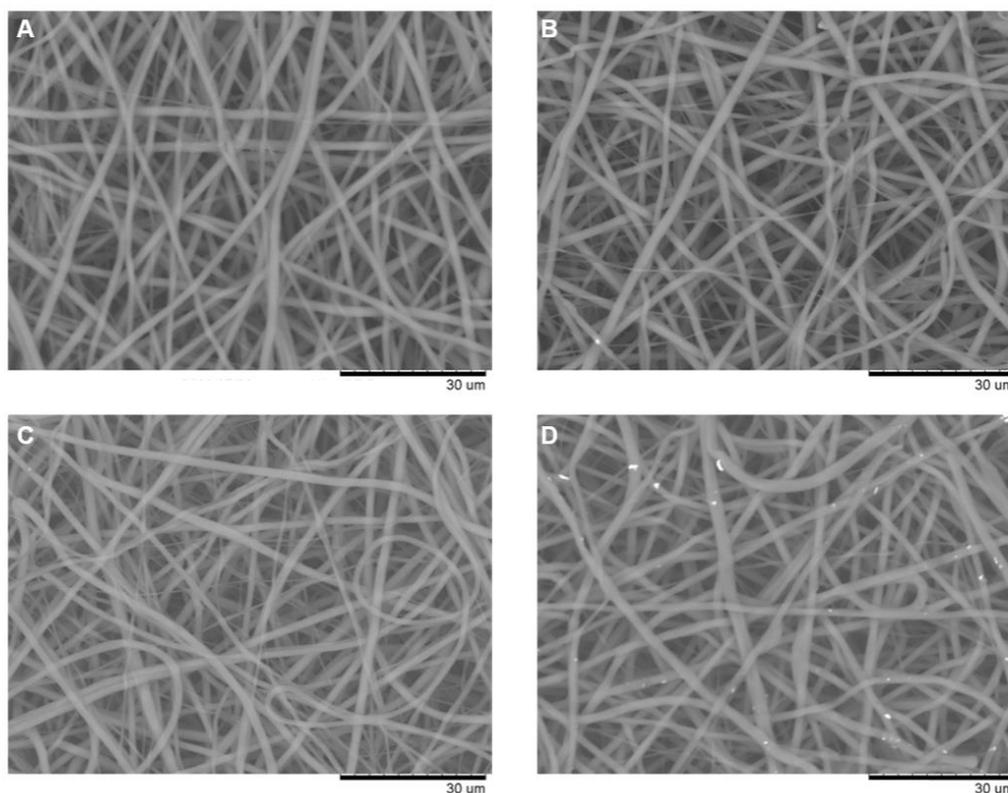


Figure 86 : Images MEB des membranes de PCL à J0 (**A**), après 2 mois dans du FBS dilué (milieu de dégradation) (**B**), après 2 mois dans le milieu avec l'ajout de l'azoture de sodium (**C**) et après 2 mois dans le milieu avec l'ajout de l'azoture de sodium, de la collagénase et de l'urée (**D**).

Ainsi, le milieu choisi nous permet de mener une étude de dégradation sans changement de composition ni de risque de contamination à long terme, lorsque les conditions de stérilisation sont respectées.

2. Étude de la dégradation *in vitro* :

La présente étude a pour objectif le suivi de la dégradation du patch (M₂) dans un milieu proche du liquide amniotique, et l'évaluation de l'effet de la fonctionnalisation de surface sur la progression de l'hydrolyse. Pour ce faire, plusieurs conditions de greffage (Figure 87) ont été étudiées pendant 6 mois de dégradation, afin de sélectionner le candidat idéal pour une implantation *in utero*.

Pour rappel, le patch M₂ a été choisi en raison de sa surface lisse antiadhésive qui évitera une étape supplémentaire de fonctionnalisation, ses propriétés mécaniques

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

ainsi que sa méthode d'élaboration facile, qui consiste à électrofiler une membrane de PCL et de la déposer sur un film de PCL obtenu par spin coating avant séchage.

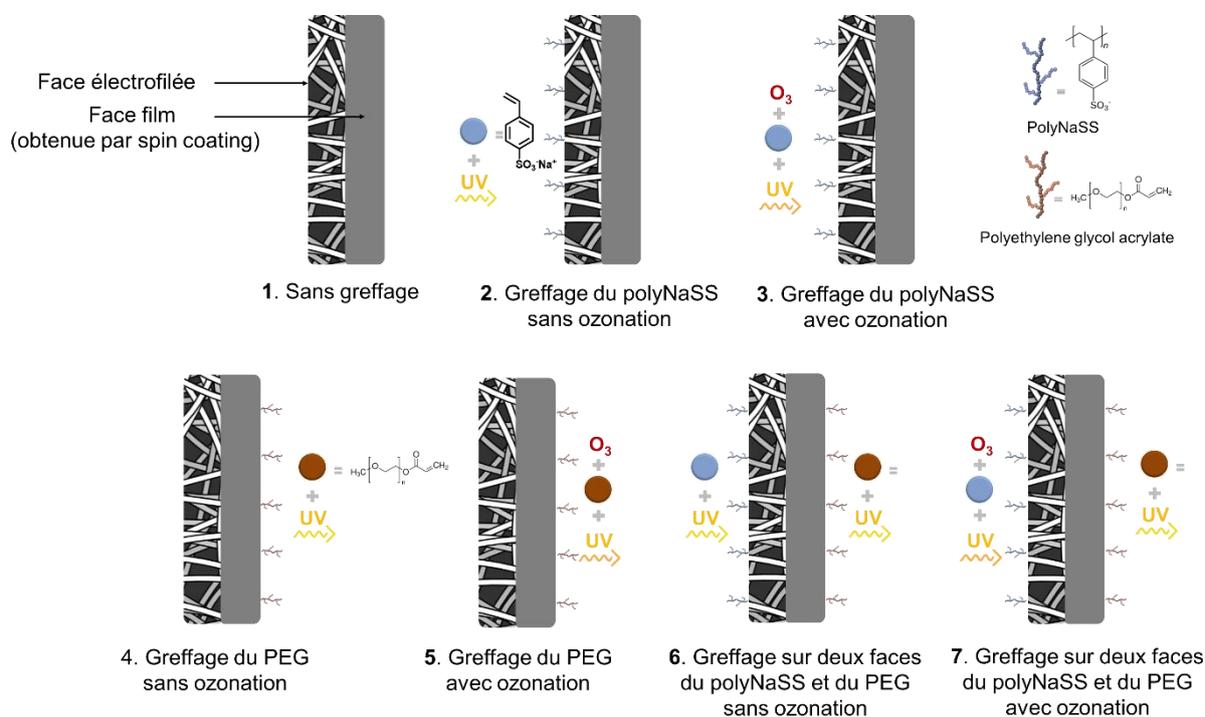


Figure 87 : Conditions de greffage testées pendant l'étude de dégradation.

2.1. Caractérisations physico-chimiques des patches après dégradation :

2.1.1. Calorimétrie différentielle à balayage :

L'analyse par DSC nous a permis de déterminer les degrés de cristallinité des échantillons de PCL à différents temps de dégradation. Comme décrit précédemment, nous avons observé qu'à J0, il n'existe pas de différence significative entre les différentes conditions (cf. partie 3 du chapitre III). De plus, la comparaison entre J0 et 6 mois de dégradation pour chaque condition révèle qu'il n'existe pas de différence significative entre les degrés de cristallinité (NG : $X_{j0} = 33,42 \pm 6,14\%$, $X_{6m} = 27,31 \pm 3,35\%$ avec un $p=0,21$). Cependant, une tendance à la hausse du degré de cristallinité est observée sur les échantillons greffés avec ozonation à 6 mois de dégradation (Tableau 17, Figure 88).

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Ces résultats rejoignent ceux de Leroux *et al.* qui ont étudié la dégradation de fils de PCL dans du PBS à 37°C, où aucune différence significative n'a été observée à 6 mois de dégradation des échantillons greffés et non greffés au PolyNaSS et entre les deux conditions [180]. Ceci peut être lié à un taux de dégradation similaire entre la phase amorphe et la phase cristalline, qui à la fin de la dégradation permet d'obtenir le même ratio.

Toutefois, plusieurs auteurs ont décrit que la dégradation des polyesters s'effectue d'abord par la diffusion de l'eau dans les zones amorphes avec une scission des liaisons ester, pour atteindre par la suite les zones cristallines qui sont moins sensibles à l'hydrolyse. Ils décrivent que le taux de cristallinité peut rester inchangé et qu'une éventuelle évolution serait favorisée par l'effet plastifiant de l'eau qui diffuse dans la phase amorphe au cours de la dégradation, de la réduction de la masse molaire des chaînes polymère et du changement de température. Ce phénomène appelé « chemicrystallisation » (chimiocrystallisation) résulte d'une migration, puis d'une cristallisation, au sein de la phase cristalline initiale, de segments de chaînes amorphes libérés par scission lors du processus d'hydrolyse [181, 182, 183]. Il peut expliquer l'augmentation du degré de cristallinité des échantillons ozonés, dans lesquelles l'eau peut diffuser aisément après dégradation des parties amorphes accélérée par ozonation.

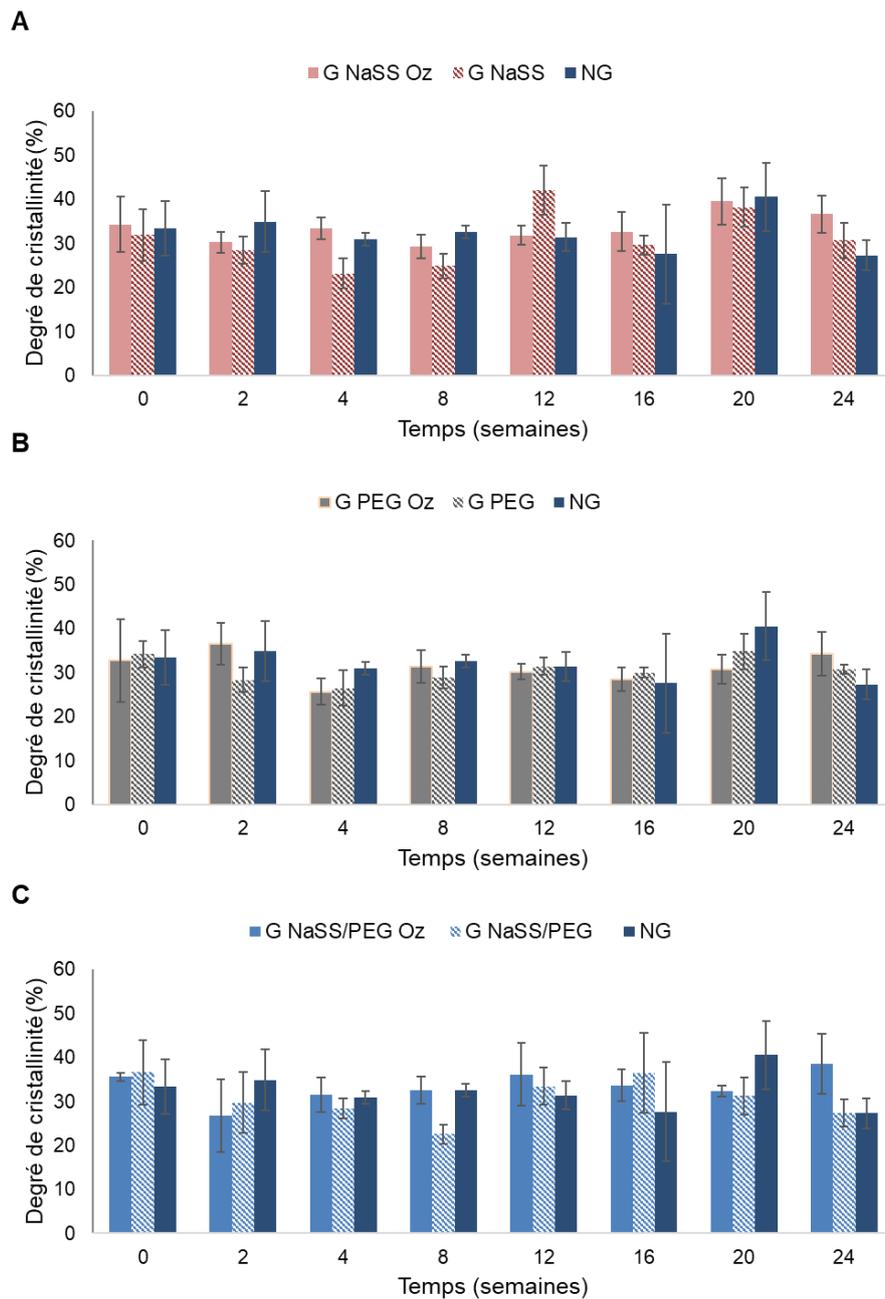


Figure 88 : Degré de cristallinité à différents temps de dégradation : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,07$), **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,12$), **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,06$).

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Tableau 17 : Degré de cristallinité des échantillons de PCL avec et sans greffage, à différents temps de dégradation.

Échantillons	Degré de cristallinité χ (%)								Valeur de p
	J0	15j	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	
Non greffés	33,42±6,14	34,92±6,87	30,93±1,45	32,54±1,42	31,41±3,27	27,61±11,25	40,53±7,75	27,31±3,35	0,26
Greffés NaSS	31,92±5,85	28,45±3,08	23,17±3,37	24,84±2,73	42,02±5,61	29,59±2,15	38,23±4,42	30,67±4,03	0,0005
Greffés NaSS Oz	34,30±6,23	30,23±2,43	33,38±2,42	29,31±2,64	31,82±2,16	32,61±4,42	39,55±5,27	36,61±4,29	0,10
Greffés PEG	34,00±3,00	28,35±2,86	26,49±3,97	28,83±2,51	31,44±1,97	29,95±1,13	34,85±4,04	30,76±1,09	0,03
Greffés PEG Oz	32,75±9,38	36,51±4,82	25,67±2,91	31,40±3,78	30,18±1,80	28,47±2,70	30,69±3,27	34,29±4,91	0,23
Greffés NaSS/PEG	36,60±7,38	29,75±6,98	28,45±2,25	22,53±2,11	33,40±4,23	36,47±9,04	31,22±4,31	27,39±3,04	0,08
Greffés NaSS/PEG Oz	35,57±0,97	26,69±8,25	31,51±3,92	32,54±3,02	36,11±7,17	33,66±3,66	32,39±1,25	38,54±6,91	0,25

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

En ce qui concerne la température de fusion, celle-ci augmente au cours de la dégradation pour toutes les conditions avec une différence significative (NG : $T_{fj0} = 61,26 \pm 0,52$ °C, $T_{f6m} = 67,35 \pm 0,21$ °C avec un $p = 6,14 \cdot 10^{-7}$) (Tableau 18). Cependant, à 6 mois de dégradation, il n'existe pas de différence significative entre les échantillons greffés et non greffés (Figure 89).

Ces résultats rejoignent ceux de Leroux *et al.* qui ont montré que la température de fusion augmentait de 6°C avec une différence significative entre le J0 et la 120^{ème} semaine de dégradation [180]. En effet, selon Yuang *et al.*, la dégradation du PLA dans un milieu alcalin (NaOH à 1,5M) à 37°C favorisait une érosion de surface des fibres et permettait d'augmenter la température de fusion par la formation de lamelles cristallines en surface, à partir des macromolécules obtenues par scission dans la région amorphe [184]. D'après Gan *et al.*, la température de fusion dépend de l'épaisseur des lamelles cristallines formées [185].

L'étude de Sailema *et al.* a montré également que la température de fusion augmentait dans deux conditions extrêmes, à pH=1 et à pH=13, sans changement significatif du taux de cristallinité à pH=13 [186, 187]. Ainsi, pour se situer par rapport à ces études, nous avons mesuré le pH du milieu de dégradation, qui passait de $8,31 \pm 0,03$ à $8,52 \pm 0,05$ après l'ajout de l'azote de sodium, de la collagénase et de l'urée.

Toutefois, plusieurs auteurs décrivent que la diminution de la masse molaire des chaînes polymère par hydrolyse permet l'augmentation de la mobilité des chaînes et par conséquent, la diminution de la température de fusion [188, 189].

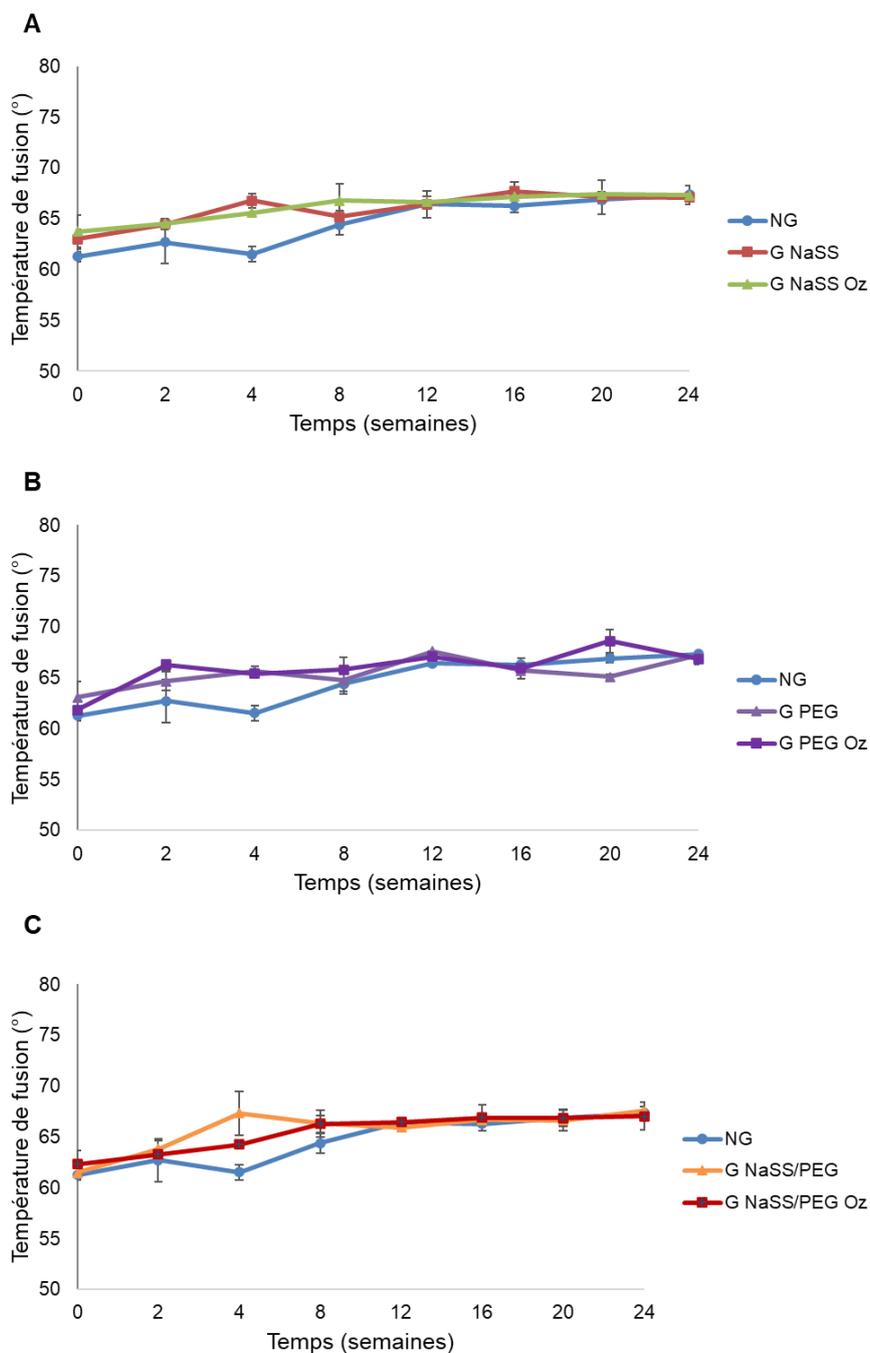


Figure 89 : Température de fusion de la PCL à différents temps de dégradation* : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,84$), **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,41$), **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,73$).

*Les courbes représentent uniquement la tendance d'évolution de la température de fusion au cours du temps.

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Tableau 18 : Température de fusion des échantillons de PCL avec et sans greffage, à différents temps de dégradation.

Échantillons	T _f (°C)								Valeur de p
	J0	15j	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	
Non greffés	61,26± 0,52	62,71±2,13	61,52±0,76	64,39±0,97	66,42±0,26	66,27±0,67	66,88±0,40	67,35±0,21	6,14.10 ⁻⁷
Greffés NaSS	62,98±0,98	64,45±0,52	66,78±0,70	65,19±0,584	66,42±1,29	67,69±0,95	67,12±1,69	67,10±0,15	0,0002
Greffés NaSS Oz	63,74±1,59	64,53±0,37	65,61±0,45	66,78±1,65	66,64±0,54	67,19±0,87	67,38±0,25	67,30±0,93	0,001
Greffés PEG	63,06±1,54	64,67±0,89	65,69±0,47	64,77±1,13	67,61±0,04	65,70±0,79	65,09±0,27	67,19±0,38	0,0001
Greffés PEG Oz	61,83±0,35	66,29±0,48	65,40±0,19	65,81±1,23	67,10±0,43	65,92±0,55	68,61±1,14	66,88±0,57	3,38.10 ⁻⁷
Greffés NaSS/PEG	61,48±0,21	63,83±0,78	67,32±2,18	66,32±1,30	65,95±0,29	66,67±0,40	66,65±1,05	67,56±0,38	2,76.10 ⁻⁵
Greffés NaSS/PEG Oz	62,31±1,39	63,29±0,08	64,26±0,22	66,26±0,82	66,45±0,28	66,88±1,29	66,83±0,77	67,03±1,36	2,55.10 ⁻⁵

2.1.2. Microscopie électronique à balayage :

La morphologie des patches à double couche après dégradation a été observée au microscope électronique à balayage, afin de déceler d'éventuels signes de dégradation au cours du temps.

Pour la face électrofilée non greffée, la morphologie des fibres semble inchangée au cours des quatre premiers mois de dégradation, à l'exception des fibres très fines, obtenues par ramification du jet, qui présentent une forme moins étirée. À 5 mois de dégradation, nous pouvons observer quelques fibres avec une forme irrégulière et un rétrécissement sur une partie de la fibre (Figure 90). Des coupures de fibres ont été observées à 6 mois de dégradation, mais leurs nombres restent moins importants.

Échantillons non greffés

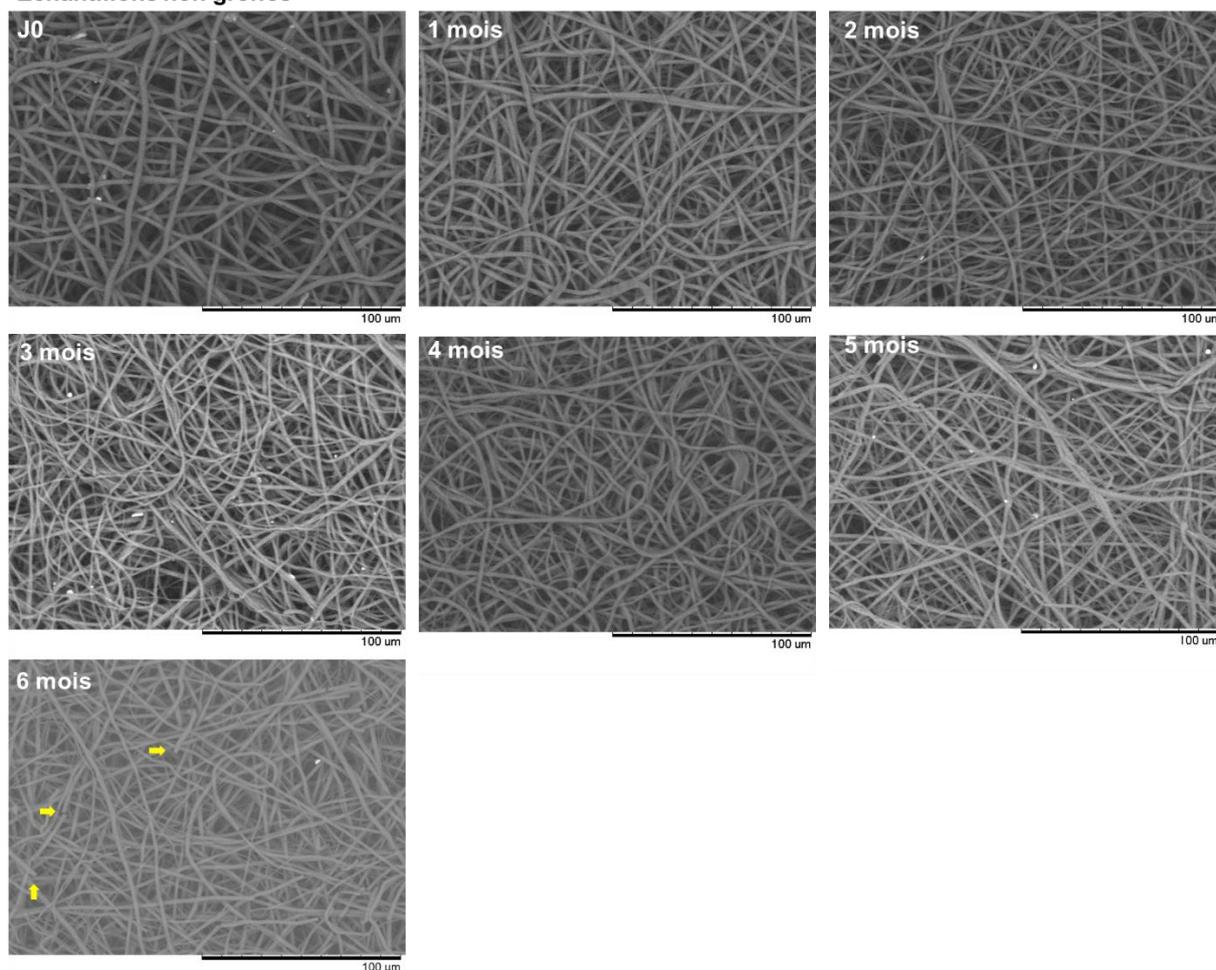


Figure 90 : Morphologies des fibres électrofilées non greffées, de 0 à 6 mois de dégradation.

