

*ÉCOLE DOCTORALE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE*

Laboratoire BioMatériaux et BioIngénierie UMR-S 1121

**THÈSE** présentée par :

**Manon ALLAIS**

soutenue le : 28 septembre 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique

**Matériaux fonctionnels à base de polyphénols**

**THÈSE dirigée par :**

**Monsieur BALL Vincent**

Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Monsieur DARD Michel**

Professeur, Columbia University, Straumann Group

**Madame NARDIN Corinne**

Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Madame ANSELME Karine**

Docteur, Université de Haute Alsace



# Matériaux fonctionnels à base de polyphénols

Manon ALLAIS

28/09/2018





# Remerciements

Les trois années de ma thèse se sont avérées riches en apprentissage scientifique mais aussi en rencontres humaines. Je souhaite remercier ici toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Tout d’abord, je remercie mon directeur de thèse, Vincent Ball. Merci infiniment pour tout ce que tu m’as apporté et ce que tu as partagé avec moi : tes précieux conseils, ta soif de connaissance, ta bonne humeur. Tu as toujours été là dans les moments de doute et tu as toujours su me remotiver quand il le fallait. Tu m’as toujours fait confiance et pour cela je t’en serai éternellement reconnaissante.

Ensuite, je voudrais remercier le directeur de laboratoire Pierre Schaaf ainsi que Philippe Laval. Merci pour m’avoir accueillie au sein du laboratoire et d’avoir permis la réalisation de moments de rencontre au sein du labo comme les séminaires au Mont Ste Odile ou en Allemagne.

Je voudrais remercier chaleureusement les membres de mon jury Pr. Michel Dard, Pr. Corinne Nardin ainsi que Dr. Karine Anselme. Merci d’avoir accepté de lire ma thèse et de juger mon travail. Merci également pour la qualité de nos échanges lors de ma soutenance.

Ensuite, je tiens à remercier les chercheurs qui m’ont encadrée durant ces 3 années. Merci tout d’abord à Guy Schlatter et Anne Hébraud qui m’ont toujours accueillie chaleureusement au sein du laboratoire ICPEES. Vos conseils m’ont été très précieux et la qualité des échanges lors de nos réunions a permis de mener à bien les parties de la thèse qui concernaient l’électropinning. Merci ensuite à Florent Meyer qui m’a encadrée sur la partie biologique de ma thèse. Merci pour nos échanges toujours dans la bonne humeur et ton enthousiasme débordant !

Je tiens maintenant à remercier tous les membres de l’ICPEES, de l’IPCMS et de l’Inserm qui m’ont aidée dans l’avancée de mes travaux, tout particulièrement Pascal Hébraud qui m’a permis de réaliser les expériences de diffusion dynamique de la lumière ainsi que Dris Ihiawakrim pour les images de cryo-TEM. Merci également à Karim pour la fabrication de mes poids en

PTFE.

Merci à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants de l'ICPEES avec qui j'ai pu partager de bons moments. Merci particulièrement à Domitille Mailley avec qui j'ai collaboré pour la partie Electrospinning d'acide tannique. C'était très agréable de travailler avec toi et ton organisation maintenant légendaire. Merci aussi pour nos soirées discussions et potins. Merci à Wassim et Martin qui ont pu collaboré au projet Electr'At Pulpe durant leur stage. Je souhaite aussi remercier Florence. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et ton aide précieux. Je remercie chaleureusement tous les autres : Morgane, Carole, Meng, Théodore, Kim, Pierre, Céline, Thibaud, Clara, Audrey...

Je remercie également tous les membres de l'unité Inserm 1121. Grâce à vous, j'ai passé 3 magnifiques années avec de bons moments aussi bien dans que hors du labo (séminaire au Mont Sainte Odile ou en Allemagne, la Strasbourgeoise en canoë et autres sorties en tout genre). Merci à Helena, Julien, Céline, Camille, Eminé, Gaëtan (notre séjour à Ambleteuse et nos posters super bien placés!), Géraldine, Morgane, Ludivine, Annie, Angela, Sarah, Florian, Mathilde, Sophie, Varvara, François, Claire, Juliette, Haseeb, Salima, Eya, Saït, Sébastien, Léa, Esteban, Naji, Engin.

Ensuite, je voudrais remercier Cynthia et Lorène qui ont été bien plus que des collègues et des colocataires de bureau. Merci pour tous ces bons moments partagés, nos discussions, nos excursions pour aller chercher les crevettes, les tentatives déco du bureau. Votre présence à mes côtés pendant ces 3 ans a été des plus précieuses. Merci pour tout !

Merci à mes amies qui me soutiennent et qui sont venues écouter les histoires de polyphénols. Merci à Cécile qui est à mes côtés depuis la 4ème. Que de chemin parcouru depuis ce temps mais tu es toujours là ! Merci à Ninon sur qui je peux compter quand j'ai des doutes. Merci pour nos échanges qui m'éclairent toujours. Et enfin merci à mes amies de l'ISIFC. Merci à Anaïs, Aurore, Marion. Même si on est un peu éparpillées dans toute la France, je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

Je souhaiterais remercier ma famille : mon père et ma mère, mes grand parents qui m'ont toujours soutenue (avec ma grand-mère et sa fameuse expressio : "on sait y quand on sait pas"). Merci également à mes frères sur qui je peux compter pour avoir toujours un avis tranché (surtout quand j'envoyais mes supers animations PowerPoint pour savoir ce que vous en pensiez!).

Enfin merci à Raphaël qui m'a supportée durant ces 3 ans. Merci pour ton soutien sans faille

et ta patience particulièrement durant la période de rédaction et à l'approche de la soutenance !



# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>15</b>
<b>Liste des publications</b>	<b>17</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>19</b>
<b>1 Revue bibliographique : les polyphénols aux interfaces</b>	<b>21</b>
1.1 Les polyphénols : définition, classification, propriétés chez les végétaux . . . . .	21
1.1.1 Définition . . . . .	21
1.1.2 Classification . . . . .	22
1.1.3 Propriétés et importance des polyphénols chez les plantes . . . . .	23
1.2 Polyphénols dans les particules colloïdales . . . . .	25
1.2.1 Auto-association des polyphénols en solution . . . . .	25
1.2.2 Interactions des polyphénols avec les protéines en solution . . . . .	26
1.3 Polyphénols à l'interface de fluides . . . . .	31
1.4 Polyphénols à l'interface solide-liquide . . . . .	32
1.4.1 Polyphénols pour la fonctionnalisation de nanoparticules . . . . .	32
1.4.2 Dépôt de films de polyphénols à l'interface solide-liquide . . . . .	34
1.4.3 Utilisation des polyphénols dans les films multicouches . . . . .	35
1.5 Applications biologiques des polyphénols . . . . .	39
1.5.1 Effets biologiques des polyphénols intéressants pour des applications dans le domaine de la santé . . . . .	40
1.5.2 Matériaux contenant des polyphénols avec une activité antimicrobienne .	43

1.5.3	Modification de surface basée sur les polyphénols pour améliorer la bio-compatibilité des matériaux . . . . .	48
1.5.4	Matériaux utilisant les polyphénols pour modifier les fonctions cellulaires . . . . .	48
1.6	Quelques autres applications des polyphénols à l'interface solide/liquide . . . . .	50
1.7	Conclusion et perspectives . . . . .	50
	Bibliographie . . . . .	52

## **2 Matériel et méthodes 63**

2.1	Matériel . . . . .	64
2.1.1	Polyphénol . . . . .	64
2.1.2	Polymères utilisés pour l'électrospinning . . . . .	64
2.1.3	Solvants utilisés pour l'électrospinning . . . . .	64
2.1.4	Oxydant . . . . .	65
2.1.5	Solution contenant des ions métalliques . . . . .	65
2.1.6	Tampons . . . . .	65
2.1.7	Enzymes et substrat utilisés pour la construction des films multicouches . . . . .	66
2.2	Electrospinning . . . . .	67
2.2.1	Historique du procédé d'électrospinning . . . . .	67
2.2.2	Principe de l'électrospinning . . . . .	68
2.2.3	Influence des paramètres liés à la solution . . . . .	70
2.2.4	Influence des paramètres du procédé . . . . .	77
2.2.5	Influence des paramètres extérieurs . . . . .	81
2.2.6	Electrospinning co-axial . . . . .	83
2.2.7	Contrôle du dépôt des fibres . . . . .	84
2.2.8	Conditions d'électrospinning utilisées . . . . .	101
2.3	Microscopie électronique à balayage . . . . .	103
2.3.1	Principe de la microscopie électronique à balayage . . . . .	103
2.3.2	Protocole . . . . .	103
2.4	Microscopie électronique en transmission et cryo-TEM . . . . .	103
2.4.1	Principe de la microscopie électronique en transmission . . . . .	103
2.4.2	Principe de la cryo-TEM . . . . .	104
2.4.3	Protocole . . . . .	105
2.5	Spectroscopie Raman . . . . .	105

2.5.1	Interaction rayonnement-matière : effet Raman . . . . .	105
2.5.2	Observation de l'effet Raman . . . . .	106
2.5.3	Protocole . . . . .	107
2.6	Mesure de la tension superficielle et des angles de contact . . . . .	107
2.6.1	Tension de surface . . . . .	107
2.6.2	Protocole . . . . .	107
2.6.3	Angle de contact . . . . .	108
2.6.4	Protocole . . . . .	108
2.7	Diffusion dynamique de la lumière . . . . .	109
2.7.1	Principe de la diffusion dynamique de la lumière . . . . .	109
2.7.2	Protocole . . . . .	110
2.7.3	Calcul des rayons hydrodynamiques . . . . .	110
2.8	Rhéologie : mesure de la viscosité . . . . .	111
2.8.1	Principe de la mesure de viscosité . . . . .	111
2.8.2	Protocole . . . . .	114
2.9	Spectroscopie UV-visible . . . . .	114
2.9.1	Principe de la spectroscopie UV-visible . . . . .	114
2.9.2	Protocole . . . . .	115
2.9.3	Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline dans les films et en solution	115
2.9.4	Mesure de la libération d'acide tannique au cours du temps dans les fibres PLA+AT . . . . .	116
2.9.5	Mesure de la libération d'acide tannique des matrices structurées . . . . .	117
2.9.6	Mesure de l'adsorption de protéines sur les fibres de PLA . . . . .	117
2.10	Traitement plasma . . . . .	118
2.10.1	Principe du traitement plasma . . . . .	118
2.10.2	Protocole . . . . .	119
2.11	Microbalance à cristal de quartz . . . . .	119
2.11.1	Principe de la microbalance à cristal de quartz . . . . .	119
2.11.2	Principe de la microbalance à cristal de quartz avec dissipation . . . . .	121
2.11.3	QCM-D utilisée . . . . .	122
2.11.4	Protocole . . . . .	123
2.12	Microscopie à force atomique . . . . .	123

2.12.1	Principe de la microscopie à force atomique (AFM)	123
2.12.2	Protocole	124
2.13	Ellipsométrie	125
2.13.1	Principe de la technique d'ellipsométrie	125
2.13.2	Protocole	125
2.14	Spectroscopie par dichroïsme circulaire	126
2.14.1	Principe de la spectroscopie par dichroïsme circulaire	126
2.14.2	Protocole	127
2.15	Microscopies utilisant la fluorescence	128
2.15.1	Principe de la fluorescence	128
2.15.2	Microscopie à épifluorescence	129
2.15.3	Microscopie confocale à balayage laser	130
2.15.4	Recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment	132
2.16	Tests biologiques	133
2.16.1	Tests cellulaires	133
2.16.2	Tests antibactériens	134
	Bibliographie	136

### **3 Fonctionnalisation et structuration à l'aide d'acide tannique de fibres électrospinnées de PLA pour l'ingénierie de la pulpe dentaire 143**

3.1	Introduction	143
3.1.1	Présentation du projet Mica ElectrATPulpe	143
3.1.2	La pulpe dentaire : anatomie, pathologie et traitement	144
3.1.3	Ingénierie de la pulpe	146
3.2	Fonctionnalisation de fibres de PLA à l'aide d'acide tannique	153
3.2.1	Electrospinning de PLA et d'AT	153
3.2.2	Alternative et perspectives : traitement plasma des fibres de PLA	161
3.3	Structuration de fibres électrospinnées de PLA à l'aide d'acide tannique	164
3.3.1	Optimisation des conditions d'obtention de la première couche	165
3.3.2	Optimisation des conditions d'électrospinning pour obtenir un matériau en 3D	170
3.3.3	Tests cellulaires sur les matrices structurées	175
3.3.4	Etude des propriétés antibactériennes des matrices	180



3.4 Conclusion et perspectives . . . . .	182
Bibliographie . . . . .	184
<b>4 Electrospinning d'acide tannique</b>	<b>189</b>
4.1 Electrospinning de non-polymères . . . . .	189
4.1.1 Electrospinning de phospholipides . . . . .	189
4.1.2 Electrospinning de peptides . . . . .	193
4.1.3 Electrospinning de cyclodextrines . . . . .	194
4.1.4 Perspectives pour l'électrospinning de l'acide tannique . . . . .	197
4.2 Electrospinning de l'acide tannique . . . . .	197
4.2.1 Electrospinning de l'acide tannique : influence de la concentration en AT et du solvant . . . . .	197
4.2.2 Agrégation et propriétés d'auto-associations de l'acide tannique dans un mélange eau-éthanol : mécanismes de formation des fibres . . . . .	200
4.2.3 Réticulation des fibres d'acide tannique . . . . .	207
4.3 Conclusion et perspectives . . . . .	210
Bibliographie . . . . .	213
<b>5 Films multicouches à base d'enzymes et d'acide tannique</b>	<b>215</b>
5.1 Introduction . . . . .	215
5.2 Films multicouches à base de phosphatase alcaline et d'acide tannique . . . . .	217
5.2.1 Caractérisation de la construction du film . . . . .	217
5.2.2 Propriétés électrochimiques et activité enzymatique du film . . . . .	222
5.2.3 Conclusion . . . . .	227
5.3 Films multicouches contenant du lysozyme et de l'acide tannique . . . . .	228
5.3.1 Caractérisation de la construction de film PEI-(LYS-AT) <sub>n</sub> . . . . .	228
5.3.2 Mesure de l'activité antimicrobienne des films . . . . .	229
5.4 Conclusion . . . . .	230
Bibliographie . . . . .	232
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>235</b>



# Table des figures

1.1	Formule semi-développée de la procyanidine B1 . . . . .	23
1.2	Formule semi-développée de certains flavanols et du groupe galloyl . . . . .	23
1.3	Formule semi-développée de l'acide tannique et du shikimate . . . . .	24
1.4	Schéma représentant les différentes interactions mises en jeu par les polyphénols, d'après Quideau et al. [1] . . . . .	24
1.5	A gauche, des hortensias roses dont la pigmentation est due à la forme cationique de la delphinidine, à droite des hortensias bleus dont la pigmentation est due à la complexation avec des ions $Al^{3+}$ et la forme anionique de la delphinidine . . .	25
1.6	Formule semi-développée de la proline . . . . .	27
1.7	Schéma représentant la formation de liaisons covalentes entre un polyphénol et des protéines à la suite d'une oxydation des fonctions hydroxyles en quinones, d'après Beart et al. [21]. . . . .	30
1.8	Formule semi-développée de la procyanidine B3 . . . . .	31
1.9	Formule semi-développée de la quercetine . . . . .	31
1.10	Pression de surface $\pi$ à l'interface air-eau pour une solution de caséine à 10 mg/mL seule ou en présence de EGC, ECG et EGCG. L'encart présente la cinétique complète; d'après Aguié-Begin et al. [27]. . . . .	33
1.11	Photos d'une tasse à thé et d'un sachet de thé (A) et d'un verre à vin (B). A gauche : avant contact; au milieu : après contact avec du thé (A) et du vin (B) et rinçage à l'eau; à droite, mise en évidence du dépôt de polyphénols à l'aide d'une solution aqueuse de $AgNO_3$ ; d'après Sileika et al. [36]. . . . .	34
1.12	Les différents états de coordinations FeIII-catéchol en fonction du pH . . . . .	35
1.13	Epaisseur des films avec EGCG et la gélatine A (a) et la gélatine B (b) pour différentes expériences indépendantes, d'après Shutava et al. [45]. . . . .	37

1.14	A : Epaisseur et rugosité des films en fonction de la vitesse de rotation lors du spin coating. B : images AFM des films en fonction de la vitesse de rotation lors du spin coating. La vitesse à 0 rpm représente des films construits par trempage, d'après Zhuk et al. [46]. . . . .	38
1.15	A : épaisseur des films AT-PolyB (carrés), AT-Gent (cercles), AT/Tob (étoiles) obtenus par spin coating à pH=7,5 en fonction du nombre de paires de couches. L'encart montre la croissance des films pour moins de 45 bicouches. B : moyenne quadratique de la rugosité des films AT/Gent. C : Images MEB en section de coupe et vue de haut pour des films AT/Gent de 30, 50 et 200 bicouches, d'après Zhuk et al. [46]. . . . .	39
1.16	A : Fils tissés à partir d'un mélange FeIII-AT-PAA. Les fils sont verts dû à des mono-espèce à pH=1. B : Histogramme montrant le nombre de tours pouvant être réalisés pour obtenir du fil avec une combinaison de FeIII/AlIII, AT et PAA. C : Fils transparents et sans couleur obtenus avec AlIII, d'après Krogsgaard et al. [47] . . . . .	40
1.17	Structure d'un des proanthocyanidines présents dans la canneberge mis en évidence par Foo et al. [53] . . . . .	41
1.18	A : Images de microscopie électronique de protéine $\alpha$ S sans et avec différents ratios molaires d'EGCG après 16h montrant une agrégation en fibrilles pour le contrôle et une agrégation en particules avec l'EGCG. La barre d'échelle vaut 100 $\mu$ m. B et C : schéma expliquant l'effet de l'EGCG sur la fibrillogénèse des protéines $\alpha$ S. B : L'EGCG se lie de préférence avec les oligomères non repliés, qui existent à l'équilibre avec les formes repliées, et empêche la formation de fibrilles par la formation d'agrégats non toxiques d'oligomères. C : l'EGCG empêche l'addition de monomère aux intermédiaires amyloïdes, d'après Ehrnhoefer et al. [72] . . . . .	43
1.19	Structure du chitosan . . . . .	45
1.20	Structure du carvacrol, thymol et eugénol . . . . .	46
1.21	Photos d'une mandarine sans et avec le film AT-FeIII après traitement et 14 jours après traitement, d'après Park et al [89] . . . . .	47

1.22	A : libération de l'acide cafféique (CA) et de l'EGCG au cours du temps quand les fibres sont plongées dans du tampon phosphate ; B : Détection de peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ généré dans le milieu de culture par les polyphénols d'après Kim et al. [103] . . . . .	49
1.23	Photo de plaques immergées dans un port pendant 12 mois avec en haut une peinture faite de cuivre et de tannins et en bas une plaque contrôle avec une peinture acrylique, d'après Perez et al [106] . . . . .	50
2.1	Extrait du brevet de J.F. Cooley pour un dispositif de dispersion d'un fluide sous l'action d'un champ électrostatique [6]. . . . .	68
2.2	Schéma du montage d'une cabine d'électrospinning . . . . .	69
2.3	a) Schéma des forces à la surface de la solution de polymère b) Photographie d'un cône de Taylor et d'un jet pour une solution de glycérine . . . . .	69
2.4	Différentes morphologies obtenues pour du PVA : (a) Fibres perlées, (b) Fibres continues (c) Fibres plates ou rubans, d'après Koski et al. [15]. . . . .	71
2.5	Les trois zones de morphologie du PCL en fonction de $[\eta]C$ . Zone 1 : électrospray, seules des particules sont obtenues. Zone 2 : des fibres perlées sont obtenues . Zone 3 : des fibres continues sont obtenues. Zone 4, au delà de $[\eta]C$ qui vaut 21, la viscosité est trop forte et empêche l'électrospinning. La courbe en noir correspond au modèle qui relie le diamètre attendu des fibres en fonction du paramètre $[\eta]C$ , d'après Lavielle et al. [16]. . . . .	72
2.6	Influence du poids moléculaire sur le nombre de perles dans le régime semi dilué enchevêtré, [18]. . . . .	73
2.7	Influence de la dispersité dans l'obtention de fibres continues. Pour un même $C/C^*$ , des fibres sont obtenues pour des polymères de 12 500 g/mol et 18 000 g/mol tandis que pour des polymères de 34 000 et 96 000 g/mol seules des perles sont obtenues. Ces deux polymères ont une dispersité plus élevée que les autres, d'après Gupta et al. [18]. . . . .	74
2.8	Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de polyméthylsilsesquioxane dans un mélange méthanol-propanol pour un ratio en volume 2/3, d'après Luo et al. [22]. . . . .	75
2.9	Tableau des conditions de préparation de solution de PVA avec ajout de NaCl, d'après Zhang et al. [20]. . . . .	75

2.10	Images MEB et diamètre des fibres de PVA obtenues avec ajout de NaCl : a) 0,05%mt de NaCl, b) 0,10%mt de NaCl, c) 0,15%mt de NaCl, d) 0,2%mt de NaCl ; d'après Zhang et al. [20]. . . . .	76
2.11	Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de PDLA avec ajout de sel a) sans sel b) avec ajout de 1%mt de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , c) avec ajout de 1%mt de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ d) avec ajout de 1%mt de NaCl ; d'après Zong et al. [23].	77
2.12	Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de PVA et répartition des diamètres pour des fibres de PVA en modifiant la tension appliquée (a) 5 kV ; (b) 8 kV ; (c) 10kV (d) 13 kV ; d'après Zhang et al. [20]. . .	78
2.13	Conditions des expériences ainsi que le diamètre des fibres obtenues pour les distances aiguilles-collecteur : 8 ; 12 et 16 cm en faisant varier la concentration en PAN ainsi que la tension appliquée, d'après Yordem et al. [25] . . . . .	79
2.14	Images de microscopie électronique à balayage de fibres de PS en fonction du débit (a) $0.004 \text{ mL.min}^{-1}$ (5 kV) ; (b) $0.07 \text{ mL.min}^{-1}$ (15 kV) ; (c) $0.1 \text{ mL.min}^{-1}$ (15 kV) ; (d) $0.14 \text{ mL.min}^{-1}$ (15 kV) ; (e) $0.24 \text{ mL.min}^{-1}$ (15 kV) ; d'après Megelski et al. [24]. . . . .	80
2.15	Images de microscopie électronique à balayage de fibres de PS en fonction de l'humidité relative (a) <25%, (b) 31-38%, (c) 40-45%, (d) 50-59%, (e) 60-72%. La barre d'échelle vaut $1\mu\text{m}$ ; d'après Casper et al. [28]. . . . .	82
2.16	Schéma du système utilisé pour l'électrospinning coaxial . . . . .	83
2.17	Imagerie de microscopie électronique à transmission de fibres co-électrospinnées avec du PEO en coquille et du polythiophène en coeur ; d'après Sun et al. [32]. .	85
2.18	Imagerie de microscopie électronique à balayage de fibres creuses de $\text{TiO}_2$ après carbonisation à $500^\circ\text{C}$ . Les fibres ont été coupées à la lame de rasoir pour observer leur section ; d'après Li et al. [33]. . . . .	85
2.19	Imagerie de microscopie électronique à balayage de fibres de PLA a)nanofibres alignées b) microfibrilles alignées c) nanofibres déposées aléatoirement d) microfibrilles déposées aléatoirement ; d'après Yang et al. [34]. . . . .	86
2.20	Imagerie de microscopie confocale de neurofilaments de cellules souches neurales après 2 jours de culture sur a) des nanofibres alignées b) des microfibrilles alignées c) des nanofibres non alignées d) des microfibrilles non alignées ; d'après Yang et al. [34]. . . . .	87

2.21	Imagerie de microscopie électronique à balayage de CSN sur : a) des nanofibres alignées de PLLA b) des microfibrilles alignées de PLLA c) des nanofibres non alignées de PLLA. Les flèches blanches montrent les structures filamenteuses du corps des CSN et des neurites pour s'attacher aux fibres. La barre d'échelle représente 5 $\mu\text{m}$ ; d'après Yang et al. [34]. . . . .	88
2.22	Schéma du dépôt de fibre de PCL sur le collecteur. . . . .	89
2.23	Images MEB d'électrospinning de PCL à 13% mt obtenu après un temps de (a)30 secondes (b) 2 minutes (c) 5 minutes (d) 10 minutes (e) 60 minutes (f) 120 minutes ; d'après Ahirwal et al. [39]. . . . .	89
2.24	Photo du scaffold épais obtenu, d'après Ahirwal et al. [39]. . . . .	90
2.25	Image MEB d'une coupe du scaffold de PCL épais montrant les colonnes et les mesopores des couches stratifiées, d'après Nedjari et al. d'après Ahirwal et al. [39].	90
2.26	Images MEB de fibres de PLA déposées sur un motif en nid d'abeille avec une taille de pore de 160 $\mu\text{m}$ a) après un court dépôt b) après un long dépôt et après avoir été retiré du collecteur dans de l'isopropanol c) nanofibres de PLA à l'intérieur du nid d'abeille d) nanofibres de PLA sur le mur du nid d'abeille ; d'après Nedjari et al. [41]. . . . .	91
2.27	Images MEB de a) fibres de PCL déposées sur un motif en nid d'abeille avec une taille de pore de 160 $\mu\text{m}$ b) nanofibres de PCL à l'intérieur du nid c) nanofibres de PCL sur les murs du nid d) répartition des diamètres sur les murs et à l'intérieur des nids ; d'après Nedjari et al. [41]. . . . .	92
2.28	a) Image MEB du scaffold de PCL obtenu avec $D_p=360 \mu\text{m}$ b) Image MEB du scaffold de PLA obtenu avec $D_p=360 \mu\text{m}$ c) Taille de la hauteur du relief en fonction de la taille du motif ; d'après Nedjari et al. [41]. . . . .	92
2.29	Images de microscopie à fluorescence d'ostéoblastes après 14 jours (a-d)scaffolds de PCL (e-h) scaffolds de PLA ; (a) et (e) $D_p=360\mu\text{m}$ , (b) et (f) $D_p=160\mu\text{m}$ , (c) et (g) $D_p=80\mu\text{m}$ , (d) et (h) $D_p=40\mu\text{m}$ ; d'après Nedjari et al. [41]. . . . .	93

2.30	(a) schéma du co-électrospinning-électrospraying (b) Image MEB de la structure composite en forme de nid d'abeille obtenue après 60 minutes (échelle=1 mm) (c) Image MEB d'un domaine élémentaire de nid d'abeille (échelle=50 $\mu\text{m}$ ) (d) Image de microscopie confocale avec les nanofibres de PLA marquées en bleu et les microparticules de PEG marquées en rose après 60 minutes de dépôt (échelle=500 $\mu\text{m}$ ), d'après Lavielle et al. [42]. . . . .	94
2.31	Images MEB de microparticules de PEG obtenues à un débit de (a) 0,08 mL.h <sup>-1</sup> (c) 0,1 mL.h <sup>-1</sup> (e) 0,2 mL.h <sup>-1</sup> . Les ronds en trait plein montrent les domaines pleins et les ronds en pointillés montrent les domaines vides de particules (barre d'échelle=10 $\mu\text{m}$ . Images de microscopie optique des matériaux composites auto-organisés par electrospinning et électrospraying des particules correspondantes (b, d, f) après 15 minutes de dépôts. La barre d'échelle vaut 1 mm ; d'après Lavielle et al. [42]. . . . .	96
2.32	(a) Schéma du montage de l'électrospinning, électrospraying simultanés (b) Structure 3D en forme de colonnes obtenue après 1h de dépôt pour $D = 160 \mu\text{m}$ (c) Structure 3D en forme de colonnes obtenue après 15 minutes de dépôt (d) Structure fibreuse obtenue dans les mêmes conditions que (b) mais sans électrospraying : aucune micro-structure 3D interne n'est obtenue ; d'après Wittmer et al. [43]. . . . .	97
2.33	(a) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospinning-électrospraying sur un collecteur $D = 160 \mu\text{m}$ (b) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospinning seul (c) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospraying seul ; d'après Wittmer et al. [43]. . . . .	98
2.34	Schéma résumant le procédé de structuration lors du co-électrospinning-électrospraying	98
2.35	Images MEB de différentes structures 3D pour des tailles de motif $D$ différentes montrant leur section ainsi que la surface qui était en contact avec le collecteur (a) $D = 40 \mu\text{m}$ (b et c) $D = 80 \mu\text{m}$ (d) $D = 160 \mu\text{m}$ (e et f) $D = 360 \mu\text{m}$ , d'après Wittmer et al. [43]. . . . .	99
2.36	Courbes caractéristiques d'un test de traction pour un scaffold de PLA électrospinné simplement (ligne en pointillés) et d'un scaffold de PLA structuré par électrospinning-électrospraying (ligne pleine) ; d'après Wittmer et al. [43]. . . . .	100



2.37	Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage. Le faisceau électronique est produit par un canon à électrons entre une cathode et une anode. Le faisceau d'électrons est ensuite focalisé grâce à des lentilles magnétiques. Le faisceau interagit ensuite avec l'échantillon produisant des électrons secondaires qui sont détectés par un détecteur d'électrons secondaires . . . . .	104
2.38	Les différentes interactions rayonnement-matière . . . . .	106
2.39	Schéma d'une goutte à l'équilibre sur une surface . . . . .	108
2.40	Schéma du principe de la DLS. Un faisceau laser traverse une solution contenant des particules. Les particules diffusent la lumière. L'intensité de la lumière diffusée dans une certaine direction est mesurée au cours du temps. Le signal de l'intensité de la lumière diffusée est ensuite autocorrélé. Plus les particules sont petites, plus elles bougent et plus vite la fonction d'autocorrélation décroît. A partir des temps caractéristiques de décroissance de la fonction d'autocorrélation il est possible d'obtenir une distribution de la taille des particules. . . . .	109
2.41	Sous l'action d'une force tangentielle $F_y$ , le plan supérieur se déplace à une vitesse $v_y$ . Le plan inférieur reste immobile. . . . .	112
2.42	Courbe caractéristique de l'influence de la viscosité en fonction de la concentration. Pour une concentration à $C^*$ , la solution est en régime dilué. Au delà de $C^*$ , la solution est en régime semi-dilué. . . . .	113
2.43	Schéma d'une géométrie cône-plan . . . . .	114
2.44	La phosphatase alcaline permet l'hydrolyse de pNPP en pNP et un ion phosphate	115
2.45	Spectre d'absorption d'une solution d'AT dans l'eau à 0,05 mg/mL. Le spectre de l'AT présente deux maxima d'absorption un à 230 nm et un à 277 nm . . . .	117
2.46	Spectre d'une solution d'hémoglobine dans un tampon Tris 50 mM NaCl 100 mM à pH=7,4 pour une concentration de 0,1 mg/mL. Le spectre présente un pic à 406 nm. . . . .	118
2.47	Cristal de QCM du côté de la surface de dépôt . . . . .	119
2.48	a) Représentation schématique du cristal de quartz excité électriquement : les deux faces bougent dans des sens opposés b) Les deux faces du cristal oscillent dans des sens opposés de manière alternative. La longueur d'onde de cisaillement vaut $2e$ . . . . .	120

2.49	Modification de la longueur d'onde $\lambda$ lorsqu'un film est déposé à la surface du cristal . . . . .	121
2.50	Représentation d'une onde amortie (en bleu). L'enveloppe (en orange) de la sinusoïde permet de retrouver le facteur D puisque son équation est proportionnelle à $\exp(-\pi f D t)$ . . . . .	122
2.51	Schéma du principe de fonctionnement de l'AFM. La surface de l'échantillon est balayée grâce à la pointe du cantilever. Leurs interactions entraînent la déflexion du levier. Cette déflexion est mesurée grâce à un faisceau laser dévié par l'extrémité du levier sur une photodiode . . . . .	124
2.52	Lorsqu'une lumière polarisée circulairement gauche et une lumière polarisée circulairement droite traversent un milieu optiquement actif, elles ne sont pas absorbées de la même manière. . . . .	127
2.53	Diagramme du processus de fluorescence . . . . .	128
2.54	Schéma d'un microscope à épifluorescence . . . . .	129
2.55	Schéma d'un microscope confocal. La ligne bleue représenté le chemin du faisceau laser focalisé qui éclaire l'échantillon. La ligne en pointillés verte représente la fluorescence parasite induite par l'éclairement de l'échantillon. Elle est arrêtée grâce au pin hole et seule la fluorescence émise par le point éclairé par le laser est observée (ligne verte continue). . . . .	131
2.56	Schéma d'une expérience de FRAP au cours du temps. . . . .	132
3.1	Schéma de la dent . . . . .	144
3.2	Sources de cellules souches du tissu dentaire chez l'adulte humain : <b>BMSCs</b> : cellules souches de la moelle osseuse ; <b>DPSCs</b> : cellules souches de la pulpe dentaire ; <b>PDLSCs</b> : cellules souches du paradonte. . . . .	148
3.3	Molécule de PLA . . . . .	153
3.4	Images MEB de fibres de PLA+AT a)sans AT b) avec 5% d'AT c)avec 10% d'AT et d) avec 20% d'AT . . . . .	154
3.5	Diamètre moyen et répartition de diamètres de fibres pour au moins 100 fibres obtenues à partir de solutions PLA et AT. . . . .	155
3.6	Image MEB d'une solution de PLA + 30% d'AT électrospinnée. Un mélange de fibres et de particules est obtenu. L'AT et le PLA ne forme plus un mélange homogène pour une concentration en AT au delà de 20% d'AT. . . . .	155

3.7	A : spectre Raman de l'acide tannique B : spectre Raman de fibres de PLA seul C : spectre Raman de fibres PLA+20% d'AT . . . . .	156
3.8	AT libéré au cours du temps pour des matériaux PLA+10% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes (—) et PLA+15% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes (—) . . . . .	157
3.9	AT libéré au cours du temps pour des matériaux PLA+15% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes pour différents temps de traitement thermique . . . . .	158
3.10	A : Photo des solutions de PLA+10% d'AT sans et avec $\text{NaIO}_4$ pour avoir un rapport molaire $\text{NaIO}_4/\text{AT}$ de 2. L'oxydation de l'AT provoque un changement de couleur de la solution. B : Image MEB de fibres électrospinnées obtenues à partir de la solution de PLA+10% d'AT contenant du $\text{NaIO}_4$ . Les fibres obtenues sont homogènes. C : Libération de l'AT quand les fibres sont plongées dans l'eau.	159
3.11	A : Photo d'une solutions de PLA+10% d'AT avec du $\text{NaIO}_4$ pour avoir un rap- port molaire $\text{NaIO}_4/\text{AT}$ de 10. B : Image MEB de fibres électrospinnées obtenues à partir de la solution de PLA+10% d'AT contenant du $\text{NaIO}_4$ avec un rapport molaire $\text{NaIO}_4/\text{AT}$ de 10. Il n'est plus possible d'obtenir des fibres homogènes .	160
3.12	Libération de l'AT quand les fibres PLA+10% d'AT sont plongées dans du tam- pon bicine 100 $\text{mmol.L}^{-1}$ à $\text{pH}=7,4$ . . . . .	160
3.13	Images de mesure d'angle de contact pour A : des fibres de PLA seul, B :des fibres PLA + 15% d'AT . . . . .	161
3.14	A : Image MEB de fibres PLA+20% d'AT présentant des petites particules d'AT. B et C : Etalement d'une goutte d'eau sur les mêmes fibres, la photo C a été prise 20 secondes après la photo B. . . . .	161
3.15	Angles de contact de fibres de PLA électrospinnées pendant 10 minutes après traitement plasma en fonction du temps après le traitement. Les angles à -5 heures correspondent au temps avant traitement plasma. . . . .	162
3.16	A : Photo des fibres immergées dans une solution d'Hb. Pour le cas des fibres traitées au plasma, le matériau est tout de suite imprégnée de solution tandis que pour les fibres non traitées, le matériau reste à la surface ne gonfle pas du tout. B : masse d'Hb adsorbée par masse de fibres (mg/g) en fonction de la concentration en Hb après une immersion pendant 4 heures des fibres de PLA non traitées au plasma (—) et traitées au plasma (—). . . . .	163

3.17 Cinétique d'adsorption de l'Hb sur des fibres de PLA traitées (●) et non traitées (○) au plasma pour une solution d'Hb à 0,1 mg/mL. . . . .	164
3.18 Images MEB de fibres de PLA électrospinnées sur une grille pendant a : 15 secondes, b : 30 secondes, c : 45 secondes, d : 1 minutes . . . . .	166
3.19 Fibres de PLA obtenues à partir d'une solution à 10%mt avec A : des particules de PCL obtenues à partir d'une solution à 10%mt et B : des particules de PCL obtenues à partir d'une solution à 30%mt . . . . .	167
3.20 Images MEB de particules obtenues à partir d'une solution A : à 10%mt de PCL et 30% d'AT B : à 10%mt de PCL et 40% d'AT, des fibrilles apparaissent (flèches jaunes). . . . .	168
3.21 A et B : Images MEB de fibres de PLA et de particules PCL-AT obtenues à partir de solution de 10%mt de PCL et 30% d'AT. C et D : Images MEB de fibres de PLA et de particules PCL-AT obtenues à partir de solution de 10%mt de PCL et 40% d'AT. La flèche et le cercle indiquent les rares défauts de positionnement.	168
3.22 Schéma de la structuration de la première couche. Les schémas a, b et c représentent la structuration pour une même quantité de particules déposées et une quantité de fibres déposées différentes tandis que les schémas d, e et f représentent la structuration pour une même quantité de fibres déposées et une quantité de particules déposées différentes. Les flèches en noir représentent l'éjection des particules hors du collecteur dû à un trop fort champ électrostatique répulsif. . . . .	169
3.23 Images MEB de matrices structurées en multicouches avec un ratio 1/1 (a et b) et un ratio 1/9 (c et d). La flèche et le cercle indique des particules sur les fibres.	171
3.24 Images MEB de matrices structurées en multicouches avec un ratio 1/3 en alternant l'électrospinning de PLA et l'électrospraying de particules de PCL-AT (a-c) et en réalisant en continu l'électrospinning et l'électrospraying (d-f) . . . . .	172
3.25 Photo du montage comportant les 3 aiguilles pour l'électrospraying et l'aiguille pour l'électrospinning . . . . .	173
3.26 Images MEB d'une matrice structurée à l'aide de 3 aiguilles d'électrospraying de PCL-AT et d'une aiguille d'électrospinning de PLA avec une rotation en continue du collecteur à 1 tour/minute. . . . .	174

3.27	Images MEB de matrices structurées à l'aide de 3 aiguilles d'électrospraying et d'une aiguille d'électrospinning de fibres de PLA en rotation continue avec a : des particules PCL-AT ; b : des particules de PCL seul sans ajout d'AT. . . . .	175
3.28	Schéma de la structuration du matériau en 3 dimensions. Les schémas a, b et c représentent la structuration pour une même quantité de particules déposées et une quantité de fibres déposées différentes tandis que les schémas d,e et f représentent la structuration pour une même quantité de fibres déposées et une quantité de particules déposées différentes. Les flèches en noir représentent l'éjection des particules hors du collecteur dû à un trop fort champ électrostatique répulsif. . . . .	176
3.29	Viabilité des cellules dans un milieu activé par les matrices PLA/PCL et matrices PLA/PCL-AT par rapport à un milieu sans activation. L'écart-type représente l'erreur sur la moyenne. . . . .	177
3.30	Suivi de la prolifération cellulaire de fibroblastes sur des matrices de PLA//PCL-AT et PLA//PCL au cours du temps. . . . .	178
3.31	Image en microscopie confocale des fibroblastes sur les fibres après 12 jours de culture A : sur des matrices PLA/PCL ; B : sur des matrices PLA/PCL-AT. En vert, les filaments d'actine marqués avec la phalloïdine-FITC ; en bleu, les noyaux cellulaires marqués avec de l'Hoechst : les filaments d'actine semblent s'aligner sur les fibres de PLA. . . . .	179
3.32	Schéma du montage du premier protocole de migration : après obtention d'un tapis cellulaire, un échantillon de matrice a été déposé au milieu du puits et un insert avec une membrane laissant passer les cellules a ensuite été déposé sur la matrice. Dans l'insert, du milieu de culture pourvu de sérum a été injecté tandis que dans le reste du puits, du milieu de culture sans sérum est ajouté afin de favoriser la migration des cellules, du puits vers l'insert . . . . .	180
3.33	A : image de microscopie confocale d'une matrice PLA/PCL-AT après 15 jours, les noyaux des cellules ont été marqués à l'Hoechst : peu de cellules sont présentes sur la matrice. B : image de microscopie confocale d'une zone de puits n'ayant pas été recouverte par une matrice . . . . .	181

3.34	Croissance de <i>S. aureus</i> dans du milieu de culture contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. Le graphique est celui obtenu pour une expérience représentative. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante et ont montré les mêmes tendances. . . . .	181
3.35	A : Croissance de <i>E. coli</i> dans du milieu de culture contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. B : Croissance de <i>E. faecalis</i> dans du milieu de culture BHI contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. Les graphiques sont ceux obtenus pour une expérience représentative. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante et ont montré les mêmes tendances. . . . .	182
3.36	Images MEB d'essais préliminaires de perçage laser sur des matrices électrospinnées de PLA pour une puissance de 8,83 watts et une fréquence de A : 50 kHz ; B : 500 kHz et C : 1000 kHz. . . . .	183
4.1	Schéma du groupe des phosphatidylcholines . . . . .	190
4.2	Schéma du comportement de la phosphatidylcholine en solution . . . . .	191
4.3	Images MEB des différentes morphologies obtenues pour différentes concentrations en lécithine, d'après Mc Kee et al. [2] . . . . .	191
4.4	Structure du surfactant étudié : bromure de N,N'-Didodecyl-N,N,N',N'-tetraméthyl-N,N'-ethanediyldiammonium . . . . .	192
4.5	Images de Cryo-MET d'une solution de tensio-actif géminé dans de l'eau (a) 1.0 %mt, micelles linéaires en forme de filament enchevêtrées (b) 2.4 %mt, micelles en forme de filaments ramifiés, (c) 4.1 %mt, réseau hautement ramifié de micelles enchevêtrées en forme de filaments, d'après Cashion et al.[4] . . . . .	193
4.6	Images de Cryo-MET d'une solution de tensio-actif géminé dans un mélange eau :methanol (1 :1 en volume) (a) 10 %mt, micelles globulaires indépendantes, (b) 12 %mt micelles se chevauchant, d'après Cashion et al.[4] . . . . .	193
4.7	Structure de la diphenylalanine . . . . .	194
4.8	A) Image de microscope optique de fibres électrospinnées de Phe-Phe pour une concentration de 17.5%mt B) Image de microscopie optique de fibres auto-assemblées pour une concentration à 0,08%mt (2,9mM) dans un mélange HFIP /eau, d'après Singh et al.[5] . . . . .	194
4.9	A) Structure des $\alpha$ et $\beta$ -CD B) Représentation schématique de la CD . . . . .	195

4.10 A) Organisation de la CD sous forme de "cage" B) Organisation de la CD de type "colonne" . . . . .	196
4.11 Images MEB des fibres de $\beta$ -CD dans une solution aqueuse avec 10% m/v de NaOH. Pour différentes concentrations en CD (a) 120% (m/v), (b) 130% (m/v), (c) 140% (m/v), (d) 150% (m/v) and (e) fibres avec des perles après ajout d'urée représentant 20% de la masse d'urée dans une solution à 150% (m/v) en $\beta$ -CD, d'après Celebioglu et al.[7] . . . . .	196
4.12 Images MEB de fibres d'AT obtenues dans des mélanges eau-EtOH(100-0%ms ; 50-50%ms ; 37,5-62,5%ms ; 12,5-87,5%ms) à des concentrations en AT de 35%, 40%, 45%, 50% et 55% dans les mélanges et les diamètres moyens associés. La photo k' montre le matériau électrospinné qui a été obtenu à partir des conditions de l'image k. Le matériau est facilement manipulable. . . . .	199
4.13 Images MEB de particules obtenues avec une solution en AT dans l'éthanol à 100 mg/mL, la concentration limite de solubilité de l'AT dans l'EtOH. . . . .	200
4.14 a) Evolution du diamètre des fibres en fonction de la concentration en eau dans des mélanges eau-EtOH pour une $C_{AT}$ de 55%. b) Viscosité de solutions d'AT en fonction de la quantité d'eau dans les mélanges eau-EtOH pour une $C_{AT}$ de 55%mt. . . . .	201
4.15 a) Conductivité (■) et tension de surface ( $\Delta$ ) et b) viscosité en fonction de concentration en AT dans l'eau pure ( $\Delta$ ) et dans un mélange eau-EtOH 37,5-62,5%ms (■). . . . .	202
4.16 a) Viscosité spécifique de solutions d'AT en fonction de la concentration à 22°C dans l'eau pure (triangle bleu) et dans le mélange eau-EtOH 37,5-62,5%mt (triangle rouge). b) Image de cryo-TEM obtenue pour une solution en AT dans un mélange eau-EtOH 37,5-62,5%mt et pour une $C_{AT}$ de 2%mt qui montre dans les domaines noirs des agrégats d'AT . . . . .	203
4.17 Fonction d'autocorrélation $g^{(2)}$ mesurée par DLS dans l'eau pure (en bleu) et dans le mélange eau-EtOH 37,5-62,5%ms (en rouge) avec $C_{(AT)}=2\%mt$ (lignes continues), $C_{(AT)}=10\%mt$ (lignes avec les tirets)et $C_{(AT)}=35\%mt$ (lignes pointillées). . . . .	205
4.18 Mécanisme possible menant à la production de polymère d'AT . . . . .	207

4.19	Image MEB des fibres obtenues juste après réticulation a) dans une solution aqueuse de $\text{NaIO}_4$ , b) dans une solution de nitrate de fer III. . . . .	208
4.20	Image MEB des fibres obtenues après réticulation dans des solutions aqueuses de $\text{NaIO}_4$ avec différentes concentrations a) 3%mt b) 5%mt c) 7%mt d) 9%mt. .	208
4.21	Photographie des échantillons réticulés avec une solution de nitrate de fer III et de $\text{NaIO}_4$ au cours du temps. Au bout d'une semaine, la matrice réticulée avec le $\text{NaIO}_4$ est totalement dégradée tandis que la matrice réticulée avec Fe(III) reste intacte . . . . .	209
4.22	Schéma des interactions des catéchols avec les ions $\text{Fe}^{3+}$ . . . . .	210
4.23	a) Image MEB de matrice d'AT après réticulation avec une solution aqueuse à 40%mt en nitrate de fer pendant 10 secondes suivie d'une complexation à pH=8 pendant 6 heures. b) Schéma des interactions entre les molécules d'AT après réticulation avec une solution contenant des ions $\text{Fe}^{3+}$ . . . . .	211
5.1	Schéma du principe du dépôt couche par couche 'LbL' des films $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ . Le substrat est recouvert de PEI puis est plongé successivement dans une solution de phosphatase alcaline puis est rincé dans du tampon puis est plongé dans une solution d'acide tannique puis rincé de nouveau. Ceci produit une paire de couches. Cette succession d'étapes est répétée n fois pour obtenir un film $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ . . . . .	216
5.2	A : Suivi de la construction des films $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ au cours du temps avec en gris les changements pour les 3 <sup>me</sup> , 5 <sup>me</sup> , 7 <sup>me</sup> et 9 <sup>me</sup> harmoniques (en gris) et le changement de dissipation (en rouge) de la 3 <sup>me</sup> harmonique au cours du temps. B : Changement de fréquence pour la 3 <sup>me</sup> harmonique après chaque étape de rinçage suivant le dépôt de PEI, d'ALP ou d'AT en fonction du nombre de paires de couches. En ligne pointillé, la fonction exponentielle qui décrit parfaitement le dépôt en fonction du nombre de couches. . . . .	219
5.3	Topographie de la surface de films $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ pour n = 4 (première ligne) et n=6 (seconde ligne) en AFM en mode contact après séchage. La taille des images vaut 5 $\mu\text{m}$ x 5 $\mu\text{m}$ (1 <sup>re</sup> colonne), 10 $\mu\text{m}$ x 10 $\mu\text{m}$ (2 <sup>me</sup> colonne), 20 $\mu\text{m}$ x 20 $\mu\text{m}$ (3 <sup>me</sup> colonne). . . . .	220



- 5.4 A : Evolution de la rugosité en fonction de la taille de l'image pour  $n=4$  pour deux films indépendants (●) et (○) et pour un film avec  $n=6$  (■) B : comparaison de l'épaisseur des films déterminés par la mesure de la hauteur du profil déterminée en AFM (●) et l'épaisseur obtenue en ellipsométrie (○). C : Lignes des profils obtenus sur des films rayés à l'aide d'une aiguille avec  $n=4$  (en noir) et  $n=6$  (en bleu) . . . . . 221
- 5.5 a) Epaisseur des films mesuré en ellipsométrie (●) et à partir des données de la QCM (○) b) Spectres UV-vis de films PEI-(ALP-AT) $_n$  pour  $n=2$  en noir,  $n=4$  en vert et  $n=6$  en rose. . . . . 222
- 5.6 A : Images des films PEI-(ALP-AT) $_{10}$  contenant l'ALP marquée à la FITC a : avant photoblanchiment, b : après photoblanchiment, c : 12 minutes après photoblanchiment B : Intensité de fluorescence de la zone photoblanchie au cours du temps. . . . . 223
- 5.7 A : Voltamogrammes cycliques (réalisé à  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ ) des films PEI-(ALP-AT) $_n$  pour des nombres de paires de couches différents en absence de sonde rédox. La ligne en pointillés correspond à la courbe capacitive de l'électrode sans film déposé. B : Évolution de l'intensité du pic d'oxydation avec le nombre de paires de couches . . . . . 223
- 5.8 A Cinétique de l'hydrolyse de pNPP suivie pour  $\lambda=405 \text{ nm}$  pour des films PEI-(ALP-AT) $_n$  dans des conditions statiques où les lamelles de quartz ont été immergées dans une solution de pNPP à  $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  pour  $n=1$ ,  $n=3$  et  $n=5$ . Les lignes noires correspondent aux régressions linéaires modélisant la cinétique de réaction. B Évolution de la vitesse de réaction en fonction du nombre de paires de couches en conditions statiques (●) et en flux continu lors des expériences de QCM avant (●) contact et après contact (■) avec une solution de  $\text{NaIO}_4$  à  $10 \text{ mM}$  dans tampon acétate  $\text{pH}=5$  pendant 10 minutes. Les lignes en pointillés indiquent l'activité enzymatique moyenne de chaque sorte d'expérience tandis que les flèches indiquent la diminution de l'activité après le traitement au  $\text{NaIO}_4$ . . . . . 225

5.9	Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité de l'ALP dans les films PEI-(ALP-AT) <sub>6</sub> (A) et en solution (B). Les traits pleins correspondent à la régression linéaire des données tandis que les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%. . . . .	226
5.10	A : Spectre DC de l'ALP dans le tampon (○) and spectre DC de l'ALP au contact avec une solution de NaIO <sub>4</sub> 10 mM dans le même tampon (●). B : Spectre DC de films PEI-(ALP-AT) <sub>6</sub> (○) et spectre DC de ces mêmes films après traitement avec une solution de NaIO <sub>4</sub> 10 mM pendant 5 minutes (●). . . . .	226
5.11	Suivi de la construction du film PEI-(LYS-AT) <sub>5</sub> au cours du temps avec en gris les changements pour les 3 <sup>me</sup> , 5 <sup>me</sup> , 7 <sup>me</sup> harmoniques (en gris) . . . . .	228
5.12	Changement de fréquence pour la 3 <sup>me</sup> harmonique après chaque étape de rinçage suivant le dépôt de PEI, de LYS ou d'AT en fonction du nombre de paires de couches. . . . .	229
5.13	Activité microbienne des films multicouches PEI-(LYS-AT) <sub>10</sub> et PEI-(LYS-AT) <sub>10</sub> -LYS après 1h et marquage de toutes les bactéries et marquage des bactéries vivantes sur la surface. m est le nombre d'images traitées pour chaque type d'échantillon. La barre d'erreur représente l'erreur standard sur la moyenne . . .	230

# Liste des tableaux

2.1	Polyphénol utilisé . . . . .	64
2.2	Liste des polymères utilisés pour l'électrospinning . . . . .	64
2.3	Liste des solvants utilisés pour l'électrospinning . . . . .	64
2.4	Oxydant utilisé pour réticuler les matériaux contenant de l'acide tannique . . . .	65
2.5	Produit utilisé pour la complexation métallique . . . . .	65
2.6	Liste des tampons utilisés . . . . .	65
2.7	Enzymes et substrat utilisés pour la construction des films multicouches . . . .	66
3.1	Organisation des fibres de PLA en fonction de la concentration en PCL pour des fibres de PLA électrospinnées pendant 15 secondes et des particules de PCL électrosprayées pendant 2 minutes. +++ : très bonne répartition ; + : quelques défauts de positionnement ; - : mauvaise répartition et apparition de gros défauts.	166
3.2	Densité cellulaire sur les matrices structurées avec et sans AT dans les particules de PCL après 24h d'incubation . . . . .	178
4.1	Diamètre moyen $D_{AT}$ des agrégats d'AT calculés à partir des modes rapides de $g^2$ .	205



# Liste des abréviations

$\eta_{sp}$  : viscosité spécifique

2D : deux dimensions

3D : trois dimensions

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

ALP : phosphatase alcaline

ATCC : American Type Culture Collection

BHI : Brain Heart Infusion

BSA : albumine de sérum bovin

$C_{AT}$  : concentration en acide tannique

CMC : concentration micellaire critique

$D_{AT}$  : diamètre des agrégats d'acide tannique

DC : dichroïsme circulaire

DCM : dichlorométhane

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DMF : diméthylformamide

DPSC : cellules souches de la pulpe dentaire

*E. Coli* : *Escherichia Coli*

*E. Faecalis* : *Enterococcus Faecalis*

EMEM : Eagle's minimal Essential Medium

EtOH : éthanol

FBS : sérum de veau fœtal

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FRAP : recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

Hb : hémoglobine

HSA : albumine de sérum humain  
 $K_m$  : constante de Michaelis-Menten  
LbL : couche-par-couche  
LYS : lysozyme  
 $M_w$  : masse molaire  
MEB : microscopie électronique à balayage  
MEC : matrice extra-cellulaire  
MHB : Mueller Hinton Broth  
mM : milli molaire  
mt : masse totale  
n : nombre de paires de couches dans les films multicouches  
PBS : tampon phosphate salin  
PCL : poly-caprolactone  
PEI : polyéthylèneimine  
PFA : paraformaldéhyde  
PLA : acide poly-lactique  
pNP : para-nitrophénol  
pNPP : para-nitrophényl phosphate  
PTFE : polytétrafluoroéthylène  
QCM : microbalance à cristal de quartz  
 $R_{AT}$  : rayon des agrégats d'acide tannique  
RPM : tour par minute  
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène  
*S. Aureus* : *Staphylococcus Aureus*  
TEM : microscopie électronique à transmission  
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane  
UV-vis : ultra-violet visible

# Liste des publications

Allais, M. ; Mailley, D. ; Hebraud, P. ; Ihiawakrim, D. ; Ball, V. ; Meyer, F. ; Hebraud, A. ; Schlatter, G. Polymer-free electrospinning of tannic acid and cross-linking in water for hybrid supramolecular nanofibres. *Nanoscale*, 2018.

Allais M. ; Meyer F. ; Ball V. Multilayered films made from tannic acid and alkaline phosphatase with enzymatic activity and electrochemical behavior, *J. Colloid Interface Sci.*, 512, 722-729, Octobre 2017.

Reitzer, F. ; Allais, M. ; Ball, V. ; Meyer, F. Polyphenols at interfaces, *Adv. Colloid. Interface Sciences*, 2018





# Introduction générale

Les polyphénols sont des molécules essentielles dans le règne végétal. Ils permettent aux plantes de se protéger contre les herbivores et les insectes ou contre les rayons du soleil et peuvent aussi jouer un rôle dans leur pigmentation.

Chez l'Homme, les bienfaits d'un régime alimentaire riche en polyphénols sont largement vantés. En effet, de nombreux effets sur la santé leurs sont attribués : antioxydants, antimicrobiens, antiviraux ou encore anticarcinogéniques. Présents dans le vin rouge, c'est en partie grâce à eux qu'on doit l'expression "the French paradox". Ainsi en France, de manière surprenante, les personnes suivant un régime riche en vin rouge et en graisse présentent un plus faible taux de maladie cardio-vasculaire ou de cancer que le reste de la population. Les vertus du vin rouge sont attribuées à un polyphénol, le resvératrol, au pouvoir puissant d'antioxydant.

Du côté de la chimie, les polyphénols présentent des propriétés intéressantes : à la fois hydrophiles et hydrophobes, donneurs et accepteurs de liaison hydrogène, antioxydants et capables de former des complexes avec les ions métalliques. Ils peuvent aussi s'adsorber sur différentes surfaces : qui n'a jamais vu par exemple, un dépôt marron se former dans sa tasse de thé ? Du fait de leurs propriétés biologiques et physicochimiques intéressantes et polyvalentes, ils sont utilisés depuis quelques années pour la fabrication et la fonctionnalisation de différents matériaux. Ils sont ainsi étudiés sous différentes formes : films multicouches, capsules, nanoparticules et avec différentes molécules : protéines, polymères ou encore ions métalliques.

Le but de cette thèse est d'utiliser l'acide tannique, un polyphénol peu onéreux présent notamment dans le chêne, afin de fonctionnaliser différents matériaux.

Le premier chapitre de cette thèse est une revue sur les propriétés des polyphénols ainsi que leurs propriétés aux interfaces et leurs applications tout particulièrement dans le domaine

biomédical.

Le chapitre 2 présente toutes les techniques qui ont été utilisées au cours des travaux réalisés pendant cette thèse au sein de l'Unité Inserm 1121 Laboratoire de Biomatériaux et Bio-ingénierie.