En ce qui concerne les faces greffées au polyNaSS, la dégradation de la PCL semble être potentialisée par l'ozonation. En effet, pour les échantillons greffés avec ozonation, des signes de dégradation sont observés dès le 2^{ème} mois avec l'apparition des érosions de surfaces et un relâchement plus important des fibres fines. Cette érosion de surface progresse avec le temps et entraîne des rétrécissements sur des parties des fibres à 5 mois, puis des coupures de fibres à 6 mois de dégradation (Figure 91).

Échantillons greffés au polyNaSS avec ozonation

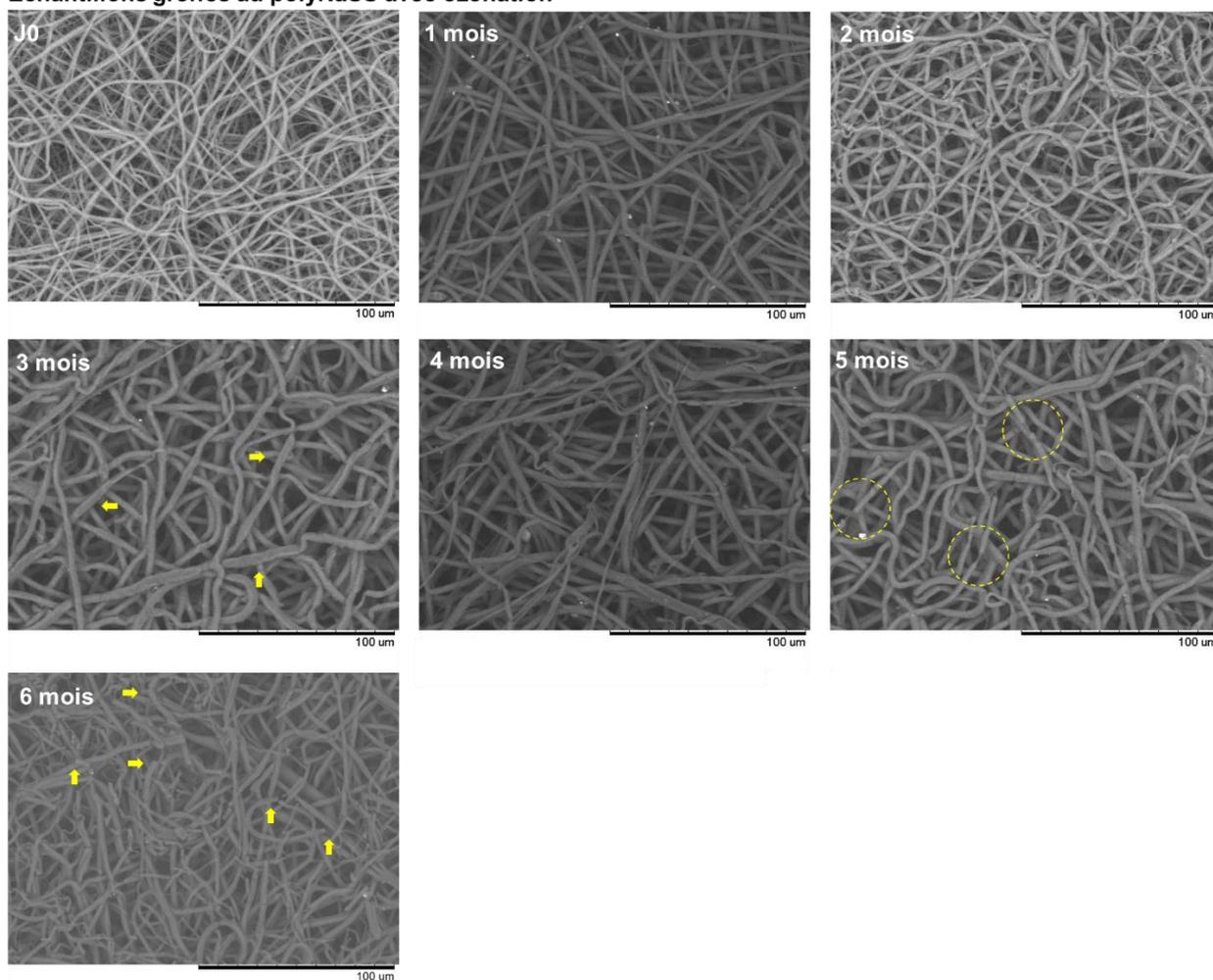


Figure 91 : Morphologies des fibres électrofilées greffées au polyNaSS avec ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches en jaune indiquent l'érosion de la surface des fibres. Les cercles en jaunes montrent les rétrécissements sur des parties des fibres.

Cependant, ces signes ne sont pas observés lorsque le greffage est effectué sans ozonation. Les fibres ont une morphologie similaire à celle des fibres non greffées, à l'exception du 6^{ème} mois, où nous observons des coupures de fibres avec un nombre plus important, regroupées essentiellement dans les zones de plis de la membrane (Figure 92).

Échantillons greffés au polyNaSS

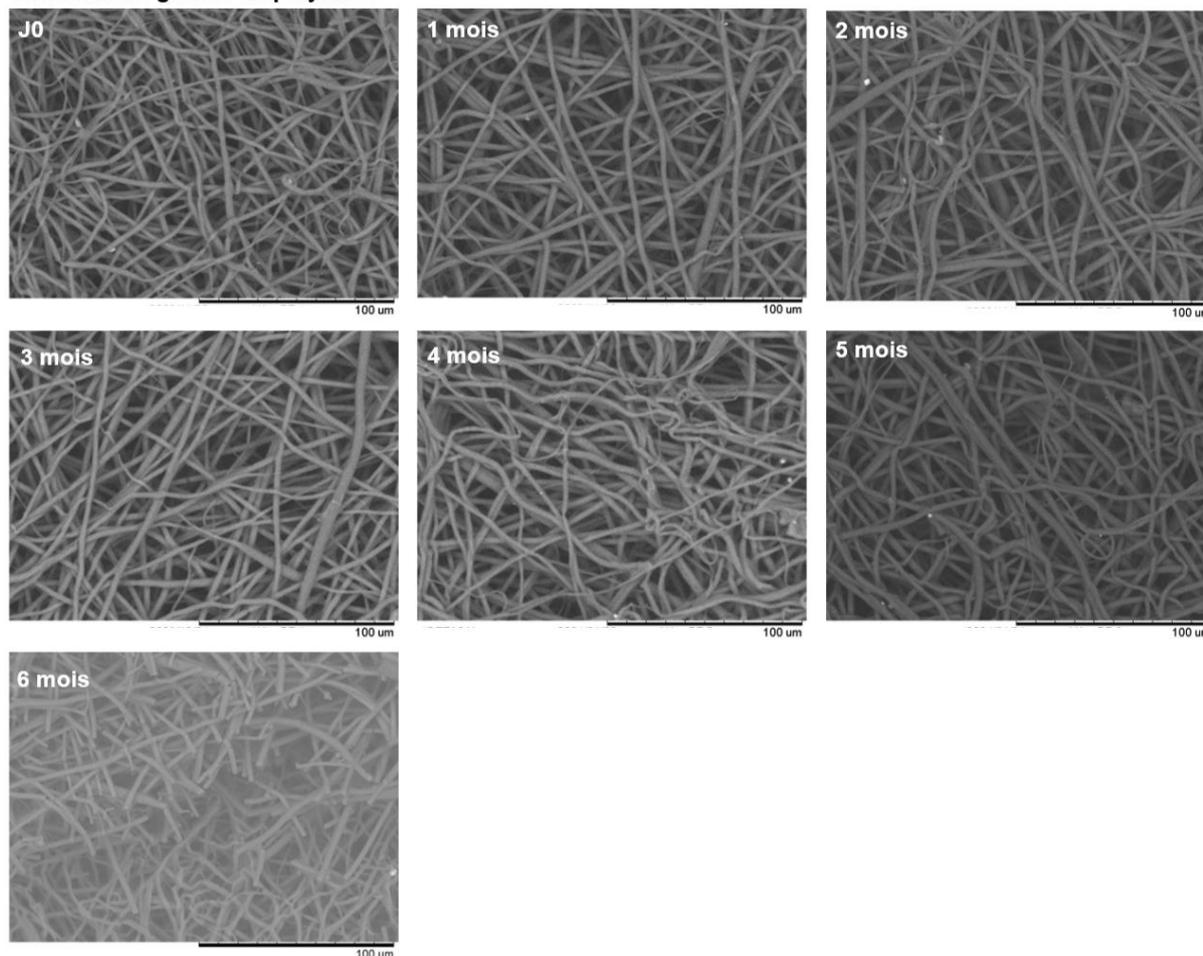


Figure 92 : Morphologies des fibres électrofilées greffées au polyNaSS sans ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation.

D'après la littérature [181], les érosions de surface seraient le résultat d'une hydrolyse intensifiée en surface et favorisée par le milieu alcalin. En effet, les ions OH^- peuvent catalyser la réaction d'hydrolyse, avec des attaques localisées en surface à cause de la faible polarité du polymère, qui limite la diffusion des espèces ioniques au cœur du matériau. Selon Elias *et al.*, ces ions hydroxydes peuvent modifier les propriétés

diélectriques de la surface des polyesters et, par conséquent, bloquer la pénétration des ions OH^- au cœur du polymère. Ainsi, l'érosion entraîne progressivement une réduction du diamètre des fibres jusqu'à la rupture (Figure 93) [181, 190].

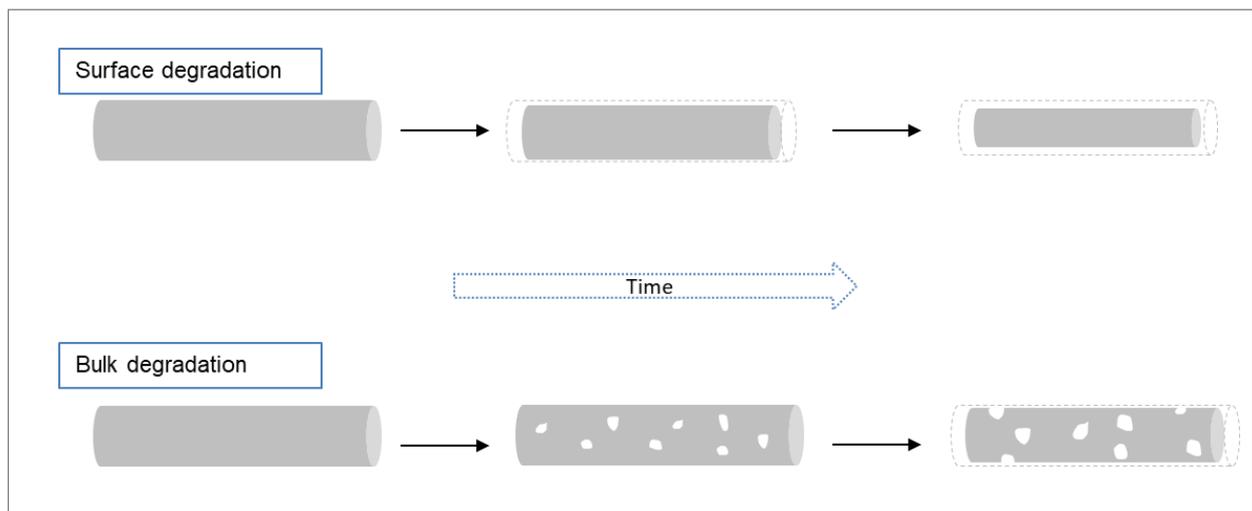


Figure 93 : Illustration du processus de dégradation en surface (érosion) et en masse.

Les images au MEB de la face, obtenue par spin coating, montrent un aspect rugueux dès le premier mois de dégradation sur les échantillons non greffés (Figure 94), et dès 3 mois pour les échantillons greffés au PEG avec et sans ozonation (Figure 95, 96). Cet aspect ne semble pas s'aggraver au cours du temps, ce qui peut être associé également à l'hydrolyse localisée en surface telle qu'observée sur les fibres électrofilées.

Échantillons non greffés

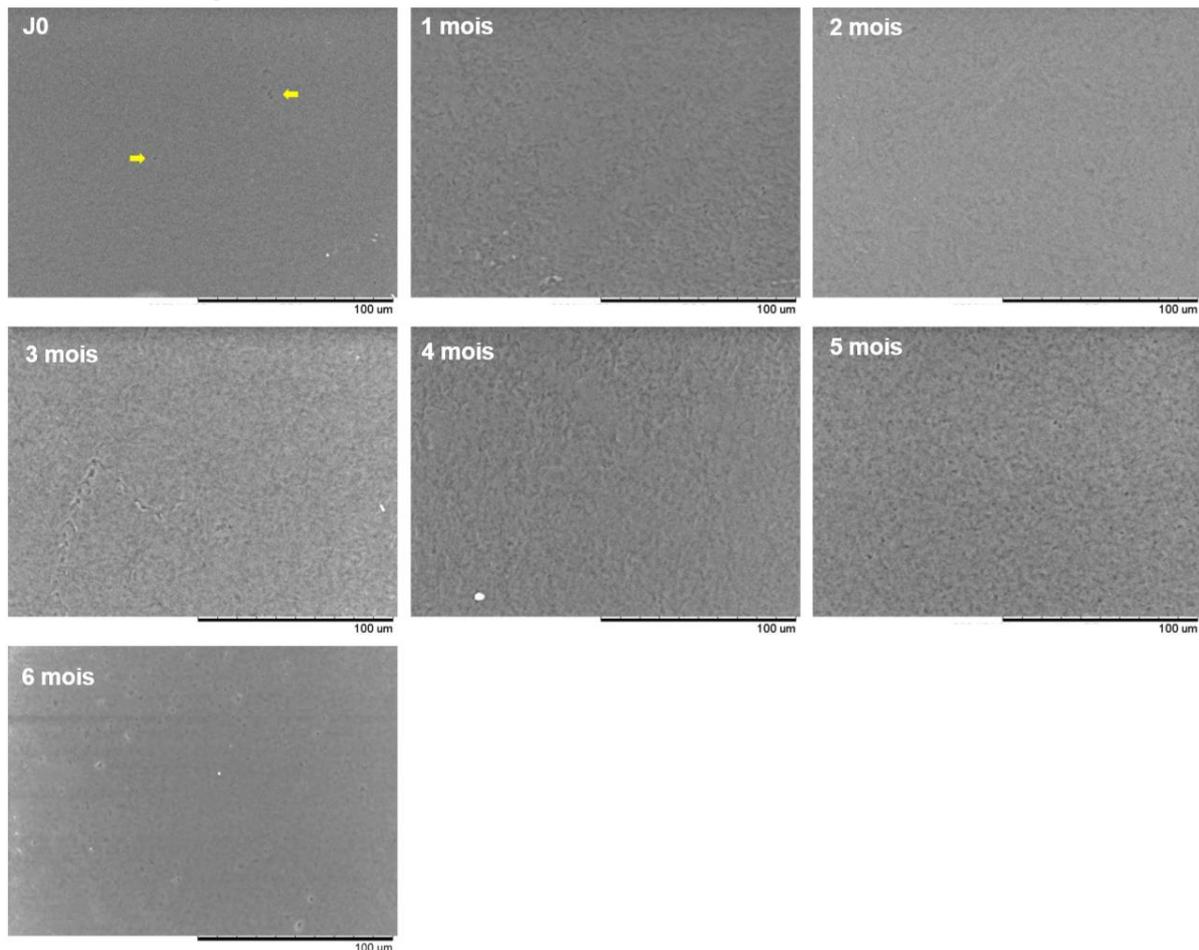


Figure 94 : Morphologies des films non greffées de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches jaunes indiquent les défauts de surface liés à la présence de bulles d'air pendant l'élaboration.

Toutefois, à 6 mois de dégradation, des craquelures sont observées sur les échantillons greffés avec ozonation (Figure 95). Celles-ci sont localisées sur une zone d'un seul échantillon, ce qui peut être liée à une dégradation au cœur du polymère, amorcée par un défaut de surface (défauts liés aux bulles d'air, observés à J0), ou par la fragilisation de la structure après ozonation. Ces craquelures sont décrites également par Leroux *et al.* sur des films de PCL greffés au polyNaSS avec 20 minutes d'ozonation, à partir de 24 semaines de dégradation (Figure 97) [180].

Échantillons greffés au PEG avec ozonation

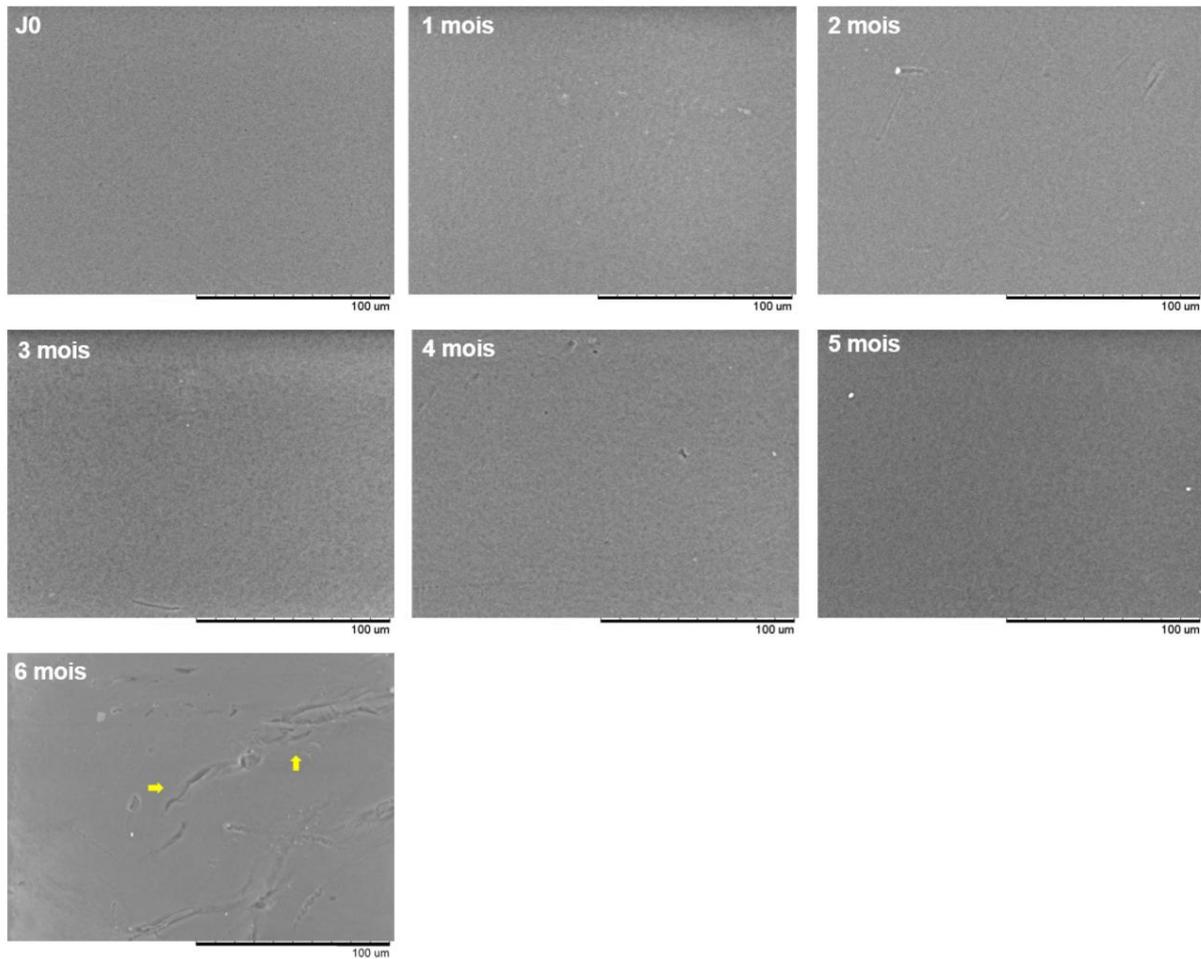


Figure 95 : Morphologies des films greffés au PEG avec ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation, les flèches jaunes indiquent les craquelures après 6 mois de dégradation.

Échantillons greffés au PEG

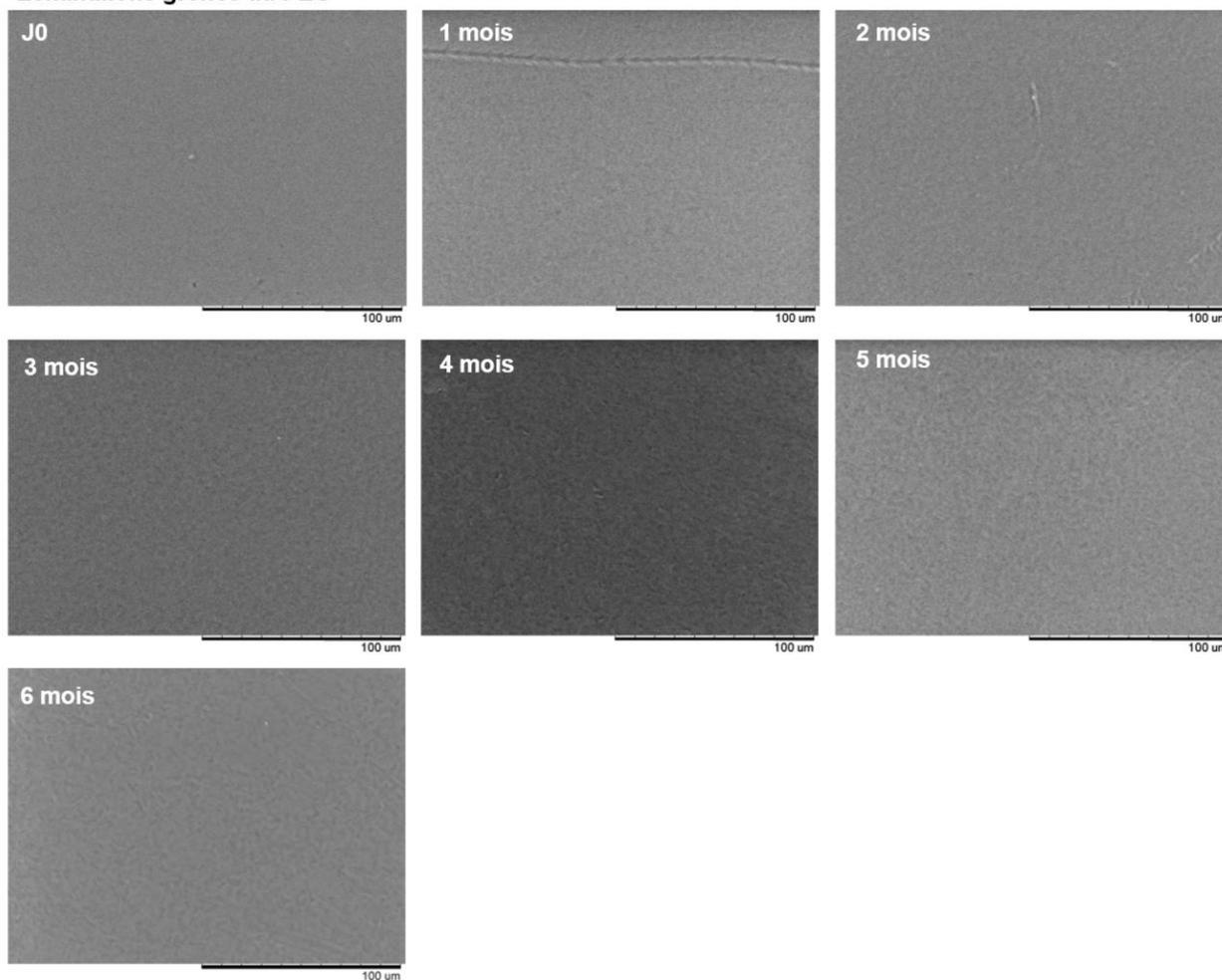


Figure 96 : Morphologies des films greffés au PEG sans ozonation, de 0 à 6 mois de dégradation.

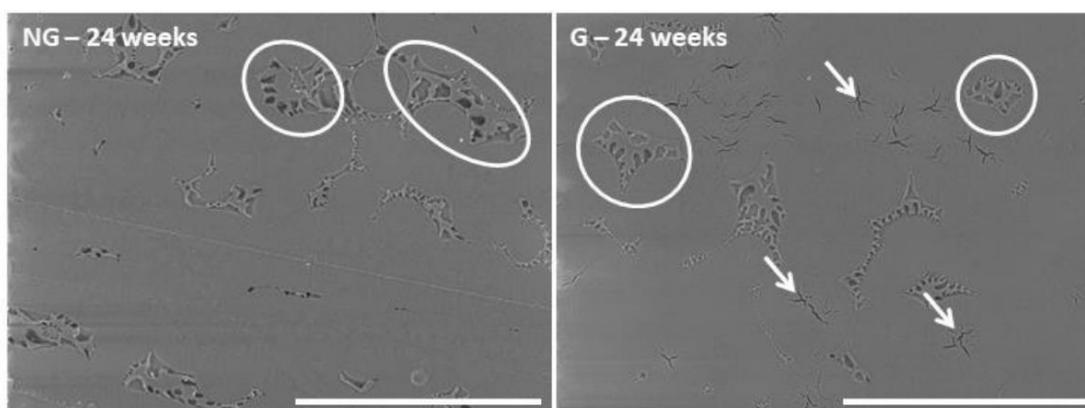


Figure 97 : Images MEB des films non greffés (NG) et greffés (G) dégradés à 37°C, pendant 24 semaines d'après Leroux *et al.* (Barre d'échelle=300µm, les flèches indiquent les craquelures) [180].

2.1.3. Chromatographie à exclusion stérique :

L'analyse par chromatographie à exclusion stérique nous a permis de suivre la dégradation à l'échelle macromoléculaire, par la détermination des masses molaires moyennes en nombre et en poids pour chaque condition et à différents temps de dégradation. L'intérêt est de déceler une éventuelle dégradation par la diminution de la masse molaire en nombre M_n et en poids M_w , ainsi que les coupures de chaînes par l'augmentation de l'indice de polydispersité I_p .

Comme décrit précédemment, la fonctionnalisation de surface ne semble pas modifier les masses molaires de la PCL. En effet, nous n'observons pas de différence significative entre les masses molaires moyennes des échantillons avec et sans greffage à J0 (cf. partie 4 du chapitre III).

Les résultats nous ont permis d'observer une diminution de la masse molaire moyenne en nombre (M_n) de J0 à 6 mois de dégradation, pour toutes les conditions ($p < 0,05$) (Tableau 19, 20, 21). Cette diminution est très marquée à partir de 4 mois de dégradation, pour toutes les conditions.

De plus, à partir de 1 mois de dégradation, nous observons une diminution de la masse molaire en nombre des échantillons greffés au polyNaSS avec ozonation par rapport aux échantillons non greffés et greffés sans activation de surface (Figure 98A). Ceci est également observé, à partir de 1 mois, sur les échantillons ozonés et greffés sur les deux faces, et à partir de 2 mois sur ceux ozonés et greffés au PEG (Figure 98B et 98C).

De même, une diminution de la masse molaire moyenne en poids (M_w) est observée au cours du temps ($p < 0,05$) (Tableau 19, 20, 21), avec une vitesse de dégradation élevée pour les échantillons greffés avec ozonation (à partir de 1 mois) (Figure 99). Tel qu'observé pour la masse molaire en nombre, la diminution de M_w est également marquée à partir de 4 mois de dégradation pour les échantillons greffés et non greffés. Celle-ci peut être associée à l'érosion de surface qui entraîne une perte de masse à partir de 4 mois jusqu'à la coupure des fibres à 6 mois de dégradation.

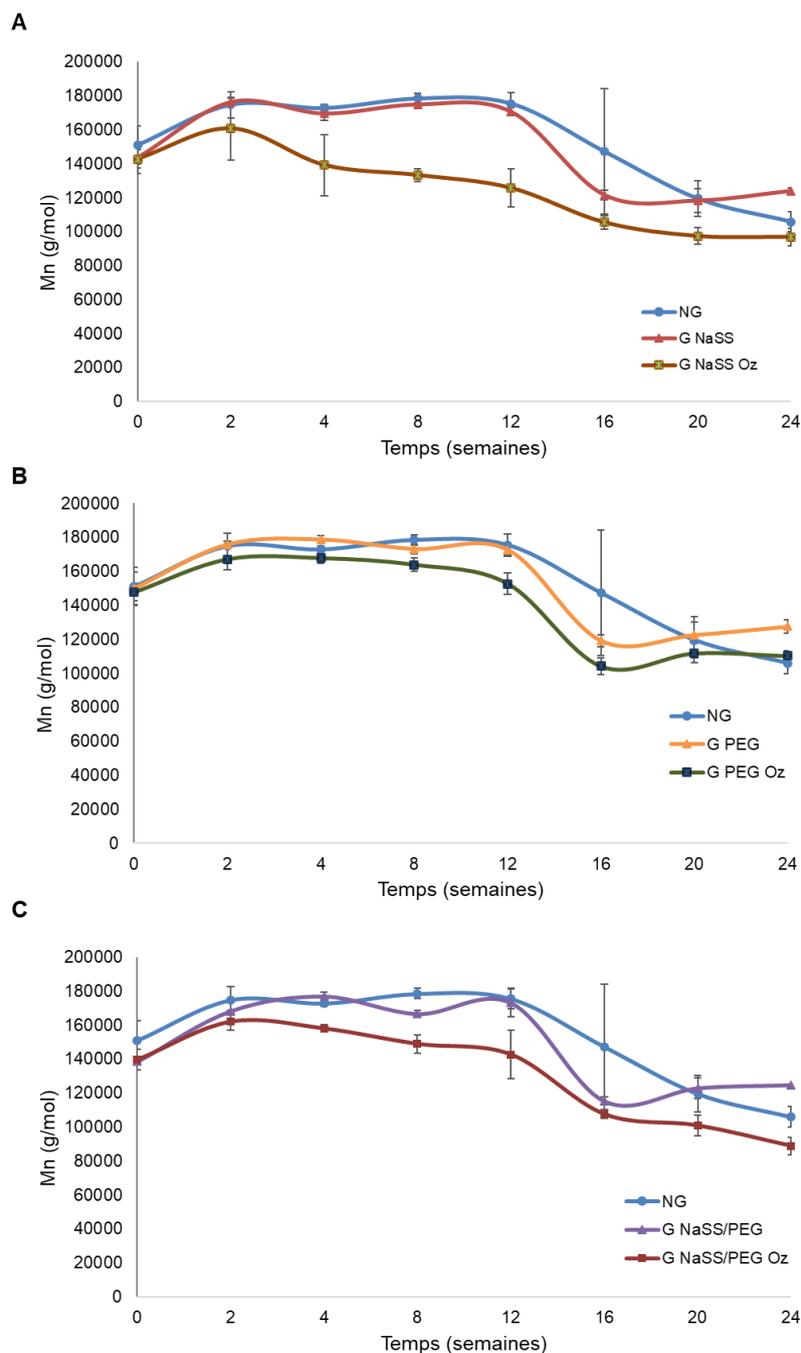


Figure 98 : Évolution de la masse molaire en nombre (M_n) en fonction du temps de dégradation* : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,001$), **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,001$), **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,0002$).

*Les courbes représentent uniquement la tendance d'évolution de la masse molaire en nombre au cours du temps.

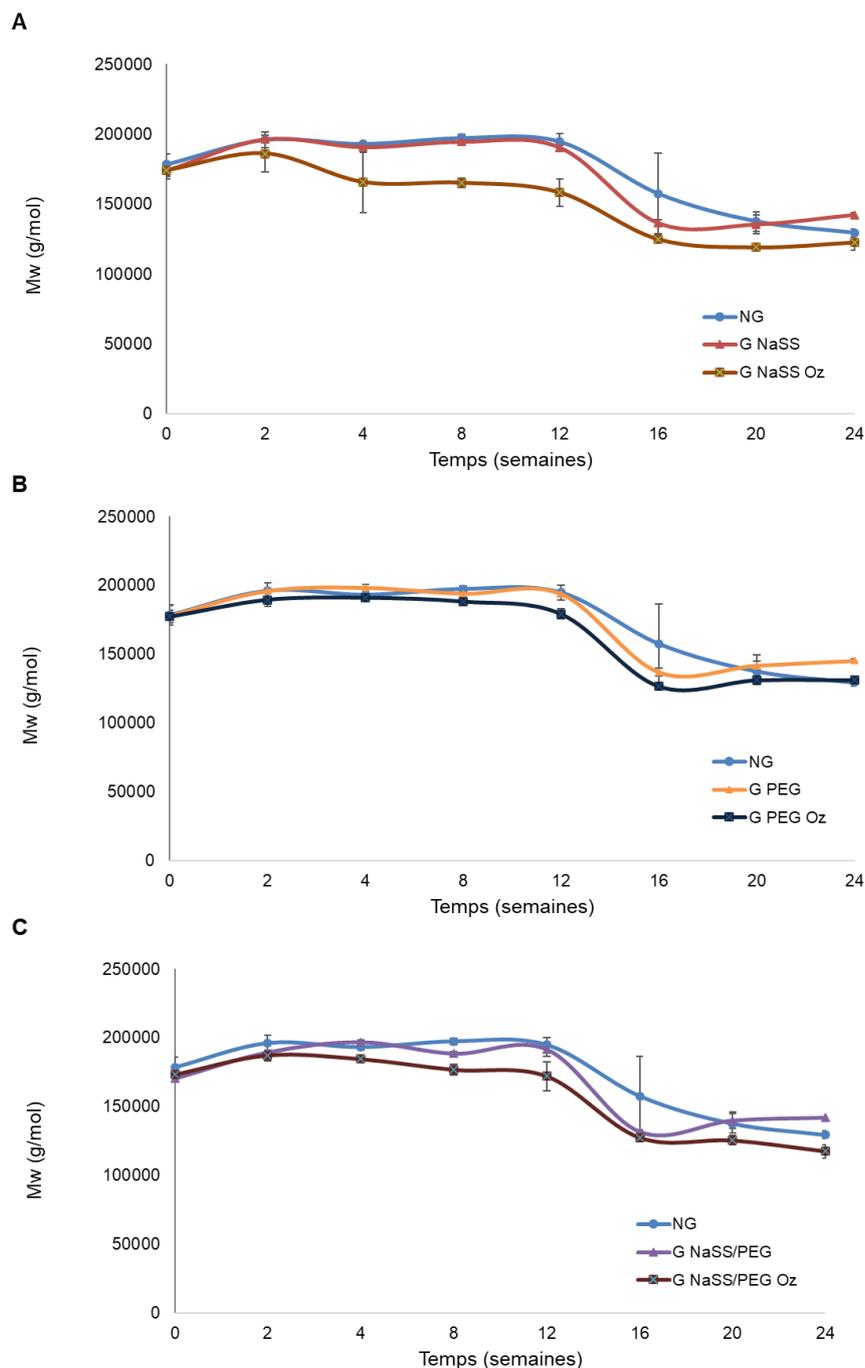


Figure 99 : Évolution de la masse molaire en poids (M_w) en fonction du temps de dégradation* : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,001$), **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,0001$), **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation (à 6 mois : $p=0,0004$).

*Les courbes représentent uniquement la tendance d'évolution de la masse molaire en poids au cours du temps.

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Ces résultats montrent que le greffage avec ozonation peut accélérer la dégradation de la PCL. En effet, l'étude de Dabasinskaite *et al.* a montré que la modification de surface de PCL par ozonation en milieu aqueux permet la formation de radicaux hydroxyles libres, qui réagissent avec la PCL en brisant les chaînes polymères pour former des oligomères et des monomères avec des groupements hydroxyles et carboxyles (Figure 100) [191]. L'ozonation peut ainsi réduire la taille des chaînes polymères et créer une coupure de chaîne, qui au cours de la dégradation permet d'accélérer la formation de bouts de chaînes. Ceci peut être confirmé par l'augmentation de l'indice de polydispersité (I_p) avec le temps d'hydrolyse ($p < 0,05$), notamment pour les échantillons ozonés (Tableau 19, 20, 21), ce qui témoigne une large distribution des masses molaires (hétérogénéité par rapport à la longueur des chaînes).

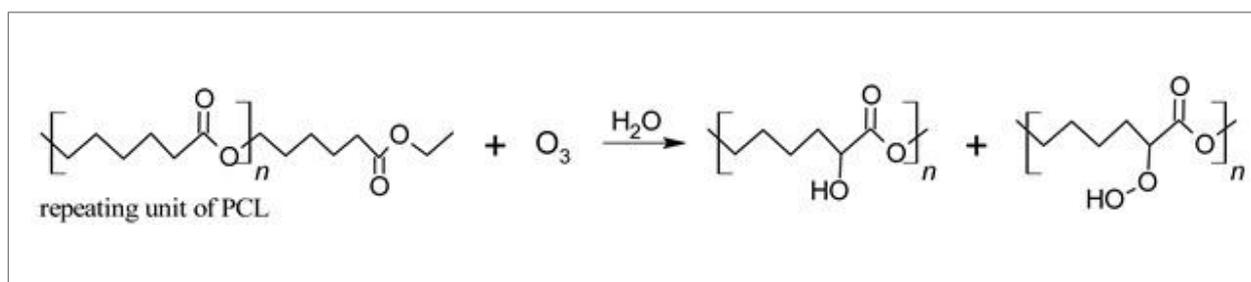


Figure 100 : Mécanisme de réaction de l’ozone avec la PCL d’après Dabasinskaite *et al.* [191].

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Tableau 19 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation

Échantillons		J0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	Valeur de p
Non greffés	M_n (g/mol)	151065±1132 1	174876±7714	172892±1848	178539±301 0	175585±619 2	147280±368 98	119549±10578	105898±601 7	5,64.10 ⁻⁵
	M_w (g/mol)	178487±7512	196098±5545	193131±1899	197371±227 3	194797±536 2	157592±287 08	137619±7108	129398±285 1	5,61.10 ⁻⁷
	I_p	1,18±0,04	1,12±0,02	1,12±0,01	1,11±0,01	1,11±0,01	1,08±0,07	1,15±0,04	1,22±0,04	0,003
Greffés NaSS	M_n (g/mol)	143503±9274	176498±2073	169751±4253	175109±760	170798±208 1	121562±266 8	118346±7205	124061±166 0	1,03.10 ⁻¹¹
	M_w (g/mol)	174047±5961	196443±1180	190829±3581	194654±255	190622±132 0	136557±217 5	135493±6785	142360±130 7	2,99.10 ⁻¹⁴
	I_p	1,21±0,04	1,11±0,01	1,12±0,01	1,11±0,01	1,12±0,01	1,12±0,01	1,15±0,01	1,15±0,01	4,53.10 ⁻⁶
Greffés NaSS Oz	M_n (g/mol)	142834±5496	160772±1837 1	139237±1796 4	133315±369 5	125722±113 46	105481±400 4	97428±4902	96905±5262	1,46.10 ⁻⁵
	M_w (g/mol)	174162±4402	186142±1288 0	165714±2193 1	165219±317 6	158321±970 1	125067±322 4	119173±2389	122708±588 5	1,32.10 ⁻⁶
	I_p	1,22±0,02	1,16±0,05	1,19±0,01	1,24±0,01	1,26±0,04	1,19±0,01	1,22±0,04	1,27±0,01	0,02

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Tableau 20 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation.

Échantillons		J0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	Valeur de p
Non greffés	M_n (g/mol)	151065±11321	174876±771 4	172892±184 8	178539±3010	175585±6192	147280±3 6898	119549±10578	105898±601 7	5,64.10 ⁻⁵
	M_w (g/mol)	178487±7512	196098±554 5	193131±189 9	197371±2273	194797±5362	157592±2 8708	137619±7108	129398±285 1	5,61.10 ⁻⁷
	I_p	1,18±0,04	1,12±0,02	1,12±0,01	1,11±0,01	1,11±0,01	1,08±0,07	1,15±0,04	1,22±0,04	0,003
Greffés PEG	M_n (g/mol)	150003±9635	175718±213 2	178564±228 5	173021 ±2862	172531±3654	119221±3 429	122645±10847	127591±392 6	2,87.10 ⁻¹⁰
	M_w (g/mol)	178182±7209	196052±199 9	198316±246 3	194062±2388	193877±2324	137002 ±3076	141736±8012	145250±133 4	8,80.10 ⁻¹³
	I_p	1,19±0,03	1,12±0,01	1,11±0,01	1,12±0,01	1,12±0,01	1,15±0,01	1,16±0,04	1,14±0,03	0,003
Greffés PEG Oz	M_n (g/mol)	147722±5248	167077±627 5	167735±311 8	163850±3874	152708 ±6201	104201±4 740	111845±5422	110288±317 5	7,11.10 ⁻¹²
	M_w (g/mol)	177249±4651	189550±475 3	191032±266 7	188247±2512	179221±3691	126705±1 529	131162±3042	131220±124 6	7,54.10 ⁻¹⁶
	I_p	1,20±0,01	1,13±0,01	1,14±0,01	1,15±0,01	1,17±0,02	1,22±0,04	1,17±0,04	1,19±0,02	0,005

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Tableau 21 : Comparaison des masses molaires moyennes en nombre (M_n), masses molaires moyennes en poids (M_w) et indice de polydispersité (I_p) des échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation.

Échantillons		J0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	Valeur de p
Non greffés	M_n (g/mol)	151065±11321	174876±771 4	172892±184 8	178539±3010	175585±6192	147280±3 6898	119549±10578	105898±601 7	5,64.10 ⁻⁵
	M_w (g/mol)	178487±7512	196098±554 5	193131±189 9	197371±2273	194797±5362	157592±2 8708	137619±7108	129398±285 1	5,61.10 ⁻⁷
	I_p	1,18±0,04	1,12±0,02	1,12±0,01	1,11±0,01	1,11±0,01	1,08±0,07	1,15±0,04	1,22±0,04	0,003
Greffés NaSS/PEG	M_n (g/mol)	138520±1920	168322±378	176948±240 3	166684±2047	173105±8039	115223±2 362	122927±6129	124757±546	7,43.10 ⁻¹³
	M_w (g/mol)	170405±848	189441±522	196898±184 0	188573±1065	191582±4840	131867±1 010	140092±6205	142146±480	1,18.10 ⁻¹⁶
	I_p	1,23±0,01	1,13±0,01	1,11±0,01	1,13±0,01	1,11±0,03	1,14±0,01	1,14±0,01	1,14±0,01	6,95.10 ⁻⁸
Greffés NaSS/PEG Oz	M_n (g/mol)	139576±6196	161990±522 9	157957±210 6	148863±5378	142647±1436	107516±2 589	100859±5882	88784±5281	1,08.10 ⁻⁹
	M_w (g/mol)	173246±4330	187193±392 2	184521 ±891	176720 ±3842	171992 ±10486	127445±9 68	125444±3388	117455±486 8	3,21.10 ⁻¹³
	I_p	1,24±0,03	1,16±0,01	1,17±0,01	1,19±0,02	1,21±0,05	1,19±0,02	1,25±0,04	1,32±0,02	3,52.10 ⁻⁵

2.2. Étude de la stabilité du greffage pendant la dégradation :

2.2.1. Dosage au bleu de toluidine :

Le dosage au bleu de toluidine a été réalisé afin de suivre l'évolution du taux de greffage du polyNaSS au cours du temps. Comme décrit précédemment, le taux de greffage (degré de greffage, DG) est évalué par le dosage d'une molécule chromophore (BT) qui complexe avec des groupements anioniques tels que le SO_3^- du polyNaSS.

Les précédents résultats ont montré que le taux de greffage est élevé pour les échantillons greffés au polyNaSS avec ozonation par rapport aux non greffés, sur lesquels ce taux correspond à une adsorption non spécifique de la molécule de BT (cf. partie 2.1.1 du chapitre III).

Pour chaque condition, un dosage au bleu de toluidine a été réalisé après les différents temps de dégradation (cf. Annexe I). Nous avons choisi de présenter les résultats des échantillons greffés au polyNaSS avec et sans ozonation comparé aux non greffés (témoins).

Les résultats nous permettent d'observer une diminution du taux de greffage pour les échantillons fonctionnalisés avec et sans ozonation ($\text{DG}_{\text{GOz}}=6,74\pm 9,86 \mu\text{mol/g}$; $\text{DG}_G=4,12\pm 1,69 \mu\text{mol/g}$) au bout de deux semaines de dégradation (Figure 101). Ceci peut être associé à la perte du greffage par dégradation de la couche superficielle de la PCL. Cette dégradation peut être accélérée par la diffusion d'eau à travers les chaînes hydrophiles du polyNaSS.

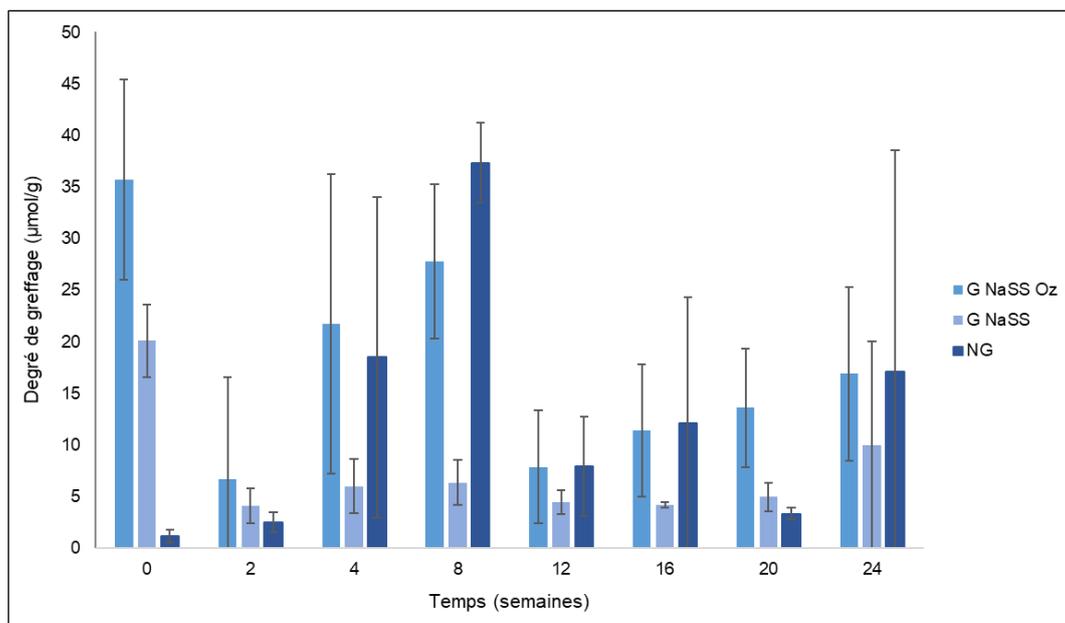


Figure 101 : Taux de greffage des échantillons greffés et non greffés, de J0 à 6 mois de dégradation.

Cependant, ce taux augmente après un mois de dégradation, non seulement pour les échantillons greffés, mais également pour les témoins non greffés ($DG_{Goz}=21,74\pm24,55$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_G=6,00\pm2,65$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_{NG}=18,51\pm15,52$ $\mu\text{mol/g}$), ce qui est probablement lié à la complexation du BT avec les groupements COO^- formés après scission des liaisons ester, et non pas par rapport aux groupements SO_3^- du polyNaSS.

Après 3 mois de dégradation, la concentration du bleu de toluidine diminue par rapport à 1 et 2 mois de dégradation ($DG_{Goz}=7,88\pm5,48$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_G=4,48\pm1,15$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_{NG}=7,90\pm4,80$ $\mu\text{mol/g}$), puis augmente légèrement jusqu'au 6^{ème} mois ($DG_{Goz}=16,90\pm8,38$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_G=9,96\pm10,11$ $\mu\text{mol/g}$; $DG_{NG}=17,11\pm21,41$ $\mu\text{mol/g}$). Cette variation peut être expliquée par l'érosion de surface, qui permet la dégradation par couche en générant des bouts de chaînes de polymère. Ces chaînes détachées vont soit être éliminées par les changements réguliers du milieu, ou se déplacer au cœur du matériau pour participer à la formation de nouvelles lamelles cristallines, tel que décrit précédemment.

Le renouvellement du milieu chaque semaine permet de maintenir l'hydrolyse avec un pH constant, qui peut jouer un rôle dans la progression de l'hydrolyse en surface.

Les résultats permettent également d'observer des écarts types élevés notamment à 2 mois de dégradation, où deux échantillons (G NaSS Oz) sur trois (2/3) présentaient une concentration élevée de BT contre un échantillon sur trois à 4 et 6 mois de dégradation. Cette disparité peut être associée à un échec de greffage sur certains échantillons, d'où l'intérêt de réaliser une étude statistique avec un nombre d'échantillons plus important.

2.2.2. Mesure de l'angle de contact :

Le greffage a été également caractérisé par la mesure de l'angle de contact, au cours de la dégradation. Les résultats précédents ont permis de montrer que le greffage d'un polymère hydrophile (polyNaSS et PEG) permettait la diminution de l'angle de contact de la surface de PCL (cf. partie 2.1.3 du chapitre III). En ce qui concerne la face électrofilée, la goutte d'eau était complètement absorbée sur les surfaces greffées au polyNaSS, ce qui a rendu difficile de mesurer l'angle de contact sur ces surfaces.