Le chapitre 3 présente une première utilisation potentielle de l'acide tannique. Cette partie s'inscrit dans le cadre d'un projet financé par l'Institut Mica dont une des parties des travaux a été réalisée au sein de l'Institut de Chimie et Procédés pour l'Environnement, l'Energie et la Santé. Il s'agit d'un projet sur l'ingénierie de la pulpe dentaire où l'acide tannique a été utilisé afin de fonctionnaliser et de structurer des fibres électrospinnées d'acide poly-lactique. Avant de présenter les différents résultats, une introduction présente les enjeux de la régénération de la pulpe dentaire.

Le chapitre 4 est dédié à l'électrospinning de fibres d'acide tannique seul. Dans la littérature, quelques rares cas d'électrospinning de non-polymères ont été décrits. Dans cette partie, après une courte revue sur l'électrospinning de non polymères, nous nous sommes ainsi interrogés sur la possibilité d'utiliser pour la première fois un polyphénol afin d'obtenir des fibres électrospinnées d'acide tannique. Par la suite, nous avons étudié la possibilité de réticuler ces fibres afin de les rendre insolubles dans l'eau et d'imaginer de potentielles applications.

Enfin le dernier chapitre, le chapitre 5, présente la possibilité d'utiliser l'acide tannique dans des films multicouches avec deux enzymes différentes : la phosphatase alcaline et le lysozyme. Il a ainsi été étudié la croissance des films et l'influence du nombre de paires de couches sur l'activité de ces deux enzymes.

# Chapitre 1

## Revue bibliographique : les polyphénols aux interfaces

### Sommaire

---

1.1 Les polyphénols : définition, classification, propriétés chez les végétaux . . . . .	21
1.2 Polyphénols dans les particules colloïdales . . . . .	25
1.3 Polyphénols à l'interface de fluides . . . . .	31
1.4 Polyphénols à l'interface solide-liquide . . . . .	32
1.5 Applications biologiques des polyphénols . . . . .	39
1.6 Quelques autres applications des polyphénols à l'interface solide/liquide	50
1.7 Conclusion et perspectives . . . . .	50
Bibliographie . . . . .	52

---

## 1.1 Les polyphénols : définition, classification, propriétés chez les végétaux

### 1.1.1 Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez les végétaux.

Le terme "polyphénol" a changé plusieurs fois de définition et peut aujourd'hui aussi se trouver sous l'appellation "tannins".

Avant l'apparition du terme polyphénol, l'appellation "tannin végétal" était utilisée du fait de la propriété de ces molécules à pouvoir être utilisées afin de tanner les peaux. En 1957, les tannins ont été définis par T. White comme suit : "molécule polyphénolique végétale possédant une masse molaire entre 500 et 3000 daltons (Da) et permettant la réticulation par la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules de collagène". En 1962, une définition des polyphénols végétaux fut proposée par les deux phytochimistes T. Swain et E.C. Bate-Smith : "composants phénoliques solubles dans l'eau avec une masse molaire entre 500 et 3000 Da, qui participent aux réactions usuelles des phénols (oxydation avec le permanganate, formation de complexes foncés en présence de fer par exemple) et qui ont la propriété de précipiter des alcaloïdes, la gélatine ou d'autres protéines en solution". La capacité des polyphénols de permettre la réticulation des molécules de collagène et donc l'action de pouvoir tanner est ainsi abandonnée dans cette définition. Elle fut ensuite améliorée quelques temps plus tard par E. Haslam. On parle alors de la définition WBSSH (pour White, Bate-Smith, Swain, Haslam). Dans cette définition, les polyphénols doivent faire référence à "des composants solubles dans l'eau avec une masse molaire comprise entre 500 et 4000 Da et qui possèdent entre 12 et 16 fonctions hydroxyles sur 5 à 7 cycles aromatiques par masse relative de 1000 Da. Les molécules doivent entrer en jeu dans les réactions usuelles des phénols et doivent pouvoir permettre de précipiter certains alcaloïdes, la gélatine ainsi que d'autres protéines en solution." En 2011, Quideau et al. [1], dans leur revue sur les polyphénols, ont proposé une nouvelle définition. Ainsi le terme polyphénol devrait être utilisé pour définir "les métabolites secondaires de plantes dérivés de shikimate (figure 1.3)/phénylpropanoïde ou de polykétides ; possédant plus d'un cycle phénolique et ne possédant pas de groupe fonctionnel contenant de l'azote.

### 1.1.2 Classification

Il existe différentes classes de polyphénols. 3 classes de polyphénols qui répondent strictement à la définition WBSSH des polyphénols ont été proposées par Haslam en 1998, selon leur structure :

- les tannins condensés ou proanthocyanidines, par exemple la procyanidine (figure 1.1). Ils proviennent de l'oligomérisation de flavanols comme l'(épi)catéchine ou l'épigallocatechine (figure 1.2).
- les ellagitannins et les gallotannins aussi appelés tannins hydrolysables. Néanmoins, certains ellagitannins ne sont pas totalement hydrolysables [2] L'acide tannique (AT) ap-

partient à cette classe (figure 1.3). Ils sont généralement composés de nombreux groupes galloyls autour le plus souvent d'un D-glucose central. Ce sont des dérivés du shikimate (figure 1.3), un précurseur de nombreuses molécules chez les végétaux.

— les phlorotannins qui proviennent des algues rouges.

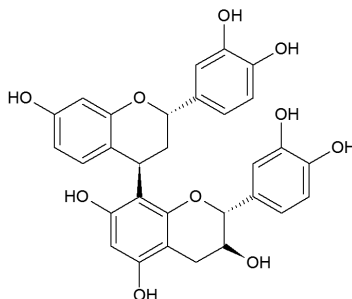


FIGURE 1.1 – Formule semi-développée de la procyanidine B1

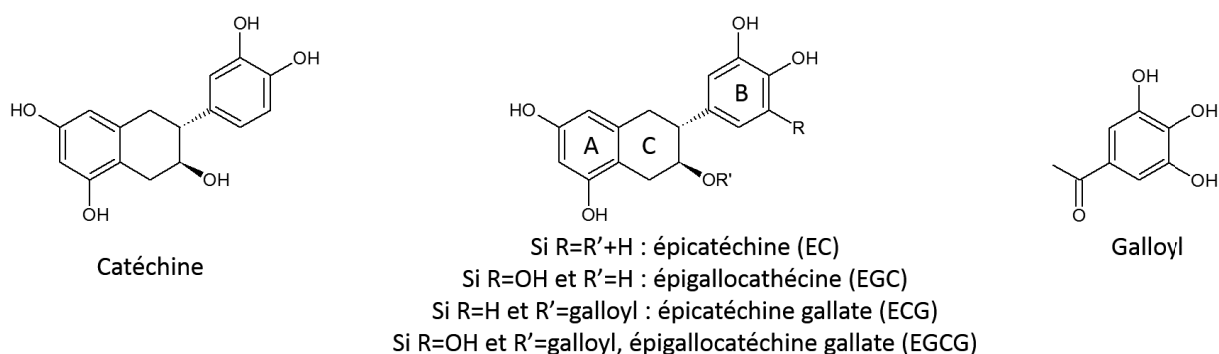


FIGURE 1.2 – Formule semi-développée de certains flavanols et du groupe galloyl

Il existe de nombreux dérivés des polyphénols qui ont été référencés dans la revue de Quideau et al. [1].

### 1.1.3 Propriétés et importance des polyphénols chez les plantes

La structure des polyphénols leur confère de nombreuses propriétés assurant différentes fonctions chez les végétaux. Un polyphénol contient à la fois de nombreux cycles aromatiques ainsi que des fonctions hydroxyles. Il est ainsi amphiphile, pouvant être à la fois accepteur et donneur de liaison hydrogène. Il peut former tout aussi bien des liaisons hydrophobes par  $\pi$ -

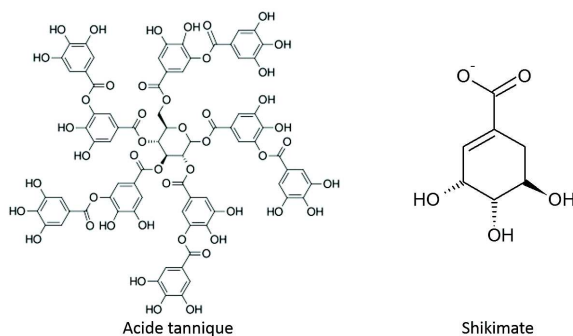


FIGURE 1.3 – Formule semi-développée de l'acide tannique et du shikimate

stacking que des liaisons hydrogènes, permettant d'interagir avec d'autres biomolécules (figure 1.4).

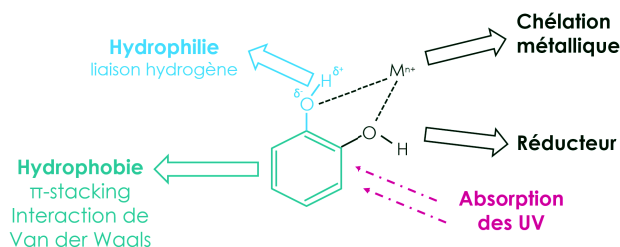


FIGURE 1.4 – Schéma représentant les différentes interactions mises en jeu par les polyphénols, d'après Quideau et al. [1]

Un des premiers rôles des polyphénols dans le règne végétal est de protéger les plantes contre les insectes et les herbivores. Il a par exemple été montré que les feuilles de chêne contenait plus de polyphénols en été. Les polyphénols inhibent la croissance de larves de mite en diminuant la disponibilité de l'azote et ils rendent peut être aussi les feuilles moins agréables à manger pour les larves [3].

Les polyphénols peuvent aussi interagir avec les métaux. Grâce à la présence de deux fonctions hydroxyles adjacentes sur un cycle aromatique, la chélation avec des ions métalliques est possible. La complexation avec des ions métalliques joue un rôle dans la pigmentation des végétaux. La couleur bleue notamment [4], est obtenue chez certaines fleurs par la complexation des anthocyanines avec des ions métalliques. Il a été montré par exemple que chez l'hortensia, la couleur bleue était due à une complexation de la delphinidine avec des ions  $Al^{3+}$  [5]. Ainsi, des hortensias bleus plantés dans un sol peu acide et pauvre en aluminium deviendront roses

(figure 1.5).

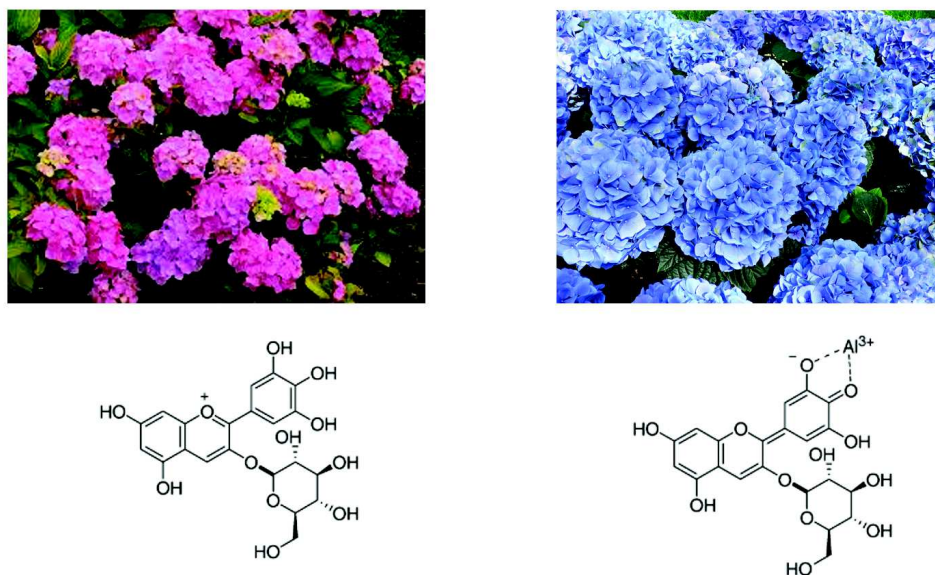


FIGURE 1.5 – À gauche, des hortensias roses dont la pigmentation est due à la forme cationique de la delphinidine, à droite des hortensias bleus dont la pigmentation est due à la complexation avec des ions  $\text{Al}^{3+}$  et la forme anionique de la delphinidine

Le rôle de certains polyphénols semble aussi de protéger les plantes des radiations ultra-violet B (UV-B, de longueur d'onde comprise entre 280 et 315 nm) et particulièrement les flavanoïdes qui absorbent, grâce à leur structure, dans une gamme de longueur d'onde de 280-320 nm qui correspond à celle des UV-B. Ces polyphénols agissent ainsi comme un filtre pour les végétaux. L'exposition aux UV-B stimule la production de flavanoïdes chez les plantes [6]. Par ailleurs, il a été montré, à l'aide de mutants ne synthétisant pas de flavanoïdes, que ces polyphénols limitaient les dégâts sur l'ADN induits par les UV-B [7].

## 1.2 Polyphénols dans les particules colloïdales

### 1.2.1 Auto-association des polyphénols en solution

Du fait de la présence de parties hydrophobes et de parties hydrophiles, les polyphénols peuvent s'auto-associer en solution, particulièrement dans des mélanges eau-éthanol qui sont largement étudiés en oenologie puisque cela peut interférer avec le traitement du vin comme la

filtration. Zanchi et al. par exemple se sont intéressés à l'épicatéchine (EC, figure 1.2) extraite de grappe de *Vitis vinifera* [8]. Quand le volume d'éthanol est plus faible que 60%, l'EC commence à s'auto-associer selon un processus de nucléation. Quand le volume d'éthanol est à 12%, des gros agrégats de rayon moyen de 330 nm ont été observés par des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS). Il a été montré par SANS, que pour une solution d'EC solubilisée dans l'éthanol pur, la vitesse d'ajout de l'eau changeait la forme des agrégats. Ainsi, quand l'eau est ajoutée lentement, les agrégats sont sphériques avec une surface lisse tandis que lorsqu'elle est ajoutée plus rapidement, les agrégats ont une forme de peigne. Dans les deux cas, dans un mélange à 12% en éthanol, les spectres de SANS sont les mêmes que pour des chaînes de petit polymère qui ont un rayon de 1,6 nm. C'est la valeur qui est attendue pour des polyphénols avec un degré de polymérisation de 11 ce qui correspond bien aux espèces initialement solubilisées dans l'éthanol.

### 1.2.2 Interactions des polyphénols avec les protéines en solution

Pour utiliser les polyphénols dans des matériaux ou dans des films aux interfaces, il est nécessaire de connaître la nature et l'intensité des interactions entre les polyphénols et les biomolécules.

#### Interactions des polyphénols avec les protéines riches en proline

Les interactions entre les polyphénols et les protéines sont étudiées dans la littérature et tout particulièrement les protéines de la salive. En effet, les interactions entre les protéines et les polyphénols sont responsables de l'astringence, sensation de sécheresse dans la bouche [9]. Ce sont tout particulièrement des protéines riches en proline (PRP) basiques qui interagissent avec les polyphénols. Ces protéines sont en grande proportion dans la salive et leur rôle principal semble de précipiter avec les polyphénols afin de limiter leurs effets négatifs sur l'organisme tels que l'inhibition de l'adsorption de fer ou la complexation avec des enzymes digestives dans la tractus gastro-intestinal. Il a été montré que les résidus proline (Pro, figure 1.6), glycine et acide glutamique représentaient 70-80% des résidus des PRP [10] avec une répétition entre 5 et 15 éléments.

L'astringence relative (AR) des polyphénols a été comparée, pour des concentrations en polyphénols induisant la précipitation de la moitié des molécules d'hémoglobine [11] en solution. Il a été montré qu'entre la stéréochimie des monomères, l'oxydation des cycles B et la masse



moléculaire, c'est la masse moléculaire qui est le facteur le plus influant sur la capacité des polyphénols à précipiter avec les PRP. Ainsi, l'acide tannique (AT), le polyphénol de plus haute masse moléculaire s'est avéré être celui qui avait l'AR la plus élevée. De plus, pour obtenir une AR équivalente à celle de l'AT, des polymères de proanthocyanidines doivent avoir une masse moléculaire proche de celle de l'AT. Ces résultats ont été confirmés et étudiés plus en détail quelques années plus tard par des mesures en spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire)[12] avec un fragment de synthèse de PRP. Le mode d'association prédominant est un empilement des cycles des polyphénols avec la proline. Il a de plus été montré que dans les séquences Pro-Pro, le premier résidu Pro est un site favorisant tout particulièrement la liaison. Les plus petits polyphénols peuvent se lier avec un cycle phénolique de proline tandis que les plus grands polyphénols peuvent occuper deux ou trois prolines consécutives. De plus, les polyphénols peuvent aussi s'auto-associer quand ils sont liés. Ainsi, un modèle a été proposé dans lequel des interactions polyphénol/polyphénol et polyphénol/PRP agissent de manière coopérative pour permettre la précipitation.

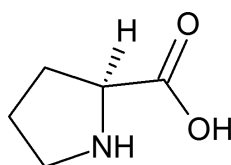


FIGURE 1.6 – Formule semi-développée de la proline

Le mécanisme de précipitation qui se passe dans la bouche a été décrit en trois étapes [13]. Plusieurs molécules de polyphénols peuvent se lier aux mêmes peptides par interaction hydrophobe. Quand la concentration en polyphénols augmente de telle façon qu'il y a assez de polyphénols liés au peptide, des dimères de peptide se forment alors en commençant à précipiter. Lors de la précipitation d'autres molécules s'ajoutent, permettant une agrégation en petites ou grosses particules dont la taille dépend de la température et du pH.

De nombreuses investigations ont été menées pour approfondir les connaissances sur les interactions entre les polyphénols et les PRP. Par exemple, les interactions entre la procyanidine et un fragment de protéines de la salive humaine ont été suivies par spectroscopie RMN, dichroïsme circulaire et modélisation moléculaire [14]. Le fragment peptidique possède une conformation en hélice de type II ainsi qu'une partie en pelote. Trois molécules de procyanidine complexent avec le fragment tout en conservant cette structure peptidique. De plus, des

liaisons hydrogènes entre les fonctions carbonyles des prolines et les groupes OH des fonctions phénols sont responsables de cette complexation. Les auteurs expliquent cette différence avec les résultats trouvés précédemment dans la littérature, qui favorisent l'hypothèse que les liaisons entre les polyphénols et les protéines étaient de types hydrophobes, avec le fait que dans les précédents articles les expériences ont été réalisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour augmenter la solubilité tandis que dans l'étude, le solvant était un mélange eau/éthanol, plus proche de la réalité.

### Interaction des polyphénols avec l'albumine

L'interaction des polyphénols a aussi été étudiée avec d'autres protéines telle que l'albumine du sérum.

Les interactions entre la catéchine (C) et l'albumine de sérum humain (HSA) ont ainsi été étudiées par titration calorimétrique isotherme (ICT), spectroscopie de fluorescence et dichroïsme circulaire (DC) [15] par Li et al. Les interactions entre la catéchine et la HSA sont de types liaisons hydrogènes et forces de van der Waals. La C permet d'éteindre la fluorescence de la HSA par quenching statique. Les expériences de DC ont permis de montrer que la catéchine modifie la structure de la HSA. La solution de HSA seule possède 56,1% d'hélice  $\alpha$  tandis que dans une solution de HSA et de catéchine pour un ratio molaire 1 :1, cette valeur diminue à 48,9%. Les auteurs ont aussi cherché à savoir quel était le site préférentiel de liaison de la C avec la HSA. La HSA est composée de deux sites de liaisons spécifiques appelés Sudlow I et Sudlow II. Par utilisation de la warfarine, qui se lie au site Sudlow I et de l'ibuprofène qui se lie au site de Sudlow II, il a ainsi été montré que la catéchine se lie de manière préférentielle au site de Sudlow I.

Une autre étude menée par Roy et al. [16] sur les interactions entre les albumines de sérum bovin (BSA) et humain (HSA) avec la catéchine (C) et l'épicatéchine (EC) a mis en évidence le même site de liaison préférentiel des polyphénols sur les deux albumines. En revanche, contrairement à Li et al. [15], ils ont montré que la C et l'EC stabilisaient les hélices  $\alpha$  au prix d'une perte de la structure en feuillets  $\beta$ . Pal et al. [17] ont étudié l'interaction entre la BSA et l'EC ou l'ECG. Il est apparu que l'affinité de liaison est plus grande avec l'ECG qu'avec l'EC, ce qui est dû à la présence d'un galloyl supplémentaire sur l'ECG. L'effet de la force ionique sur la liaison entre l'ECG et la BSA a été testé. L'ajout de sel en solution diminue la constante de Stern-Volmer ce qui indique que les attractions électrostatiques sont une des interactions

permettant la liaison de l'ECG avec la BSA. Par ailleurs, des expériences de DC ont permis de montrer que la structure en hélice  $\alpha$  diminuait avec 58,1% d'hélices  $\alpha$  pour la BSA seule ; 53.5% d'hélices  $\alpha$  pour les complexes BSA-EC et 49.9% d'hélices  $\alpha$  dans des complexes BSA-ECG. Dans les cas des deux polyphénols, les auteurs ont eux aussi identifié le site de Sudlow I comme le site de liaison.

De manière générale [18], il a été montré que le nombre de sites de liaison entre les polyphénols du thé (C, EC, ECG, EGC, EGCG) et l'albumine était de 1 suggérant une complexation 1 :1 entre les polyphénols et les albumines. Dans tous les cas, la complexation entraîne un changement dans la conformation de la protéine. La structure du polyphénol joue un rôle clé, et particulièrement la présence d'un galloyl sur le cycle C. En effet, la constante d'affinité la plus forte pour la HSA est obtenue avec l'ECG puis diminue dans cet ordre : ECG>EGCG»EC>EGC. La présence du groupe galloyl par son cycle aromatique permet de former des liaisons hydrophobes tandis que les fonctions hydroxyles permettent de former des liaisons hydrogènes, expliquant ainsi la plus grande affinité des polyphénols ECG et EGCG pour l'albumine.

D'autres polyphénols que ceux du thé ont été utilisés. Par exemple, l'influence du pH sur les interactions entre la BSA et l'AT a été étudiée par Osawa et al. [19]. Ainsi à pH acide <3 et à pH basique >7 ; les complexes AT-BSA sont dissociés, confirmant des travaux précédents où la gamme de pH optimale pour former des complexes AT-BSA est entre 4 et 6. La capacité de l'AT à se lier à la BSA est ainsi diminuée avec un pH acide. En revanche pour un pH très acide <0,5, l'AT n'est pas hydrolysé tandis que le traitement à un pH basique >6,5 permet une hydrolyse de l'AT avec une libération d'acide gallique. Ceci permet de supposer que les polyphénols peuvent se dissocier de l'albumine dans l'estomac où le pH est acide ou encore dans le gros intestin où le pH est compris entre 7 et 8.

### Interaction de polyphénols avec la caséine

De la même manière, les interactions entre les polyphénols du thé avec la  $\alpha$  et la  $\beta$  caséine ont été suivies [20] notamment pour tenter d'expliquer pourquoi l'ajout de lait modifie l'activité anti-oxydante du thé. Les résultats sont similaires à ceux trouvés avec l'albumine. Les interactions sont de type hydrophobes et hydrophiles ; le nombre de polyphénols liés par molécule de caséine est proche de 1 sauf pour l'EGCG où pour les deux caséines il vaut 1,5 ; la conformation des caséines est modifiée avec une diminution du nombre d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  et une augmentation de la structure en pelote.

## Formation de liaisons covalentes avec les protéines

Les interactions vues précédemment sont des interactions secondaires (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques ou hydrophobes). Des liaisons covalentes peuvent se former entre les polyphénols et les protéines particulièrement quand ceux-là sont oxydés. Les quinones alors obtenues sont extrêmement réactives avec les groupes nucléophiles : -SH ou -NH<sub>2</sub>. Ils permettent ainsi l'addition d'un thiol ou la formation d'une base de Schiff (voir figure 1.7) [21].

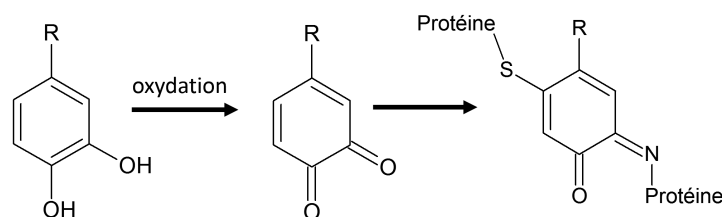


FIGURE 1.7 – Schéma représentant la formation de liaisons covalentes entre un polyphénol et des protéines à la suite d'une oxydation des fonctions hydroxyles en quinones, d'après Beart et al. [21].

Ce phénomène d'oxydation et de formation de liaisons covalentes avec les protéines a notamment été étudié pour expliquer le phénomène de formation de trouble dans la bière au cours du temps [22]. Les polyphénols présents dans la bière et ayant le plus d'affinité pour les protéines (c'est à dire essentiellement ceux de masses moléculaires plus élevées) forment des complexes insolubles avec les protéines présentes dans la bière et sont ainsi facilement éliminés. Il a été montré que les polyphénols, tels que la catéchine ou la procyanidine B3 (figure 1.8) n'ayant pas particulièrement d'affinité pour les protéines, ne sont pas éliminés et restent dans la bière. Par la suite, en présence d'oxygène, ils forment des polymères de plus hautes masses moléculaires qui interagissent fortement avec les protéines restantes. Il semble ainsi qu'un mécanisme d'oxydation entraînant la polymérisation des polyphénols a lieu permettant la formation de complexes avec les protéines et créant ainsi un trouble dans la bière.

Les méthodes utilisées pour déterminer les interactions réversibles et irréversibles entre les protéines et les polyphénols ont été décrites dans un article de revue [23].

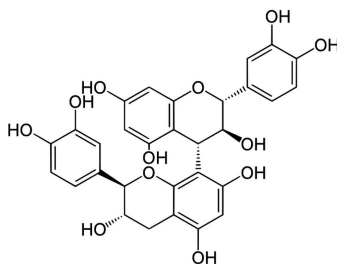


FIGURE 1.8 – Formule semi-développée de la procyanidine B3

### 1.3 Polyphénols à l'interface de fluides

Grâce à leur structure, les polyphénols peuvent se comporter comme des molécules amphiphiles ou modifier l'équilibre hydrophile/hydrophobe des molécules avec lesquelles ils interagissent.

Il a par exemple été montré [24] que la quercétine (figure 1.9) à l'interface entre l'eau et la bicouche lipidique formait des complexes avec la vitamine E ou la vitamine C. La formation de ces complexes permet une synergie des deux molécules puisque l'activité anti-oxydante augmente fortement.

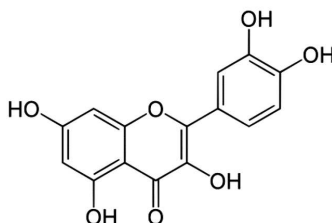


FIGURE 1.9 – Formule semi-développée de la quercétine

Le rôle d'un mélange de polyphénols pour la stabilisation de mousse de  $\beta$ -lactoglobuline ou de caséine [25] a été mis en évidence. Le mélange de polyphénols avec la  $\beta$ -lactoglobuline ou la caséine forme des nanoparticules avec un diamètre compris entre 30 et 90  $\mu\text{m}$ . La formation de ces nanoparticules diminue la tension de surface. Cependant, le volume occupé par la mousse n'est pas affecté par la présence de ces particules et la mousse met plus de temps à retomber. Elle est aussi beaucoup moins hydratée avec la présence de polyphénols. Il semble ainsi que les polyphénols aident à stabiliser les mousses grâce aux propriétés de la monocouche formée à l'interface air-eau.

Des résultats similaires avaient été obtenus auparavant avec la catéchine et la  $\beta$ -lactoglobuline [26]. La catéchine permet ainsi une meilleure formation et stabilité des mousses pour un ratio molaire 0,1 catéchine : 1  $\beta$ -lactoglobuline. Avec l'ajout de catéchine, l'épaisseur du film formé à l'interface augmente jusqu'à atteindre un maximum puis diminue avec la concentration en catéchine. La catéchine permet de ralentir le drainage de liquide et il a aussi été montré qu'elle permet de ralentir la diffusion d'une sonde dans la couche adsorbée. Les auteurs pensent que cette amélioration est due à une réticulation des protéines induite par la catéchine au niveau de la couche adsorbée.

L'adsorption de polyphénols (C ; EC ; ECG ; EGC ou EGCG)- $\beta$  caséine à l'interface air-eau a été suivie par tensiométrie dynamique et statique, ellipsométrie et spectroscopie de masse [27]. Tandis qu'aucune adsorption n'est obtenue avec une solution contenant uniquement des polyphénols, la cinétique d'adsorption de protéines est modifiée avec l'ajout de ECG, EGC et EGCG qui forment des complexes présents à l'interface avec la caséine tandis que C et EC ne forment pas de complexes avec la caséine. Le suivi de la pression de surface (différence entre la tension de surface du solvant pur et de la tension de surface de la solution contenant les molécules tensio-actives) en fonction du temps a permis de mettre en évidence le fait que le temps d'induction est plus lent avec l'ajout de EGCG et ECG mais légèrement plus rapide avec l'ajout de EGC (figure 1.10). Pour une concentration identique en  $\beta$ -caséine, la tension de surface est plus faible avec l'ajout de polyphénols (sauf avec C et EC pour lesquels l'ajout ne modifie pas la tension de surface).