Tel qu'observé au dosage du bleu de toluidine, après 15 jours de dégradation, nous observons une augmentation de l'angle de contact sur les surfaces fonctionnalisées avec du polyNaSS ($\theta_{Goz}=102,07^{\circ}\pm 17,21$; $\theta_G=100,40^{\circ}\pm 2,18$) et du PEG ($\theta_{Goz}=80,63^{\circ}\pm 4,28$; $\theta_G=79,8^{\circ}\pm 2,19$). La perte du caractère hydrophile est associée à l'absence des polymères provenant du greffage sur la surface de PCL, probablement par dégradation de la couche superficielle.

Pour la face électrofilée, une diminution de l'angle de contact est observée à partir de 4 mois de dégradation pour les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS sans ozonation, et à partir de 5 mois pour les échantillons greffés avec ozonation (1 échantillon sur 3 absorbait la goutte d'eau) (Figure 102). La diminution de l'angle de contact semble être associée à la formation de groupements polaires après scission des liaisons ester.

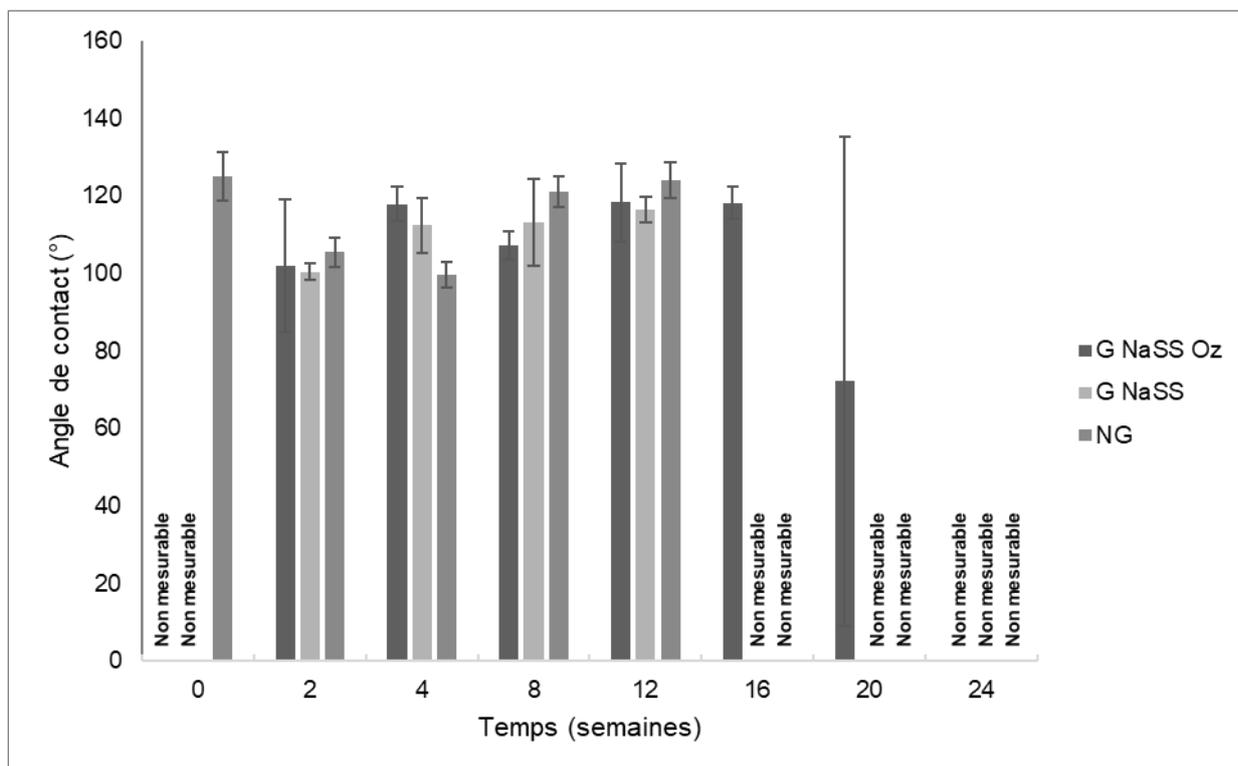


Figure 102 : Angle de contact des surfaces électrofilées, avec et sans greffage du polyNaSS, en fonction du temps de dégradation.

De plus, il existe une différence entre le greffage avec et sans ozonation à partir de 4 mois de dégradation. Celle-ci peut être due à une dégradation par couche de fibres électrofilées, accélérée par l'ozonation, qui permet d'exposer à nouveau des fibres de PCL non dégradées, augmentant ainsi l'angle de contact. En effet, à partir de 5 mois de dégradation, nous avons pu observer à l'œil nu et au MEB, un détachement de couches de fibres électrofilées sur les échantillons fonctionnalisés avec ozonation (Figure 103). Cette hypothèse peut être confirmée par les analyses précédentes, dans lesquelles une diminution importante de la masse molaire est observée à partir de 4 mois de dégradation.

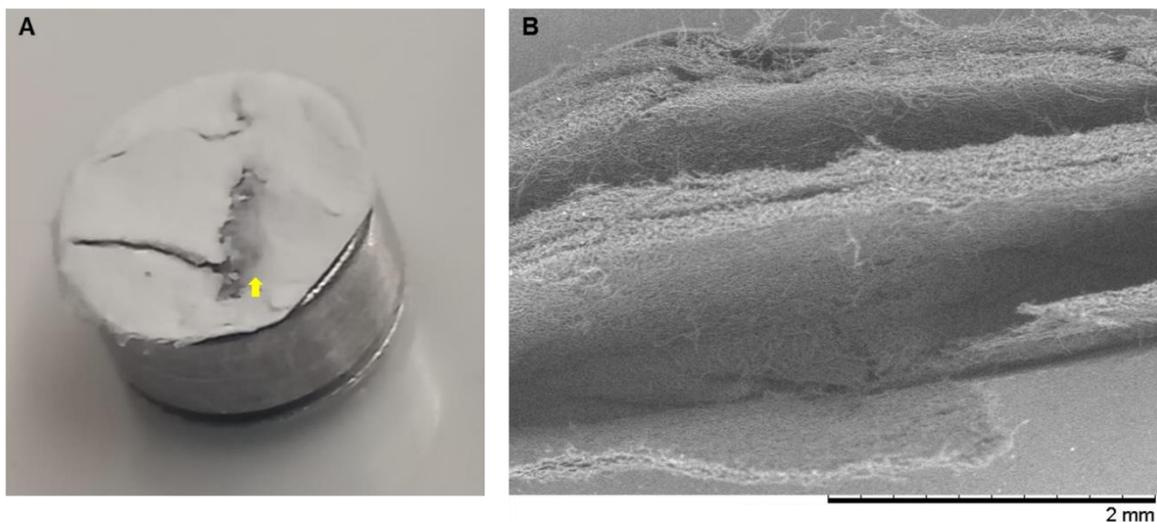


Figure 103 : (A) image du patch greffé avec ozonation après 5 mois de dégradation sur lequel une délamination des couches supérieures est observée, (B) image MEB de la face électrofilée (G NaSS OZ) qui présente des couches de fibres séparées après 5 mois de dégradation.

En ce qui concerne la face obtenue par spin coating, celle-ci connaît également une diminution de l'angle de contact à partir de 5 mois de dégradation pour les surfaces avec et sans greffage (à 6 mois : $\theta_{GoZ}=67,43^{\circ}\pm 7,36$; $\theta_G=72,73^{\circ}\pm 15,11$; $\theta_{NG}=70,43^{\circ}\pm 16,14$) (Figure 104). Toutefois, cette diminution est moins importante que sur la surface électrofilée, qui par sa porosité et sa surface spécifique élevée, va favoriser la diffusion de l'eau et son interaction avec les chaînes polymères.

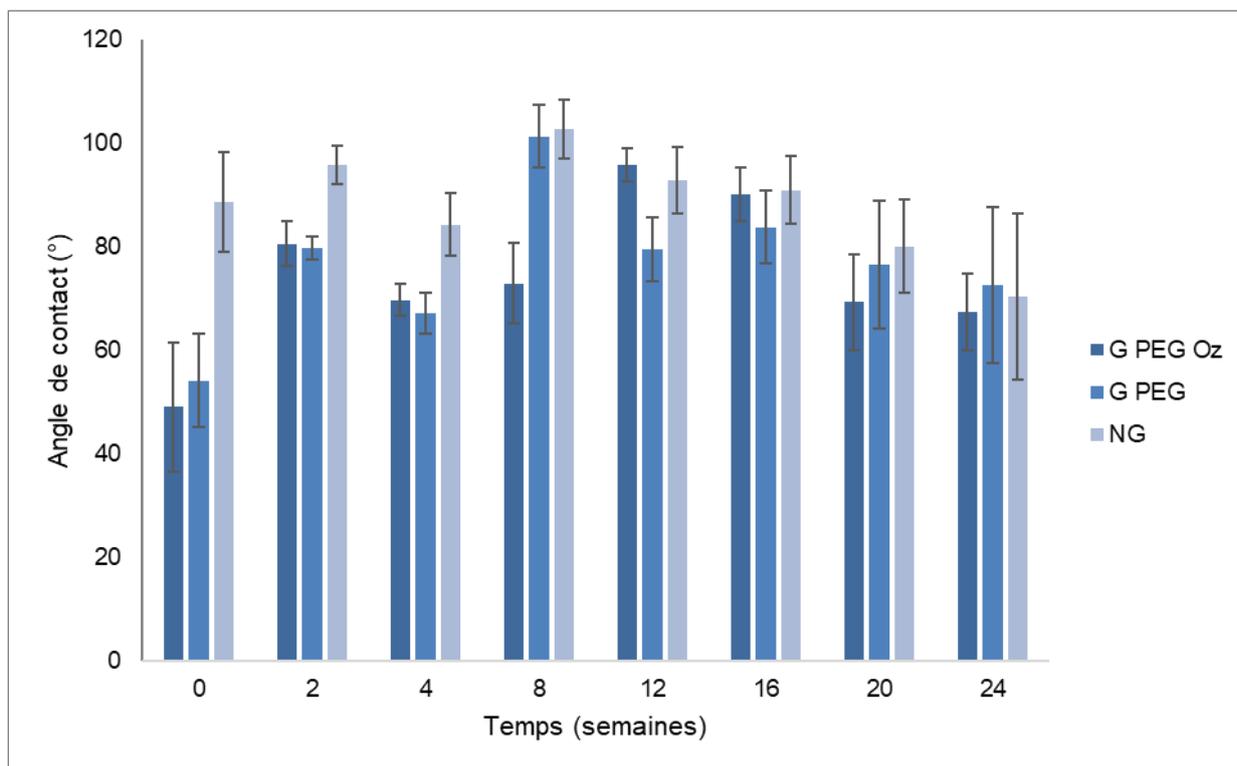


Figure 104 : Angle de contact des surfaces de PCL, avec et sans greffage du PEG, en fonction du temps de dégradation.

Enfin, une analyse statistique, avec un nombre important d'échantillons, est nécessaire pour évaluer la stabilité du greffage au cours du temps.

2.3. Étude des propriétés mécaniques après dégradation :

L'évolution des propriétés mécaniques au cours de la dégradation a été étudiée grâce à des essais de traction uni-axiale pour chaque condition, et à différents temps de dégradation.

Les changements des propriétés physico-chimiques suscités semblent avoir des effets sur le comportement mécanique du patch. En effet, à 6 mois de dégradation, une diminution du module de Young est observée pour toutes les conditions (à J0 : $E_{NG0} = 62,5 \pm 4,5$ MPa, à 6 mois : $E_{NG6} = 35,9 \pm 16,9$) (Figure 105). Cependant, il n'existe pas de différence entre les échantillons greffés avec ozonation et non greffés par rapport à l'évolution du module de Young, probablement en raison de la forte contribution de la couche pleine qui semble être moins altérée par l'ozonation.

De même, de J0 à 6 mois de dégradation, nous observons une diminution de la contrainte maximale jusqu'à 50% de la valeur initiale (à J0 : $\sigma_{NG0} = 11,0 \pm 1,5$ MPa, à 6 mois : $\sigma_{NG6} = 4,6 \pm 2,2$) (Figure 106). Celle-ci semble être accélérée par le greffage avec ozonation, notamment sur les échantillons greffés au polyNaSS (à 6 mois : $\sigma_{NaSS Oz} = 3,0 \pm 2,5$). Ces résultats rejoignent ceux de Elias *et al.* qui décrivent une baisse de la résistance à la rupture du polyéthylène téréphtalate par la diminution du diamètre des fibres, causée par l'hydrolyse en milieu alcalin [190].

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

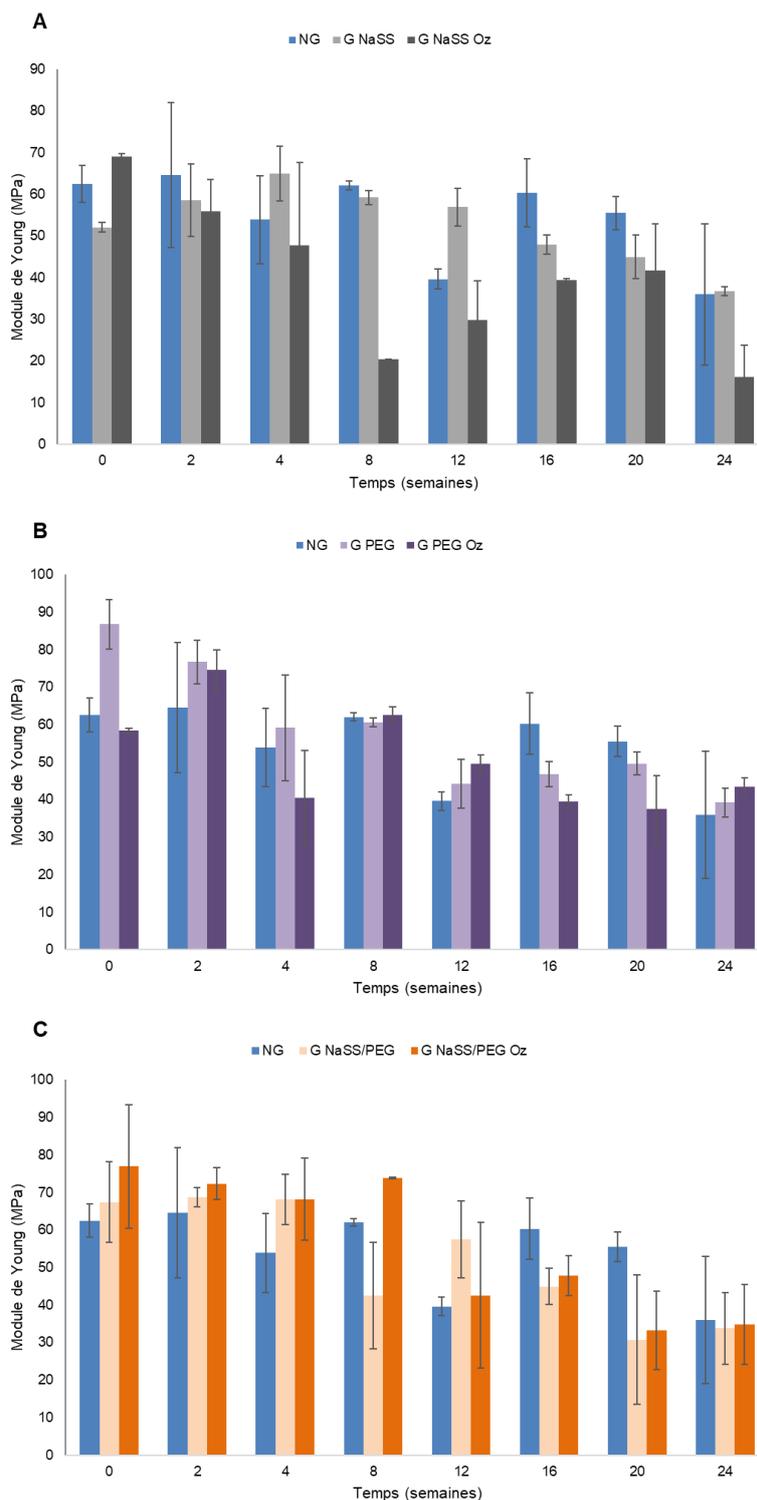


Figure 105 : Évolution du module de Young (E) en fonction du temps de dégradation : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation, **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation, **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation.

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

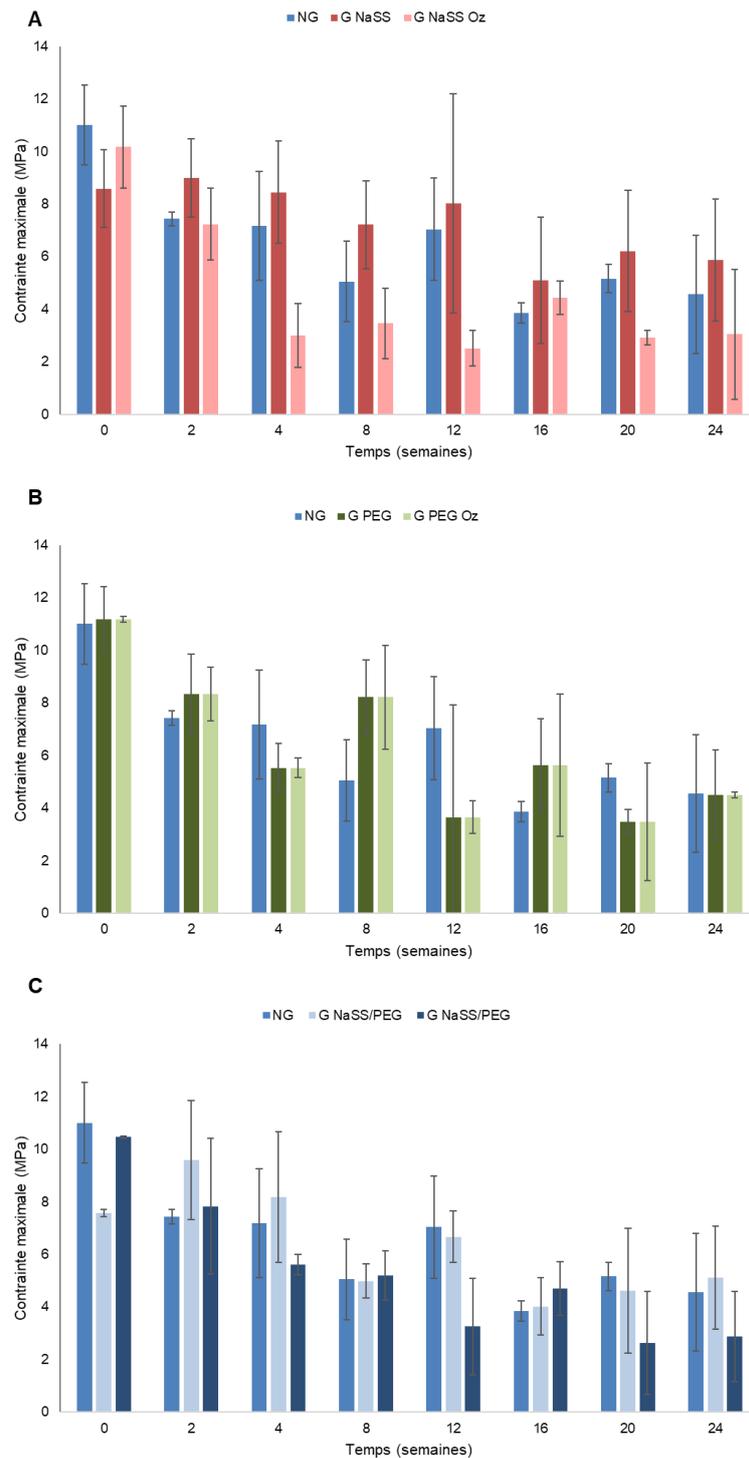


Figure 106 : Évolution de la contrainte maximale (σ_{\max}) en fonction du temps de dégradation : **(A)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au polyNaSS avec et sans ozonation, **(B)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés au PEG avec et sans ozonation, **(C)** comparaison entre les échantillons non greffés et greffés sur les deux faces avec et sans ozonation.

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

Afin d'étudier le comportement mécanique après dégradation, nous avons comparé, pour chaque condition, les courbes contrainte-déformation à trois temps : J0, 3 mois et 6 mois. Le 3^{ème} mois a été choisi comme temps intermédiaire pour apprécier la vitesse d'évolution de l'allongement à la rupture.

À partir de 3 mois, une faible déformation à la rupture (ϵ_{\max}) est observée sur les échantillons greffés avec ozonation ($\epsilon_{\text{NaSSOz}} < 100\%$), qui semblent avoir un comportement fragile, observé également à 6 mois de dégradation (Figure 107).

Par ailleurs, une allure en « marche d'escalier » est observée sur les courbes après dégradation. Selon Sangtabi *et al.*, ce comportement est observé sur les structures à double couches, lorsque celles-ci ne rompent pas au même temps. Il est souvent provoqué par la délamination des couches pendant l'essai de traction [192]. En effet, nous avons pu constater une rupture différée des deux couches (Figure 108), probablement causée par la délamination des couches de fibres, tel qu'observé au MEB (cf. partie 2.2.2 du chapitre VI).

Enfin, pour les différentes comparaisons, nous avons pris des courbes individuelles représentatives du comportement le plus observé. Ainsi, une analyse statistique avec un nombre d'échantillons plus important reste nécessaire.

Chapitre IV : Étude de la dégradation du patch dans un milieu proche du liquide amniotique

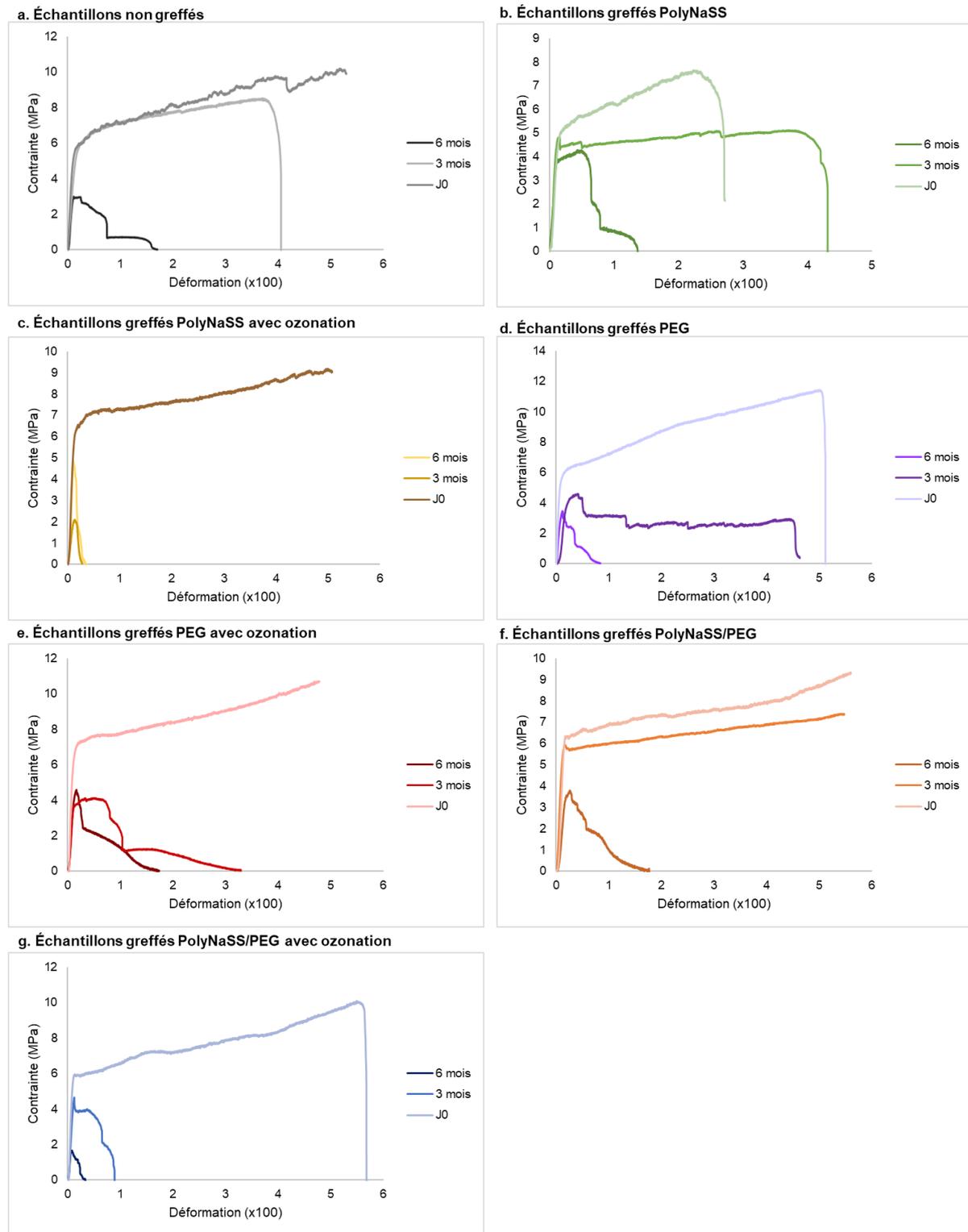


Figure 107 : Courbes contrainte-déformation des différentes conditions à J0, 3 mois et 6 mois de dégradation.

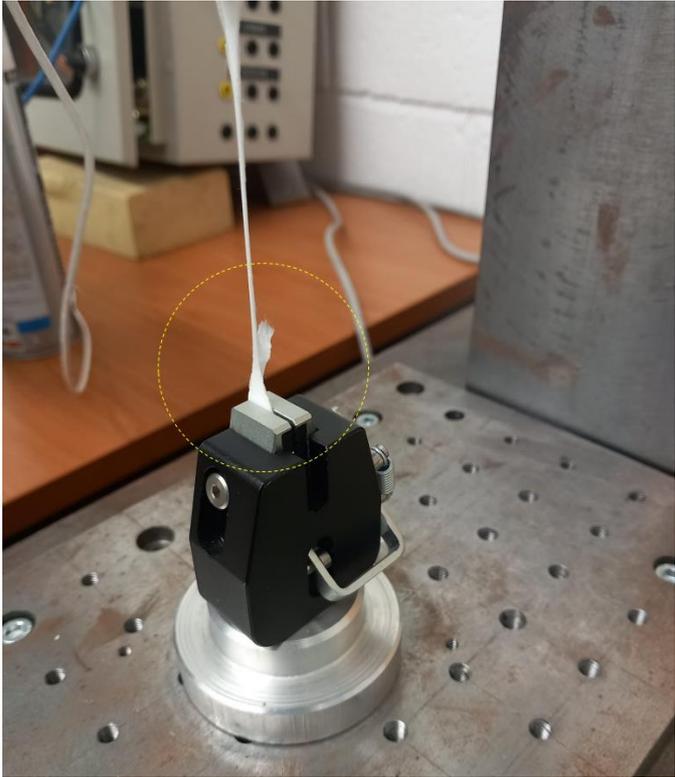


Figure 108 : Rupture différée des couches pendant l'essai de traction.

3. Conclusion :

Les caractérisations physico-chimiques et mécaniques du patch dans le FBS révèlent la progression de la dégradation hydrolytique de la PCL. En comparaison aux études réalisées au laboratoire BEST [121,180], cette progression semble être accélérée, probablement par la nature du milieu de dégradation choisi (eau, NaCl, PBS, FBS), mais aussi par les différences en termes d'échantillons étudiés (électrofilés, films, fils, patches à double couche) et de la méthode de fonctionnalisation (thermique, UV). En effet, les enzymes présentes dans le milieu choisi peuvent jouer un rôle de catalyseurs de la réaction d'hydrolyse lorsqu'ils ne sont pas directement impliqués dans cette dernière (lipases et estérases) [62].

De plus, les résultats de notre étude suggèrent que le greffage avec activation de surface peut augmenter la vitesse d'hydrolyse et fragiliser la structure du patch. Toutefois, la double exposition aux UV par le greffage des deux faces ne semble pas altérer la surface de la PCL. En effet, à travers les différentes techniques de caractérisation, nous avons pu constater un comportement similaire entre les échantillons greffés sur une seule face et sur les deux faces. Ainsi, le greffage sans ozonation se présente comme la technique idéale pour bénéficier des propriétés biologiques du polyNaSS et antiadhésives PEG, sans altérer la structure du patch au cours des premiers mois d'implantation.

**Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative
des colles chirurgicales et nouvelles approches de
conception du patch**

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch.

Le présent chapitre regroupe les études réalisées dans une perspective d'essai *in vivo* chez l'animal et d'amélioration de la réponse cellulaire au contact du patch. Il est consacré, dans un premier temps, à l'étude comparative des colles chirurgicales, afin de proposer une colle adaptée à la couverture par fœtoscopie de la myéломéningocèle, à l'aide du patch. Nous présentons par la suite, les premiers résultats obtenus par l'électrofilage dynamique sur un dispositif rotatif, conçu par le Pr S. Ramtani et A. Douhou au sein du laboratoire BEST. L'objectif est d'obtenir des fibres alignées pour une couverture épithéliale.

1. Étude comparative des colles chirurgicales :

La présente étude a pour objectif l'évaluation de la force d'adhésion des colles chirurgicales, afin de choisir celle la plus adaptée à la mise en place du patch *in utero*, notamment pour des tests *in vivo* chez l'animal. Pour ce faire, nous avons testé des colles chirurgicales d'origine naturelle et synthétique commercialisées en France telles que : la colle TISSEEL® à base de fibrinogène et de thrombine, la Floseal® constituée de granules de gélatine et de thrombine, la Bioglue® à base d'albumine bovine et de glutaraldéhyde ainsi que la Duraseal® à base de PEG et de trilycine.

Les tests ont été réalisés grâce un essai de pelage en T. Celui-ci nous permet de déterminer la résistance au pelage des colles, en mesurant la force de pelage d'un assemblage de deux patchs (sous forme d'éprouvettes rectangulaires) collés sur la face interne (face film) (Figure 109). La force de pelage (ou résistance au pelage) est exprimée en force par unité de largeur de l'éprouvette (N/mm) [193]. Selon Ashter *et al.*, celle-ci est constante au début du test, puis tend à fluctuer vers une valeur moyenne au fur et à mesure que le test progresse. La rupture peut se produire soit par la séparation des deux interfaces, soit par le déchirement d'une couche au lieu de son décollement [194].

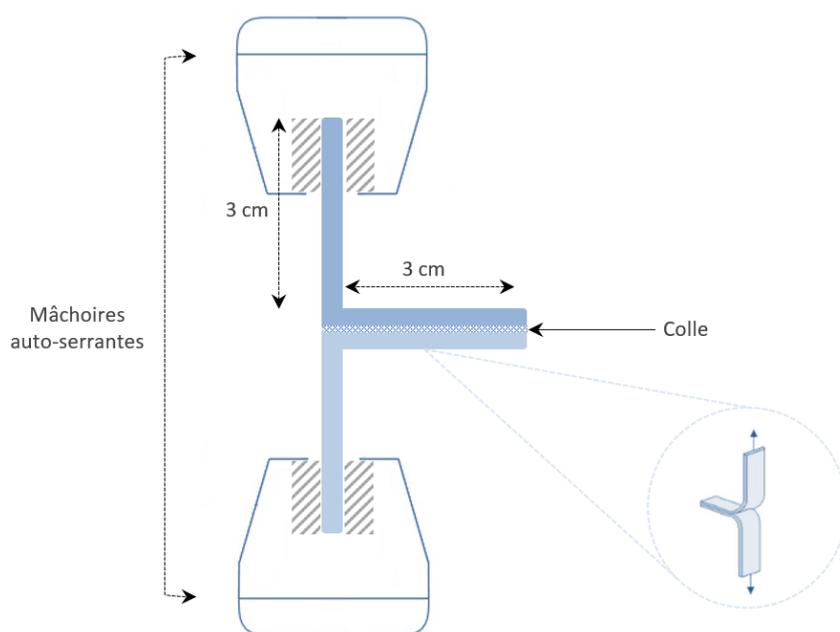


Figure 109 : Schéma représentatif du test de pelage en T (T-Peel).

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

Bien qu'elles soient reconnues pour leur efficacité hémostatique, les colles testées n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants. En effet, aucune force n'a été enregistrée pendant les différents essais et ce, quelle que soit la face testée (électrofilée ou lisse), à l'exception de la Bioglue[®], avec laquelle nous avons pu observer une forte adhésion sur la face électrofilée, avec rupture du patch avant le décollement de la couche de colle (Figure 110).



Figure 110 : Éprouvettes après essai de pelage, sur lesquelles un déchirement d'une couche est observé.

L'enregistrement de la force de pelage en fonction de la distance, avec la Bioglue[®], nous permet d'obtenir une courbe dont l'allure est présentée dans la figure 111. Cette courbe nous permet de déterminer une force de pelage maximale de $0,22 \pm 0,07$ N/mm avant la rupture du patch à plusieurs endroits. Toutefois, cette adhésion n'est possible que sur les faces électrofilées grâce à leur porosité. Nous pourrions donc envisager une nouvelle conception du patch à double couche avec une bordure électrofilée, qui sera au contact de la peau pour permettre le collage, et le film au centre pour éviter son accolement à la moelle épinière et bloquer le passage des liquides (Figure 112).

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

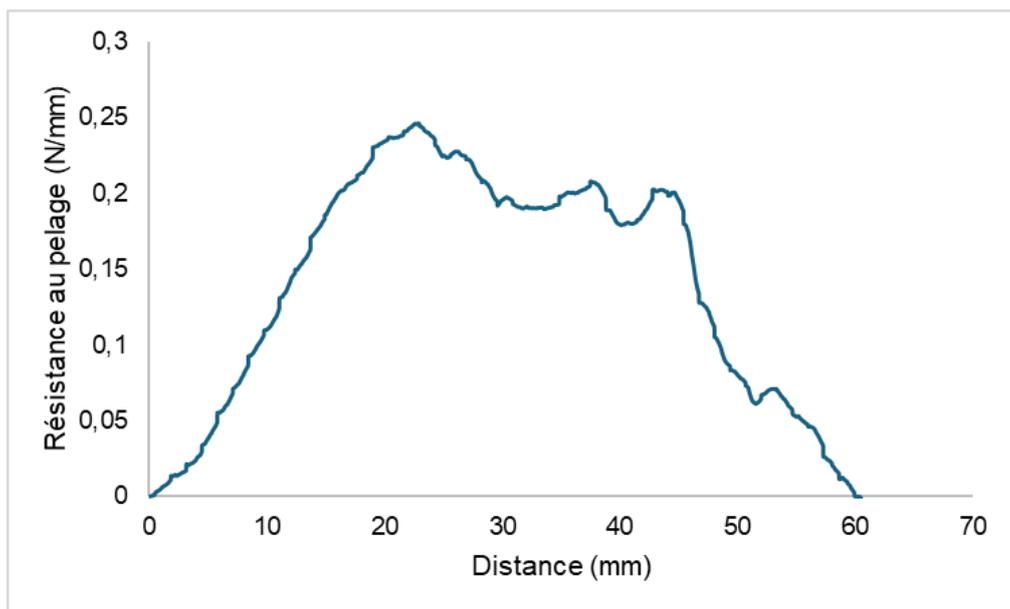


Figure 111 : Essai de pelage en T à 4,23mm/s : résistance au pelage en fonction de la distance en utilisant de la Bioglue® sur faces électrofilées.

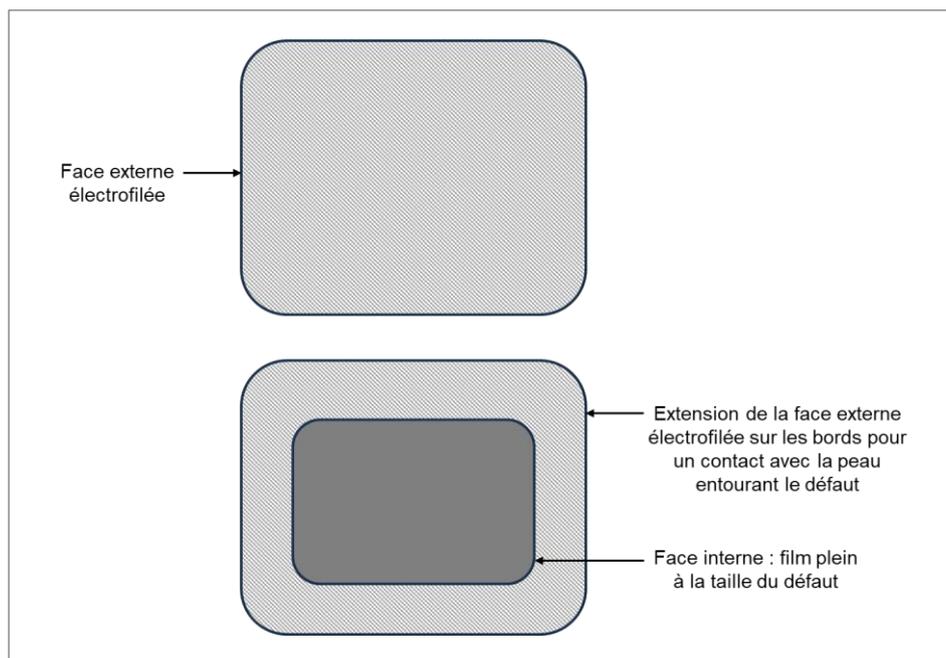


Figure 112 : Conception du patch pour un meilleur collage.

Bien que nos essais n'aient pas été réalisés dans des conditions physiologiques, nous avons pu observer des résultats similaires à ceux de Zientara *et al.*, qui ont mis au point un test de pelage en T sur une aorte porcine disséquée et réparée avec de la Bioglue®, en appliquant différents niveaux de pression [195]. Le test a été réalisé dans un bain de PBS à 37°C pour se rapprocher des conditions physiologiques. Ils ont

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

montré qu'avec une pression intermédiaire de 1711 Pa, la résistance au pelage moyenne était de 0,21 N/mm (de 0,05 à 0,304).

Ainsi, la Bioglue® semble offrir un moyen de mise en place du patch *in vivo* grâce à sa polymérisation rapide (2 minutes) qui permet de former des liaisons amides avec les tissus biologiques quelle que soit la nature du milieu (sec ou humide) [196]. Cependant, après polymérisation, cette colle est très peu dégradée et rigide, ce qui, selon Gracia *et al.*, peut entraver le processus de régénération tissulaire [196].

Enfin, cette étude présente plusieurs limites, notamment par rapport à la vitesse de polymérisation de la Bioglue®, qui ne permettait pas d'étaler de manière homogène la colle et de contrôler son épaisseur. Les tests ont été réalisés à sec et à température ambiante, sur deux éprouvettes de PCL, ce qui est probablement à l'origine de l'échec de collage des colles à base de protéines qui interagissent avec les tissus biologiques dans des conditions physiologiques (humidité, 37°C et présence de protéines membranaires).

La réparation de la MMC impose également un cahier des charges pour la mise en place du patch grâce à une colle. L'objectif serait de développer une colle biocompatible qui conserve sa force d'adhésion en milieu humide jusqu'à la couverture tissulaire. De plus, son temps de prise doit être suffisamment long pour bien l'étaler et poser le patch (temps de travail), mais relativement court pour réduire la durée de l'intervention. Enfin, la colle idéale doit être biodégradable avec des propriétés physico-chimiques qui permettent son étalement, pour ne pas bloquer le processus de régénération tissulaire au bords libres du défaut.

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

2. Optimisation des paramètres d'électrofilage pour des fibres alignées :

Pour obtenir des fibres alignées, nous avons utilisé les paramètres retenus lors des premières expériences (cf partie 1.1.1 et 1.1.2 du chapitre III) avec un collecteur rotatif à grande vitesse. L'intérêt d'obtenir des fibres alignées est d'avoir un guide à l'adhésion et à la prolifération des cellules épithéliales de la peau (kératinocytes), en mimant la membrane basale. En effet, l'étude de Hu *et al.* a montré que la disposition linéaire des fibres électrofilées permettait, par rapport aux fibres aléatoires, d'accélérer la cicatrisation de la peau chez la souris, avec la formation d'un épithélium stratifié et la régénération des follicules pileux et des glandes sébacés (Figure 113) [197].

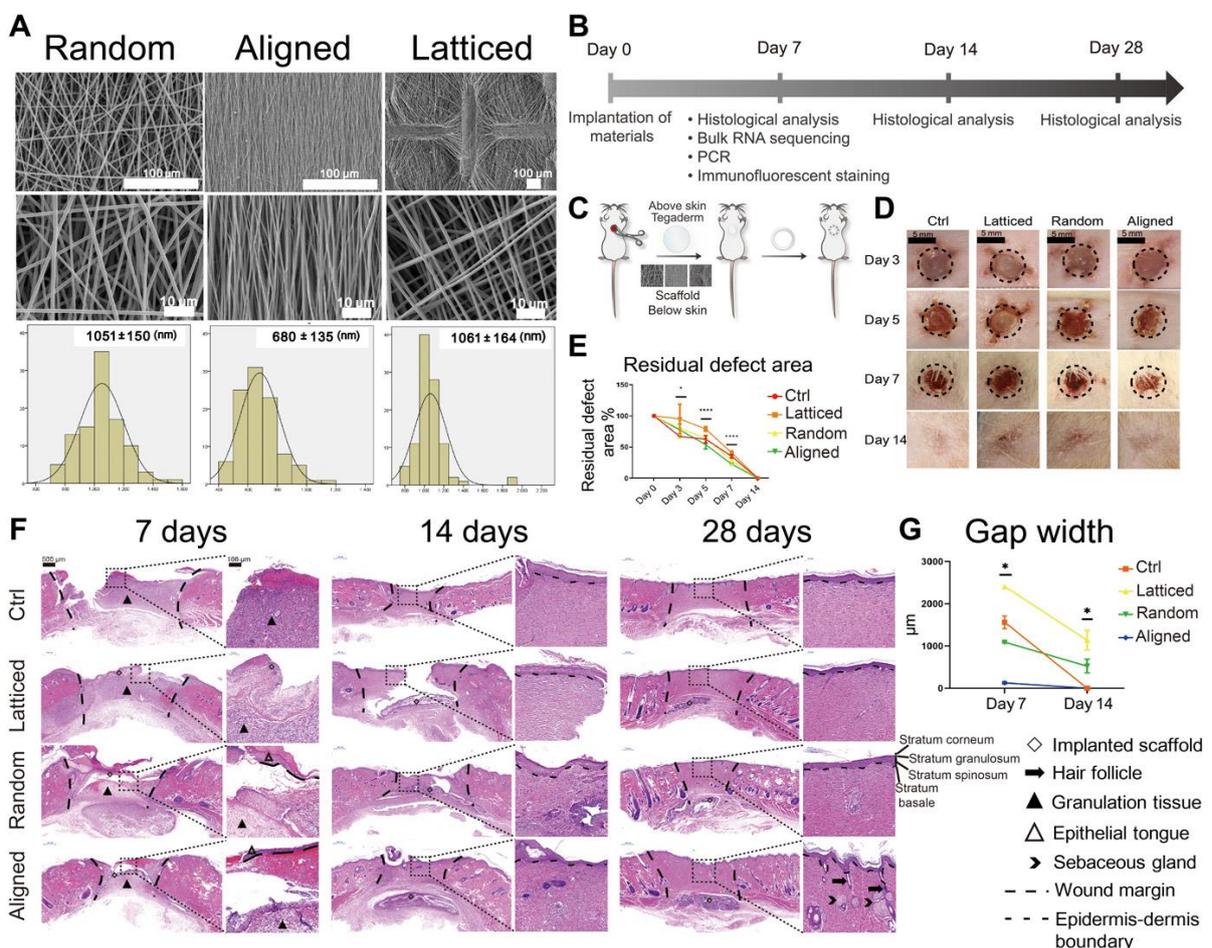


Figure 113 : Évaluation de la cicatrisation des plaies cutanées chez le rat implémenté avec trois types d'échafaudages électrofilés : **(A)** morphologie de surface des membranes électrofilées aléatoires, alignées et en treillis, **(B)** Processus d'évaluation de la cicatrisation des plaies cutanées chez le rat : PCR, réaction en chaîne de la polymérase, **(C)** protocole chirurgical de l'implantation des échafaudages, **(D et E)**

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

Surface résiduelle de cicatrisation à 3, 5, 7 et 14 jours, (F) coupe histologique du groupe témoin (Ctrl) et des groupes implantés avec trois types d'échafaudages. L'épithélium régénéré présente une structure stratifiée à 14 jours, (G) Évaluation semi-quantitative de la largeur de la fente [197].

Dans notre étude, les fibres alignées ont été obtenues à partir des vitesses $V_4=2418,33\pm 16,07$ *tr/mn* et $V_6=4182,33\pm 32,01$ *tr/mn*. Cependant, seuls les paramètres d'électrofilage, avec l'utilisation du premier système de solvant ($\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3$: DMF), nous ont permis d'obtenir des fibres alignées et sans défauts (Figure 114, A), mais avec une très faible épaisseur difficile à manipuler pour le greffage et la culture cellulaire. Nous avons donc tenté d'isoler toutes les parties métalliques de l'appareil d'électrofilage ainsi que le moteur du cylindre pour éviter que les fibres soient déviées et améliorer l'épaisseur des membranes. Les résultats ont montré l'apparition de fibres « artefacts » qui ne sont pas alignées dans la direction des autres fibres. L'augmentation de la vitesse et/ou de la tension ainsi que le changement de la distance n'ont pas empêché l'apparition de ces fibres.

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

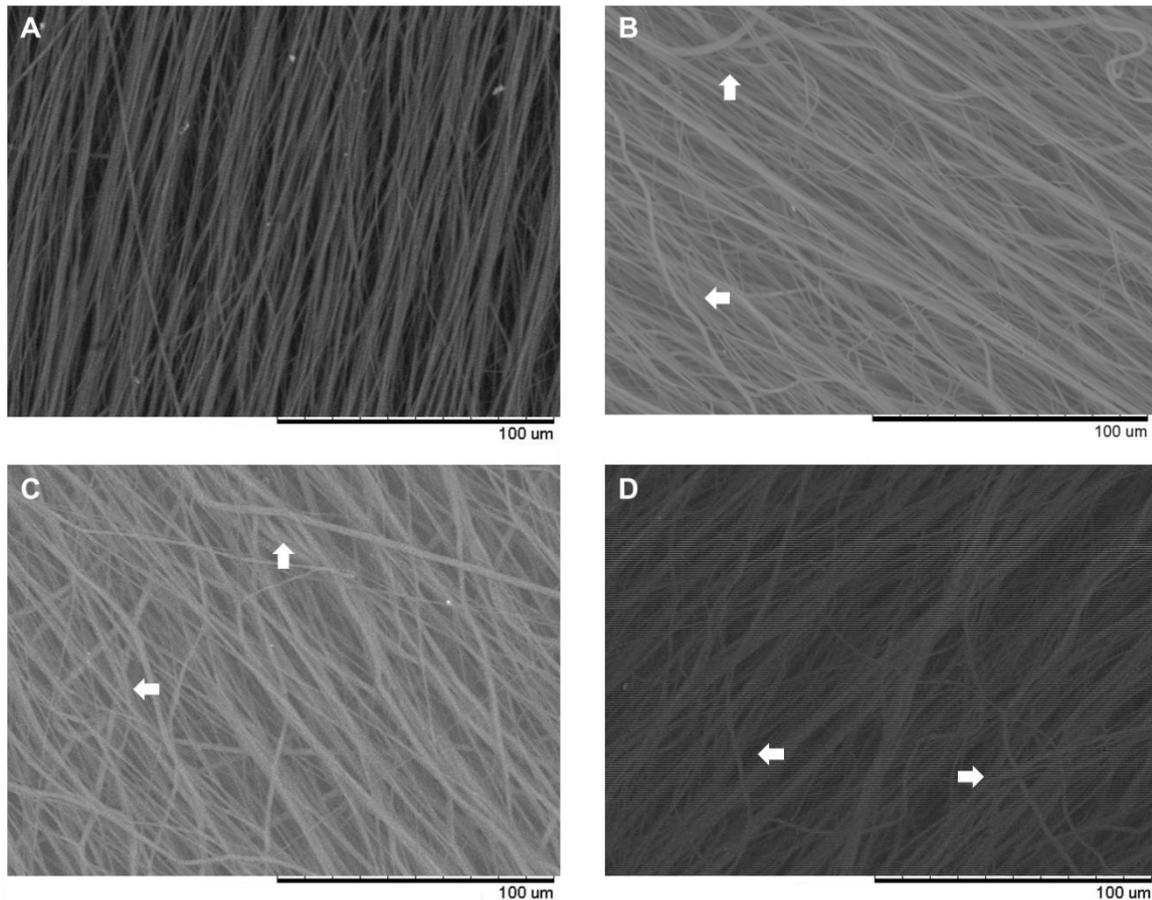


Figure 114 : Membranes électrofilées sur un cylindre rotatif : **(A)** vitesse V4 à 9,5 kV, **(B)** vitesse V4 à 9,5 kV (après isolation), **(C)** vitesse V4 à 12 kV, **(D)** vitesse V6 ($4182,33 \pm 32,01$ tours/minute) à 9,5 kV (les flèches blanches montrent les fibres « artefacts »).

Enfin, des améliorations du dispositif d'électrofilage sur cylindre sont à prévoir dans le but d'empêcher l'apparition des fibres artefacts et d'augmenter l'épaisseur des membranes. L'optimisation des paramètres d'électrofilage est également nécessaire pour définir les conditions idéales qui permettent de reproduire des fibres alignées sans défauts avec une épaisseur suffisante pour l'élaboration du patch à double couche, sa fonctionnalisation et l'étude de la réponse biologique à son contact.