## 1.4 Polyphénols à l'interface solide-liquide

De nombreux polyphénols sont capables de s'adsorber à l'interface solide-liquide. Des complexes polysaccharides/polyphénols peuvent par exemple encrasser des équipements lors des étapes de filtration du vin [28] mais les polyphénols peuvent aussi être une ressource très intéressante pour la fonctionnalisation de surfaces.

### 1.4.1 Polyphénols pour la fonctionnalisation de nanoparticules

Les interactions entre la BSA et les polyphénols ont permis la préparation de capsules pour des utilisations thérapeutiques. Par exemple, des films multicouches de BSA et d'AT ont été déposés sur des particules de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) contenant une molécule

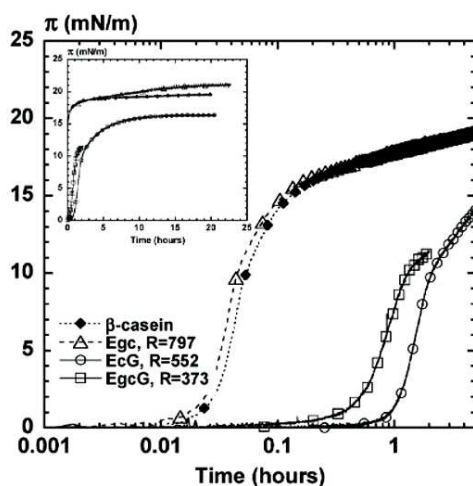


FIGURE 1.10 – Pression de surface  $\pi$  à l'interface air-eau pour une solution de caséine à 10 mg/mL seule ou en présence de EGC, ECG et EGCG. L'encart présente la cinétique complète ; d'après Aguié-Begin et al. [27].

thérapeutique modèle. Le cœur en  $\text{CaCO}_3$  a ensuite été dissous [29]. Les capsules, qui présentent une bonne biocompatibilité, sont dégradées par l'action de l' $\alpha$ -chymotrypsine alors qu'elles ne le sont pas par la trypsine qui n'agit pas sur la BSA. Ceci peut être intéressant pour des applications thérapeutiques ciblées. La libération de la molécule thérapeutique modèle est observée à la suite du traitement avec l' $\alpha$ -chymotrypsine.

Des nanoparticules de chitosan ont été chargées en polyphénols du thé afin d'augmenter leur biodisponibilité et leur stabilité. Il a été montré que ces nanoparticules limitaient la prolifération de cellules cancéreuses du foie et pouvaient induire l'apoptose de ces cellules [30].

L'AT a été utilisé pour la synthèse de nanoparticules d'argent. Des nanoparticules d'AT-argent de diamètre compris en 25 et 45 nm sont stables et présentent une activité antibactérienne contre une large gamme de bactéries Gram-positives et Gram-négatives avec une meilleure activité contre les Gram-positives [31]. De la même façon, des extraits de feuilles de *Psidium guajava*, riches en AT et flavonoïdes ont aussi été utilisés pour synthétiser des nanoparticules d'argent avec un diamètre d'environ 25 nm et possédant de meilleures propriétés antibactériennes contre *Escherichia coli* (*E. coli*) que les nanoparticules d'argent seules [32].

La possibilité d'utiliser les polyphénols dans la production de nanoparticules est très intéressante du fait de la faible toxicité de ces matériaux pour l'environnement et peuvent être une voie vers une synthèse plus "verte" de nanoparticules [33]. Par exemple, des cellules solaires à pigment photosensible (DSSC pour Dye Sensitized Solar Cells) ont été développées à partir de

flavonoïdes extraits de mûre adsorbés sur des nanoparticules d'oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) [34]. Ainsi les polyphénols tout comme les caroténoïdes ou les chlorophylles pourraient progressivement remplacer l'utilisation de complexes de ruthénium dans les DSSC. Néanmoins, ces molécules sont sensibles à l'oxydation, il faut donc rendre les DSSC imperméables à l'oxygène ou ajouter des anti-oxydants sur les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  [35].

### 1.4.2 Dépôt de films de polyphénols à l'interface solide-liquide

Le dépôt de polyphénols, qui peut notamment être observé dans les tasses ayant contenu du thé ou dans les verres de vin (figure 1.11), sur toutes sortes de matériaux a été caractérisé d'un point de vue physico-chimique [36]. Un dépôt recouvrant d'AT a été obtenu sur différentes surfaces : du métal comme l'acier inoxydable ou des polymères hydrophobes tels que le polytétrafluoroéthylène (PFTE).

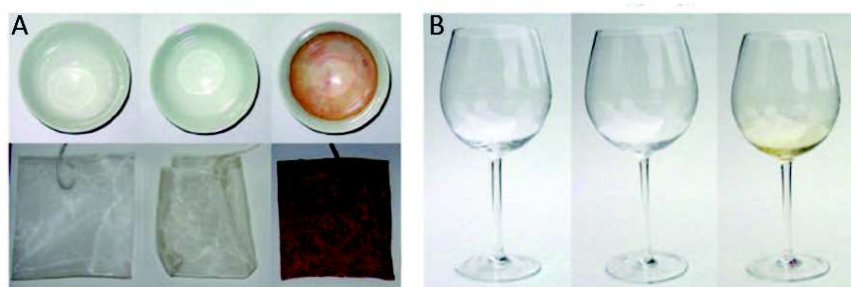


FIGURE 1.11 – Photos d'une tasse à thé et d'un sachet de thé (A) et d'un verre à vin (B). A gauche : avant contact ; au milieu : après contact avec du thé (A) et du vin (B) et rinçage à l'eau ; à droite, mise en évidence du dépôt de polyphénols à l'aide d'une solution aqueuse de  $\text{AgNO}_3$  ; d'après Sileika et al. [36].

L'adsorption d'AT sur des surfaces d'or ou de silice à partir de solution à pH acide entraîne un dépôt d'une monocouche de quelques nanomètres indépendamment de la concentration en AT (entre 0,1 et 50 mg/mL) [37]. Des expériences de voltamétrie cyclique ont montré que la monocouche était homogène et compacte puisqu'elle était imperméable à l'hexacyanoferrate de potassium. La cinétique de dépôt d'AT et de pyrogallol a aussi été étudiée en conditions basiques où les polyphénols subissent une oxydation spontanée [38]. La cinétique est plus lente qu'en condition acide. Après 24 heures, la cinétique n'est toujours pas terminée pour le pyrogallol. Les épaisseurs obtenues sont également plus élevées avec une épaisseur de 50 nm obtenue pour



un temps de dépôt supérieur à 4 heures pour l'AT et une épaisseur de 75 nm pour le pyrogallol après 24h.

L'assemblage de coordination de polyphénols et de cations métalliques comme  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  a été réalisé en mélangeant une solution de polyphénols avec une solution de ces cations métalliques. Ejima et al. [39] ont ainsi réalisé des revêtements à base d'AT et de  $\text{Fe}^{3+}$  en une seule étape en mettant en contact le mélange avec différents types de surfaces comme le polystyrène, le silicone ou l'or et de différentes formes. La coordination entre les ions  $\text{Fe}^{3+}$  et l'AT dépend du pH (figure 1.12). Des capsules creuses d'AT et  $\text{Fe}^{3+}$  ont été obtenues à l'aide de particules de carbonate de calcium sacrificielles. La couleur des capsules dépend du pH. Elles sont sans couleur à  $\text{pH} < 2$ , bleues pour  $3 < \text{pH} < 6$  et rouge à  $\text{pH} > 7$ . À pH acide, les fonctions hydroxyles de l'AT sont presque toutes protonées ce qui entraîne la déstabilisation des films formés. Ainsi à  $\text{pH}=2$ , les capsules rétrécissent immédiatement ; à  $\text{pH}=3$ , les capsules sont dissoutes au bout de 4 heures alors que pour les pH 5 et 7,4 au bout de 10 jours, 70 et 90% respectivement des capsules restent intactes. La même équipe a montré qu'il était possible de réaliser cette étape plusieurs fois afin d'obtenir une épaisseur de film proportionnelle au nombre de couches déposées [40], proposant ainsi une méthode d'assemblage de coordination en plusieurs étapes.

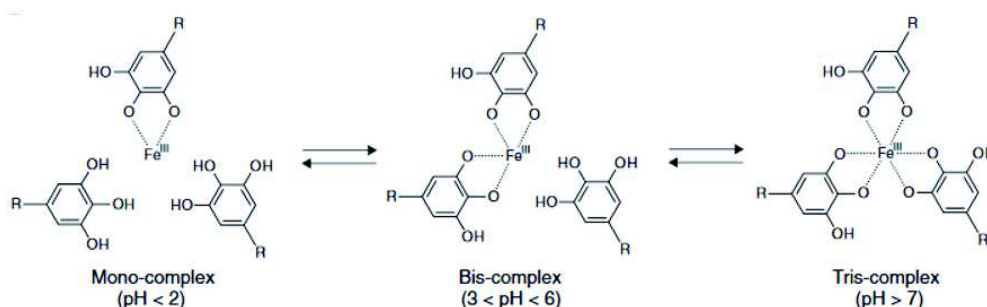


FIGURE 1.12 – Les différents états de coordinations  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -catéchol en fonction du pH

### 1.4.3 Utilisation des polyphénols dans les films multicouches

Le dépôt couche par couche (LbL pour layer by layer), qui repose sur un dépôt alterné d'espèces mutuellement complémentaires comme des polyélectrolytes chargées ou des polymères possédant des groupes receveurs de liaisons hydrogènes et d'autres de donneurs de liaisons hydrogènes [41] est aussi possible avec des polyphénols.

Des films multicouches ont été construits avec de l'AT et du poly-éthylèneimine (PEI) [42].

La croissance des films, suivie par microbalance de quartz (QCM), est linéaire avec le nombre de paires de couches déposées. Après construction des films, il a été possible de les charger avec des ions  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ . Les films montrant une capacité de chargement en  $\text{Fe}^{3+}$  proportionnelle avec le nombre de couches et irréversible tant que le pH est supérieur à 2, les ions  $\text{Fe}^{3+}$  restent dans le film. Ceci suggère que seule une partie des polyphénols interagit avec le PEI via des liaisons électrostatiques tandis que l'autre partie peut ensuite se coordonner avec des cations métalliques. Des films LbL PEI-(AT- $\text{Fe}^{3+}$ )<sub>n</sub>, où n représente le nombre de bicouches déposées, ont par la suite pu être construits grâce aux mêmes interactions que pour les assemblages de coordination [43]; le PEI servant de couche d'ancrage. Le dépôt des films s'est avéré très peu dépendant de la concentration en NaCl alors que les interactions électrostatiques jouent un rôle important dans la construction du film, ceci montre que les interactions entre l'AT et les ions  $\text{Fe}^{3+}$  sont très fortes et que le film est très stable. Ceci a été montré par le fait qu'en présence d'anion hexacyanoferrate les ions  $\text{Fe}^{3+}$  n'interagissaient pas pour former du bleu de Prusse.

Il a été montré que des films multicouches construits à partir de poly(allylamine) et d'AT n'étaient pas stables à un pH élevé et à pH faible du fait d'une diminution des interactions électrostatiques dans ces conditions [44]. En effet, l'AT n'est pas chargé à faible pH tandis que la PAH n'est pas chargée au-dessus de son pKa qui se situe aux alentours de 9. Un traitement avec une solution de périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) permet de stabiliser les films en les réticulant. Le  $\text{NaIO}_4$  est un oxydant fort qui permet d'oxyder les fonctions catéchols de l'AT en quinones qui sont très réactives avec les groupes amines de la PAH. La réticulation permet non seulement de stabiliser les films mais elle permet aussi de réduire leur perméabilité aux ions hexacyanoferrate sans modifier leur morphologie.

Le dépôt de films (gélatine-EGCG)<sub>n</sub> où n représente le nombre de cycles de dépôt a été étudié avec la gélatine de type A et la gélatine de type B [45]. La croissance des films avec la gélatine A est exponentielle tandis qu'elle est linéaire avec la gélatine B (figure 1.13). Dans les conditions expérimentales, la gélatine A et la gélatine B ne sont pas chargées de la même manière. L'EGCG est chargée négativement et la gélatine A est chargée positivement ainsi des interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes ont lieu. La gélatine B, tout comme l'EGCG, est chargée négativement. Ainsi, bien que les deux molécules soient chargées de la même manière, un film se construit grâce certainement à la prédominance des interactions hydrophobes. L'activité anti-oxydantes des films (gélatine A-EGCG) a été mesurée à l'aide du test à l'ABTS (Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)). L'activité anti-

oxydante augmente avec l'épaisseur des films suggérant que tous les polyphénols dans le film sont accessibles. Néanmoins, l'activité est inférieure à l'activité d'une solution contenant la même quantité d'EGCG en solution certainement du fait des interactions entre l'EGCG et la gélatine limitant l'accès aux groupes -OH réactifs des polyphénols. Par la suite, les auteurs ont montré la possibilité de réaliser des capsules creuses (gélatine-EGCG)<sub>4</sub> de 30 nm d'épaisseur environ et perméables à du dextran fluorescent jusqu'à une masse molaire de  $2 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.

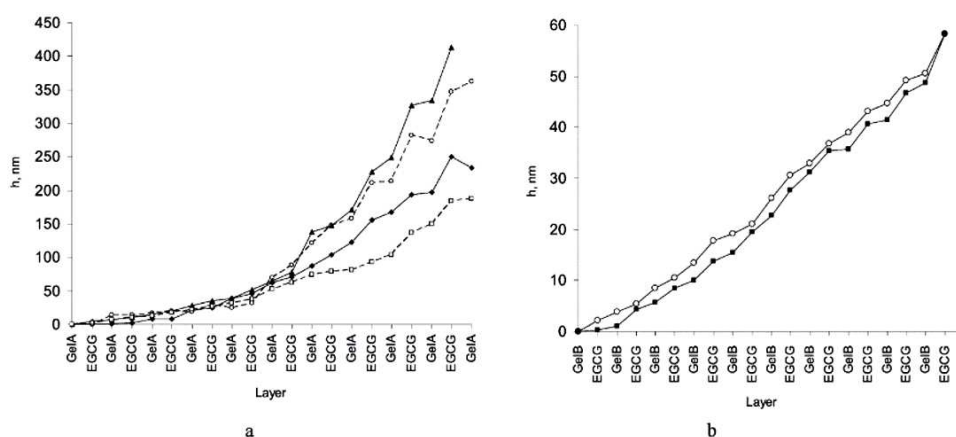


FIGURE 1.13 – Epaisseur des films avec EGCG et la gélatine A (a) et la gélatine B (b) pour différentes expériences indépendantes, d'après Shutava et al. [45].

Des films multicouches avec de l'AT et des antibiotiques cationiques : Gentamicine (Gent), Tobramycine (Tob), Polymixine B, (PolyB) ont été construits suivant deux manières : une par trempage simple et l'autre par la méthode de spin coating [46]. Les films obtenus par spin coating sont moins poreux et moins rugueux que ceux obtenus par trempage successif (figure 1.14). Les films construits par spin coating montrent une transition de morphologie très intéressante après un dépôt de 50 paires de couches passant d'un film fin 2D à une structure 3D. Jusqu'à 40-45 paires de couches, la croissance du film est linéaire avec une augmentation de l'ordre du nanomètre pour chaque bicouche déposée tandis qu'après 50 paires de bicouches, l'épaisseur augmente environ 15 fois plus que dans le premier régime 2D (figure 1.15). Les films sont stables dans le temps dans des conditions physiologiques à pH=7,5 puisqu'aucune libération et aucune modification de l'épaisseur pendant un mois n'ont été mesurées. En revanche, à pH=5,5, les films libèrent des antibiotiques. Les auteurs expliquent ce comportement par le fait qu'à pH acide, l'AT devient moins chargé ce qui induit une accumulation des groupes amines chargés positivement dans le film et ainsi un déséquilibre entre les charges positives et négatives. Pour

maintenir l'électroneutralité du film à un pH plus faible, les films AT-antibiotiques libèrent des molécules d'antibiotiques. Après 3 jours, à pH=5,5; les films ont libéré assez d'antibiotiques et restent stables par la suite. Après 3 jours, la même quantité d'antibiotiques est libérée quel que soit l'antibiotique utilisé mais néanmoins la cinétique de libération est différente avec une libération beaucoup plus rapide avec Tob, l'antibiotique le plus hydrophile des trois. Ce comportement dépendant du pH a été utilisé pour déclencher une réponse antibactérienne des films contre *E. coli* et *Staphylococcus epidermis* car ces bactéries acidifient le milieu par la sécrétion d'acides acétiques et lactiques respectivement. Les films (AT-antibiotiques)<sub>n</sub> présentent par ailleurs une bonne biocompatibilité avec des cellules eucaryotes.

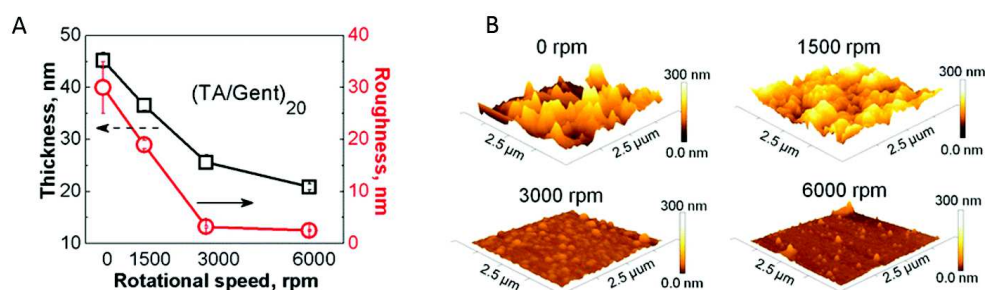


FIGURE 1.14 – A : Epaisseur et rugosité des films en fonction de la vitesse de rotation lors du spin coating. B : images AFM des films en fonction de la vitesse de rotation lors du spin coating. La vitesse à 0 rpm représente des films construits par trempage, d'après Zhuk et al. [46].

### Autre exemple des polyphénols à l'interface solide-liquide

Des fils, basés sur le byssus de la moule, à base d'AT ont pu être fabriqués à partir d'un mélange d'AT, de poly(allylamine)(PAA) comme polycation et de  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Al}^{3+}$  comme polycations (figure 1.16). Les fils sont verts du fait de la présence de mono-espèce (voir figure 1.12). Après un traitement aux vapeurs d'ammoniac pour augmenter le pH et permettre l'oxydation de l'AT et la formation de liaisons covalentes avec les groupes amines de la poly(allylamine), les fils deviennent rouges. Ils possèdent une contrainte à la rupture de 4 MPa [47].

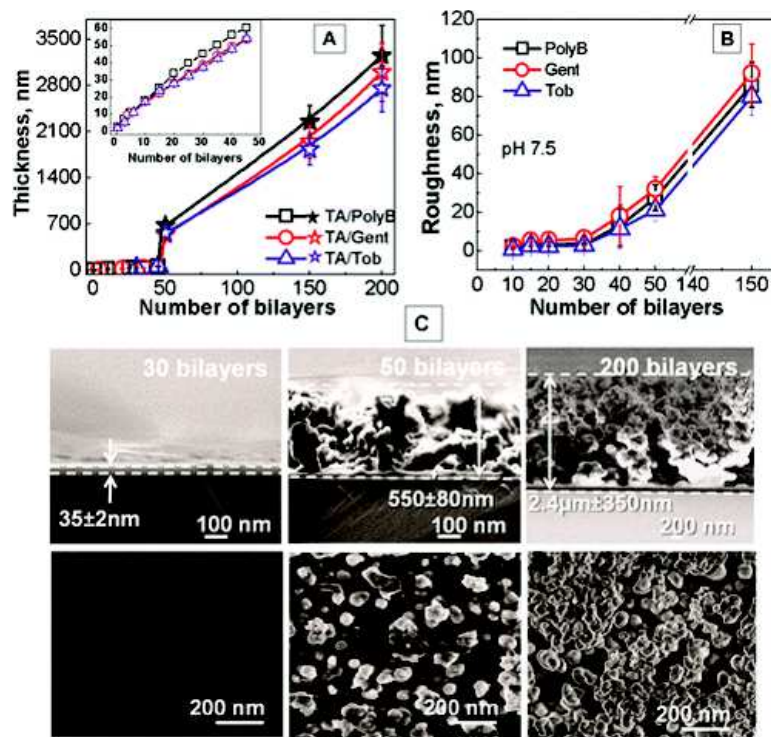


FIGURE 1.15 – A : épaisseur des films AT-PolyB (carrés), AT-Gent (cercles), AT/Tob (étoiles) obtenus par spin coating à pH=7,5 en fonction du nombre de paires de couches. L’encart montre la croissance des films pour moins de 45 bicouches. B : moyenne quadratique de la rugosité des films AT/Gent. C : Images MEB en section de coupe et vue de haut pour des films AT/Gent de 30, 50 et 200 bicouches, d’après Zhuk et al. [46].

## 1.5 Applications biologiques des polyphénols

Les polyphénols présentent une large gamme possible d’applications dans le biomédical. Il a été montré que les polyphénols conservaient leurs propriétés quand ils étaient immobilisés aux interfaces. Ainsi des applications des polyphénols dans le domaine de la santé peuvent être classées en deux catégories :

- des matériaux qui libèrent des polyphénols dans le milieu environnant permettant ensuite une diffusion dans les tissus,
- des matériaux qui ne libèrent pas de composés actifs mais dont la surface est modifiée soit par liaisons covalentes de polyphénols soit par incorporation/adsorption.

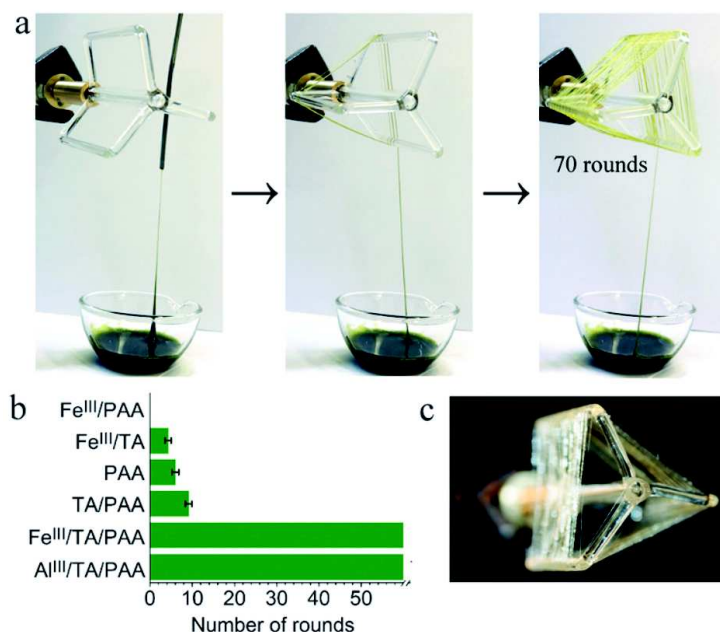


FIGURE 1.16 – A : Fils tissés à partir d'un mélange Fe<sup>III</sup>-AT-PAA. Les fils sont verts dû à des mono-espèce à pH=1. B : Histogramme montrant le nombre de tours pouvant être réalisés pour obtenir du fil avec une combinaison de Fe<sup>III</sup>/Al<sup>III</sup>, AT et PAA. C : Fils transparents et sans couleur obtenus avec Al<sup>III</sup>, d'après Krogsgaard et al. [47]

### 1.5.1 Effets biologiques des polyphénols intéressants pour des applications dans le domaine de la santé

#### Activité antimicrobienne

Les polyphénols possèdent une activité contre une large gamme de bactéries aussi bien des bactéries Gram-positives que des bactéries Gram-négatives [48] [49] [50]. Différents mécanismes semblent avoir lieu pour expliquer l'effet antibactérien. Les polyphénols peuvent former des complexes avec les ions métalliques présents dans les milieux privant ainsi les bactéries de ces ions et limitant ainsi leur croissance. Ils peuvent aussi interagir avec la membrane des bactéries, la perforer ou diminuer sa perméabilité par exemple. Les enzymes extracellulaires des bactéries peuvent être inhibées par les polyphénols par exemple certaines enzymes responsables de la formation de biofilm [51] comme la sortase. Un autre mécanisme qui a été montré chez les polyphénols de la canneberge est le mécanisme d'antiadhésion [52] contre *Escherichia coli* (*E. coli*). Ce mécanisme est propre à la structure des polyphénols contenus dans la canneberge qui sont composés de plusieurs unités flavanols avec au moins une liaison de type-A qui est composée

de deux liaisons entre 2 sous-unités (figure 1.17). Cette liaison de type-A semble essentielle pour le mécanisme d'antiadhésion puisque les proanthocyanidines présentant que des liaisons de type-B (simple liaison entre les unités flavanols) n'ont pas montré d'effet d'antiadhésion contre *E. coli*.

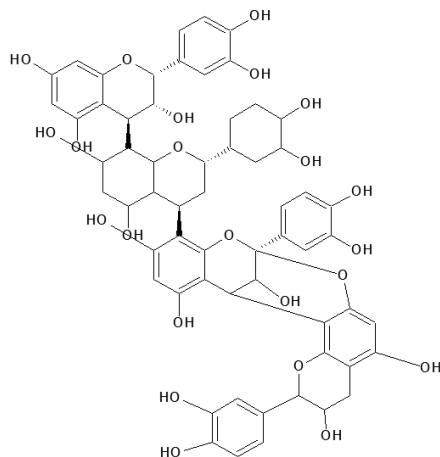


FIGURE 1.17 – Structure d'un des proanthocyanidines présents dans la canneberge mis en évidence par Foo et al. [53]

Les polyphénols ont aussi des activités antivirales. Les polyphénols du thé et tout particulièrement l'EGCG, ont montré des activités contre le virus de la grippe, notamment en se liant à l'hémagglutinine empêchant ainsi les particules virales de se fixer sur les récepteurs cellulaires [54] ; contre des adénovirus [55] ou des entérovirus [56]. Des ellagitannins ont montré aussi une action contre les virus HIV [57] [58].

L'EGCG a aussi montré une activité antifongique contre *Candida albicans* [59]. Des ellagitannins extraits de lauracées ont montré une activité contre *Candida parapsilosis* [60].

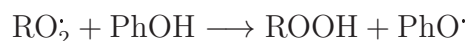
### Activité antioxydante

Une des propriétés les plus souvent présentées à propos des polyphénols est leur activité antioxydante [61] notamment via le piégeage d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) tels que les espèces  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$  ou  $NO^{\cdot}$  ou les radicaux libres dérivés de lipoprotéines [62], de protéines ou de l'ADN et ARN [63]. Les ROS peuvent induire un stress oxydant lié à de nombreuses maladies telles que les cancers [64], les maladies cardiovasculaires [65] ou les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [66].

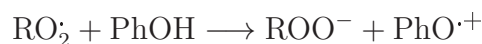
Les polyphénols ont une activité antioxydante via trois mécanismes. Les deux premiers sont des mécanismes indirects : les polyphénols peuvent agir comme antioxydant grâce à la chélation d'ions métalliques [67] qui sont impliqués dans la conversion des ROS  $O_2$  et  $H_2O_2$  en  $HO\cdot$ , qui est hautement réactif, via la réaction de Fenton. Les polyphénols peuvent également inhiber certaines enzymes responsables de la génération de ROS. Il a ainsi été montré que les flavonoïdes inhibaient la protéine kinase C [68], la xanthine oxydase [69] et une gamme très large d'autres enzymes [61].

Le troisième mécanisme est une réaction directe des polyphénols (PhOH) avec les ROS ou des radicaux libres qui semble le meilleur moyen des polyphénols de montrer leur pouvoir antioxydant[70]. Deux réactions sont possibles :

— un transfert d'atome d'hydrogène :



— un transfert d'un simple électron :



Le premier mécanisme de transfert d'atome hydrogène permet de donner un atome d'hydrogène à un radical libre  $R\cdot$ , tels que les radicaux peroxydes  $LOO\cdot$  générés durant l'auto-oxydation des lipides ( $LH \longrightarrow L\cdot$  puis  $L\cdot + {}^3O_2 \longrightarrow LOO\cdot$ ). L'activité antioxydante repose sur la rapidité du transfert de l'atome d'hydrogène et sur la stabilité du radical phénoxy formé par le mécanisme. Ce radical ne doit pas réagir de nouveau avec  $LOOH$  ou  $LH$  permettant ainsi de terminer la propagation de la réaction en chaîne :  $LOO\cdot + LH \longrightarrow LOOH + L\cdot$ .

C'est ce mécanisme qui apparaît être prépondérant avec les polyphénols.

Le second mécanisme est basé sur le transfert d'un électron d'un polyphénol PhOH vers un radical libre  $R\cdot$  avec la formation d'un radical cation stable  $PhOH^{\cdot+}$ .