3. Conclusion :

Nous pouvons en conclure que l'utilisation de la Bioglue® peut être une solution pour la mise en place du patch *in vivo* chez l'animal. Celle-ci peut être introduite grâce à un embout adapté à travers un trocart opérateur, tel que décrit par Guilbaud *et al.* dans ses travaux sur l'utilisation de deux trocarts pour la couverture de la myéломéningocèle chez le fœtus de brebis [198]. Ce modèle animal, mis au point par Meuli *et al.* [6], présente plusieurs avantages pour des essais *in vivo*. En effet, contrairement au rat, la brebis peut être porteuse d'une grossesse singleton ou gémellaire, et présente une taille qui permet la réparation chirurgicale par fœtoscopie. De plus, la création du dysraphisme permet de mimer la pathologie, en retrouvant les anomalies cérébrales présentes chez le fœtus humain en cas de myéломéningocèle. Enfin, le temps de gestation long (140-150 jours) de la brebis permet la création du dysraphisme, puis sa réparation tout en étant assez court pour limiter le temps de l'étude [199, 200].

Par ailleurs, la couverture tissulaire attendue peut être obtenue par la différenciation des cellules mésenchymateuses en fibroblastes pour la régénération de la peau (derme), lorsque les conditions locales le permettent. Cependant, le scénario le plus probable serait une couverture épithéliale par migration cellulaire à partir des bords libres du défaut. En effet, lors de la cicatrisation d'un feuillet épithélial, la motilité des cellules, se trouvant à proximité de l'espace à combler, est augmentée et les cellules migrent collectivement pour combler le défaut [201]. Dans cet objectif, l'optimisation des paramètres d'électrofilage pour obtenir des fibres alignées peut être une approche intéressante pour créer un guide à la migration collective des cellules épithéliales, qui peuvent selon Vedula *et al.*, créer des ponts suspendus entre les fibres alignées pour maintenir l'intégrité du tissu pendant la cicatrisation (Figure 115) [202].

Chapitre V : De l'*in vitro* à l'*in vivo* : Étude comparative des colles chirurgicales et nouvelles approches de conception du patch

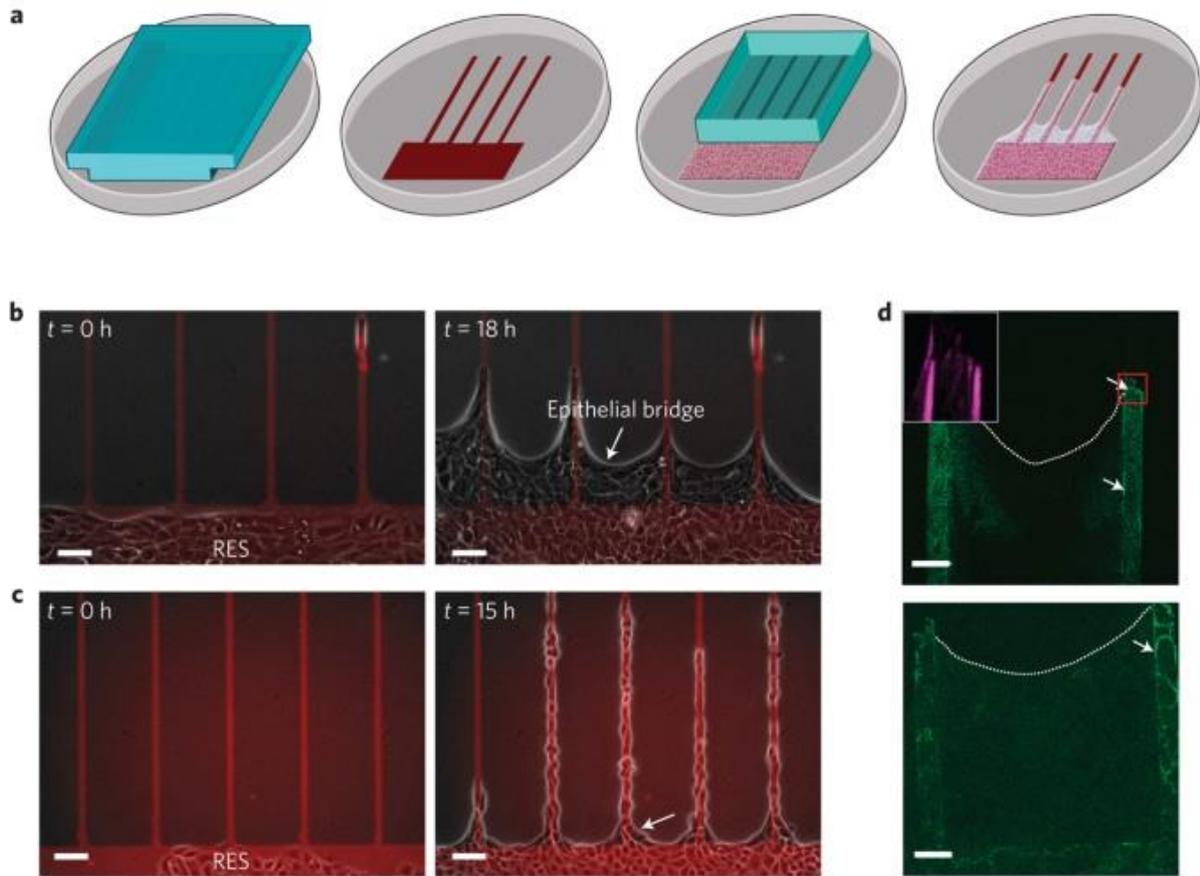


Figure 115 : La migration collective des cellules épithéliales d'après Vedula *et al.* [202] : (a) schéma décrivant l'essai de migration *in vitro* sur des motifs de fibronectine (10 μ m de largeur), (b) les kératinocytes forment des ponts épithéliaux multicellulaires suspendus sur les régions non adhésives entre les bandes de fibronectine, (c) les cellules épithéliales ne forment pas de ponts épithéliaux bien développés, mais quelques structures ressemblant à des ponts peuvent être observées à la jonction de la bande de fibronectine et du réservoir (flèche), (d) coupes confocales basales des ponts épithéliaux immuno-fluorescents montrant des adhérences focales (flèches). L'encart du panneau supérieur (magenta) montre la F-actine dans la région délimitée par le carré rouge. Les lignes blanches en pointillé représentent le bord concave du pont épithélial.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives :

Afin de proposer une alternative à la fermeture chirurgicale pour le traitement de la myéломéningocèle, nous nous sommes appuyés sur l'expertise du laboratoire BEST, pour l'élaboration et la fonctionnalisation d'un patch à base de polycaprolactone, destiné à protéger la moelle épinière, et d'offrir un support à la régénération tissulaire pour la fermeture du défaut.

Le premier objectif a été d'élaborer un patch imperméable aux liquides pour une couverture étanche de la moelle épinière. Nous avons pu montrer que la conception d'un patch à double couche permettra non seulement d'obtenir une barrière empêchant le passage du liquide amniotique, grâce à sa couche interne, mais aussi de fournir une face poreuse externe mimant la matrice extracellulaire, obtenue par électrofilage. Cette technique nous a permis d'obtenir des fibres sans défauts grâce à un dispositif conçu au laboratoire BEST, en utilisant l'acide acétique comme solvant, une tension de 9,5 kV, un débit de 2ml/h et une distance de 15cm entre l'aiguille et le collecteur.

Pour moduler la réponse biologique au contact du patch, nous avons fonctionnalisé la surface en utilisant la technique du « grafting from ». Celle-ci permet la polymérisation radicalaire d'un polymère bioactif sur la face externe du patch, et d'un polymère antiadhésif sur sa face interne. Le greffage a été réalisé sous irradiation UV avec ou sans activation préalable par ozonation. Les caractérisations de surface ont montré qu'une concentration de 0,7M de NaSS et un greffage d'une heure sous irradiation UV permettaient de greffer de manière covalente le polyNaSS sur la PCL. De même, une concentration de 0,25M de PEG permet son greffage sur la surface de la PCL pendant 45 minutes, et pendant 30 minutes avec une première étape d'ozonation.

L'étude de la réponse biologique a montré que la présence du polyNaSS en surface, même en faible quantité (greffage sans ozonation), permettait d'améliorer la réponse cellulaire en favorisant l'adhésion et la prolifération des fibroblastes, dès 24 heures d'incubation. De plus, la deuxième technique d'élaboration (M₂) a permis d'obtenir une surface lisse antiadhésive, qui évitera une étape supplémentaire de fonctionnalisation.

Conclusion générale et perspectives

Toutefois, le greffage du PEG peut s'avérer utile car il permet non seulement de renforcer l'effet antiadhésif du patch M₂, mais aussi de réduire son immunogénicité.

Par ailleurs, nous pouvons en conclure que le patch présente des propriétés mécaniques intéressantes avec un module de Young de $62,5 \pm 4,5$ MPa, une résistance à la rupture de $11,01 \pm 1,53$ MPa et un allongement à la rupture de plus de 400% pour les patchs non greffés. De plus, la fonctionnalisation de surface ne semble pas altérer ces propriétés qu'elle soit avec ou sans ozonation. Toutefois, en absence de référence, nous ne pouvons pas déterminer les propriétés mécaniques idéales pour la résistance du patch après implantation. Le patch doit donc posséder des propriétés mécaniques suffisantes pour son introduction à travers le trocart. Nous pouvons espérer une prolifération cellulaire rapide, telle qu'observée *in vitro*, qui couvre le défaut avant la dégradation du patch et l'altération de ses propriétés intrinsèques.

L'étude de la dégradation du patch a révélé que le greffage avec activation de surface peut augmenter la vitesse d'hydrolyse et fragiliser la structure du patch. Ainsi, le greffage sans ozonation se présente comme la technique idéale pour bénéficier des propriétés biologiques du polyNaSS et antiadhésives du PEG, sans altérer la structure du patch au cours des premiers mois d'implantation.

En termes de perspectives, l'électrofilage de fibres alignées semble être une voie intéressante pour guider la migration et la prolifération des cellules épithéliales à partir du bord libre du défaut. La conception du patch peut être également améliorée en utilisant des techniques disponibles au laboratoire telles que l'impression 3D, ou des techniques à grande échelle telles que le melt-blown (soufflage à l'état fondu).

Des premiers tests de morphologie cellulaire, en utilisant des kératinocytes primaires, sont en cours, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire « Physiopathology of pigmentation and tissue engineering » (Dr Muriel Cario). Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet du changement de structure et de la fonctionnalisation de surface sur le comportement des cellules de l'épiderme.

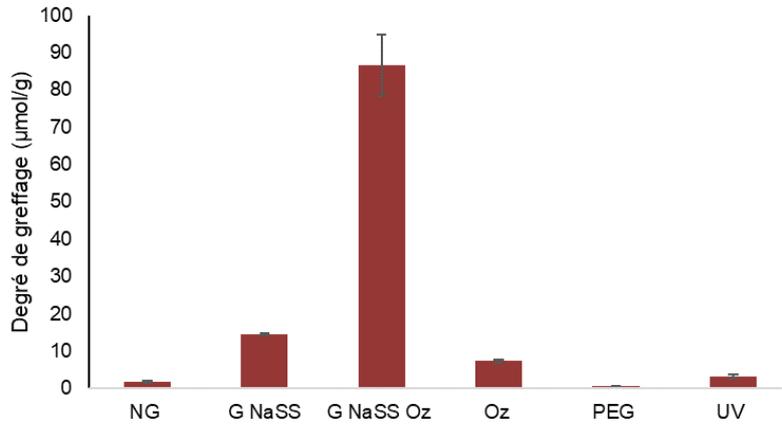
Conclusion générale et perspectives

Pour évaluer les performances du patch et d'améliorer la technique de mise en place, des études *in vivo* chez l'animal sont indispensables. Celles-ci seront réalisées chez la brebis en évaluant la cinétique de dégradation du patch, la cicatrisation du défaut par des examens histologiques, la morbidité materno-foetale liée à l'intervention et la correction de la malformation de Chiari II. Dans un premier temps, l'utilisation de la Bioglue® peut s'avérer utile pour la mise en place du patch.

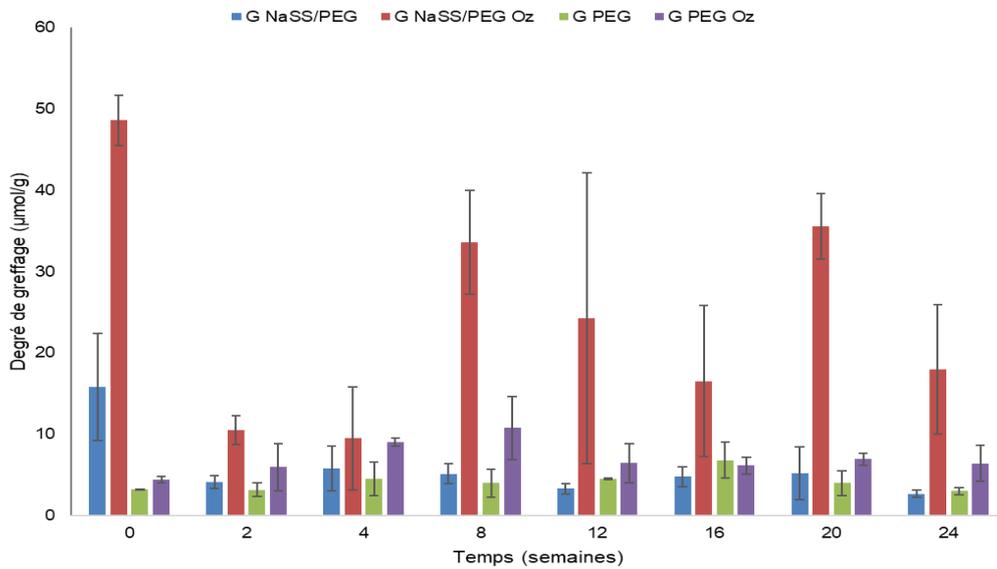
Un dernier objectif serait de développer une colle biocompatible pour la mise en place du patch. Cette colle peut être développée à partir des travaux antérieurs du laboratoire BEST, en améliorant la composition et la consistance, afin de répondre aux exigences de la réparation de la myéломéningocèle.

Annexes

1. Taux de greffage du polyNaSS sur le patch M₂ avec et sans activation de surface.



2. Taux de greffage des échantillons greffés sur les deux faces et greffés au PEG de 0 à 6 mois de dégradation :



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Bowman, R. M.; Lee, J. Y.; Yang, J.; Kim, K. H.; Wang, K.-C. Myelomeningocele: The Evolution of Care over the Last 50 Years. *Childs Nerv Syst* 2023, 39 (10), 2829–2845. <https://doi.org/10.1007/s00381-023-06057-1>.
2. Adzick, N. S. Fetal Myelomeningocele: Natural History, Pathophysiology, and in-Utero Intervention. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010, 15 (1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.05.002>.
3. Swaroop, V.; Dias, L. Orthopedic Management of Spina Bifida. Part I: Hip, Knee, and Rotational Deformities. *Journal of children's orthopaedics* 2009, 3, 441–449. <https://doi.org/10.1007/s11832-009-0214-5>.
4. Heffez, D. S.; Aryanpur, J.; Hutchins, G. M.; Freeman, J. M. The Paralysis Associated with Myelomeningocele: Clinical and Experimental Data Implicating a Preventable Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 1990, 26 (6), 987–992.
5. Au, K. S.; Ashley-Koch, A.; Northrup, H. Epidemiologic and Genetic Aspects of Spina Bifida and Other Neural Tube Defects. *Dev Disabil Res Rev* 2010, 16 (1), 6–15. <https://doi.org/10.1002/ddrr.93>.
6. Meuli, M.; Meuli-Simmen, C.; Hutchins, G. M.; Yingling, C. D.; Hoffman, K. M.; Harrison, M. R.; Adzick, N. S. In Utero Surgery Rescues Neurological Function at Birth in Sheep with Spina Bifida. *Nat Med* 1995, 1 (4), 342–347. <https://doi.org/10.1038/nm0495-342>.
7. Encinas, J. L.; García-Cabezas, M. Á.; Barkovich, J.; Fontecha, C. G.; Peiró, J. L.; Soto, G. M. C.; Borrell, V.; Reillo, I.; López-Santamaría, M.; Tovar, J. A.; Farmer, D. L. Maldevelopment of the Cerebral Cortex in the Surgically Induced Model of Myelomeningocele: Implications for Fetal Neurosurgery. *J Pediatr Surg* 2011, 46 (4), 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.11.028>.
8. Copp, A. J.; Adzick, N. S.; Chitty, L. S.; Fletcher, J. M.; Holmbeck, G. N.; Shaw, G. M. Spina Bifida. *Nat Rev Dis Primers* 2015, 1, 15007. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.7>.
9. Haute Autorité de Santé (HAS) : Prise en charge des dysraphismes en période périnatale - PNDS, Décembre 2021.
10. Beuriat, P.-A.; Szathmari, A.; Hameury, F.; Poirot, I.; Massoud, M.; Massardier, J.; Mottolese, C.; Di Rocco, F. Épidémiologie Du Spina Bifida En France Dans Les 30 Dernières Années. *Neurochirurgie* 2017, 63 (2), 109–111. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2017.01.003>.
11. Eurocat: European Platform on Rare Disease Registration (consulté le 13/03/2024).
12. Chen, F. C.-K.; Gerhardt, J.; Entezami, M.; Chaoui, R.; Henrich, W. Detection of Spina Bifida by First Trimester Screening – Results of the Prospective Multicenter Berlin IT-Study. *Ultraschall Med* 2017, 38 (2), 151–157. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1399483>.

Références bibliographiques

13. Alruwaili AA, M Das J. Myelomeningocele. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
14. Kumar, J.; Afsal, M.; Garg, A. Imaging Spectrum of Spinal Dysraphism on Magnetic Resonance: A Pictorial Review. *World J Radiol* 2017, 9 (4), 178–190. <https://doi.org/10.4329/wjr.v9.i4.178>.
15. Chen, C.-P. Syndromes, Disorders and Maternal Risk Factors Associated with Neural Tube Defects (I). *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008, 47 (1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60048-0](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60048-0).
16. Copp, A. J.; Stanier, P.; Greene, N. D. E. Neural Tube Defects: Recent Advances, Unsolved Questions, and Controversies. *Lancet Neurol* 2013, 12 (8), 799–810. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70110-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70110-8).
17. Fieggen, K.; Stewart, C. Aetiology and Antenatal Diagnosis of Spina Bifida. *SAMJ: South African Medical Journal* 2014, 104 (3), 218–218.
18. Prevention of Neural Tube Defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991, 338 (8760), 131–137.
19. Krishnamurthy, K. B. Managing Epilepsy during Pregnancy: Assessing Risk and Optimizing Care. *Curr Treat Options Neurol* 2012, 14 (4), 348–355. <https://doi.org/10.1007/s11940-012-0184-7>.
20. Haute Autorité de Santé (HAS) : Épilepsies Particularités de la prise en charge des filles et des femmes en âge de procréer, Octobre 2020.
21. Upasani, V. V.; Ketwaroo, P. D.; Estroff, J. A.; Warf, B. C.; Emans, J. B.; Glotzbecker, M. P. Prenatal Diagnosis and Assessment of Congenital Spinal Anomalies: Review for Prenatal Counseling. *World J Orthop* 2016, 7 (7), 406–417. <https://doi.org/10.5312/wjo.v7.i7.406>.
22. Imbruglia, L.; Cacciatore, A.; Carrara, S.; Recupero, S.; La Galia, T.; Pappalardo, E. M.; Chiara Accardi, M.; Pedata, R.; Rapisarda, G.; Mammaro, A. Abnormal Skull Findings in Neural Tube Defects. *J Prenat Med* 2009, 3 (3), 44–47.
23. Kunpalin, Y.; Richter, J.; Mufti, N.; Bosteels, J.; Ourselin, S.; De Coppi, P.; Thompson, D.; David, A. L.; Deprest, J. Cranial Findings Detected by Second-Trimester Ultrasound in Fetuses with Myelomeningocele: A Systematic Review. *BJOG* 2021, 128 (2), 366–374. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16496>.
24. Peranteau, W. H.; Adzick, N. S. Prenatal Surgery for Myelomeningocele. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016, 28 (2), 111–118. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000253>.

Références bibliographiques

25. Heuer, G. G.; Moldenhauer, J. S.; Scott Adzick, N. Prenatal Surgery for Myelomeningocele: Review of the Literature and Future Directions. *Childs Nerv Syst* 2017, 33 (7), 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3440-z>.
26. Scott Adzick, N. Fetal Surgery for Spina Bifida: Past, Present, Future. *Seminars in Pediatric Surgery* 2013, 22 (1), 10–17. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2012.10.003>.
27. Bauman, J.; Schwartz, D.; Welch, W.; Sutton, L. Congenital Anomalies of the Spinal Cord; 2011; pp 573–607. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6726-9.00031-6>.
28. Joyeux, L.; Chalouhi, G. E.; Ville, Y.; Sapin, E. La Chirurgie Maternofoetale Du Spina Bifida : Perspectives. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2014, 43 (6), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2014.01.014>.
29. Adzick, N. S.; Thom, E. A.; Spong, C. Y.; Brock, J. W.; Burrows, P. K.; Johnson, M. P.; Howell, L. J.; Farrell, J. A.; Dabrowiak, M. E.; Sutton, L. N.; Gupta, N.; Tulipan, N. B.; D'Alton, M. E.; Farmer, D. L.; MOMS Investigators. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *N Engl J Med* 2011, 364 (11), 993–1004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014379>.
30. Joyeux, L.; Danzer, E.; Flake, A. W.; Deprest, J. Fetal Surgery for Spina Bifida Aperta. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 2018, 103 (6), F589–F595. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315143>.
31. Kabagambe, S. K.; Jensen, G. W.; Chen, Y. J.; Vanover, M. A.; Farmer, D. L. Fetal Surgery for Myelomeningocele: A Systematic Review and Meta-Analysis of Outcomes in Fetoscopic versus Open Repair. *Fetal Diagn Ther* 2018, 43 (3), 161–174. <https://doi.org/10.1159/000479505>.
32. Pedreira, D. A. L.; Zanon, N.; Nishikuni, K.; Moreira de Sá, R. A.; Acacio, G. L.; Chmait, R. H.; Kontopoulos, E. V.; Quintero, R. A. Endoscopic Surgery for the Antenatal Treatment of Myelomeningocele: The CECAM Trial. *Am J Obstet Gynecol* 2016, 214 (1), 111.e1-111.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.09.065>.
33. Pedreira, D. a. L.; Reece, E. A.; Chmait, R. H.; Kontopoulos, E. V.; Quintero, R. A. Fetoscopic Repair of Spina Bifida: Safer and Better? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016, 48 (2), 141–147. <https://doi.org/10.1002/uog.15987>.
34. Kohl, T. Percutaneous Minimally Invasive Fetoscopic Surgery for Spina Bifida Aperta. Part I: Surgical Technique and Perioperative Outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014, 44 (5), 515–524. <https://doi.org/10.1002/uog.13430>.
35. Carrabba, G.; Macchini, F.; Fabietti, I.; Schisano, L.; Meccariello, G.; Campanella, R.; Bertani, G.; Locatelli, M.; Boito, S. et al. Minimally Invasive Fetal Surgery for Myelomeningocele: Preliminary Report from a Single Center.

Références bibliographiques

- Neurosurg Focus* 2019, 47 (4), E12.
<https://doi.org/10.3171/2019.8.FOCUS19438>.
36. Soltani Khaboushan, A.; Shakibaei, M.; Kajbafzadeh, A.-M.; Majidi Zolbin, M. Prenatal Neural Tube Anomalies: A Decade of Intrauterine Stem Cell Transplantation Using Advanced Tissue Engineering Methods. *Stem Cell Rev Rep* 2022, 18 (2), 752–767. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10150-w>.
37. Watanabe, M.; Li, H.; Kim, A. G.; Weilerstein, A.; Radu, A.; Davey, M.; Loukogeorgakis, S.; Sánchez, M. D.; Sumita, K.; Morimoto, N.; Yamamoto, M.; Tabata, Y.; Flake, A. W. Complete Tissue Coverage Achieved by Scaffold-Based Tissue Engineering in the Fetal Sheep Model of Myelomeningocele. *Biomaterials* 2016, 76, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.051>.
38. Grigoryants, V.; Jane, J. A.; Lin, K. Y. Salvage of a Complicated Myelomeningocele Using Collagen (Duragen) and Dermal (Alloderm) Matrix Substitutes. Case Report and Review of the Literature. *Pediatr Neurosurg* 2007, 43 (6), 512–515. <https://doi.org/10.1159/000108798>.
39. Miyabe, M.; Murphy, K.; Oria, M.; Duru, S.; Lin, C.-Y.; Peiro, J. Dural Substitutes for Spina Bifida Repair: Past, Present, and Future. *Child's Nervous System* 2022, 38, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00381-022-05486-8>.
40. Snowise, S.; Mann, L.; Morales, Y.; Moise, K. J.; Johnson, A.; Fletcher, S.; Grill, R. J.; Tseng, S. C. G.; Papanna, R. Cryopreserved Human Umbilical Cord versus Biocellulose Film for Prenatal Spina Bifida Repair in a Physiologic Rat Model. *Prenat Diagn* 2017, 37 (5), 473–481. <https://doi.org/10.1002/pd.5035>.
41. Bartal, A. D.; Heilbronn, Y. D.; Plashkes, Y. Y. Reconstruction of the Dural Canal in Myelomeningocele. Case Report. *Plast Reconstr Surg* 1971, 47 (1), 87–89. <https://doi.org/10.1097/00006534-197101000-00020>.
42. Fontecha, C. G.; Peiro, J. L.; Aguirre, M.; Soldado, F.; Añor, S.; Fresno, L.; Martínez-Ibañez, V. Inert Patch with Bioadhesive for Gentle Fetal Surgery of Myelomeningocele in a Sheep Model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009, 146 (2), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.06.022>.
43. Park, Y. K.; Tator, C. H. Prevention of Arachnoiditis and Postoperative Tethering of the Spinal Cord with Gore-Tex Surgical Membrane: An Experimental Study with Rats. *Neurosurgery* 1998, 42 (4), 813–823; discussion 823–824. <https://doi.org/10.1097/00006123-199804000-00076>.
44. Graf, K.; Kohl, T.; Neubauer, B. A.; Dey, F.; Faas, D.; Wanis, F. A.; Reinges, M. H. T.; Uhl, E.; Kolodziej, M. A. Percutaneous Minimally Invasive Fetoscopic Surgery for Spina Bifida Aperta. Part III: Neurosurgical Intervention in the First Postnatal Year. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016, 47 (2), 158–161. <https://doi.org/10.1002/uog.14937>.