### Autres activités

Les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes sont certainement les plus connues des polyphénols. Les polyphénols, grâce notamment à l'inhibition de certaines enzymes, peuvent avoir aussi une activité anticarcinogénique et anti métastatique [71]. Il a aussi été montré que l'EGCG pouvait empêcher la formation de feuillets  $\beta$  de protéines amyloïdes, qui jouent un



rôle dans la maladie d'Alzheimer [72]. L'EGCG peut se lier à des protéines  $\alpha$ S non repliées et permet leur agrégation non structurée plutôt qu'une formation en fibrilles (1.18).

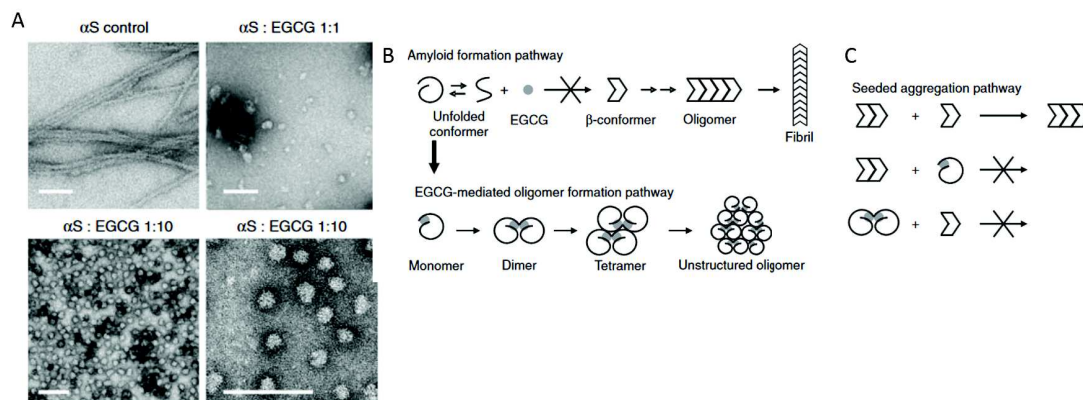


FIGURE 1.18 – A : Images de microscopie électronique de protéine  $\alpha$ S sans et avec différents ratios molaires d'EGCG après 16h montrant une agrégation en fibrilles pour le contrôle et une agrégation en particules avec l'EGCG. La barre d'échelle vaut 100  $\mu$ m. B et C : schéma expliquant l'effet de l'EGCG sur la fibrillogénèse des protéines  $\alpha$ S. B : L'EGCG se lie de préférence avec les oligomères non repliés, qui existent à l'équilibre avec les formes repliées, et empêche la formation de fibrilles par la formation d'agrégats non toxiques d'oligomères. C : l'EGCG empêche l'addition de monomère aux intermédiaires amyloïdes, d'après Ehrnhoefer et al. [72]

Cette découverte a permis d'ouvrir la voie à une autre méthode thérapeutique dans le traitement des maladies neurodégénératives. Pour augmenter la stabilité de l'EGCG et permettre une meilleure activité d'inhibition de la formation de fibrilles, des nanoparticules d'EGCG ont été fabriquées à l'aide d'acide polyaspartique. Ceci a permis d'augmenter entre un facteur 10 et 100 sa capacité à inhiber la formation de fibrilles comparé à l'EGCG non lié. De la même manière, les nanoparticules d'EGCG sont plus efficaces pour dégrader les fibrilles amyloïdes déjà formées [73].

### 1.5.2 Matériaux contenant des polyphénols avec une activité antimicrobienne

Pour des applications antimicrobiennes, des polyphénols ont été utilisés pour la modification de matériaux en différentes stratégies : contact killing (les bactéries qui adhèrent à la surface sont tuées), release killing (le matériau libère l'agent antimicrobien dans l'environnement) et antifouling (le matériau empêche les bactéries de se fixer à la surface).

#### Approche dite de "release-killing"

Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, de nombreuses applications se basent sur la libération de polyphénols afin d'activer la mort de bactéries. Les polyphénols sont ainsi intégrés dans des matériaux par l'intermédiaire de liaisons non covalentes comme les liaisons hydrogènes ou les interactions électrostatiques.

De nombreuses combinaisons de polyphénols comme l'AT, l'EGCG ou des proanthocyanidines ont été utilisés comme donneur de protons avec d'autres macromolécules comme le polyéthylène glycol, la gélatine, le poly-(vinyl pyrrolidone) ou le poly-(métacrylate de sulfobetaine) pour produire des films minces à l'aide de la technique du couche par couche [45][74, 75, 76]. Ces films présentent une libération de polyphénols en solution liée au caractère réversible de la liaison hydrogène entraînant une déconstruction du film ou bien encore un stimulus externe tel qu'une modification du pH peut entraîner une libération des polyphénols. Les études ont notamment montré que les polyphénols conservaient leur activité anti-oxydante. En revanche, l'activité antibactérienne n'a pas été montrée. Il est possible que dans ces films minces, la concentration des polyphénols libérés en solution ne permette pas d'atteindre une concentration assez élevée pour observer un effet antibactérien.

D'autres matériaux peuvent être chargés en polyphénols afin d'induire leur libération en solution, comme les hydrogels ou les matériaux fibreux. Des extraits d'algues rouges riches en phlorotannins ont ainsi été intégrés dans des hydrogels dans des gommages gellanes [77]. L'ajout de polyphénols augmente le module de compression des matériaux. De plus, la libération rapide des phlorotannins a montré un effet antibactérien contre *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) résistant à la méthicilline. Des nanofibres d'un mélange acide polylactique et gélatine ont ainsi été incorporés avec des extraits de *Lawsania Idernis*, (du henné), riche en polyphénols. Les matériaux ont montré une conservation de la structure des polyphénols dans les fibres ainsi qu'une libération graduelle. Des tests *in vitro* ont permis de mettre en lumière une action

antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* [78].

Des nanoparticules d'AT ont été fabriquées par réticulation à l'aide de 3 réticulants biocompatibles. Chaque réticulant permet une cinétique de libération différentes à différents pH permettant ainsi un contrôle de la libération selon les applications voulues avec par exemple une libération continue et lente pendant 30 jours à pH=7,4 pour les particules réticulées à l'aide d'éther de polyéthylène glycol diglycidyle. Ces nanoparticules ont permis de montrer un effet antibactérien contre différentes souches Gram-positive et Gram-négative mais les nanoparticules d'AT dégradées n'ont montré aucune activité contre *Candida albicans* [79]. De manière intéressante, la quantité de nanoparticules d'AT est beaucoup plus faible pour atteindre la même inhibition bactérienne que des microparticules développées par le même groupe [80] certainement du fait d'une plus grande surface spécifique et d'un plus grand nombre de groupes fonctionnels à la surface.

### Approche dite de "contact-killing"

Les polyphénols peuvent interagir fortement avec le chitosan (figure 1.19). Ceci a permis la préparation de films à partir d'amidon de pois, de chitosan et de polyphénols extraits de thym. Le mélange amidon-chitosan a permis l'incorporation de polyphénols du thym avec une libération progressive au cours du temps. La cinétique de libération est plus lente comparée au matériau composé seulement d'amidon. Une réticulation des films a été réalisée à l'aide d'AT, ce qui a diminué la libération des polyphénols au cours du temps. L'utilisation de solvants acides augmente la cinétique de libération en raison de la solubilisation du chitosan. La libération des polyphénols a permis de mettre en évidence une bonne activité antioxydante mais l'activité antibactérienne n'a pas là non plus été évaluée [81]. L'incorporation de curcuma dans des films de chitosan préparés par solvant casting puis réticulés a permis d'obtenir des films plus rigides qu'en absence de curcuma et a permis d'augmenter les propriétés antibactériennes contre *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* [82]. De la même façon, des films avec du chitosan et différents polyphénols ont permis de montrer une activité antibactérienne contre une large gamme de bactéries montrant ainsi une possible application pour l'utilisation dans l'alimentaire [83]. La production de conjugué chitosan-polyphénol et leurs applications possibles comme l'emballage alimentaire ont été publiées dans une revue par Hu et al. [84].

D'autres matériaux pour l'emballage alimentaire ont été utilisés. Des extraits de feuilles de basilic ont ainsi été incorporés dans des films contenant de l'alcool polyvinylique et des

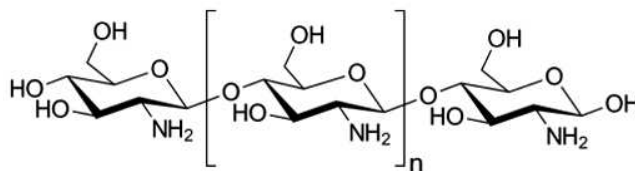


FIGURE 1.19 – Structure du chitosan

nanocristaux de cellulose par solvant casting. Les films ont montré une activité contre des bactéries alimentaires *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*[85].

La technique d'évaporation à laser pulsé assistée par matrice (MAPLE) a été utilisée pour couvrir de l'acier inoxydable avec du poly méthyl métacrylate ou du bioverre avec des extraits de basilic ou de curcuma. Les films contenant du basilic présentent une libération très lente contrairement aux films contenant du curcuma. Néanmoins, les deux matériaux présentent le même ordre de grandeur de l'inhibition de croissance chez *S. aureus* (90% d'inhibition) et *E. coli* (50% d'inhibition) [86].

Il a été montré que l'immobilisation de phénols sur des surfaces n'altérerait pas leurs propriétés antimicrobiennes et qu'elle pouvait même l'amplifier. Du carvacrol, du thymol et de l'eugénol (figure 1.20) ont été immobilisés sur des particules de silice. Ces particules ont montré une meilleure activité antibactérienne contre *Listeria innocua* avec par exemple une concentration minimum bactéricide (CMB) de 0,05 mg/mL sur des particules de silice fumée alors qu'en solution, la CMB est supérieure à 0,2 mg/mL [87]. De la même manière, de l'acide gallique a été immobilisé sur des nanoparticules de silice. L'immobilisation permet de maintenir la stabilité de l'acide gallique tandis que la concentration minimale d'inhibition (MIC) est entre 14 et 27 fois plus faible pour l'acide gallique immobilisé sur les nanoparticules qu'en solution [88]. Cette tendance peut s'expliquer avec le fait que les nanoparticules interagissent de manière plus efficace avec la paroi bactérienne.

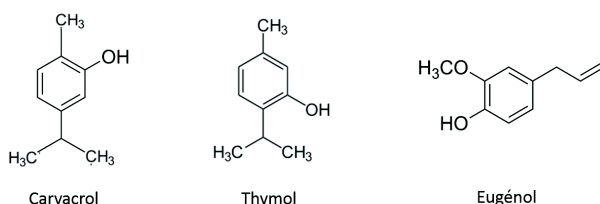


FIGURE 1.20 – Structure du carvacrol, thymol et eugénol

En plus d'utiliser la possibilité d'immobiliser les polyphénols par la création de liaison covalente, les complexes métallo-organiques de complexation ont aussi été étudiés pour réaliser des matériaux antimicrobiens. Un spray alterné d'AT et d'ions  $\text{Fe}^{3+}$  a permis d'obtenir des films minces de 20-30 nm d'épaisseur avec des propriétés antifongiques permettant des applications pour permettre la conservation des fruits par exemple (figure 1.21) [89].



FIGURE 1.21 – Photos d'une mandarine sans et avec le film AT-FeIII après traitement et 14 jours après traitement, d'après Park et al [89]

Des films LbL, à base de lysozyme et d'AT, ont été déposés sur des nanoparticules d'oxyde de fer et ont montré une activité antibactérienne à la fois due à du contact-killing, du fait du lysozyme particulièrement, mais aussi du release-killing envers *S. aureus* et *E. coli* [90].

### Approche dite "antifouling"

La troisième approche utilisée pour développer des matériaux antibactériens est l'approche antifouling. Un mélange d'AT et d'un peptide dérivé de la salive ont été adsorbés à la surface d'hydroxyapatite. L'hydrophilie de l'hydroxyapatite a grandement augmenté, l'angle de contact passant de  $60^\circ$  à  $14^\circ$  après l'adsorption du film. Ce matériau super hydrophile empêche ensuite l'adsorption de protéines telle que la BSA ainsi que l'adhésion de *Streptococcus mutans* [91]. D'une manière similaire, des films LbL avec de l'AT et un polymère zwitterionique de poly(sulfobetaine méthacrylate) (PSBMA) ont été construits pour obtenir une surface super hydrophile avec un angle de contact de l'ordre de  $15^\circ$ . L'adsorption de la BSA, de lysozyme ou d'hémoglobine sur ces films est grandement diminuée avec une masse adsorbée de 0,42; 52,9 et

37,9 ng/cm<sup>2</sup> respectivement sur des films de 20 paires de couches et de 328 ; 357 et 509 ng/cm<sup>2</sup> sur des surfaces d'or sans revêtement [74].

### 1.5.3 Modification de surface basée sur les polyphénols pour améliorer la biocompatibilité des matériaux

En plus de leur propriété antimicrobienne, les polyphénols ont aussi été utilisés dans des biomatériaux pour améliorer leur biocompatibilité.

Des polyphénols du thé ont ainsi été utilisés pour stabiliser et réduire des oxydes de graphène pour renforcer les propriétés mécaniques du chitosan. De plus, l'utilisation des polyphénols a permis de promouvoir la prolifération et la différenciation d'ostéoblastes [92]. L'utilisation d'acide caféique dans des scaffolds de chitosan a permis d'augmenter le module de compression mais aussi d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses [93]. Tandis que la mucine, une glycoprotéine de la salive, inhibe l'étalement de cellules, une surface recouverte de multicouches de mucine et d'EGCG permet un étalement des cellules [94]. Les polyphénols peuvent aussi être utilisés pour produire des surfaces répulsives. Une surface composée d'AT et d'ions Fe<sup>3+</sup> a permis de créer une surface empêchant l'adhésion de plaquettes [95]. L'EGCG a été utilisé pour réticuler des gels de collagène augmentant la rugosité de la surface ainsi que le module de compression du gel de collagène. Ces gels ont permis de favoriser la prolifération de cellules souches de la pulpe dentaire ainsi qu'une plus grande expression de la phosphatase alcaline. De manière assez intéressante, l'EGCG seul ne permet pas d'obtenir de tels effets [96]. Des gels de collagène réticulés avec de l'AT ont été utilisés pour des applications de traitements de cicatrisation. Des expériences de cicatrisation ont permis de montrer une plus grande activité pour les matériaux réticulés que les matériaux non réticulés [97]. Des matériaux composites gélatine/chitosan, réticulés à l'aide de l'acide tannique, ont montré une bonne biomcompatibilité, une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* mais aussi une activité hémostatique dans des modèles d'artère de lapin permettant une bonne coagulation [98].

### 1.5.4 Matériaux utilisant les polyphénols pour modifier les fonctions cellulaires

Les polyphénols ont aussi été utilisés dans des matériaux dans des thérapies anticancer. Du collagène de type I a été réticulé avec de l'AT et il a été montré que la libération de l'AT au

cours du temps permettait l'apoptose de cellules cancéreuses du sein HER+ [99]. Des nanoparticules de gélatine ont été recouvertes d'EGCG et mises au contact avec des cellules cancéreuses du foie. L'EGCG libéré permet alors de bloquer un facteur de croissance induit dans la signalisation cellulaire des cancers du sein [100]. L'EGCG a aussi été utilisé avec des nanoparticules mésoporeuses de silice afin d'encapsuler des médicaments anti-cancer. L'EGCG permet de stabiliser les nanoparticules et de ralentir la libération des médicaments grâce à un changement du pH ou de l'activité de la glutathione des cellules mais il permet aussi d'immobiliser des ligands spécifiques [101]. Une autre application étudiée est l'encapsulation de cellules pancréatiques dans le cas d'un traitement de diabète de type 1. Des îlots pancréatiques humains ont ainsi été recouverts de films multicouches LbL de polyvinylpyrrolidone et d'AT. Ce revêtement a permis de préserver la viabilité et la fonctionnalité des cellules pendant au moins 96 heures mais aussi d'avoir une activité anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de cytokine inflammatoire [102].

Des fibres de polycaprolactone et de polyphénols (acide caféique CA et EGCG) ont été obtenues par électrospinning d'une solution contenant les deux molécules. Dans une solution tampon, les polyphénols sont libérés progressivement et au bout de 9 jours un plateau est atteint comme le montre le graphe A sur la figure 1.22 et seulement 10% de l'EGCG et 20% du CA initialement présents dans les fibres sont libérés. La libération de ces polyphénols dans le milieu de culture permet de réduire la viabilité de cellules de cancer gastrique notamment grâce à la production de peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire des polyphénols (graphe B figure 1.22).

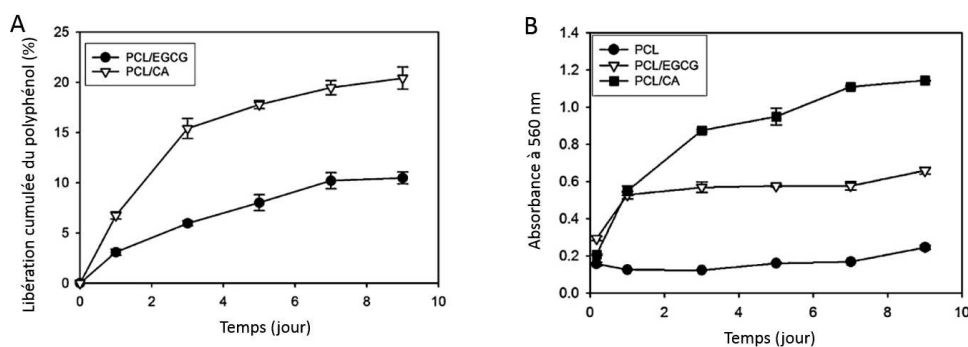


FIGURE 1.22 – A : libération de l'acide caféique (CA) et de l'EGCG au cours du temps quand les fibres sont plongées dans du tampon phosphate; B : Détection de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  généré dans le milieu de culture par les polyphénols d'après Kim et al. [103]

## 1.6 Quelques autres applications des polyphénols à l'interface solide/liquide

Grâce à leur propriété de réducteur, les polyphénols peuvent protéger la nourriture contre l'oxydation [104]. Des peintures antifouling ont été développées grâce à la complexation entre des polyphénols et des cations métalliques [105, 106]. Comme le montre la photo figure 1.23, une peinture fabriquée à partir de polyphénols et de cuivre permet d'empêcher l'adhésion de larves responsables d'encrassement biologique.



FIGURE 1.23 – Photo de plaques immergées dans un port pendant 12 mois avec en haut une peinture faite de cuivre et de tannins et en bas une plaque contrôle avec une peinture acrylique, d'après Perez et al [106]

L'AT a été utilisé pour rendre insoluble des fibres de poly-vinylcaprolactam (PVCL) grâce à la formation de liaison hydrogène entre l'AT et les groupes carbonyles de PVCL [107]. Des nanoparticules recouvertes avec des complexes d'AT et de cations métalliques ont été utilisées pour construire des superstructures sur des plus grandes particules. Cette méthode d'autoassociation est indépendante de la chimie de surface des particules utilisées [108]

## 1.7 Conclusion et perspectives

L'activité de protection chez les plantes, les bénéfices pour la santé chez l'humain et les nombreuses propriétés chimiques ont permis d'ouvrir la voie à l'utilisation des polyphénols



pour modifier les interfaces. Les polyphénols ont pu ainsi être utilisés à l'interface des biomatériaux que ce soit après immobilisation sur une surface ou dans un revêtement permettant leur libération progressive dans le milieu. Les activités les plus étudiées pour le développement de matériaux sont les activités antimicrobiennes contre des agents pathogènes et antioxydantes pour la protection de l'alimentation ou la protection dans la cicatrisation. D'autres applications comme le développement de matériaux pour la thérapie contre le cancer ou la modification de la biocompatibilité des matériaux, sont aussi une voie d'étude. Leur polyvalence dans la fonctionnalisation de différents types de matériaux des nanoparticules à des matériaux volumineux permettra de développer encore de nouvelles applications dans le biomédical. Par ailleurs, les polyphénols peuvent ouvrir la voie à une synthèse plus verte de matériaux comme les cellules photovoltaïques de panneaux solaires ou de peintures antifouling. De plus, il pourrait être intéressant d'étudier une synergie entre les nombreux polyphénols à notre disposition. Les polyphénols pourraient aussi trouver des applications intéressantes dans les revêtements auto-cicatrisant.

## Bibliographie

- [1] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouysegu. Plant Polyphenols : Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3) :586–621, 2011.
- [2] K. Khanbabaee and T. van Ree. Tannins : Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18(6) :641–649, December 2001.
- [3] P. Feeny. Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Caterpillars. *Ecology*, 51(4) :565–581, July 1970.
- [4] K. Yoshida, M. Mori, and T. Kondo. Blue flower color development by anthocyanins : from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, 26(7) :884–915, June 2009.
- [5] H. D. Schreiber, A. M. Swink, and T. D. Godsey. The chemical mechanism for  $\text{Al}^{3+}$  complexing with delphinidin : A model for the bluing of hydrangea sepals. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(7) :732–739, July 2010.
- [6] A. Lavola. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. *Tree Physiology*, 18(1) :53–58, January 1998.
- [7] A. E. Stapleton and V. Walbot. Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiology*, 105(3) :881–889, July 1994.
- [8] D. Zanchi, A. Vernhet, C. Poncet-Legrand, D. Cartalade, C. Tribet, R. Schweins, and B. Cabane. Colloidal Dispersions of Tannins in Water–Ethanol Solutions. *Langmuir*, 23(20) :9949–9959, September 2007.
- [9] T. Ozawa, T. H. Lilley, and E. Haslam. Polyphenol interactions : astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26(11) :2937–2942, January 1987.
- [10] D. L. Kauffman and P. J. Keller. The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Archives of Oral Biology*, 24(4) :249–256, January 1979.
- [11] L. J. Porter and J. Woodruffe. Haemanalysis : The relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, 23 :1255–1256, May 1984.
- [12] N. J. Baxter, T. H. Lilley, E. Haslam, and M. P. Williamson. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*, 36(18) :5566–5577, May 1997.

- [13] A. J. Charlton, N. J. Baxter, M. L. Khan, A. J. G. Moir, E. Haslam, A. P. Davies, and M. P. Williamson. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6) :1593–1601, March 2002.
- [14] C. Simon, K. Barathieu, M. Laguerre, J.-M. Schmitter, E. Fouquet, I. Pianet, and E. J. Dufourc. Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin–Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach. *Biochemistry*, 42(35) :10385–10395, September 2003.
- [15] X. Li and S. Wang. Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *New Journal of Chemistry*, 39(1) :386–395, December 2014.
- [16] D. Roy, S. Dutta, S. S. Maity, S. Ghosh, A. Singha Roy, K. S. Ghosh, and S. Dasgupta. Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *Journal of Luminescence*, 132(6) :1364–1375, June 2012.
- [17] S. Pal, C. Saha, M. Hossain, S. K. Dey, and G. S. Kumar. Influence of Galloyl Moiety in Interaction of Epicatechin with Bovine Serum Albumin : A Spectroscopic and Thermodynamic Characterization. *PLOS ONE*, 7(8) :e43321, August 2012.
- [18] A. Bose. Interaction of tea polyphenols with serum albumins : A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence*, 169 :220–226, January 2016.
- [19] R. Osawa and T. P. Walsh. Effects of acidic and alkaline treatments on tannic acid and its binding property to protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5) :704–707, May 1993.
- [20] I. Hasni, P. Bourassa, S. Hamdani, G. Samson, R. Carpentier, and H.-A. Tajmir-Riahi. Interaction of milk alpha- and beta-caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2) :630–639, May 2011.
- [21] J. E. Beart, T. H. Lilley, and E. Haslam. Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition ; observations on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 0(9) :1439–1443, January 1985.
- [22] K. Asano, K. Ohtsu, K. Shinagawa, and N. Hashimoto. Affinity of Proanthocyanidins and Their Oxidation Products for Haze-forming Proteins of Beer and the Formation of Chill Haze. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(5) :1139–1146, May 1984.

- [23] C. Le Bourvellec and C. M. G. C. Renard. Interactions between Polyphenols and Macromolecules : Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3) :213–248, March 2012.
- [24] G. Fabre, I. Bayach, K. Berka, M. Paloncýová, M. Starok, C. Rossi, J.-L. Duroux, M. Otyepka, and P. Trouillas. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*, 51(36) :7713–7716, April 2015.
- [25] S. D. Rodríguez, M. von Staszewski, and A. M. R. Pilosof. Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles : Bulk, interfacial and foaming behavior. *Food Hydrocolloids*, 50 :108–115, August 2015.
- [26] D. Sarker, P. J. Wilde, and D. C. Clark. Control of Surfactant-Induced Destabilization of Foams through Polyphenol-Mediated Protein-Protein Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 :295–300, February 1995.
- [27] V. Aguié-Béghin, P. Sausse, E. Meudec, V. Cheynier, and R. Douillard. Polyphenol –beta-Casein Complexes at the Air/Water Interface and in Solution : Effects of Polyphenol Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20) :9600–9611, October 2008.
- [28] A. Vernhet and M. Moutounet. Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents : importance, relative impact of wine polysaccharides and polyphenols and incidence of membrane properties. *Journal of Membrane Science*, 201(1) :103–122, May 2002.
- [29] M. V. Lomova, A. I. Brichkina, M. V. Kiryukhin, E. N. Vasina, A. M. Pavlov, D. A. Gorin, G. B. Sukhorukov, and M. N. Antipina. Multilayer Capsules of Bovine Serum Albumin and Tannic Acid for Controlled Release by Enzymatic Degradation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(22) :11732–11740, June 2015.
- [30] J. Liang, F. Li, Y. Fang, W. Yang, X. An, L. Zhao, Z. Xin, L. Cao, and Q. Hu. Cytotoxicity and apoptotic effects of tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles on human hepatoma HepG2 cells. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 36 :7–13, March 2014.
- [31] T. Y. Kim, S.-H. Cha, S. Cho, and Y. Park. Tannic acid-mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 39(4) :465–473, April 2016.

- [32] U. K. Parashar, V. Kumar, T. Bera, P. S. Saxena, G. Nath, S. K. Srivastava, Giri. Rajiv, and A. Srivastava. Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 22(41) :415104, 2011.
- [33] O. V. Kharissova, H. V. R. Dias, B. I. Kharisov, B. O. Pérez, and V. M. J. Pérez. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4) :240–248, April 2013.
- [34] N. J. Cherepy, G. P. Smestad, M. Grätzel, and J. Z. Zhang. Ultrafast Electron Injection : Implications for a Photoelectrochemical Cell Utilizing an Anthocyanin Dye-Sensitized TiO<sub>2</sub> Nanocrystalline Electrode. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(45) :9342–9351, November 1997.
- [35] H. Hug, M. Bader, P. Mair, and T. Glatzel. Biophotovoltaics : Natural pigments in dye-sensitized solar cells. *Applied Energy*, 115 :216–225, February 2014.
- [36] T. S. Sileika, D. G. Barrett, R. Zhang, K. H. A. Lau, and P. B. Messersmith. Colorless Multifunctional Coatings Inspired by Polyphenols Found in Tea, Chocolate, and Wine. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(41) :10766–10770, 2013.
- [37] V. Ball and F. Meyer. Deposition kinetics and electrochemical properties of tannic acid on gold and silica. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 491 :12–17, February 2016.
- [38] S. Geißler, A. Barrantes, P. Tengvall, P. B. Messersmith, and H. Tiiainen. Deposition Kinetics of Bioinspired Phenolic Coatings on Titanium Surfaces. *Langmuir*, 32(32) :8050–8060, August 2016.
- [39] H. Ejima, J. J. Richardson, K. Liang, J. P. Best, M. P. van Koeven, G. K. Such, J. Cui, and F. Caruso. One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6142) :154–157, July 2013.
- [40] Md. A. Rahim, H. Ejima, K. L. Cho, K. Kempe, M. Müllner, J. P. Best, and F. Caruso. Coordination-Driven Multistep Assembly of Metal–Polyphenol Films and Capsules. *Chemistry of Materials*, 26(4) :1645–1653, February 2014.
- [41] J. Borges and J. F. Mano. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chemical Reviews*, 114(18) :8883–8942, September 2014.
- [42] V. Ball. High loading capacity of Fe<sup>3+</sup> cations in LBL films made from poly(ethyleneimine) and tannic acid : An alternative to coordination driven multistep

- assembly using polyphenols and  $\text{Fe}^{3+}$ . *Colloid and Interface Science Communications*, 3 :1–4, November 2014.
- [43] C. Ringwald and V. Ball. Layer-by-layer deposition of tannic acid and  $\text{Fe}^{3+}$  cations is of electrostatic nature but almost ionic strength independent at pH 5. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450 :119–126, July 2015.
- [44] V. Ball. Stabilization of [poly(allylamine)–tannic acid] $_n$  multilayer films in acidic and basic conditions after crosslinking with  $\text{NaIO}_4$ . *RSC Advances*, 5(69) :55920–55925, June 2015.
- [45] T. G. Shutava, S. S. Balkundi, and Y. M. Lvov. (–)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330(2) :276–283, February 2009.
- [46] I. Zhuk, F. Jariwala, A. B. Attygalle, Y. Wu, M. R. Libera, and S. A. Sukhishvili. Self-Defensive Layer-by-Layer Films with Bacteria-Triggered Antibiotic Release. *ACS Nano*, 8(8) :7733–7745, August 2014.
- [47] M. Krogsgaard, A. Andersen, and H. Birkedal. Gels and threads : mussel-inspired one-pot route to advanced responsive materials. *Chemical Communications*, 50(87) :13278–13281, October 2014.
- [48] M. Daglia. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2) :174–181, April 2012.
- [49] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, H.-L. Alakomi, and K.-M. Oksman-Caldentey. Bio-active berry compounds-novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1) :8–18, April 2005.
- [50] T. P. Tim Cushnie and Andrew J. Lamb. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2) :99–107, August 2011.
- [51] A. R. Blanco, A. Sudano-Roccaro, G. C. Spoto, A. Nostro, and D. Rusciano. Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10) :4339–4343, January 2005.
- [52] A. B. Howell, J. D. Reed, C. G. Krueger, R. Winterbottom, D. G. Cunningham, and M. Leahy. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*, 66(18) :2281–2291, September 2005.

- [53] L. Y. Foo, Y. Lu, A. B. Howell, and N. Vorsa. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry*, 54(2) :173–181, May 2000.
- [54] M. Nakayama, K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara, and T. Shimamura. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research*, 21(4) :289–299, August 1993.
- [55] J. M. Weber, A. Ruzindana-Umunyana, L. Imbeault, and S. Sircar. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Research*, 58(2) :167–173, April 2003.
- [56] H. Ho, M.-L. Cheng, S.-F. Weng, Y.-L. Leu, and D. T.-Y. Chiu. Antiviral Effect of Epigallocatechin Gallate on Enterovirus 71. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14) :6140–6147, July 2009.
- [57] F. Notka, G. Meier, and R. Wagner. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*, 64(2) :93–102, November 2004.
- [58] V. Martino, J. Morales, J. J. Martinez-Irujo, M. Font, A. Monge, and J. Coussio. Two ellagitannins from the leaves of *terminalia triflora* with inhibitory activity on hiv 1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research*, 18(8) :667–669, 2004.
- [59] M. Hirasawa and K. Takada. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2) :225–229, February 2004.
- [60] M. U. Yamaguchi, F. P. Garcia, D. A. G. Cortez, T. Ueda-Nakamura, B. P. D. Filho, and C. V. Nakamura. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3) :507–514, March 2011.
- [61] P.-G. Pietta. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7) :1035–1042, July 2000.
- [62] A. Neudorffer, J. P. Desvergne, D. Bonnefont-Rousselot, A. Legrand, M. B. Fleury, and M. Largeron. Protective effects of 4-hydroxycinnamic ethyl ester derivatives and related dehydrodimers against oxidation of LDL : Radical scavengers or metal chelators? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5) :1898–1905, March 2006. WOS :000236037000055.

- [63] A. S. H. Li, B. Bandy, S. S. Tsang, and A. J. Davidson. DNA-Breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radical Research*, 33(5) :551–566, 2000.
- [64] S. S. Sabharwal and P. T. Schumacker. Mitochondrial ROS in cancer : initiators, amplifiers or an Achilles’ heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11) :709–721, November 2014.
- [65] S. Aldosari, M. Awad, E. O. Harrington, F. W. Sellke, and M. R. Abid. Subcellular Reactive Oxygen Species (ROS) in Cardiovascular Pathophysiology. *Antioxidants*, 7(1) :14, January 2018.
- [66] W. R. Markesbery. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer’s disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1) :134–147, 1997.
- [67] N. Sugihara, M. Ohnishi, M. Imamura, and K. Furuno. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes. *Journal of Health Science*, 47(2) :99–106, April 2001.
- [68] F. Ursini, M. Maiorino, P. Morazzoni, A. Roveri, and G. Pifferi. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(5) :547–553, May 1994.
- [69] Y. Hanasaki, S. Ogawa, and S. Fukui. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 16(6) :845–850, June 1994.
- [70] J. S. Wright, E. R. Johnson, and G. A. DiLabio. Predicting the activity of phenolic antioxidants : Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6) :1173–1183, February 2001. WOS :000166873000018.
- [71] D. Avtanski and L. Poretsky. Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. *Molecular Medicine*, 24(1) :29, December 2018.
- [72] D. E. Ehrnhoefer, J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore, and E. E. Wanker. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(6) :558–566, June 2008.
- [73] K. Debnath, S. Shekhar, V. Kumar, N. R. Jana, and N. R. Jana. Efficient Inhibition of Protein Aggregation, Disintegration of Aggregates, and Lowering of Cytotoxicity by Green



- Tea Polyphenol-Based Self-Assembled Polymer Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(31) :20309–20318, August 2016.
- [74] P.-F. Ren, H.-C. Yang, H.-Q. Liang, X.-L. Xu, L.-S. Wan, and Z.-K. Xu. Highly Stable, Protein-Resistant Surfaces via the Layer-by-Layer Assembly of Poly(sulfobetaine methacrylate) and Tannic Acid. *Langmuir*, 31(21) :5851–5858, June 2015.
- [75] Y.-N. Zhao, J. Gu, S. Jia, Y. Guan, and Y. Zhang. Zero-order release of polyphenolic drugs from dynamic, hydrogen-bonded LBL films. *Soft Matter*, 12(4) :1085–1092, 2016.
- [76] L. Zhou, M. Chen, L. Tian, Y. Guan, and Y. Zhang. Release of Polyphenolic Drugs from Dynamically Bonded Layer-by-Layer Films. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(9) :3541–3548, May 2013.
- [77] T. E. L. Douglas, A. Dokupil, K. Reczynska, G. Brackman, J. K. Keppler, M. Bozic, P.I Van Der Voort, K.f Pietryga, S. K.i Samal, L. Balcaen, J. van den Bulcke, J. Van Acker, F. Vanhaecke, K. Schwarz, and E. Pamula. Enrichment of enzymatically mineralized gellan gum hydrogels with phlorotannin-rich Ecklonia cava extract Seanol ® to endow antibacterial properties and promote mineralization. *Biomedical Materials*, 11(4) :045015, 2016.
- [78] S. Vakilian, M. Norouzi, M. Soufi-Zomorrod, I. Shabani, S. Hosseinzadeh, and M. Soleimani. L. inermis-loaded nanofibrous scaffolds for wound dressing applications. *Tissue and Cell*, 51 :32–38, April 2018.
- [79] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, and C. Silan. Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 142 :334–343, June 2016.
- [80] N. Sahiner, S. Sagbas, and N. Aktas. Single step natural poly(tannic acid) particle preparation as multitalented biomaterial. *Materials Science and Engineering : C*, 49 :824–834, April 2015.
- [81] E. Talon, K. T. Trifkovic, M. Vargas, A. Chiralt, and C. González-Martínez. Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers*, 175 :122–130, November 2017.
- [82] Z. Kalaycioğlu, E. Torlak, G. Akın-Evingür, I. Özen, and F. B. Erim. Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101 :882–888, August 2017.

- [83] D.-S. Lee, J.-Y. Woo, C.-B. Ahn, and J.-Y. Je. Chitosan–hydroxycinnamic acid conjugates : Preparation, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 148 :97–104, April 2014.
- [84] Q. Hu and Y. Luo. Polyphenol-chitosan conjugates : Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 151 :624–639, October 2016.
- [85] S. Singh, K. K. Gaikwad, and Y. S. Lee. Antimicrobial and antioxidant properties of polyvinyl alcohol bio composite films containing seaweed extracted cellulose nano-crystal and basil leaves extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107 :1879–1887, February 2018.
- [86] L. Floroian, C. Ristoscu, G. Candiani, N. Pastori, M. Moscatelli, N. Mihailescu, I. Negut, M. Badea, M. Gilca, R. Chiesa, and I. N. Mihailescu. Antimicrobial thin films based on ayurvedic plants extracts embedded in a bioactive glass matrix. *Applied Surface Science*, 417 :224–233, September 2017.
- [87] M. Ruiz-Rico, E. Perez-Esteve, A. Bernardos, F. Sancenon, R. Martinez-Manez, M. D. Marcos, and J. M. Barat. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233 :228–236, October 2017.
- [88] T. A. Vico, V. B. Arce, M. F. Fangio, L. B. Gende, C. A. Bertran, D. O. Martire, and M. S. Churio. Two choices for the functionalization of silica nanoparticles with gallic acid : characterization of the nanomaterials and their antimicrobial activity against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(11) :348, November 2016.
- [89] J. Park, S. Choi, H. Moon, H. Seo, J. Kim, S.-P. Hong, B. Lee, E. Kang, J. Lee, D. Ryu, and I. S. Choi. Antimicrobial spray nanocoating of supramolecular Fe(III)-tannic acid metal-organic coordination complex : applications to shoe insoles and fruits. *Scientific Reports*, 7(1) :6980, August 2017.
- [90] X. Wang, W. Cao, Q. Xiang, F. Jin, X. Peng, Q. Li, M. Jiang, B. Hu, and X. Xing. Silver nanoparticle and lysozyme/tannic acid layer-by-layer assembly antimicrobial multilayer on magnetic nanoparticle by an eco-friendly route. *Materials Science and Engineering : C*, 76 :886–896, July 2017.
- [91] X. Yang, P. Huang, H. Wang, S. Cai, Y. Liao, Z. Mo, X. Xu, C. Ding, C. Zhao, and J. Li. Antibacterial and anti-biofouling coating on hydroxyapatite surface based on peptide-modified tannic acid. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 160 :136–143, December 2017.

- [92] Q. Huang, L. Hao, J. Xie, T. Gong, J. Liao, and Y. Lin. Tea Polyphenol–Functionalized Graphene/Chitosan as an Experimental Platform with Improved Mechanical Behavior and Bioactivity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(37) :20893–20901, September 2015.
- [93] J. C. Shiu, M.-H. Ho, S.-H. Yu, A.-C. Chao, Y.-R. Su, W.-J. Chen, and W. P. Chiang, Z.-Cand Yang. Preparation and characterization of caffeic acid grafted chitosan/CPTMS hybrid scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, 79(3) :724–730, February 2010.
- [94] J. McColl, R. Horvath, A. Aref, L. Larcombe, I. Chianella, S. Morgan, G. E. Yakubov, and J. J. Ramsden. Polyphenol Control of Cell Spreading on Glycoprotein Substrata. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(5-6) :841–851, January 2009.
- [95] L. Yang, L. Han, and L. Jia. A Novel Platelet-Repellent Polyphenolic Surface and Its Micropattern for Platelet Adhesion Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(40) :26570–26577, October 2016.
- [96] Y.-S. Kwon, H.-J. Kim, Y.-C. Hwang, V. Rosa, M.-K. Yu, and K.-S. Min. Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. *Journal of Endodontics*, 43(2) :289–296, February 2017.
- [97] V. Natarajan, N. Krithica, B. Madhan, and P. K. Sehgal. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, 101B(4) :560–567, 2013.
- [98] G. Lan, B. Lu, T. Wang, L. Wang, J. Chen, K. Yu, J. Liu, F. Dai, and D. Wu. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 136 :1026–1034, December 2015.
- [99] L. G. Jordan and B. W. Booth. HER2(+) breast cancer cells undergo apoptosis upon exposure to tannic acid released from remodeled cross-linked collagen type I. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(1) :26–32, January 2018.
- [100] T. G. Shutava, S. S. Balkundi, P. Vangala, J. J. Steffan, R. L. Bigelow, J. A. Cardelli, D. P. O’Neal, and Y. M. Lvov. Layer-by-Layer-Coated Gelatin Nanoparticles as a Vehicle for Delivery of Natural Polyphenols. *ACS Nano*, 3(7) :1877–1885, July 2009.
- [101] J. Li, S. Wu, C. Wu, L. Qiu, G. Zhu, C. Cui, Y. Liu, W. Hou, Y. Wang, L. Zhang, I.-t. Teng, H.-H. Yang, and W. Tan. Versatile surface engineering of porous nanomaterials

- with bioinspired polyphenol coatings for targeted and controlled drug delivery. *Nanoscale*, 8(16) :8600–8606, April 2016.
- [102] V. Kozlovskaya, O. Zavgorodnya, Y. Chen, K. Ellis, H. M. Tse, W. Cui, J. A. Thompson, and E. Kharlampieva. Ultrathin Polymeric Coatings Based on Hydrogen-Bonded Polyphenol for Protection of Pancreatic Islet Cells. *Advanced Functional Materials*, 22(16) :3389–3398, 2012.
- [103] Y.-J. Kim, M. R. Park, M. S. Kim, and O. H. Kwon. Polyphenol-loaded polycaprolactone nanofibers for effective growth inhibition of human cancer cells. *Materials Chemistry and Physics*, 133(2) :674–680, April 2012.
- [104] M. J. Roman, E. A. Decker, and J. M. Goddard. Biomimetic polyphenol coatings for antioxidant active packaging applications. *Colloid and Interface Science Communications*, 13 :10–13, July 2016.
- [105] N. Bellotti, C. Deyá, B. del Amo, and R. Romagnoli. Antifouling Paints with Zinc “Tannate”. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(7) :3386–3390, April 2010.
- [106] M. Pérez, G. Blustein, M. García, B. del Amo, and M. Stupak. Cupric tannate : A low copper content antifouling pigment. *Progress in Organic Coatings*, 55(4) :311–315, April 2006.
- [107] J. L. Whittaker, S. Subianto, N. K. Dutta, and N. R. Choudhury. Induced insolubility of electrospun poly(N-vinylcaprolactam) fibres through hydrogen bonding with Tannic acid. *Polymer*, 87 :194–201, March 2016.
- [108] J. Guo, B. L. Tardy, A. J. Christofferson, Y. Dai, J. J. Richardson, W. Zhu, M. Hu, Y. Ju, J. Cui, R. R. Dagastine, I. Yarovsky, and F. Caruso. Modular assembly of superstructures from polyphenol-functionalized building blocks. *Nature Nanotechnology*, 11(12) :1105–1111, December 2016.

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

### Sommaire

---

2.1	Matériel . . . . .	64
2.2	Electrospinning . . . . .	67
2.3	Microscopie électronique à balayage . . . . .	103
2.4	Microscopie électronique en transmission et cryo-TEM . . . . .	103
2.5	Spectroscopie Raman . . . . .	105
2.6	Mesure de la tension superficielle et des angles de contact . . . . .	107
2.7	Diffusion dynamique de la lumière . . . . .	109
2.8	Rhéologie : mesure de la viscosité . . . . .	111
2.9	Spectroscopie UV-visible . . . . .	114
2.10	Traitement plasma . . . . .	118
2.11	Microbalance à cristal de quartz . . . . .	119
2.12	Microscopie à force atomique . . . . .	123
2.13	Ellipsométrie . . . . .	125
2.14	Spectroscopie par dichroïsme circulaire . . . . .	126
2.15	Microscopies utilisant la fluorescence . . . . .	128
2.16	Tests biologiques . . . . .	133
	Bibliographie . . . . .	136

---

## 2.1 Matériel

Tous les produits chimiques ayant servi dans cette thèse ont été utilisés sans purification. Les solutions ont été préparées à l'aide d'eau ultra pure Milli Q (Milli Plus, Millipore, Billerica).

### 2.1.1 Polyphénol

Polyphénol	Masse molaire	Référence	Fournisseur
Acide tannique	1700 Da	403040	Sigma-Aldrich

TABLE 2.1 – Polyphénol utilisé

### 2.1.2 Polymères utilisés pour l'électrospinning

Polymère	Masse molaire	Référence	Fournisseur
Acide poly-lactique (PLA)	180 kDa	5000D	Nature Works
Poly-caprolactone (PCL)	14 kDa	440752	Sigma-Aldrich

TABLE 2.2 – Liste des polymères utilisés pour l'électrospinning

### 2.1.3 Solvants utilisés pour l'électrospinning

Solvant	Fournisseur
Dichlorométhane (DCM)	Sigma-Aldrich
Diméthylformamide (DMF)	TCI
Ethanol absolu	Sigma-Aldrich
N,N-Diméthylacétamide (DMAC)	Sigma-Aldrich

TABLE 2.3 – Liste des solvants utilisés pour l'électrospinning

Le PLA utilisé pour obtenir des fibres électrospinnées de PLA a été dissous pour obtenir une solution avec une masse totale en PLA de 10% dans un mélange DCM/DMF 50/50 volume/volume. Le PCL a été dissous à différentes concentrations dans du DMAC. L'AT lors de l'électrospinning de fibres d'AT a été dissous à différentes concentrations dans de l'eau pure et dans différents mélange eau-éthanol.

#### 2.1.4 Oxydant

Oxydant	Référence	Fournisseur
Périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ )	71859	Sigma-Aldrich

TABLE 2.4 – Oxydant utilisé pour réticuler les matériaux contenant de l'acide tannique

Dans la partie sur les films multicouches, la solution de  $\text{NaIO}_4$  utilisée pour réticuler les films a été préparée dans le tampon acétate à une concentration de 10 mM.

#### 2.1.5 Solution contenant des ions métalliques

Poudre	Référence	Fournisseur
Nitrate de fer III	202492500	Acros Organics

TABLE 2.5 – Produit utilisé pour la complexation métallique

Le nitrate de fer utilisé pour la complexation de l'AT avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  a été dissous dans l'eau pour obtenir une masse totale en nitrate de fer de 30 et 40%.

#### 2.1.6 Tampons

Tampon	Concentration	pH	Référence	Fournisseur
Acétate de sodium anhydre	50 mM	5	W302406	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxyméthyl-aminométhane (Tris))	50 mM	8,5	200923-A	Euromedex
Bicine	100 mM	7,4	B3876	Sigma-Aldrich

TABLE 2.6 – Liste des tampons utilisés

Le pH des tampons a été ajusté à l'aide de solutions de HCl à 1M et NaOH à 1M.

### 2.1.7 Enzymes et substrat utilisés pour la construction des films multicouches

Enzyme/substrat	point isoélectrique	Référence	Fournisseur
Phosphatase alcaline (ALP)	4,4-5,8	P7640	Sigma-Aldrich
Lysozyme	11	L6876	Sigma-Aldrich
para-nitrophényl-phosphate (pNPP)		N7653	Sigma-Aldrich

TABLE 2.7 – Enzymes et substrat utilisés pour la construction des films multicouches

Lors de la construction des films multicouches, l'ALP, l'AT et le LYS ont été dissous dans le tampon acétate à une concentration de 1 mg/mL. Pour les tests enzymatiques, la solution de pNPP a été diluée dans le tampon Tris.



## 2.2 Electrospinning

### 2.2.1 Historique du procédé d'électrospinning

L'électrospinning (contraction de « electrostatic » et « spinning ») ou électrofilage est un procédé permettant de mettre en forme une solution de polymères en fibres de quelques micromètres à quelques nanomètres de diamètre sous l'action d'un champ électrique. Même si la technique est déjà connue et étudiée depuis le début du 20ème siècle, elle ne prend réellement son essor dans le monde de la recherche que dans les années 1990.

C'est au 17ème siècle qu'est décrite pour la première fois la déformation d'une goutte sous la forme d'un cône grâce à l'attraction électrique [1][2]. En 1745, la formation d'aérosols par l'application d'une haute tension électrique à des gouttes de liquides est décrite par G.M. Bose [3]. Lord Rayleigh à la fin du 19ème siècle a mis en évidence le nombre de charges nécessaires pour s'opposer à la tension de surface d'une goutte. Il a aussi beaucoup travaillé sur les instabilités des jets [4] [5].

Un premier brevet est publié en 1902 par J.F. Cooley [6] pour un dispositif de dispersion d'un fluide sous l'action d'un champ électrostatique (voir figure 2.1). Entre 1934 et 1944, Anton Formhals participe grandement au développement de la technique en publiant 22 brevets notamment sur la production de filament d'acétate de cellulose pour le textile [7] [8]. Néanmoins, à cause de la 2nde Guerre Mondiale, ses brevets ont du mal à être commercialisés. En URSS, I.V. Petryanov à la même époque, étudie la fabrication de fibres électrospinnées pour la filtration. Ces fibres sont utilisées pour la fabrication de masque à gaz, aussi appelés "filtres Petryanov". Il s'agit ainsi du premier produit à base de fibres électrospinnées mis sur le marché [9]. Dans les années 1960, Sir Taylor travaille sur la théorie de l'électrospinning. En 1964, il publie un article sur la modélisation mathématique de la forme du cône formé par la goutte de liquide sous l'effet du champ électrique [10]. Ce cône est ainsi nommé cône de Taylor. Au début des années 1990, de nombreux groupes de recherche commencent à travailler sur ce procédé. En 1995, Reneker publie un article où est utilisé pour la première fois le mot "electrospinning" qui est la contraction des mots "electrostatic" et "spinning" [11]. Après ces travaux, le nombre de publications sur l'électrospinning n'a cessé d'augmenter.

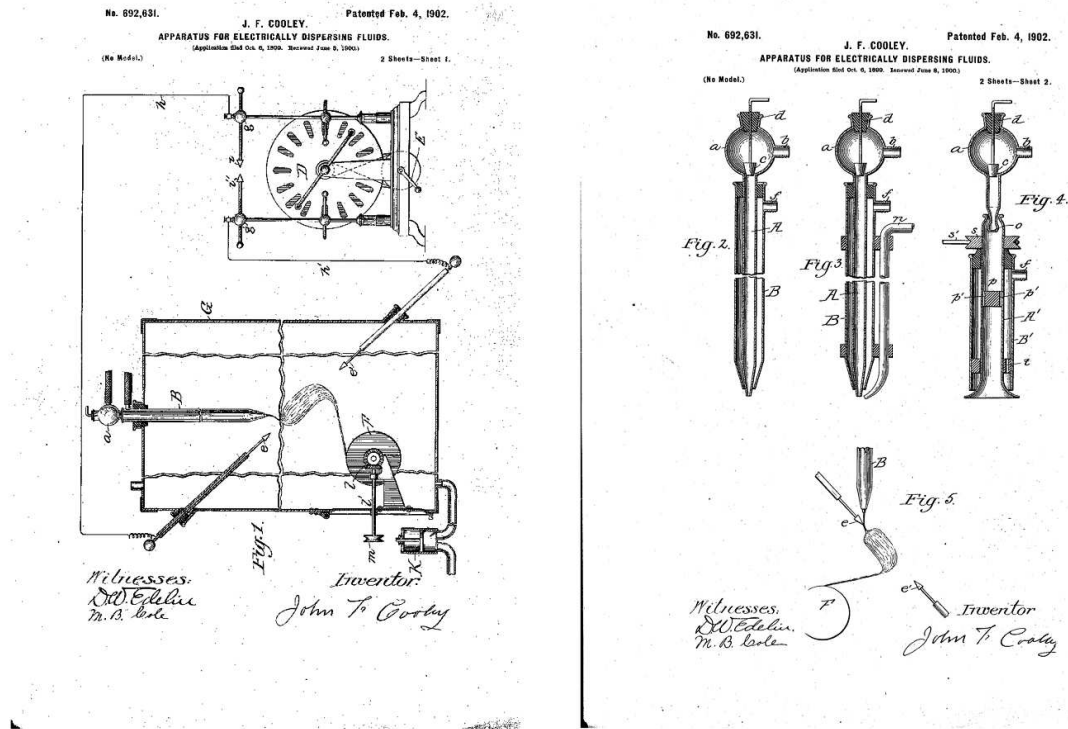


FIGURE 2.1 – Extrait du brevet de J.F. Cooley pour un dispositif de dispersion d'un fluide sous l'action d'un champ électrostatique [6].

### 2.2.2 Principe de l'électrospinning

L'électrospinning est une technique simple à mettre en place. Elle nécessite une alimentation haute tension, un pousse-seringue, une aiguille et un collecteur, rotatif ou non (voir figure 2.2).

Une solution de polymère en régime semi dilué enchevêtré [12] est amenée jusqu'à l'extrémité d'une aiguille de centaines de  $\mu\text{m}$  de diamètre, le plus souvent en métal. Une forte tension, allant du kilovolt (kV) à la dizaine de kV est appliquée entre cette aiguille, qui sert ainsi d'électrode, et un collecteur [11]. La goutte de solution de polymère formée à l'extrémité de l'aiguille, maintenue grâce à la tension de surface, devient ainsi chargée à sa surface. Elle est alors soumise à deux types de forces électrostatiques : les forces de répulsion liées aux charges à la surface de la goutte et les forces de Coulomb exercées par le champ électrique externe. La goutte se déforme alors pour former ce que l'on appelle le cône de Taylor [10] (voir figure 2.3). Quand le champ électrique  $E$  appliqué atteint une certaine valeur [13], les forces électrostatiques peuvent contrebalancer la tension de surface ce qui permet la formation d'un jet très fin (voir l'équation 2.1 où  $\gamma$  est la tension de surface de la solution,  $R$  est le rayon de courbure de la

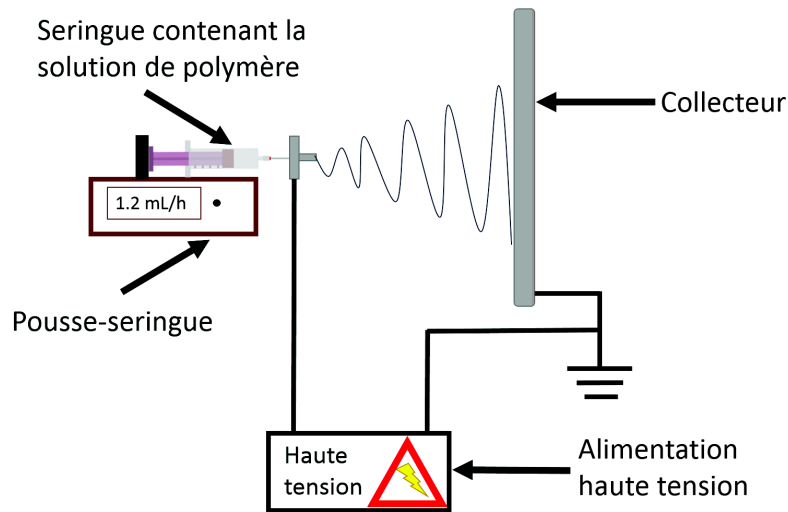


FIGURE 2.2 – Schéma du montage d'une cabine d'électrospinning

goutte,  $\varepsilon$  la permittivité du vide). Le jet, qui subit un mouvement de fouet, se dépose sur le collecteur. Entre l'aiguille et le collecteur, le solvant s'évapore ce qui permet le dépôt de fibres sèches de polymère solides de diamètre micrométrique ou nanométrique.

$$E = \sqrt{\frac{4\gamma}{R\varepsilon}} \quad (2.1)$$

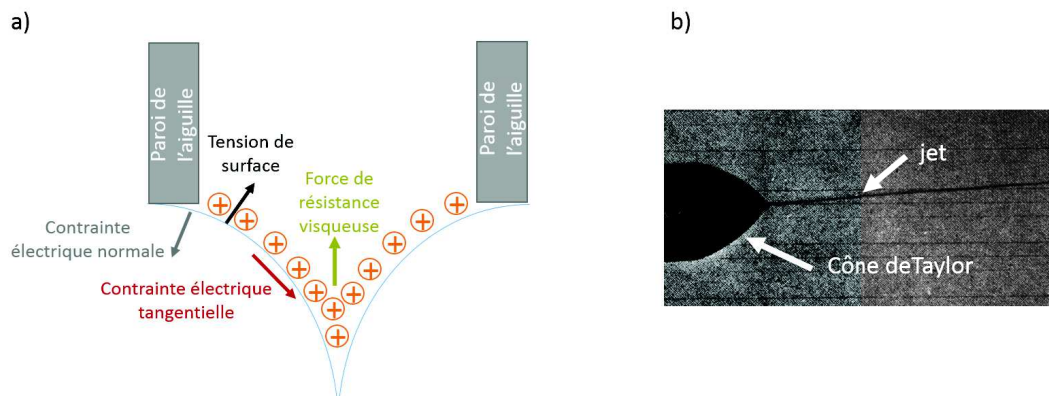


FIGURE 2.3 – a) Schéma des forces à la surface de la solution de polymère b) Photographie d'un cône de Taylor et d'un jet pour une solution de glycérine

De nombreux paramètres influencent le procédé de l'électrospinning. Trois grandes catégories de paramètre peuvent être établies : les paramètres liés à la solution ; les paramètres liés au

procédé et les conditions extérieures [14].

### 2.2.3 Influence des paramètres liés à la solution

#### Influence du choix du polymère

Le polymère est le premier paramètre à choisir lors de la mise en œuvre de l'électrospinning. En principe, n'importe quel polymère soluble ou fusible peut être électrospinné si les autres paramètres (concentration, viscosité, tension de surface, conductivité, température, humidité relative, paramètres du procédé) détaillés plus loin sont correctement ajustés. Le choix du polymère dépend des propriétés souhaitées du matériau final (propriétés mécaniques, électriques, chimiques, biologiques...). L'importance des conditions de réalisation du procédé peut aussi intervenir, par exemple, aujourd'hui, la possibilité d'électrospinner dans l'eau est de plus en plus souhaitée pour palier à l'utilisation de solvants toxiques ou dangereux pour l'environnement. Une fois, le polymère choisi, de nombreux autres paramètres sont à ajuster.