Références bibliographiques

45. Bardill, J.; Williams, S. M.; Shabeka, U.; Niswander, L.; Park, D.; Marwan, A. I. An Injectable Reverse Thermal Gel for Minimally Invasive Coverage of Mouse Myelomeningocele. *J Surg Res* 2019, 235, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.09.078>.
46. Saadai, P.; Nout, Y. S.; Encinas, J.; Wang, A.; Downing, T. L.; Beattie, M. S.; Bresnahan, J. C.; Li, S.; Farmer, D. L. Prenatal Repair of Myelomeningocele with Aligned Nanofibrous Scaffolds—a Pilot Study in Sheep. *J Pediatr Surg* 2011, 46 (12), 2279–2283. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.09.014>.
47. Tatu, R.; Oria, M.; Pulliam, S.; Signey, L.; Rao, M. B.; Peiro, J. L.; Lin, C.-Y. Using Poly(l-Lactic Acid) and Poly(ε-Caprolactone) Blends to Fabricate Self-Expanding, Watertight and Biodegradable Surgical Patches for Potential Fetoscopic Myelomeningocele Repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019, 107 (2), 295–305. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34121>.
48. Watanabe, M.; Li, H.; Kim, A. G.; Weilerstein, A.; Radu, A.; Davey, M.; Loukogeorgakis, S.; Sánchez, M. D.; Sumita, K.; Morimoto, N.; Yamamoto, M.; Tabata, Y.; Flake, A. W. Complete Tissue Coverage Achieved by Scaffold-Based Tissue Engineering in the Fetal Sheep Model of Myelomeningocele. *Biomaterials* 2016, 76, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.051>.
49. Watanabe, M.; Jo, J.; Radu, A.; Kaneko, M.; Tabata, Y.; Flake, A. W. A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele with Gelatin Sponges Incorporating Basic Fibroblast Growth Factor. *Tissue Eng Part A* 2010, 16 (5), 1645–1655. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0532>.
50. Wang, A.; Brown, E. G.; Lankford, L.; Keller, B. A.; Pivetti, C. D.; Sitkin, N. A.; Beattie, M. S.; Bresnahan, J. C.; Farmer, D. L. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Transl Med* 2015, 4 (6), 659–669. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0296>.
51. Galganski, L. A.; Kumar, P.; Vanover, M. A.; Pivetti, C. D.; Anderson, J. E.; Lankford, L.; Paxton, Z. J.; Chung, K.; Lee, C.; Hegazi, M. S.; Yamashiro, K. J.; Wang, A.; Farmer, D. L. In Utero Treatment of Myelomeningocele with Placental Mesenchymal Stromal Cells—Selection of an Optimal Cell Line In Preparation for Clinical Trials. *J Pediatr Surg* 2020, 55 (9), 1941–1946. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.09.029>.
52. Li, X.; Yuan, Z.; Wei, X.; Li, H.; Zhao, G.; Miao, J.; Wu, D.; Liu, B.; Cao, S.; An, D.; Ma, W.; Zhang, H.; Wang, W.; Wang, Q.; Gu, H. Application Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BMSCs) Based Tissue-Engineering for Spinal Cord Defect Repair in Rat Fetuses with Spina Bifida Aperta. *J Mater Sci Mater Med* 2016, 27 (4), 77. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5684-7>.
53. Saadai, P.; Wang, A.; Nout, Y. S.; Downing, T. L.; Lofberg, K.; Beattie, M. S.; Bresnahan, J. C.; Li, S.; Farmer, D. L. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells Integrate into the Injured Spinal Cord in the

Références bibliographiques

- Fetal Lamb Model of Myelomeningocele. *J Pediatr Surg* 2013, 48 (1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.10.034>.
54. Mandal, P.; Shunmugam, R. Polycaprolactone: A Biodegradable Polymer with Its Application in the Field of Self-Assembly Study. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 2020, 58 (2), 111–129. <https://doi.org/10.1080/10601325.2020.1831392>.
55. Mohamed, R. M.; Yusoh, K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *Advanced Materials Research* 2016, 1134, 249–255. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1134.249>.
56. Azari, A.; Golchin, A.; Mahmoodinia Maymand, M.; Mansouri, F.; Ardeshiryajimi, A. Electrospun Polycaprolactone Nanofibers: Current Research and Applications in Biomedical Application. *Adv Pharm Bull* 2022, 12 (4), 658–672. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.070>.
57. Mondal, D.; Griffith, M.; Venkatraman, S. S. Polycaprolactone-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Drug Delivery: Current Scenario and Challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2016, 65 (5), 255–265. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1103241>.
58. Nair, L.; Laurencin, C. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007, 32, 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.
59. Gunatillake, P. A.; Adhikari, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *Eur Cell Mater* 2003, 5, 1–16; discussion 16. <https://doi.org/10.22203/ecm.v005a01>.
60. Eshraghi, S.; Das, S. Mechanical and Microstructural Properties of Polycaprolactone Scaffolds with 1-D, 2-D, and 3-D Orthogonally Oriented Porous Architectures Produced by Selective Laser Sintering. *Acta Biomater* 2010, 6 (7), 2467–2476. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.002>.
61. Labet, M.; Thielemans, W. Synthesis of Polycaprolactone: A Review. *Chem Soc Rev* 2009, 38 (12), 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/b820162p>.
62. Guarino, V.; Gentile, G.; Sorrentino, L.; Ambrosio, L. Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2017; pp 1–36. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst658>.
63. Carballo, F. P. The Use of Electrospinning in the Development of Systems for Buccal Drug Delivery: A Review. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento* 2023, 02 (10), 100–135.

Références bibliographiques

64. Doshi, J.; Reneker, D. H. Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *Journal of Electrostatics* 1995, 35 (2), 151–160. [https://doi.org/10.1016/0304-3886\(95\)00041-8](https://doi.org/10.1016/0304-3886(95)00041-8).
65. Reneker, D.; Yarin, A.; Fong, H.; Koombhongse, S. Bending Instability of Electrically Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning. *Journal of Applied Physics* 2000, 87, 4531–4547. <https://doi.org/10.1063/1.373532>.
66. Yarin, A. L.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H. Branching in Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Physics* 2005, 98 (6), 064501. <https://doi.org/10.1063/1.2060928>.
67. Basson, N. Free Volume of Electrospun Organic-Inorganic Copolymers, Stellenbosch University, 2014.
68. Lee, K. H.; Kim, H. Y.; Khil, M. S.; Ra, Y. M.; Lee, D. R. Characterization of Nano-Structured Poly(ϵ -Caprolactone) Nonwoven Mats via Electrospinning. *Polymer* 2003, 44 (4), 1287–1294. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00820-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00820-0).
69. Fong, H.; Chun, I.; Reneker, D. H. Beaded Nanofibers Formed during Electrospinning. *Polymer* 1999, 40 (16), 4585–4592. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00068-3).
70. Bölgen, N.; Menceloğlu, Y. Z.; Acatay, K.; Vargel, I.; Pişkin, E. In Vitro and in Vivo Degradation of Non-Woven Materials Made of Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanofibers Prepared by Electrospinning under Different Conditions. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005, 16 (12), 1537–1555. <https://doi.org/10.1163/156856205774576655>.
71. Gu, S.; Ren, J. F.; Vancso, G. Process Optimization and Empirical Modeling of Electrospun Polyacrylonitrile (PAN) Nanofiber Precursor of Carbon Nanofibers. *European Polymer Journal* 2005, 41, 2559–2568. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.05.008>.
72. Jia, Y.-T.; Kim, H.-Y.; Gong, J.; Lee, D.-R. Electrospun Nanofibers of Block Copolymer of Trimethylene Carbonate and ϵ -Caprolactone. *Journal of Applied Polymer Science* 2006, 99 (4), 1462–1470. <https://doi.org/10.1002/app.22633>.
73. Shin, Y. M.; Hohman, M.; Brenner, M. P.; Rutledge, G. C. Experimental Characterization of Electrospinning: The Electrically Forced Jet and Instabilities. *Polymer* 2001, 42, 09955–09967. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00540-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00540-7).
74. Theron, S. A.; Zussman, E.; Yarin, A. L. Experimental Investigation of the Governing Parameters in the Electrospinning of Polymer Solutions. *Polymer* 2004, 45, 2017–2030. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.01.024>.

Références bibliographiques

75. He, J.-H.; Wu, Y.; Zuo, W.-W. Critical Length of Straight Jet in Electrospinning. *Polymer* 2005, 46 (26), 12637–12640. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.10.130>.
76. Leclinche, F. ; Rossi, R. Électrofilage – Electrospinning. *Techniques de l'Ingénieur*. (accessed 2024-03-30).
77. Sowmya, B.; Hemavathi, A. B.; Panda, P. K. Poly (ϵ -Caprolactone)-Based Electrospun Nano-Featured Substrate for Tissue Engineering Applications: A Review. *Prog Biomater* 2021, 10, 91–117. <https://doi.org/10.1007/s40204-021-00157-4>.
78. Safaeijavan, R.; Soleimani, M.; Divsalar, A.; Eidi, A.; Ardeshiryajimi, A. Biological Behavior Study of Gelatin Coated PCL Nanofibrous Electrospun Scaffolds Using Fibroblasts. *Archives of Advances in Biosciences* 2014, 5 (1). <https://doi.org/10.22037/jps.v5i1.5467>.
79. Atyabi, S. M.; Sharifi, F.; Irani, S.; Zandi, M.; Mivehchi, H.; Nagheh, Z. Cell Attachment and Viability Study of PCL Nano-Fiber Modified by Cold Atmospheric Plasma. *Cell Biochem Biophys* 2016, 74 (2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0718-1>.
80. Ko, Y.-M.; Choi, D.-Y.; Jung, S.-C.; Kim, B.-H. Characteristics of Plasma Treated Electrospun Polycaprolactone (PCL) Nanofiber Scaffold for Bone Tissue Engineering. *J Nanosci Nanotechnol* 2015, 15 (1), 192–195. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.8372>.
81. Asadian, M.; Grande, S.; Morent, R.; Nikiforov, A.; Declercq, H.; Geyter, N. D. Effects of Pre- and Post-Electrospinning Plasma Treatments on Electrospun PCL Nanofibers to Improve Cell Interactions. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2017, 841 (1), 012018. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/841/1/012018>.
82. Shafei, S.; Foroughi, J.; Chen, Z.; Wong, C. S.; Naebe, M. Short Oxygen Plasma Treatment Leading to Long-Term Hydrophilicity of Conductive PCL-PPy Nanofiber Scaffolds. *Polymers (Basel)* 2017, 9 (11), 614. <https://doi.org/10.3390/polym9110614>.
83. Yan, D.; Jones, J.; Yuan, X. Y.; Xu, X. H.; Sheng, J.; Lee, J. C.-M.; Ma, G. Q.; Yu, Q. S. Plasma Treatment of Electrospun PCL Random Nanofiber Meshes (NFMs) for Biological Property Improvement. *J Biomed Mater Res A* 2013, 101 (4), 963–972. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34398>.
84. Gautam, S.; Chou, C.-F.; Dinda, A. K.; Potdar, P. D.; Mishra, N. C. Surface Modification of Nanofibrous Polycaprolactone/Gelatin Composite Scaffold by Collagen Type I Grafting for Skin Tissue Engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014, 34, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.043>.
85. Adeli-Sardou, M.; Yaghoobi, M. M.; Torkzadeh-Mahani, M.; Dodel, M. Controlled Release of Lawsone from Polycaprolactone/Gelatin Electrospun

Références bibliographiques

- Nano Fibers for Skin Tissue Regeneration. *Int J Biol Macromol* 2019, 124, 478–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.237>.
86. Heydarkhan-Hagvall, S.; Schenke-Layland, K.; Dhanasopon, A. P.; Rofail, F.; Smith, H.; Wu, B. M.; Shemin, R.; Beygui, R. E.; MacLellan, W. R. Three-Dimensional Electrospun ECM-Based Hybrid Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering. *Biomaterials* 2008, 29 (19), 2907–2914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.034>.
87. Valizadeh, A.; Bakhtiary, M.; Akbarzadeh, A.; Salehi, R.; Frakhani, S. M.; Ebrahimi, O.; Rahmati-yamchi, M.; Davaran, S. Preparation and Characterization of Novel Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Nanofibrous Scaffolds. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016, 44 (2), 504–509. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.965310>.
88. Cipitria, A.; Skelton, A.; Dargaville, T. R.; Dalton, P. D.; Hutmacher, D. W. Design, Fabrication and Characterization of PCL Electrospun Scaffolds—a Review. *J. Mater. Chem.* 2011, 21 (26), 9419–9453. <https://doi.org/10.1039/C0JM04502K>.
89. Lam, C. X.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W. Comparison of the Degradation of Polycaprolactone and Polycaprolactone–(β -Tricalcium Phosphate) Scaffolds in Alkaline Medium. *Polymer International* 2007, 56 (6), 718–728. <https://doi.org/10.1002/pi.2195>.
90. Oyane, A.; Uchida, M.; Choong, C.; Triffitt, J.; Jones, J.; Ito, A. Simple Surface Modification of Poly(ϵ -Caprolactone) for Apatite Deposition from Simulated Body Fluid. *Biomaterials* 2005, 26 (15), 2407–2413. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.048>.
91. Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H. Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds. *Progress in Polymer Science* 2007, 32 (7), 698–725. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>.
92. Ma, Z.; Mao, Z.; Gao, C. Surface Modification and Property Analysis of Biomedical Polymers Used for Tissue Engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, 60 (2), 137–157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.019>.
93. Koh, H. S.; Yong, T.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S. Enhancement of Neurite Outgrowth Using Nano-Structured Scaffolds Coupled with Laminin. *Biomaterials* 2008, 29 (26), 3574–3582. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.014>.
94. Ma, Z.; He, W.; Yong, T.; Ramakrishna, S. Grafting of Gelatin on Electrospun Poly(Caprolactone) Nanofibers to Improve Endothelial Cell Spreading and Proliferation and to Control Cell Orientation. *Tissue Eng* 2005, 11 (7–8), 1149–1158. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1149>.

Références bibliographiques

95. Lam, M.; Migonney, V.; Falentin-Daudre, C. Review of Silicone Surface Modification Techniques and Coatings for Antibacterial/Antimicrobial Applications to Improve Breast Implant Surfaces. *Acta Biomaterialia* 2021, 121, 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.020>.
96. Zhu, Y.; Gao, C.; Shen, J. Surface Modification of Polycaprolactone with Poly(Methacrylic Acid) and Gelatin Covalent Immobilization for Promoting Its Cytocompatibility. *Biomaterials* 2002, 23 (24), 4889–4895. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00247-8).
97. Amokrane, G.; Humblot, V.; Jubeli, E.; Yagoubi, N.; Ramtani, S.; Migonney, V.; Falentin-Daudré, C.; Falentin-Daudré, C. Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Fiber Scaffolds Functionalized by the Covalent Grafting of a Bioactive Polymer: Surface Characterization and Influence on *in Vitro* Biological Response. *ACS Omega* 2019, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01647>.
98. Maurice, E.; Rangel, A. L. R.; Venkatesan, J. K.; Leroux, A.; El Hafci, H.; Pichard, D.; Manassero, M.; Godineau, T.; Vial, J.; Schmitt, G.; Speicher-Mentges, S.; Vandesteene, M.; Cucchiari, M.; Migonney, V.; Viateau, V. The Effect of pNaSS Grafting of Knitted Poly(ϵ -Caprolactone) Artificial Ligaments on *in Vitro* Mineralization and *in Vivo* Osseointegration. *Materialia* 2022, 21, 101331. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101331>.
99. Gross, K.; Venkatesan, J. K.; Falentin-Daudré, C.; Vaquette, C.; Migonney, V.; Cucchiari, M. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Aspirates Enhanced by Overexpression of RAAV- SOX9 and TGF-B upon Vector Delivery via Pnass-Grafted Microstructured Poly(E-Caprolactone) Scaffolds. *Osteoarthritis and Cartilage* 2020, 28, S520–S521. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.02.818>.
100. Chouirfa, H.; Evans, M. D. M.; Bean, P.; Saleh-Mghir, A.; Crémieux, A. C.; Castner, D. G.; Falentin-Daudré, C.; Migonney, V. Grafting of Bioactive Polymers with Various Architectures: A Versatile Tool for Preparing Antibacterial Infection and Biocompatible Surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018, 10 (2), 1480–1491. <https://doi.org/10.1021/acsmi.7b14283>.
101. Uyar, T.; Kny, E. *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization*; Woodhead Publishing, 2017.
102. Aghdam, R. M.; Shakhesi, S.; Najarian, S.; Mohammadi, M. M.; Ahmadi Tafti, S. H.; Mirzadeh, H. Fabrication of a Nanofibrous Scaffold for the *In Vitro* Culture of Cardiac Progenitor Cells for Myocardial Regeneration. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2014, 63 (5), 229–239. <https://doi.org/10.1080/00914037.2013.800983>.
103. Hitscherich, P.; Aphale, A.; Gordan, R.; Whitaker, R.; Singh, P.; Xie, L.-H.; Patra, P.; Lee, E. J. Electroactive Graphene Composite Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res A* 2018, 106 (11), 2923–2933. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36481>.

Références bibliographiques

104. Bertram, U.; Steiner, D.; Poppitz, B.; Dippold, D.; Köhn, K.; Beier, J. P.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R.; Schubert, D. W.; Horch, R. E.; Arkudas, A. Vascular Tissue Engineering: Effects of Integrating Collagen into a PCL Based Nanofiber Material. *Biomed Res Int* 2017, 2017, 9616939. <https://doi.org/10.1155/2017/9616939>.
105. Fu, W.; Liu, Z.; Feng, B.; Hu, R.; He, X.; Wang, H.; Yin, M.; Huang, H.; Zhang, H.; Wang, W. Electrospun Gelatin/PCL and Collagen/PLCL Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Int J Nanomedicine* 2014, 9, 2335–2344. <https://doi.org/10.2147/IJN.S61375>.
106. Duan, N.; Geng, X.; Ye, L.; Zhang, A.; Feng, Z.; Guo, L.; Gu, Y. A Vascular Tissue Engineering Scaffold with Core-Shell Structured Nano-Fibers Formed by Coaxial Electrospinning and Its Biocompatibility Evaluation. *Biomed Mater* 2016, 11 (3), 035007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/3/035007>.
107. Chong, L.; Hassan, M.; Sultana Phd Ceng Csci, N. Electrospun Polycaprolactone (PCL) and PCL/ Nano-Hydroxyapatite (PCL/nHA)-Based Nanofibers for Bone Tissue Engineering Application; 2015; pp 1–4. <https://doi.org/10.1109/ASCC.2015.7244569>.
108. Pattanashetti, N. A.; Achari, D. D.; Torvi, A. I.; Doddamani, R. V.; Kariduraganavar, M. Y. Multilayer Electrospinning of PCL and PVA: NaAlg Nanofibres for Bone Tissue Engineering. Rochester, NY November 11, 2019. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3484669>.
109. Silva, J. C.; Udangawa, R. N.; Chen, J.; Mancinelli, C. D.; Garrudo, F. F. F.; Mikael, P. E.; Cabral, J. M. S.; Ferreira, F. C.; Linhardt, R. J. Kartogenin-Loaded Coaxial PGS/PCL Aligned Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020, 107, 110291. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110291>.
110. Alemi, P. S.; Atyabi, S. A.; Sharifi, F.; Mohamadali, M.; Irani, S.; Bakhshi, H.; Atyabi, S. M. Synergistic Effect of Pressure Cold Atmospheric Plasma and Carboxymethyl Chitosan to Mesenchymal Stem Cell Differentiation on PCL/CMC Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering. *Polymers for Advanced Technologies* 2019, 30 (6), 1356–1364. <https://doi.org/10.1002/pat.4568>.
111. Bolaina-Lorenzo, E.; Martínez-Ramos, C.; Monleón-Pradas, M.; Herrera-Kao, W.; Cauich-Rodríguez, J. V.; Cervantes-Uc, J. M. Electrospun Polycaprolactone/Chitosan Scaffolds for Nerve Tissue Engineering: Physicochemical Characterization and Schwann Cell Biocompatibility. *Biomed Mater* 2016, 12 (1), 015008. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/12/1/015008>.
112. Ghasemi-Mobarakeh, L.; Prabhakaran, M. P.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M. H.; Ramakrishna, S. Bio-Functionalized PCL Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C* 2010, 30 (8), 1129–1136. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.06.004>.

Références bibliographiques

113. Xie, J.; Macewan, M. R.; Willerth, S. M.; Li, X.; Moran, D. W.; Sakiyama-Elbert, S. E.; Xia, Y. Conductive Core-Sheath Nanofibers and Their Potential Application in Neural Tissue Engineering. *Adv Funct Mater* 2009, 19 (14), 2312–2318. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801904>.
114. Ghasemi-Mobarakeh, L.; Prabhakaran, M. P.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M.-H.; Ramakrishna, S. Electrospun Poly(Epsilon-Caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Biomaterials* 2008, 29 (34), 4532–4539. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.08.007>.
115. Sadari, N.; Rajabi, M.; Akbari, B.; Firouzi, M.; Hassannejad, Z. Fabrication and Characterization of Gold Nanoparticle-Doped Electrospun PCL/Chitosan Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2018, 29 (9), 134. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6144-3>.
116. Etienne Bourgart. Métabolisme cutané et biomarqueurs d'exposition aux mélanges complexes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019.
117. Sharif, S.; Ai, J.; Azami, M.; Verdi, J.; Atlasi, M. A.; Shirian, S.; Samadikuchaksaraei, A. Collagen-Coated Nano-Electrospun PCL Seeded with Human Endometrial Stem Cells for Skin Tissue Engineering Applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018, 106 (4), 1578–1586. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33966>.
118. Zahedi, E.; Esmaili, A.; Eslahi, N.; Shokrgozar, M. A.; Simchi, A. Fabrication and Characterization of Core-Shell Electrospun Fibrous Mats Containing Medicinal Herbs for Wound Healing and Skin Tissue Engineering. *Mar Drugs* 2019, 17 (1), 27. <https://doi.org/10.3390/md17010027>.
119. Zarekhalili, Z.; Bahrami, S. H.; Ranjbar-Mohammadi, M.; Milan, P. B. Fabrication and Characterization of PVA/Gum Tragacanth/PCL Hybrid Nanofibrous Scaffolds for Skin Substitutes. *Int J Biol Macromol* 2017, 94 (Pt A), 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.042>.
120. Salehi, M.; Niyakan, M.; Ehterami, A.; Haghi-Daredeh, S.; Nazarnezhad, S.; Abbaszadeh-Goudarzi, G.; Vaez, A.; Hashemi, S. F.; Rezaei, N.; Mousavi, S. R. Porous Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Mat Containing Cinnamon for Wound Healing Application: In Vitro and in Vivo Study. *Biomed Eng Lett* 2020, 10 (1), 149–161. <https://doi.org/10.1007/s13534-019-00138-4>.
121. Amokrane, G. Influence Du Greffage Covalent de Polymères Bioactifs, Sous Irradiations UV, Sur Des Échafaudages En Fibres PCL Électrofilées : Caractérisation de Surface, Étude Des Propriétés Mécaniques et Évaluation de La Réponse Biologique. Thèse de doctorat, Université Paris 13, 2019.
122. Lowery, J. L.; Datta, N.; Rutledge, G. C. Effect of Fiber Diameter, Pore Size and Seeding Method on Growth of Human Dermal Fibroblasts in