#### Influence de la concentration en polymère, de la viscosité et de l'enchevêtrement

La concentration du polymère dans la solution est un paramètre clé dans l'électrospinning. Plus une solution est concentrée en polymère, plus la viscosité est grande. Un paramètre prépondérant a été défini : le nombre de Berry  $[\eta]C$  avec  $[\eta]$  la viscosité intrinsèque du polymère dans un solvant donné et  $C$ , la concentration du polymère dans ce solvant. Koski et al. [15] ont étudié l'électrospinning de l'alcool polyvinylique (PVA) à différents poids moléculaires. Des fibres continues sont obtenues lorsque le polymère est en régime semi-dilué enchevêtré. Pour ce polymère, les conditions d'obtention de différentes morphologies ont été évaluées de manière expérimentale (voir figure 2.4) pour différents  $[\eta]C$  :

- $[\eta]C > 5$  : des fibres continues sont obtenues ;
- $[\eta]C > 9$  : des fibres continues plates ou rubans sont obtenus ;
- $[\eta]C \ll 4$  : un jet discontinu apparaît, on parle alors d'électrospray.

L'électrospinning de la poly-caprolactone (PCL) est un autre exemple de polymère dont la morphologie a été étudiée par Lavielle et al [16]. Les différentes zones de morphologie ainsi que le diamètre des fibres ont été étudiés en fonction du paramètre  $[\eta]C$  (voir figure 2.5). Pour  $[\eta]C$  inférieur à 3, des particules de PCL sont obtenues. Pour  $[\eta]C$  compris entre 3 et 10 des fibres avec des perles sont obtenues. Pour  $[\eta]C$  qui vaut entre 10 et 21, des fibres continues

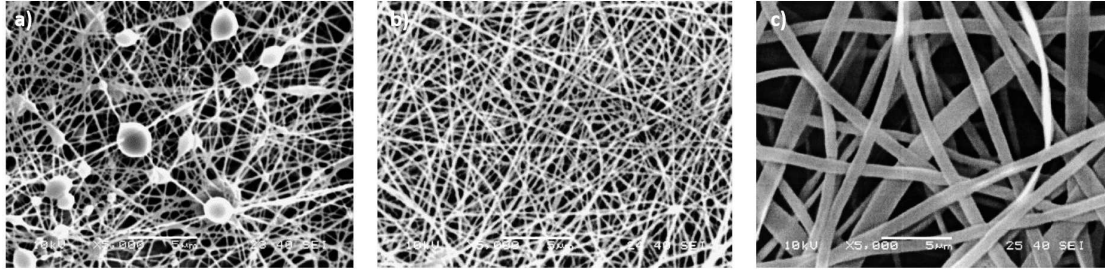


FIGURE 2.4 – Différentes morphologies obtenues pour du PVA : (a) Fibres perlées, (b) Fibres continues (c) Fibres plates ou rubans, d’après Koski et al. [15].

sont obtenues. Au delà de 21, la viscosité devient trop grande et empêche l’électrospinning. Un modèle a été calculé pour prédire le diamètre des fibres,  $\varnothing$  en fonction de  $[\eta]C$  :

$$\varnothing(nm) = 4.2([\eta]C)^{1.5} \quad (2.2)$$

Shenoy et al. [12] ont étudié différents couples de solvant/polymère électrospinnés dans la littérature (polystyrène/tétrahydrofurane ; oxyde de polyéthylène/eau ; acide poly-D,L-lactique (PDLA)/diméthylformamide (DMF) ; acide poly-L-lactique (PLLA) /dichlorométhane (DCM) ; PLLA/chloroforme ; PLLA/tétrachloroéthane ; polyvinylpyrrolidone (PVP)/éthanol) afin d’établir le rôle de l’enchevêtrement dans l’électrospinning. Il apparaît de cette étude de couples assez hétérogènes, que pour avoir des fibres continues et un électrospinning stable, il faut avoir au moins 2,5 enchevêtrements par chaînes de polymère.

### Influence du poids moléculaire du polymère

Le poids moléculaire du polymère utilisé est un paramètre qui peut influencer les caractéristiques de la solution : la viscosité, la tension de surface, la conductivité ou encore la rigidité diélectrique (rapport entre la tension à laquelle se produit une perte des propriétés isolantes et la distance entre les deux électrodes de part et d’autre du polymère auxquelles est appliquée la tension) [17]. Généralement des polymères de haut poids moléculaires sont utilisés lors de l’électrospinning pour pouvoir les utiliser à faible concentration et conserver un enchevêtrement suffisant. Gupta et al. [18] ont étudié l’influence du poids moléculaire ( $M_w$ ) de poly(méthacrylate de méthyl) en le faisant varier entre 12 500 et 365 000 g/mol. La concentration critique de recouvrement,  $C^*$  pour chaque poids moléculaire a été déterminée. Le régime semi-dilué enchevêtré

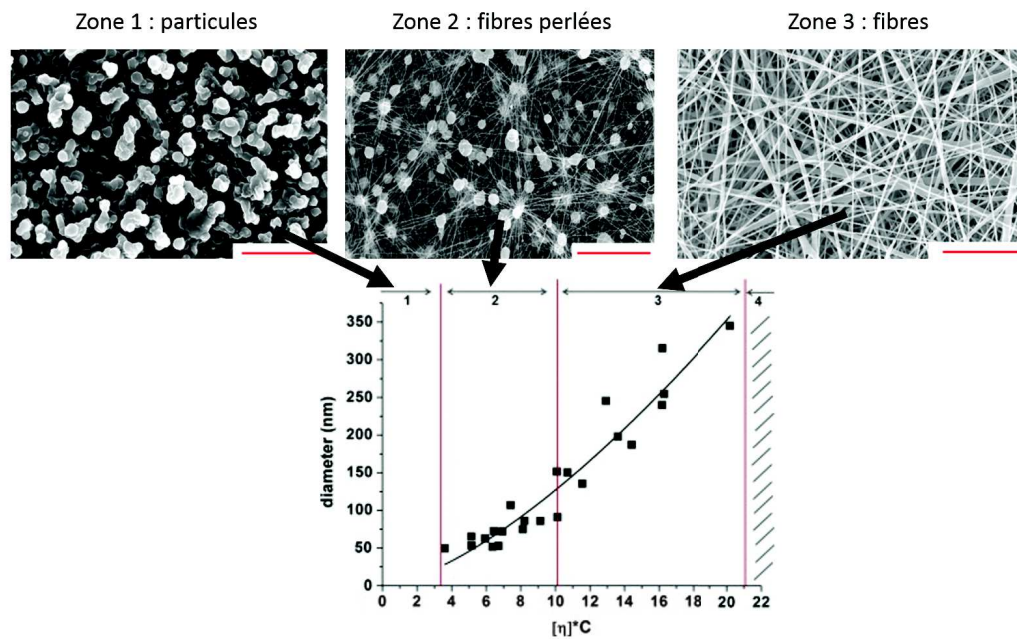


FIGURE 2.5 – Les trois zones de morphologie du PCL en fonction de  $[\eta]C$ . Zone 1 : électrospray, seules des particules sont obtenues. Zone 2 : des fibres perlées sont obtenues. Zone 3 : des fibres continues sont obtenues. Zone 4, au delà de  $[\eta]C$  qui vaut 21, la viscosité est trop forte et empêche l'électrospinning. La courbe en noir correspond au modèle qui relie le diamètre attendu des fibres en fonction du paramètre  $[\eta]C$ , d'après Lavielle et al. [16].

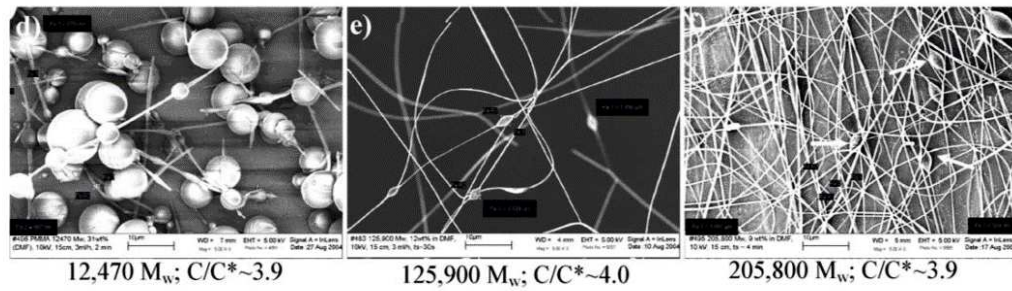


FIGURE 2.6 – Influence du poids moléculaire sur le nombre de perles dans le régime semi dilué enchevêtré, [18].

apparaît pour une concentration  $C$  en polymère où  $C/C^* > 3$ . Pour les poids moléculaires de 34 000 et 95 000 g/mol, des fibres homogènes ne sont obtenues qu'à partir d'une concentration  $C$  où  $C/C^* > 10$ . Tandis que pour les autres poids moléculaires, des fibres homogènes apparaissent à partir de  $C/C^* > 6$ . Pour ces poids moléculaires, le nombre de perles semble diminuer avec l'augmentation du poids moléculaire (voir figure 2.6). Par ailleurs, pour les poids moléculaires : 34 000 et de 95 000 g/mol, pour lesquels il n'était possible d'obtenir des fibres qu'à partir de  $C/C^* > 10$ , un autre critère a été étudié : la dispersité  $M_w/M_n$  (avec  $M_w$  : la masse molaire moyenne en masse et  $M_n$  : la masse molaire moyenne en nombre). Les polymères de poids moléculaires moyens 34 000 et 95 000 g/mol possèdent une dispersité (1,62 et 2,12 respectivement) plus grande que les autres (1,03 pour les polymères de  $M_w$  : 12 500 et 18 000 g/mol). Ce paramètre semble ainsi expliquer pourquoi il faut une concentration plus élevée pour obtenir des fibres continues (voir figure 2.7).

Le poids moléculaire est à prendre en compte lors de la mise en place de l'électrospinning. Il faut s'assurer de travailler à une concentration permettant un enchevêtrement suffisant entre les molécules de polymère.

### Influence de la tension de surface

La tension de surface est un paramètre qui dépend essentiellement du solvant utilisé. Comme nous l'avons vu précédemment, la tension appliquée doit être suffisante pour contrebalancer la tension de surface. Cependant, de manière générale, une trop forte tension de surface peut empêcher l'électrospinning à cause d'instabilités dans le jet [19]. La tension de surface joue un rôle dans la formation de gouttes, de perles ou de fibres. Une tension de surface de la solution



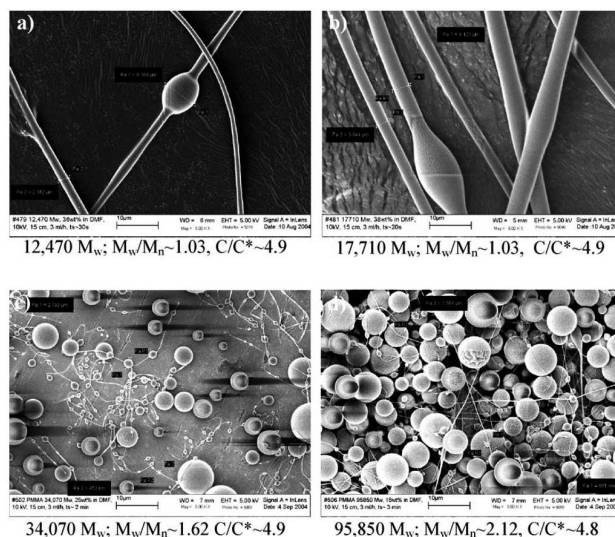


FIGURE 2.7 – Influence de la dispersité dans l’obtention de fibres continues. Pour un même  $C/C^*$ , des fibres sont obtenues pour des polymères de 12 500 g/mol et 18 000 g/mol tandis que pour des polymères de 34 000 et 96 000 g/mol seules des perles sont obtenues. Ces deux polymères ont une dispersité plus élevée que les autres, d’après Gupta et al. [18].

d’électrospinning plus faible, permet de travailler à des tensions électriques plus basses et de diminuer la probabilité de former des perles ou des particules [20]. L’ajout de surfactant permet de diminuer la tension de surface d’une solution et de modifier le procédé d’électrospinning. Yao et al. [21] par exemple, ont réussi à électrospinner une solution de PVA totalement hydrolysé en ajoutant du Triton (T), un surfactant non ionique. Sans l’ajout de T, la tension de surface était trop élevée et avec le montage disponible, seules des particules étaient obtenues lors de l’électrospinning de la solution de PVA.

### Influence de la volatilité du solvant

Il apparaît à première vue que la vitesse d’évaporation du solvant ne doit pas être trop grande sinon un bouchon se forme à l’extrémité de l’aiguille, empêchant la formation d’un jet. Au contraire, une évaporation du solvant incomplète empêche la solidification des nanofibres. Par ailleurs, une forte volatilité du solvant peut aussi entraîner une séparation de phase et une porosité dans les fibres électrospinnées. Luo et al. [22] ont ainsi électrospinné du polyméthylsilsesquioxane (PMSQ) dans différents solvants et mélanges de solvant. Dans un mélange méthanol-propanol, des pores sont apparus dans les fibres de PMSQ (voir figure 2.8).



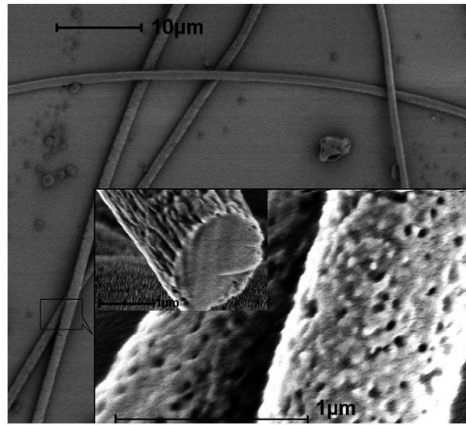


FIGURE 2.8 – Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de poly-méthylsilsesquioxane dans un mélange méthanol-propanol pour un ratio en volume 2/3, d'après Luo et al. [22].

Properties of PVA solution								
Sample no.	PVA (g)	DH of PVA (%)	H <sub>2</sub> O (ml)	NaCl (g)	Ethanol (ml)	Viscosity (Pas)	Surface tension (mN/m)	Conductivity (mS/cm)
1	6	98	94			0.075	66.81	0.55
2	6.5	98	93.5			0.120	65.89	0.56
3	7	98	93			0.155	67.49	0.54
4	8	98	92			0.232	65.36	0.58
5	8	98	100	0.05		0.210	67.06	1.53
6	8	98	100	0.10		0.190	68.16	2.01
7	8	98	100	0.15		0.200	67.79	2.75
8	8	98	100	0.20		0.200	65.96	10.5

FIGURE 2.9 – Tableau des conditions de préparation de solution de PVA avec ajout de NaCl, d'après Zhang et al. [20].

### Influence des propriétés diélectriques et de la conductivité de la solution

La conductivité dépend du polymère et des solvants utilisés ainsi que de la présence de sels. Quand la conductivité électrique d'une solution augmente, le diamètre des fibres diminue considérablement. Si la conductivité d'une solution est faible, l'élongation du jet par les forces électriques est trop faible pour obtenir des fibres homogènes et des perles peuvent être observées. Zhang et al. [20] ont étudié l'effet d'ajout de NaCl pour l'électrospinning de PVA (alcool polyvinylique). Même un faible ajout de NaCl dans la solution augmente la conductivité de la solution (voir figure 2.9). Ainsi un ajout de 0,05%mt (masse totale) de NaCl fait augmenter la conductivité de 0,58 mS/cm à 1,53 mS/cm (échantillon 5) et un ajout de 0,2%mt de NaCl donne une conductivité de 10,5 mS/cm (échantillon 8).

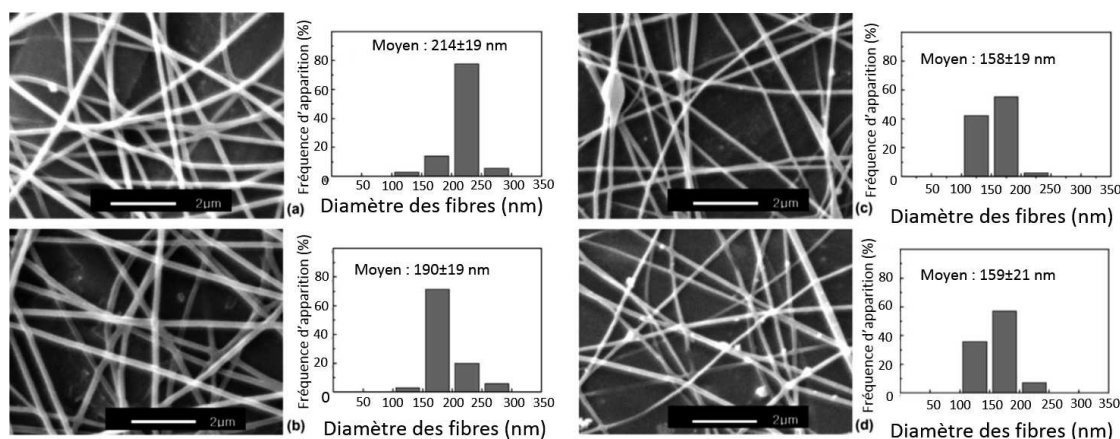


FIGURE 2.10 – Images MEB et diamètre des fibres de PVA obtenues avec ajout de NaCl : a) 0,05%mt de NaCl, b) 0,10%mt de NaCl, c) 0,15%mt de NaCl, d) 0,2%mt de NaCl; d'après Zhang et al. [20].

Le diamètre des fibres obtenues dans les mêmes conditions a ensuite été mesuré (voir figure 2.10). L'ajout de NaCl permet de diminuer le diamètre des fibres qui passe de  $214 \pm 19$  nm pour 0,02%mt de NaCl à  $159 \pm 21$  nm pour 0,2%mt de NaCl dans la solution. L'ajout de NaCl permet d'augmenter la densité de charge dans la solution ce qui permet d'augmenter la force d'étirement exercée sur le jet entraînant une diminution du diamètre des fibres.

Zong et al. [23] ont étudié l'ajout de sels de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), de dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) et de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) dans une solution de PDLA à 30% mt (30 % en masse totale). Les sels ont chacun été ajouté à 1%mt dans la solution. L'ajout de sel modifie la morphologie des fibres (voir figure 2.11). Alors que sans sel, de gros défauts sont présents dans les fibres (image 2.11 a), les défauts sont largement moins abondants avec l'ajout de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (image 2.11 b) et des fibres sans défaut sont obtenues avec l'ajout de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et de  $\text{NaCl}$  (image 2.11 c et d). La répartition des diamètres est unimodale lors de l'ajout de  $\text{NaCl}$  et de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Le diamètre moyen des fibres est plus faible avec l'ajout de sels : 210 nm lors de l'ajout de  $\text{NaCl}$ , 330 nm avec l'ajout de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 1000 nm avec ajout de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La taille des ions, en plus de la densité de charge, apparaît ainsi être un critère qui influence le diamètre des fibres. Les ions avec le plus petit rayon atomique ont une plus grande densité de charge et une plus grande mobilité sous l'action d'un champ électrique externe. Les ions sodium et chlorure sont les plus petits. Ainsi, la force d'élongation imposée au jet avec l'ajout de  $\text{NaCl}$  est plus grande ce qui explique pourquoi le diamètre est beaucoup

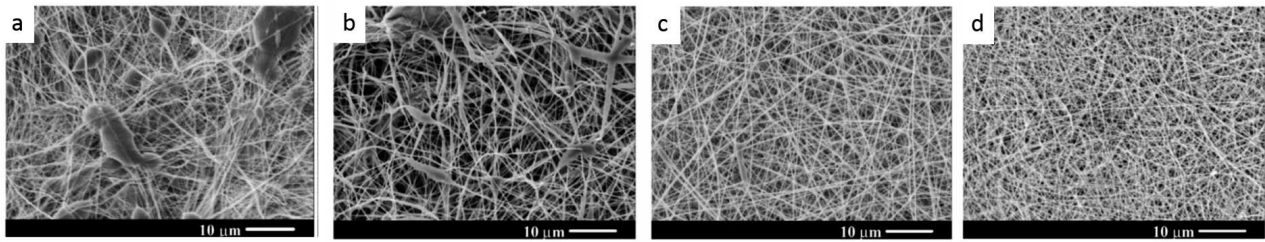


FIGURE 2.11 – Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de PDLA avec ajout de sel a) sans sel b) avec ajout de 1%mt de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , c) avec ajout de 1%mt de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  d) avec ajout de 1%mt de  $\text{NaCl}$ ; d'après Zong et al. [23].

plus petit qu'avec les deux autres sels.

L'ajout de sels permet ainsi d'augmenter l'homogénéité des fibres et de diminuer le diamètre des fibres.

## 2.2.4 Influence des paramètres du procédé

### Influence de la tension appliquée

La tension appliquée apparaît être un paramètre crucial puisqu'il faut atteindre un certain seuil de tension pour initier le jet. Cependant, le rôle que joue la tension appliquée sur le procédé est discuté. Certains suggèrent que, quand une plus forte tension est appliquée, plus de polymère est éjecté ce qui facilite l'obtention de diamètres de fibre plus grands. Tandis que d'autres ont montré qu'une augmentation de la tension appliquée permettait de diminuer le diamètre des fibres.

L'influence de la tension appliquée a été étudiée par Zhang et al. sur des fibres de PVA [20]. Tous les autres paramètres étant maintenus constants, la tension a été variée entre 5 et 13 kV. Le diamètre des fibres ainsi que la répartition ont été mesurés (voir figure 2.12). Tout d'abord, l'augmentation de la tension semble augmenter légèrement le diamètre moyen des fibres qui passe de 218 nm pour une tension de 5 kV à 254 nm pour une tension de 13 kV. Par ailleurs, un nombre important de fibres de diamètres inférieurs à 150 nm est obtenu quand la tension appliquée est de 10-13 kV alors qu'il n'y en a pas pour les tensions 5-8kV. De plus, la répartition des diamètres pour les tensions 10 et 13 kV est beaucoup plus large que pour les tensions de 5 et 8kV. Les auteurs suggèrent que deux phénomènes aux conséquences opposées expliquent ces résultats. Augmenter la tension appliquée augmente les forces électrostatiques de répulsion

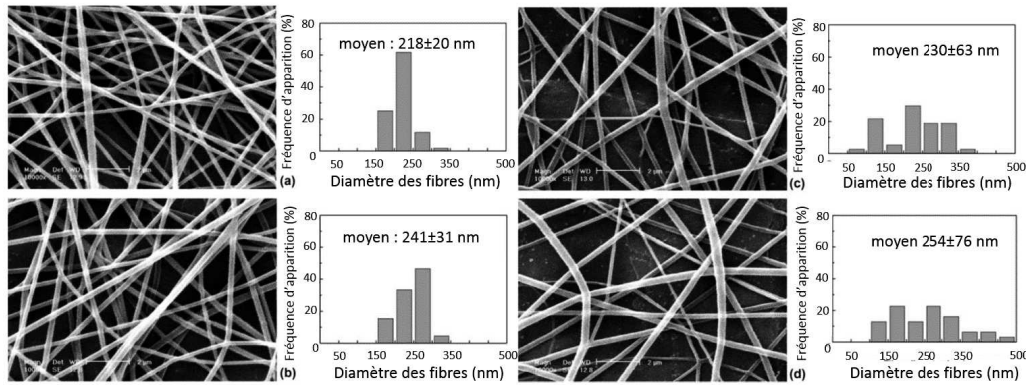


FIGURE 2.12 – Images de microscopie électronique à balayage de fibres électrospinnées de PVA et répartition des diamètres pour des fibres de PVA en modifiant la tension appliquée (a) 5 kV ; (b) 8 kV ; (c) 10kV (d) 13 kV ; d’après Zhang et al. [20].

appliquées sur le jet ce qui va favoriser la formation de fibres plus fines. D’un autre côté, la solution est éjectée de l’aiguille plus rapidement ce qui induit une augmentation du diamètre des fibres. Dans ce cas, l’augmentation de la tension peut entraîner une diminution du diamètre moyen des fibres mais augmenter la répartition en diamètre.

D’autres études ont mis en évidence la diminution du diamètre moyen des fibres avec l’augmentation de la tension. Par exemple, dans les mêmes conditions, une augmentation de 5 à 12 kV a fait diminuer le diamètre de fibres de polystyrène (PS) de 20 à 10  $\mu\text{m}$ [24].

Par ailleurs, Yördem et al. [25] ont étudié l’interaction de trois paramètres (voir le plan d’expérience figure 2.13) : la concentration de la solution, la distance aiguille-collecteur et la tension appliquée ; sur le diamètre de fibres de polyacrylonitrile (PAN). L’influence de la tension sur le diamètre des fibres dépend des autres paramètres. Ainsi quand les concentrations sont les plus élevées, la tension appliquée n’influence pas le diamètre des fibres de diamètres micro-métriques mais seule la concentration permet de contrôler le diamètre. En revanche, quand la concentration et la distance aiguille-collecteur sont plus faibles, l’influence de la tension appliquée est grande. De cette étude, il résulte que c’est l’interaction entre les différents paramètres qui influence le diamètre des fibres.

Experiment	Collector Distance, $x_4$ : 8, 12, 16 cm		Mean Diameter $\pm$ std. dev ( $\mu\text{m}$ )		
	Solution concentr., $x_2$ (%)	Applied voltage, $x_3$ (kV)	at $x_4 = 8$ cm	at $x_4 = 12$ cm	at $x_4 = 16$ cm
1	8	10	$0.083 \pm 0.039$	$0.166 \pm 0.058$	$0.137 \pm 0.065$
2	8	20	$0.109 \pm 0.065$	$0.093 \pm 0.040$	$0.162 \pm 0.111$
3	8	30	$1.592 \pm 0.473$	$0.084 \pm 0.033$	$0.124 \pm 0.041$
4	10	15	$0.773 \pm 0.403$	$0.244 \pm 0.086$	$0.171 \pm 0.101$
5	10	25	$0.955 \pm 0.440$	$0.326 \pm 0.107$	$0.339 \pm 0.127$
6	12	10	$0.920 \pm 0.360$	$0.625 \pm 0.305$	$0.714 \pm 0.205$
7	12	20	$0.556 \pm 0.226$	$0.548 \pm 0.209$	$0.540 \pm 0.173$
8	12	30	$0.548 \pm 0.243$	$0.635 \pm 0.383$	$0.561 \pm 0.166$
9	14	15	$0.804 \pm 0.350$	$1.608 \pm 0.731$	$0.880 \pm 0.222$
10	14	25	$0.942 \pm 0.409$	$1.569 \pm 0.474$	$1.127 \pm 0.378$
11	16	10	$1.933 \pm 0.655$	$1.756 \pm 0.586$	$2.694 \pm 0.696$
12	16	20	$2.782 \pm 0.742$	$1.643 \pm 0.625$	$1.348 \pm 0.419$
13	16	30	$1.771 \pm 0.413$	$1.361 \pm 0.386$	$2.564 \pm 1.167$

FIGURE 2.13 – Conditions des expériences ainsi que le diamètre des fibres obtenues pour les distances aiguilles-collecteur : 8; 12 et 16 cm en faisant varier la concentration en PAN ainsi que la tension appliquée, d'après Yordem et al. [25]

### Influence du débit de la solution

Pour permettre le renouvellement de la solution à l'extrémité, il apparaît clairement qu'un débit minimal est nécessaire. Par ailleurs, le débit est un paramètre qui peut influencer la morphologie et le diamètre des fibres. Dans leur étude sur l'électrospinning de PS, Megelski et al [24] ont étudié l'influence du débit appliqué en le faisant varier entre  $0,004 \text{ mL.min}^{-1}$  et  $0,24 \text{ mL.min}^{-1}$ . Le diamètre des fibres augmente alors de  $5 \mu\text{m}$  (pour le débit le plus faible) à  $20 \mu\text{m}$  (pour le débit le plus élevé). La formation de perles sur les fibres a été observée à partir d'un débit de  $0,10 \text{ mL.min}^{-1}$ . Ceci peut s'expliquer par le fait que lorsque le débit augmente trop, les fibres ont moins le temps de sécher lors de l'émission du jet ce qui fait que le nombre de défauts augmente. Les auteurs ont aussi étudié la microstructure des fibres et notamment le diamètre des pores de fibres de PS. Il apparaît que la taille des pores augmente avec le débit passant d'un diamètre moyen de  $90 \text{ nm}$  à  $150 \text{ nm}$  (voir figure 2.14). L'augmentation du diamètre des fibres et de la probabilité d'apparition de défaut avec le débit a aussi été montré dans le cas de PDLA par exemple [23].