Références bibliographiques

- Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Fibrous Mats. *Biomaterials* 2010, 31 (3), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.072>.
123. Ferreira, J. L.; Gomes, S.; Henriques, C.; Borges, J. P.; Silva, J. C. Electrospinning Polycaprolactone Dissolved in Glacial Acetic Acid: Fiber Production, Nonwoven Characterization, and In Vitro Evaluation. *Journal of Applied Polymer Science* 2014, 131 (22). <https://doi.org/10.1002/app.41068>.
124. Paul, B. K.; Mondal, D.; Bhattacharya, D.; Ghosh, A.; Das, S. Processing of Thin-Film Electrode Based Supercapacitors: Progress during the Last Decade. In Reference Module in Materials Science and Materials Engineering; Elsevier, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96020-5.00071-6>.
125. Yang, B.; Gong, C.; Zhao, X.; Zhou, S.; Li, Z.; Qi, X.; Zhong, Q.; Luo, F.; Qian, Z. Preventing Postoperative Abdominal Adhesions in a Rat Model with PEG-PCL-PEG Hydrogel. *Int J Nanomedicine* 2012, 7, 547–557. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26141>.
126. Ten Broek, R. P. G.; Kok-Krant, N.; Verhoeve, H. R.; van Goor, H.; Bakkum, E. A. Efficacy of Polyethylene Glycol Adhesion Barrier after Gynecological Laparoscopic Surgery: Results of a Randomized Controlled Pilot Study. *Gynecol Surg* 2012, 9 (1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s10397-011-0698-0>.
127. Askari, F.; Zandi, M.; Shokrolahi, P.; Tabatabaei, M. H.; Hajirasoliha, E. Reduction in Protein Absorption on Ophthalmic Lenses by PEGDA Bulk Modification of Silicone Acrylate-Based Formulation. *Prog Biomater* 2019, 8 (3), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00119-x>.
128. Kato, K.; Ikada, Y. Selective Adsorption of Proteins to Their Ligands Covalently Immobilized onto Microfibers. *Biotechnology and Bioengineering* 1995, 47 (5), 557–566. <https://doi.org/10.1002/bit.260470508>.
129. Gupta, B.; Geeta; Ray, A. Preparation of Poly(Epsilon-Caprolactone)/Poly(Epsilon-Caprolactone-Co-Lactide) (PCL/PLCL) Blend Filament by Melt Spinning. *Journal of Applied Polymer Science* 2012, 123, 1944–1950. <https://doi.org/10.1002/app.34728>.
130. Haddad, L. Analyse de la déformation des matériaux métalliques à l'aide de la technique de corrélation d'images numériques. Thesis, UAMB, 2020.
131. Olarinoye, A. O.; Olaomo, N. O.; Adesina, K. T.; Ezeoke, G. G.; Aboyeji, A. P. Comparative Diagnosis of Premature Rupture of Membrane by Nitrazine Test, Urea, and Creatinine Estimation. *Int J Health Sci (Qassim)* 2021, 15 (6), 16–22.
132. Tong, X.-L.; Wang, L.; Gao, T.-B.; Qin, Y.-G.; Qi, Y.-Q.; Xu, Y.-P. Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development---Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and

Références bibliographiques

- Maternal Serum at Mid and Late Gestation. *J Chin Med Assoc* 2009, 72 (7), 368–373. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70389-2](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70389-2).
133. Lee, D. Y.; Yun, S. H.; Lee, S. Y.; Lee, J.; Jr. Mariano, E.; Joo, S.; Choi, I.; Choi, J. S.; Kim, G.; Lee, J.; Choi, S.-H.; Hur, S. J. Analysis of Commercial Fetal Bovine Serum (FBS) and Its Substitutes in the Development of Cultured Meat. *Food Research International* 2023, 174, 113617. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113617>.
134. Oliveira, F. R.; Barros, E. G.; Magalhães, J. A. Biochemical Profile of Amniotic Fluid for the Assessment of Fetal and Renal Development. *Braz J Med Biol Res* 2002, 35 (2), 215–222. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002000200010>.
135. T, L.; J, B. Zell- Und Gewebekultur. Einfuehrung in Die Grundlagen Sowie Ausgewaehlte Methoden Und Anwendungen.; 1989.
136. Duarte Rojas, J.; Munera, L.; Mira, S. *Comparison between Platelet Lysate, Platelet Lysate Serum, and Fetal Bovine Serum as a Supplement for Cell Culture, Expansion, and Cryopreservation*; 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3171753/v1>.
137. Fortunato, S. J.; LaFleur, B.; Menon, R. Collagenase-3 (MMP-13) in Fetal Membranes and Amniotic Fluid during Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2003, 49 (2), 120–125. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00012.x>.
138. Maymon, E.; Romero, R.; Pacora, P.; Gervasi, M.-T.; Bianco, K.; Ghezzi, F.; Yoon, B. H. Evidence for the Participation of Interstitial Collagenase (Matrix Metalloproteinase 1) in Preterm Premature Rupture of Membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000, 183 (4), 914–920. <https://doi.org/10.1067/mob.2000.108879>.
139. Lichstein, H. C. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration. *J Bacteriol* 1944, 47 (3), 239–251.
140. Cabrol, L.; Quéméneur, M.; Misson, B. Inhibitory Effects of Sodium Azide on Microbial Growth in Experimental Resuspension of Marine Sediment. *Journal of Microbiological Methods* 2017, 133, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.021>.
141. Pal, S.; Srivastava, R.; Nandan, B. Effect of Spinning Solvent on Crystallization Behavior of Confined Polymers in Electrospun Nanofibers. *Polymer crystallization* 2021, 4. <https://doi.org/10.1002/pcr2.10209>.
142. Zheng, J.; Sun, B.; Long, Y.-Z.; Zhang, H. D.; Zhang, Z. M.; Zhang, Z. H.; Han, W. H.; Shao, F.; Huang, J. Y. Fabrication of Nanofibers by Low-Voltage Near-Field Electrospinning. *Advanced Materials Research* 2012, 486, 60–64. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.486.60>.

Références bibliographiques

143. Chen, S.; Hou, H.; Hu, P.; Wendorff, J.; Greiner, A.; Agarwal, S. Effect of Different Bicomponent Electrospinning Techniques on the Formation of Polymeric Nanosprings. *Macromolecular Materials and Engineering* 2009, 294, 781–786. <https://doi.org/10.1002/mame.200900139>.
144. Zargham, S.; Bazgir, S.; Tavakoli, A.; Rashidi, A.; Damerchely, R. The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 2012, 7, 42–49. <https://doi.org/10.1177/155892501200700414>.
145. Tariq, A.; Behraves, A. H.; Utkarsh, U.; Rizvi, G. Statistical Modeling and Optimization of Electrospinning for Improved Morphology and Enhanced β -Phase in Polyvinylidene Fluoride Nanofibers. *Polymers* 2023, 15, 4344. <https://doi.org/10.3390/polym15224344>.
146. Amokrane, G.; Falentin-Daudré, C.; Ramtani, S.; Migonney, V. A Simple Method to Functionalize PCL Surface by Grafting Bioactive Polymers Using UV Irradiation. *IRBM* 2018, 39. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2018.07.002>.
147. Law, K.-Y. Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014, 5 (4), 686–688. <https://doi.org/10.1021/jz402762h>.
148. Shaikh, S.; Khatri, Z.; Oh, K. W.; Kim, I.-S.; Kim, S. Preparation and Characterization of Hybrid Polycaprolactone/Cellulose Ultrafine Fibers via Electrospinning. *Macromolecular Research* 2014, 22, 562–568. <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2078-x>.
149. Rajzer, I.; Menaszek, E.; Kwiatkowski, R.; Planell, J. A.; Castano, O. Electrospun Gelatin/Poly(ϵ -Caprolactone) Fibrous Scaffold Modified with Calcium Phosphate for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C* 2014, 44, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.017>.
150. Sałdyka, M.; Mielke, Z.; Haupa, K. Structural and Spectroscopic Characterization of DMF Complexes with Nitrogen, Carbon Dioxide, Ammonia and Water. *Infrared Matrix Isolation and Theoretical Studies. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2018, 190, 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.046>.
151. Venkata Chalapathi, V. ; Venkata Ramiah, K. Normal Vibrations of N, N-Dimethylformamide and N, N-Dimethylacetamide. *Proc. Indian Acad. Sci.* 1968, 68 (3), 109–122. <https://doi.org/10.1007/BF03049367>.
152. Chouirfa, H.; Migonney, V.; Falentin-Daudré, C. Grafting Bioactive Polymers onto Titanium Implants by UV Irradiation. *RSC Adv.* 2016, 6. <https://doi.org/10.1039/C5RA24497H>.
153. Ramazani, S.; Karimi, M. Investigating the Influence of Temperature on Electrospinning of Polycaprolactone Solutions. *e-Polymers* 2014, 14. <https://doi.org/10.1515/epoly-2014-0110>.

Références bibliographiques

154. Balani, K., Verma, V., Agarwal, A. and Narayan, R. (2014). Physical, Thermal, and Mechanical Properties of Polymers. In Biosurfaces. <https://doi.org/10.1002/9781118950623.app1>.
155. Felgueiras, H.; Migonney, V. Cell Spreading and Morphology Variations as a Result of Protein Adsorption and Bioactive Coating on Ti6Al4V Surfaces. IRBM 2016, 37. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2016.03.006>
156. Lensen, M.; Schulte, V.; Diez, M. Cell Adhesion and Spreading on an Intrinsically Anti-Adhesive PEG Biomaterial; 2011. <https://doi.org/10.5772/24273>.
157. Li, K.; Qi, Y.; Zhou, Y.; Sun, X.; Zhang, Z. Microstructure and Properties of Poly(Ethylene Glycol)-Segmented Polyurethane Antifouling Coatings after Immersion in Seawater. Polymers 2021, 13, 573. <https://doi.org/10.3390/polym13040573>.
158. Ostuni, E.; Chapman, R.; Holmlin, R.; Takayama, S.; Whitesides, G. A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces That Resist the Adsorption of Protein. Langmuir 2001, 17. <https://doi.org/10.1021/la010384m>.
159. Dahanayake, J. N.; Mitchell-Koch, K. R. Entropy Connects Water Structure and Dynamics in Protein Hydration Layer. Phys Chem Chem Phys 2018, 20 (21), 14765–14777. <https://doi.org/10.1039/c8cp01674g>.
160. Li, M.; Joung, D.; Hughes, B.; Waldman, S. D.; Kozinski, J. A.; Hwang, D. K. Wrinkling Non-Spherical Particles and Its Application in Cell Attachment Promotion. Sci Rep 2016, 6 (1), 30463. <https://doi.org/10.1038/srep30463>.
161. Giljean, S. Caractérisation Multi-Échelles de La Rugosité de Matériaux Métalliques à Usage Biomédical : Effet Sur La Mouillabilité et l'Adhésion de Cellules Osseuses. Université de Haute Alsace, Mulhouse, 2007.
162. Ponsonnet, L.; Comte, V.; Othmane, A.; Lagneau, C.; Charbonnier, M.; Lissac, M.; Jaffrezic, N. Effect of Surface Topography and Chemistry on Adhesion, Orientation and Growth of Fibroblasts on Nickel–Titanium Substrates. Materials Science and Engineering: C 2002, 21 (1), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00097-8).
163. Bigerelle, M.; Anselme, K.; Noël, B.; Ruderman, I.; Hardouin, P.; Iost, A. Improvement in the Morphology of Ti-Based Surfaces: A New Process to Increase in Vitro Human Osteoblast Response. Biomaterials 2002, 23 (7), 1563–1577. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00271-X).
164. Sun, Q.; Hou, Y.; Chu, Z.; Wei, Q. Soft Overcomes the Hard: Flexible Materials Adapt to Cell Adhesion to Promote Cell Mechanotransduction. Bioactive Materials 2021, 10. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.08.026>.

Références bibliographiques

165. Cornillon, J.; Campos, L.; Guyotat, D. Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Med Sci (Paris)* 2003, 19 (6–7), 743–752. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031967743>.
166. Khenoussi, N. Contribution à l'étude et à la caractérisation de nanofibres obtenues par électro-filage : Application aux domaines médical et composite. phdthesis, Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2010.
167. Gnaba, I.; Soulat, D.; Wang, P.; Ferreira, M.; Vroman, P.; Omrani, F. Etude Du Comportement Mécanique de Non-Tissé Lin/PP à l'échelle Renfort et Composite. In *CFM 2017 - 23ème Congrès Français de Mécanique; Mécanique, A. F. de, Ed.*, 2017.
168. Lu, J.-W.; Zhang, Z.-P.; Ren, X.-Z.; Chen, Y.-Z.; Yu, J.; Guo, Z.-X. High-Elongation Fiber Mats by Electrospinning of Polyoxymethylene. *Macromolecules* 2008, 41 (11), 3762–3764. <https://doi.org/10.1021/ma702881k>.
169. Aljaber, K. G. J. Processing and Characterisation of Electrospun Nanofibrous Membranes: Influence of Polymer Rheology, Structuration of Fiber Network and Its Mechanical Properties. phdthesis, Université Grenoble Alpes, 2017.
170. ISO 527-1 :2019(fr), Plastiques : Détermination des propriétés en traction. <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:527:-1:ed-3:v1:fr:term:3.7> (accessed 2024-04-30).
171. Fontanille, M.; Gnanou, Y. Structure moléculaire et morphologie des polymères. *Techniques de l'Ingénieur* (accessed 2024-04-30).
172. Bessell, T. J.; Hull, D.; Shortall, J. B. The Effect of Polymerization Conditions and Crystallinity on the Mechanical Properties and Fracture of Spherulitic Nylon 6. *Journal of Materials Science* 1975, 10 (7), 1127–1136. <https://doi.org/10.1007/BF00541393>.
173. Yuan, S.; Zhang, B.; Wen, X.; Chen, K.; Jiang, S.; Luo, Y. Influence of Strain Rate on Mechanical Properties of HTPE/PCL Propellant Applying to Wide Temperature Range. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* 2021, 46 (4), 618–625. <https://doi.org/10.1002/prop.202000238>.
174. Nor, F. M.; Lee, H. Y.; Lim, J. Y.; Kurniawan, D. Strain Rate and Temperature Effects on Elastic Properties of Polycaprolactone/Starch Composite. *e-Polymers* 2016, 16 (3), 217–223. <https://doi.org/10.1515/epoly-2015-0261>.
175. Rietsch, F.; Bouette, B. The Compression Yield Behaviour of Polycarbonate over a Wide Range of Strain Rates and Temperatures. *European Polymer Journal* 1990, 26 (10), 1071–1075. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(90\)90005-O](https://doi.org/10.1016/0014-3057(90)90005-O).

Références bibliographiques

176. Richeton, J.; Ahzi, S.; Daridon, L.; Rémond, Y. A Formulation of the Cooperative Model for the Yield Stress of Amorphous Polymers for a Wide Range of Strain Rates and Temperatures. *Polymer* 2005, 46 (16), 6035–6043. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.05.079>.
177. Passot, A. ; Cabodevila, G. Fabrication et Caractérisation d'une Peau Humaine Artificielle Vascularisée. In CFM 2011 - 20ème Congrès Français de Mécanique ; Mécanique, A. F. de, Ed. France, 2011.
178. Wijn, P. F. F.; Brakkee, A. J. M.; Kuiper, J. P.; Vendrik, A. J. H. The Alinear Viscoelastic Properties of Human Skin in Vivo Related to Sex and Age. In *Bioengineering and the Skin: Based on the Proceedings of the European Society for Dermatological Research Symposium, held at the Welsh National School of Medicine, Cardiff, 19–21 July 1979*; Marks, R., Payne, P. A., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1981; pp 135–145. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7310-7_17.
179. Di Meo, V.; Moccia, M.; Sanità, G.; Crescitelli, A.; Lamberti, A.; Galdi, V.; Rendina, I.; Esposito, E. Probing Denaturation of Protein A via Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *Biosensors (Basel)* 2022, 12 (7), 530. <https://doi.org/10.3390/bios12070530>.
180. Leroux, A. Implant ligamentaire bioactif et biodégradable : élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes. phdthesis, Université Sorbonne Paris Cité, 2019.
181. Vouyovitch van Schoors, L. Vieillissement Hydrolytique Des Géotextiles Polyester (Polyéthylène Téréphtalate) : Etat de l'art. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées* 2007, No. 270–271, pp 133-154.
182. Allen, N. S.; Edge, M.; Mohammadian, M.; Jones, K. Hydrolytic Degradation of Poly(Ethylene Terephthalate): Importance of Chain Scission versus Crystallinity. *European Polymer Journal* 1991, 27 (12), 1373–1378. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(91\)90237-I](https://doi.org/10.1016/0014-3057(91)90237-I).
183. Bélan, F.; Bellenger, V.; Mortaigne, B. Hydrolytic Stability of Unsaturated Polyester Networks with Controlled Chain Ends. *Polymer Degradation and Stability* 1997, 56 (1), 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(96\)00185-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(96)00185-1).
184. Yuan, X.; Mak, A. F. T.; Yao, K. Surface Degradation of Poly(L-Lactic Acid) Fibres in a Concentrated Alkaline Solution. *Polymer Degradation and Stability* 2003, 79 (1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00237-9).
185. Gan, Z.; Yu, D.; Zhong, Z.; Liang, Q.; Jing, X. Enzymatic Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone)/Poly(DL-Lactide) Blends in Phosphate Buffer Solution. *Polymer* 1999, 40 (10), 2859–2862. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00549-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00549-7).
186. Sailema-Palate, G. P.; Vidaurre, A.; Campillo-Fernández, A. J.; Castilla-Cortázar, I. A Comparative Study on Poly(ϵ -Caprolactone) Film Degradation at

Références bibliographiques

- Extreme pH Values. *Polymer Degradation and Stability* 2016, 130, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.005>.
187. Bartnikowski, M.; Dargaville, T. R.; Ivanovski, S.; Hutmacher, D. W. Degradation Mechanisms of Polycaprolactone in the Context of Chemistry, Geometry and Environment. *Progress in Polymer Science* 2019, 96, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.05.004>
188. Yang, L.; Thomason, J.; Zhu, W. The Influence of Thermo-Oxidative Degradation on the Measured Interface Strength of Glass Fibre-Polypropylene. *Composites Part A-applied Science and Manufacturing - COMPOS PART A-APPL SCI MANUF* 2011, 42, 1293–1300. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2011.05.011>.
189. Rodriguez Ortega, E. Hydrolyse de polylactides et de mélanges de polylactide/polyméthacrylate de méthyle. Université de Sherbrooke 2018.
190. Elias, V.; Salman, A.; Goulias, D. The Effect of pH, Resin Properties, and Manufacturing Process on Laboratory Degradation of Polyester Geosynthetics. *Geosynthetics International* 1998, 5. <https://doi.org/10.1680/gein.5.0133>.
191. Dabasinskaite, L.; Krugly, E.; Baniukaitiene, O.; Martuzevicius, D.; Ciuzas, D.; Jankauskaite, L.; Aukstikalne, L.; Usas, A. The Effect of Ozone Treatment on the Physicochemical Properties and Biocompatibility of Electrospun Poly(ϵ)Caprolactone Scaffolds. *Pharmaceutics* 2021, 13 (8), 1288. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081288>.
192. Sangtabi, M. S.; Dolatabadi, M. K.; Gorji, M.; Gharehaghaji, A. A.; Rashidi, A. Hybrid Electrospun Nanofibrous Membranes: Influence of Layer Arrangement and Composition Ratio on Tensile and Transport Properties. *Journal of Industrial Textiles* 2022, 51 (3_suppl), 4665S-4697S. <https://doi.org/10.1177/1528083720917948>.
193. ISO 11339:2010(fr), Adhésifs — Essai de pelage en T d'assemblages collés flexible sur flexible. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11339:ed-3:v1:fr> (accessed 2024-05-20).
194. Ashter, S. A. 6 - Mechanics of Materials. In *Thermoforming of Single and Multilayer Laminates*; Ashter, S. A., Ed.; William Andrew Publishing: Oxford, 2014; pp 123–145. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3172-5.00006-2>.
195. Zientara, A.; Tseng, Y.-T.; Salmasi, Y. M.; Quarto, C.; Stock, U. How to Test Adhesive Strength: A Biomechanical Testing for Aortic Glue Used in Type a Dissection Repair. *Eur J Cardiothorac Surg* 2023, 64 (4), ezad270. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezad270>.
196. Gracia, M. Collage d'hydrogels par des nanoparticules de silice. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017.

Références bibliographiques

197. Hu, C.; Chu, C.; Liu, L.; Wang, C.; Jin, S.; Yang, R.; Rung, S.; Li, J.; Qu, Y.; Man, Y. Dissecting the Microenvironment around Biosynthetic Scaffolds in Murine Skin Wound Healing. *Science Advances* 2021, 7, eabf0787. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf0787>.
198. Guilbaud, L.; Roux, N.; Friszer, S.; Garabedian, C.; Dhombres, F.; Bessières, B.; Fallet-Bianco, C.; Di Rocco, F.; Zerah, M.; Jouannic, J.-M. Fetoscopic Patch Coverage of Experimental Myelomeningocele Using a Two-Port Access in Fetal Sheep. *Childs Nerv Syst* 2017, 33 (7), 1177–1184. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3461-7>.
199. Steele, J. W.; Bayliss, S.; Bayliss, J.; Lin, Y. L.; Wlodarczyk, B. J.; Cabrera, R. M.; Asfaw, Y. G.; Cummings, T. J.; Finnell, R. H.; George, T. M. Heritable Spina Bifida in Sheep: A Potential Model for Fetal Repair of Myelomeningocele. *J Pediatr Surg* 2020, 55 (3), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.06.019>.
200. Kabagambe, S. K.; Lee, C. J.; Goodman, L. F.; Chen, Y. J.; Vanover, M. A.; Farmer, D. L. Lessons from the Barn to the Operating Suite: A Comprehensive Review of Animal Models for Fetal Surgery. *Annu Rev Anim Biosci* 2018, 6, 99–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014637>.
201. Theveneau, É.; David, N. Migrations cellulaires collectives. *Med Sci (Paris)* 2014, 30 (8–9), 751–757. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143008012>.
202. Vedula, S. R. K.; Hirata, H.; Nai, M. H.; Brugués, A.; Toyama, Y.; Trepát, X.; Lim, C. T.; Ladoux, B. Epithelial Bridges Maintain Tissue Integrity during Collective Cell Migration. *Nature Mater* 2014, 13 (1), 87–96. <https://doi.org/10.1038/nmat3814>.

Résumé :

La myéломéningocèle (MMC) est une anomalie congénitale caractérisée par l'extériorisation du tissu médullaire et des méninges à travers des arcs vertébraux ouverts. L'exposition à l'environnement intra-utérin entraîne une destruction progressive du tissu médullaire, engendrant des troubles neurologiques. Bien que la chirurgie fœtale permette de réduire les séquelles postnatales, une approche précoce et moins invasive améliorerait d'avantage le pronostic, tout en minimisant les risques materno-fœtaux. Plusieurs études ont proposé l'utilisation de patches comme alternative à la réparation chirurgicale, afin d'espérer une couverture précoce du défaut et de réduire la durée de l'intervention chirurgicale. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail avec l'objectif de développer un patch biocompatible et biodégradable facilitant la réparation *in utero* de la myéломéningocèle. Ce patch doit être imperméable avec une face interne antiadhésive pour éviter son accolement au tissu médullaire, et une face externe bioactive pour favoriser la couverture tissulaire. La première étape a été de développer un patch imperméable, grâce à une conception à double couche, qui possède de bonnes propriétés mécaniques. Nous avons montré à travers les différentes techniques de caractérisations, la réussite du greffage du poly (styrène sulfonate de sodium) (polyNaSS) sur la face externe, et du polyéthylène glycol méthyl éther acrylate (PEG) sur la face interne connu pour ses propriétés antiadhésives. L'étude de la réponse biologique a montré que la présence du polyNaSS en surface favorise l'adhésion et la prolifération des fibroblastes L929. L'élaboration d'une face interne lisse a permis d'obtenir une surface antiadhésive, qui évitera une étape supplémentaire de fonctionnalisation. Enfin, l'étude de dégradation du patch dans un milieu simulant le liquide amniotique, nous a permis de comprendre son mécanisme et l'influence de la fonctionnalisation de surface sur sa cinétique, afin de prédire le comportement du patch *in vivo*.

Mots clés : Myéломéningocèle, patch à double couche, polycaprolactone, électrofilage.

Abstract:

Myelomeningocele (MMC) is a congenital defect of the spine characterized by meningeal and spinal cord protrusion through the open vertebral arches. As a result of exposure to the intrauterine environment, spinal cord tissue is progressively damaged, leading to neurological disorders. Although fetal surgery can reduce postnatal consequences, an early, less invasive approach would further improve the outcomes, and reduce maternal-fetal risks. Several studies have proposed the use of patches as an alternative to surgical repair, to achieve early coverage of the defect and reduce surgical time. The aim of this work is to develop a biocompatible, biodegradable patch to improve *in utero* MMC repair. This patch must be watertight, with an anti-adhesive internal surface to prevent adhesion to spinal cord tissue, and a bioactive external surface to promote tissue coverage. The first step was to develop a watertight patch based on a double-layer design, offering good mechanical properties. We demonstrated, through various characterization techniques, the successful grafting of poly (sodium styrene sulfonate) (polyNaSS) on the external side, and polyethylene glycol methyl ether acrylate (PEG) on the internal side, known for its anti-adhesive properties. A study of the biological response showed that the presence of polyNaSS on the surface promoted L929 fibroblasts adhesion and proliferation. The development of a smooth internal surface resulted in an anti-adhesive surface, saving an additional functionalization step. Finally, the study of patch degradation in a simulated amniotic fluid medium allowed us to understand its mechanism, and the influence of surface functionalization on its kinetics, in order to predict *in vivo* patch behaviors.

Keywords: Myelomeningocele, Double-layer patch, Polycaprolactone, Electrospinning.