### Influence de la distance collecteur-aiguille

La distance entre le collecteur et l'aiguille est aussi un paramètre qui doit être fixé lors de l'électrospinning. Il apparaît tout d'abord qu'il existe une distance minimale entre l'aiguille et le collecteur pour permettre un temps de séchage suffisant des fibres avant qu'elles se déposent

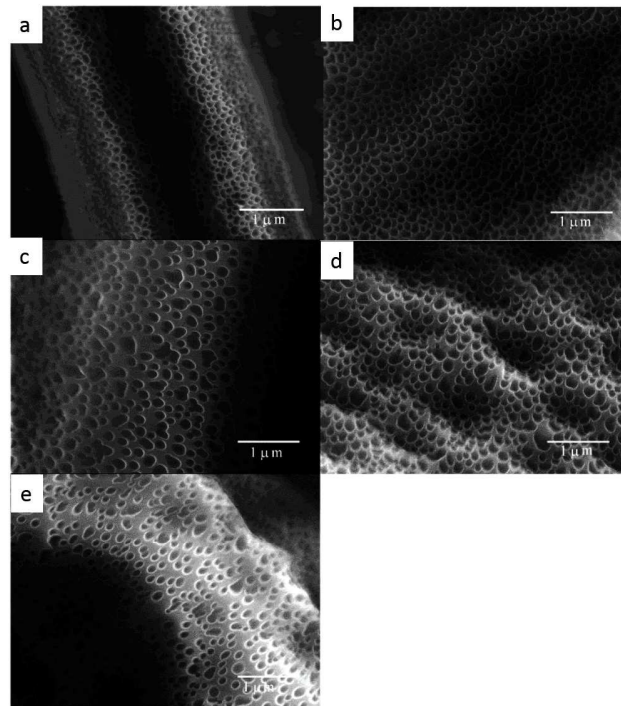


FIGURE 2.14 – Images de microscopie électronique à balayage de fibres de PS en fonction du débit (a)  $0.004 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (5 kV); (b)  $0.07 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (15 kV); (c)  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (15 kV); (d)  $0.14 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (15 kV); (e)  $0.24 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (15 kV); d'après Megelski et al. [24].

sur le collecteur. Par ailleurs, quand la distance est trop grande, des perles apparaissent dans les fibres. Par exemple, lors de l'étude de l'électrospinning de la gélatine, Ki et al.[26] ont observé que pour une distance de 15 cm, il n'y avait pas de problèmes lors du procédé alors que pour une distance de 20 cm, l'électrospinnabilité était mauvaise avec la formation de gouttes et de fibres perlées. Par ailleurs, la distance entre l'aiguille et le collecteur influence peu le diamètre des fibres de gélatine. Pour l'électrospinning du polystyrène [24] ou du PVA [20], il a aussi été montré que la distance avait très peu d'influence sur le diamètre des fibres.

### 2.2.5 Influence des paramètres extérieurs

En plus, des paramètres de la solution et des paramètres du procédé, les paramètres ambiants tels que la température et l'humidité peuvent influencer l'électrospinning.

#### Influence de la température

L'influence de la température a été étudiée par exemple pour l'électrospinning de polyamide [27]. L'augmentation de la température entre 30 et 60°C fait diminuer le diamètre moyen des fibres de polyamide de 98 nm à 90 nm. Ce phénomène est expliqué par l'influence de la température sur les autres paramètres. En effet, la viscosité d'une solution diminue avec l'augmentation de la température ce qui entraîne une diminution du diamètre des fibres. La tension de surface et la conductivité diminuent aussi avec l'augmentation de la température mais dans une moindre mesure. Par ailleurs, les auteurs ont aussi observé une augmentation du nombre de fibres déposées pour un même temps d'électrospinning lors de l'augmentation de la température. Les auteurs expliquent ce phénomène du fait que pour un débit de masse fixe, la diminution du diamètre moyen des fibres implique une augmentation de la longueur totale des fibres. Ainsi pour une période de dépôt fixe, l'augmentation de la longueur totale des fibres entraîne une augmentation du nombre de fibres déposées.

La température est ainsi un paramètre qui doit être connu et contrôlé lors de l'électrospinning car il a une influence sur les paramètres de la solution et ainsi sur le résultat obtenu.

#### Influence de l'humidité relative

L'humidité relative (HR) est un paramètre qui a différents effets dont les mécanismes peuvent être complexes. Casper et al. [28] par exemple ont étudié l'influence de l'humidité



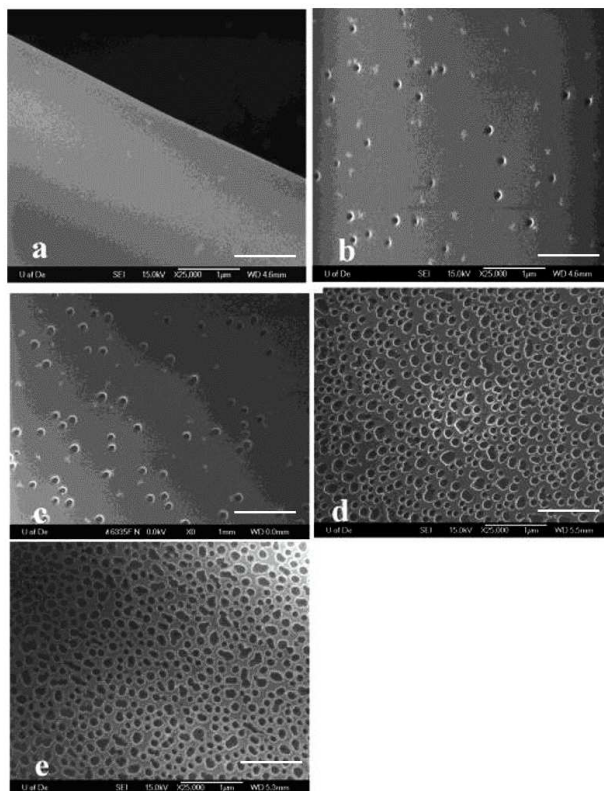


FIGURE 2.15 – Images de microscopie électronique à balayage de fibres de PS en fonction de l’humidité relative (a)  $<25\%$ , (b)  $31-38\%$ , (c)  $40-45\%$ , (d)  $50-59\%$ , (e)  $60-72\%$ . La barre d’échelle vaut  $1\mu\text{m}$ ; d’après Casper et al. [28].

relative lors de l’électrospinning de polystyrène (PS) (voir figure 2.15). Pour une humidité relative inférieure à  $25\%$  (figure 2.15a), les fibres obtenues sont lisses tandis que pour une HR supérieure à  $31\%$  des pores commencent à apparaître sur les fibres et leur nombre augmente avec le % d’HR. Par ailleurs jusqu’à  $45\%$  d’HR, les pores sont circulaires tandis qu’au delà, dû à leur trop grand nombre, ils commencent à coalescer entre eux et perdent cette forme circulaire. La formation de ces pores est expliquée par les auteurs du fait de l’évaporation du solvant lors de l’émission du jet. La surface du jet refroidit et l’eau contenue dans l’air se condense à la surface de la fibre. Quand la fibre sèche, les gouttelettes d’eau laissent alors une empreinte.

Par ailleurs, De Vrieze et al. [29] ont étudié l’influence de l’humidité relative lors de l’électrospinning de PVP solubilisé dans de l’éthanol et d’acétate de cellulose (AC) solubilisé dans un mélange acétone/diméthylacétamide. Pour ces deux polymères, une augmentation de l’HR a des effets opposés : augmenter l’HR diminue le diamètre des fibres pour le PVP tandis que pour l’AC augmenter l’HR augmente le diamètre des fibres. Pour l’AC, les auteurs expliquent



l'augmentation du diamètre avec l'HR par une précipitation rapide du polymère quand de l'eau est ajoutée. Plus l'HR est élevée, plus d'eau est au contact du jet ou est absorbée durant le procédé. Il est alors envisagé que cela précipite les nanofibres dans le jet plus rapidement et empêche l'élongation du jet ce qui forme des fibres avec un diamètre moyen plus grand. Au contraire, pour le PVP, l'absorption d'eau ralentit la précipitation des nanofibres et une augmentation de l'HR entraîne ainsi une diminution du diamètre. Il est à préciser que le PVP est soluble dans l'eau ce qui n'est pas le cas de l'AC.

L'HR est aussi un paramètre qui doit être contrôlé, ou au mieux connu, au cours du procédé afin d'obtenir des résultats reproductibles.

### 2.2.6 Electrospinning co-axial

Maintenant que les principaux paramètres influents ont été décrits, il est intéressant de voir différentes possibilités de structuration ou d'organisation des fibres qu'offre l'électrospinning.

#### Principe de l'électrospinning co-axial

Dans certains cas, la fonctionnalisation des nanofibres est difficile par l'électrospinning classique. Les molécules fonctionnelles cibles peuvent, par exemple avoir un poids moléculaire trop faible pour pouvoir être électrospinnée directement en fibres. Dans ce cas, une technique : l'électrospinning coaxial, peut être appliquée. Une aiguille avec deux becs concentriques est alors utilisée (voir le schéma figure 2.16) avec deux solutions différentes. La même tension est appliquée à ces deux becs et déforme la goutte formée par les deux solutions à l'extrémité de l'aiguille. Dans le meilleur des cas, une fibre "cœur-coquille" est obtenue. Les conditions d'obtention de telles fibres sont assez complexes.

Des modélisations [30] ont permis de montrer que les charges électriques de la solution au cœur migrent rapidement à la surface du jet durant l'électrospinning. Le mouvement de la solution au cœur est donc majoritairement entraînée par les forces de traction visqueuses. De cette façon, la viscosité de la solution de la coquille doit être assez élevée pour permettre assez de traction visqueuse sur la solution cœur. La solution du "cœur" doit être suffisamment visqueuse pour empêcher le jet de se rompre lors du mouvement de fouet [31]. Par ailleurs, il est accordé que les solvants utilisés pour les deux solutions doivent être identiques ou du moins miscibles. Il est à noter que pour obtenir des fibres "cœur-coquille", la solution en cœur n'a pas besoin d'être nécessairement "électrospinnable".

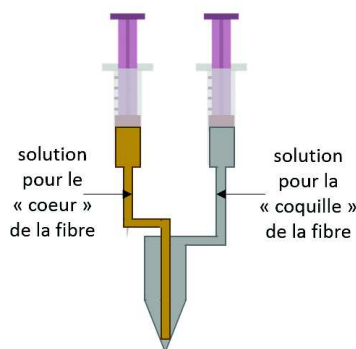


FIGURE 2.16 – Schéma du système utilisé pour l'électrospinning coaxial

### Quelques exemples d'électrospinning coaxial

En 2003, Sun et al. ont été parmi les premiers à étudier la fabrication de fibres électrospinnées coeur-coquille [32]. Ils ont par exemple électrospinné des fibres avec du PEO qui est un isolant électrique en coquille et du polythiophène, un conducteur électrique en cœur. Les fibres ont été observées par de la microscopie électronique à transmission (voir figure 2.17). Il est possible d'observer les fibres ainsi coélectrospinnées grâce à la présence de sulfure dans le polythiophène qui donne un contraste plus fort que pour le PEO. Les fibres ont un diamètre moyen de 1000 nm tandis que le diamètre de la zone du cœur a un diamètre moyen de 200 nm. Il est à noter que le diamètre de la fibre est bien plus grand que le diamètre généralement obtenu pour l'électrospinning de PEO. Par ailleurs, bien que le polythiophène ne forme pas de fibre quand il est utilisé seul, ici, il apparaît clairement que l'électrospinning coaxial a permis de former des fibres de polythiophène.

L'électrospinning coaxial ne permet pas uniquement d'obtenir des fibres coeur-coquille mais aussi d'obtenir d'autres structures intéressantes. En 2004, Li et al. ont ainsi électrospinné des fibres creuses de titane [33]. La solution "coquille" était une solution de PVP et  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$  tandis qu'en coeur, la solution était une solution de PVP seul. Les deux solutions ont été co-électrospinnées puis les fibres obtenues ont été calcinées pour ne conserver que le  $\text{TiO}_2$  (voir figure 2.18).

#### 2.2.7 Contrôle du dépôt des fibres

Initialement, l'électrospinning est un dépôt de fibres aléatoires. Dans certains cas, il peut être intéressant d'avoir un dépôt contrôlé des fibres.

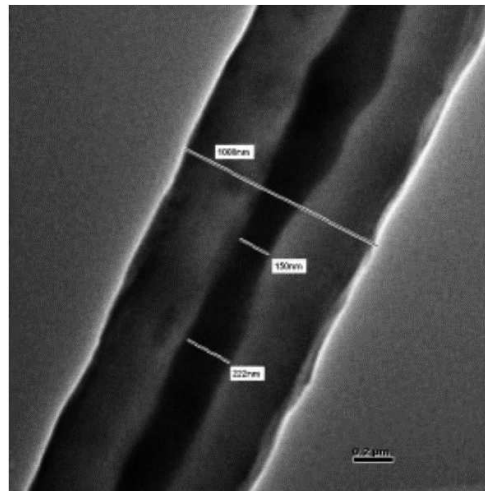


FIGURE 2.17 – Imagerie de microscopie électronique à transmission de fibres co-électrospinnées avec du PEO en coquille et du polythiophène en coeur ; d’après Sun et al. [32].

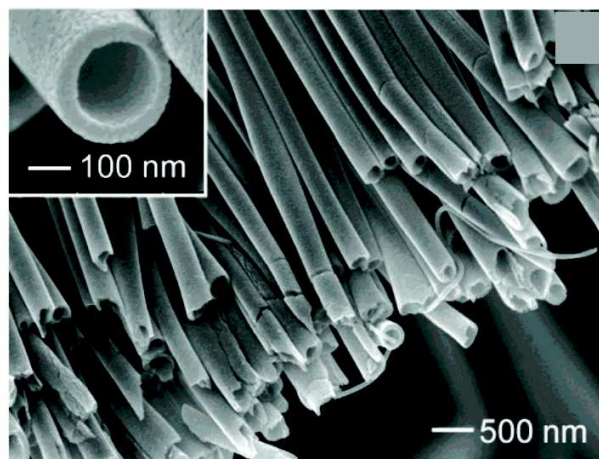


FIGURE 2.18 – Imagerie de microscopie électronique à balayage de fibres creuses de  $\text{TiO}_2$  après carbonisation à  $500^\circ\text{C}$ . Les fibres ont été coupées à la lame de rasoir pour observer leur section ; d’après Li et al. [33].

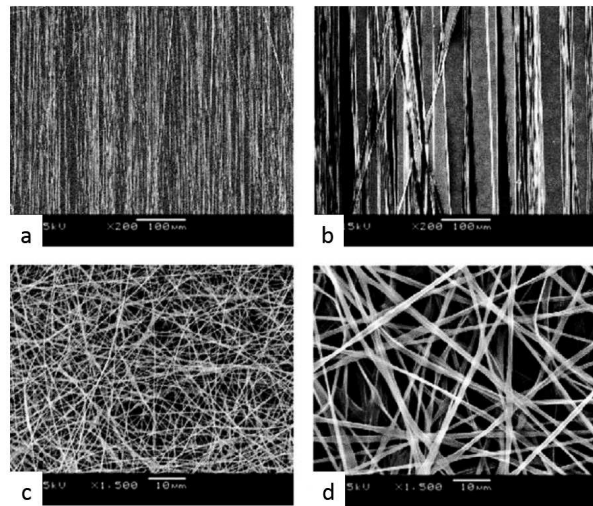


FIGURE 2.19 – Imagerie de microscopie électronique à balayage de fibres de PLA a) nanofibres alignées b) microfibres alignées c) nanofibres déposées aléatoirement d) microfibres déposées aléatoirement ; d’après Yang et al. [34].

### Alignement des fibres

L’alignement des fibres peut être nécessaire dans certains cas. Il est de plus relativement simple à mettre en place. Un des travaux les plus cités sur ce sujet est celui de Yang et al [34]. Ils ont ainsi étudié l’influence de l’alignement des fibres de PLA (voir figure 2.19) pour l’ingénierie de nerf. L’alignement des fibres a été obtenu grâce à l’utilisation d’un collecteur cylindrique qui tourne à grande vitesse à 1000 tours/min.

Les chercheurs ont ensuite étudié l’influence de l’alignement des fibres ainsi que le diamètre (nanofibres ou microfibres) sur l’alignement et la croissance des neurites (les prolongations des cellules nerveuses). La figure 2.20 montre les résultats de la culture de cellules souches neurales (CSN) sur les différents types de fibres. Différents résultats peuvent être observés : i) les neurites sont orientés de manière aléatoire sur les fibres non alignées alors qu’ils suivent l’orientation des fibres sur les fibres alignées ii) les CSN ont développé de multiples prolongements sur les fibres non alignées iii) sur les fibres non alignées, certains neurites se sont connectés de manière aléatoire pour former des jonctions synaptiques. Ensuite, il a été observé que les nanofibres qu’elles soient alignées ou non alignées permettaient une meilleure différenciation des CSN que les microfibres. D’autre part, la longueur des neurites a été mesurée et ce sont sur les nanofibres alignées que la longueur moyenne des neurites étaient la plus grande.

L’interaction entre les CSN et les fibres de PLLA a aussi été observée (figure 2.21). Sur

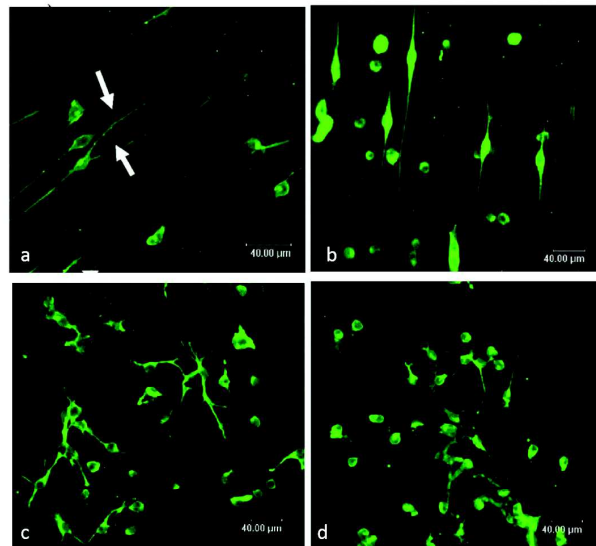


FIGURE 2.20 – Imagerie de microscopie confocale de neurofilaments de cellules souches neurales après 2 jours de culture sur a) des nanofibres alignées b) des microfibres alignées c) des nanofibres non alignées d) des microfibres non alignées; d’après Yang et al. [34].

les images 2.21a et 2.21b, des structures filamenteuses (indiquées par les flèches) s’étendent du corps des CSN et des neurites pour s’attacher aux fibres alignées. Les auteurs pensent qu’il s’agit de contacts focaux qui assurent une forte adhésion entre la cellule et son substrat. Ceci montre une forte interaction entre les cellules et les fibres. Ces structures filamenteuses n’ont pu être observées sur des fibres non alignées ce qui indiquerait une meilleure interaction des cellules sur les fibres alignées.

Cette étude montre l’intérêt de pouvoir utiliser l’électrospinning et le fait de pouvoir contrôler l’alignement des fibres. Les fibres ont été alignées grâce à un collecteur tournant à haute vitesse mais d’autres techniques peuvent être utilisées comme l’utilisation d’un collecteur composé de deux substrats conducteurs séparés par un vide. Les fibres se déposent alors entre les deux substrats de manière alignée[35].

### Structuration des fibres

Les tissus électrospinnés présentent des petits pores. Ce peut être un avantage pour la filtration par exemple. En revanche, pour les applications d’ingénierie tissulaire, de petits pores, souvent bien plus petits qu’une cellule, peuvent être un inconvénient puisqu’ils empêchent la migration des cellules à l’intérieur des scaffolds. Dans cette optique d’application notamment,

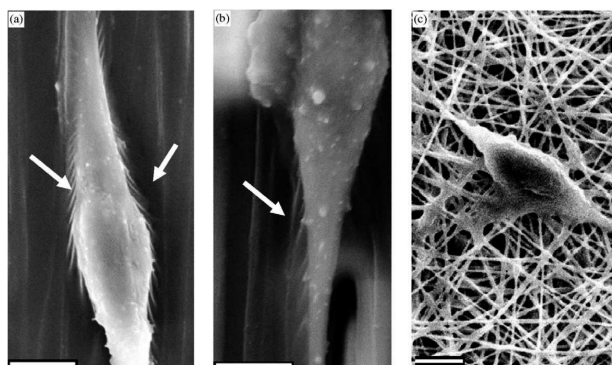


FIGURE 2.21 – Imagerie de microscopie électronique à balayage de CSN sur : a) des nanofibres alignées de PLLA b) des microfibres alignées de PLLA c) des nanofibres non alignées de PLLA. Les flèches blanches montrent les structures filamenteuses du corps des CSN et des neurites pour s'attacher aux fibres. La barre d'échelle représente 5  $\mu\text{m}$  ; d'après Yang et al. [34].

des techniques de structuration des fibres ont été mises au point, tout particulièrement dans le laboratoire ICPEES à Strasbourg.

### Structuration de fibres de polymère simple

La structuration de fibres en structure en "nid d'abeille" est possible grâce à l'auto-organisation des fibres sur le collecteur. Les premières structures d'auto-organisation ont été observées par Deitzel et al. avec l'oxyde de polyéthylène [36]. D'autres membranes structurées ont été étudiées avec d'autres polymères comme le polyuréthane [37], le PVA et le polyacrylonitrile [38]. Le laboratoire ICPEES, quant à lui s'est consacré à l'étude du PCL [39], [40].

L'auto-organisation des fibres de PCL est obtenue grâce à une distribution bimodale du diamètre des fibres. Les fibres de PCL possèdent un domaine épais et un domaine fin. Quand les fibres se déposent sur le collecteur, les domaines épais sont en contact direct avec le collecteur, ce qui permet une évacuation de leurs charges électriques. Les domaines fins, qui ont un diamètre entre 5 et 10 fois plus petit que les domaines épais, sont quant à eux maintenus en l'air et conservent leurs charges électriques (figure 2.22). Il y a ainsi une distribution hétérogène de charges électriques qui s'accumulent à la surface. Cette distribution facilite l'apparition de la première couche en nid d'abeille.

Les agrégats de domaines épais ne sont pas distribués de manière régulière à la surface du collecteur. Les motifs du nid d'abeille présentent ainsi une large distribution de taille. Les

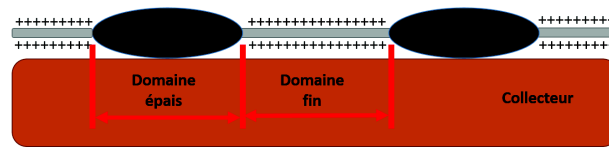


FIGURE 2.22 – Schéma du dépôt de fibre de PCL sur le collecteur.

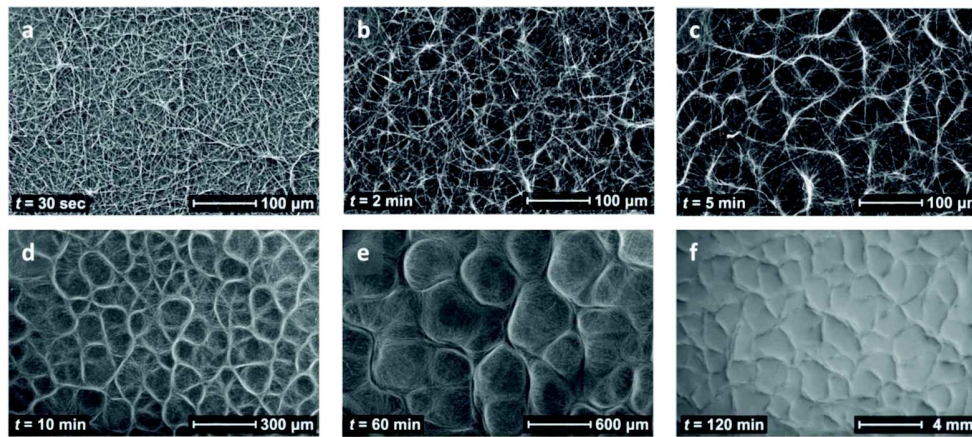


FIGURE 2.23 – Images MEB d'électrospinning de PCL à 13% mt obtenu après un temps de (a) 30 secondes (b) 2 minutes (c) 5 minutes (d) 10 minutes (e) 60 minutes (f) 120 minutes; d'après Ahirwal et al. [39].

plus grands motifs de nids d'abeille induisent une plus grande composante verticale du champ électrique sur les bords vifs, ce qui entraîne un plus grand dépôt. Ainsi, au cours du temps d'électrospinning, les plus grands motifs prennent l'ascendant sur les plus petits qui disparaissent et le motif des nids d'abeille grossit, jusqu'à devenir visible à l'oeil nu (figure 2.23).

Grâce à l'utilisation de collecteur structuré en nid d'abeille, il est possible d'obtenir des pores de taille contrôlée et de pouvoir électrospinner durant des temps très longs pour obtenir des scaffolds épais. Il a ainsi été possible d'obtenir un scaffold de 15 mm d'épaisseur (voir la photo figure 2.24).

La section du scaffold obtenu a été étudiée. Une structure en forme de colonne apparaît clairement (figure 2.25, flèches 1). Elle est due à la croissance sur les murs du motif en nid d'abeille. Entre ces murs, une succession de mésopores (figure 2.25, flèche 2) est séparée par une fine membrane (figure 2.25, flèche 3). Ainsi la matrice électrospinnée ressemble à une mousse. De plus, une analyse statistique de la section du scaffold a permis de montrer qu'il y



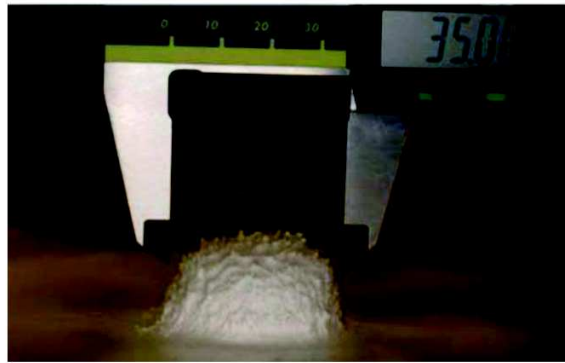


FIGURE 2.24 – Photo du scaffold épais obtenu, d’après Ahirwal et al. [39].

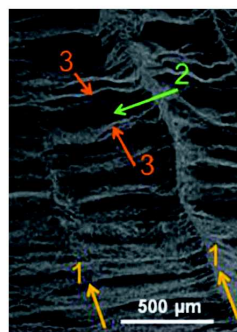


FIGURE 2.25 – Image MEB d’une coupe du scaffold de PCL épais montrant les colonnes et les mesopores des couches stratifiées, d’après Nedjari et al. d’après Ahirwal et al. [39].

avait une augmentation de la hauteur des mésopores et de la porosité selon l’axe vertical. Ce gradient de taille des pores d’une centaine de micromètre peut être très utile pour l’ingénierie tissulaire.

D’autres essais ont été réalisés sur des collecteurs en nid d’abeille avec des tailles de pores différents avec du PLA et du PCL [41]. Contrairement au PCL, les fibres de PLA présentent une distribution unimodale de leur diamètre ce qui ne permet pas d’obtenir des scaffolds épais. Néanmoins, à l’aide de collecteur en nid d’abeille, il est possible d’obtenir une structuration des fibres avec le même motif.

Après un court dépôt, les fibres de PLA sont déposées essentiellement sur les murs du collecteur et peu sont tendues entre les murs (figure 2.26a). Ceci peut être dû au fait que le champ électrique est plus fort sur les murs, y favorisant le dépôt. Après un plus long dépôt, en revanche, les fibres recouvrent toute la surface du collecteur (figure 2.26b) et l’architecture est moins visible. Néanmoins, la densité de fibres reste plus faible à l’intérieur du nid que sur les



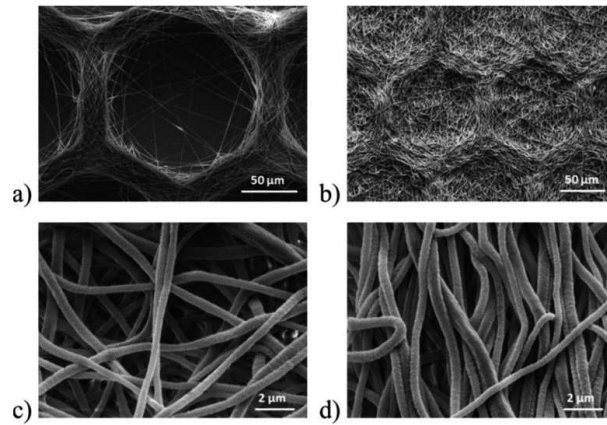


FIGURE 2.26 – Images MEB de fibres de PLA déposées sur un motif en nid d’abeille avec une taille de pore de  $160\ \mu\text{m}$  a) après un court dépôt b) après un long dépôt et après avoir été retiré du collecteur dans de l’isopropanol c) nanofibres de PLA à l’intérieur du nid d’abeille d) nanofibres de PLA sur le mur du nid d’abeille ; d’après Nedjari et al. [41].

murs. De plus, il apparaît que les fibres à l’intérieur du nid ont une orientation aléatoire (figure 2.26c) tandis que les fibres sur le mur semblent alignées (figure 2.26d).

Pour le PCL, en revanche, la structure en nid d’abeille est conservée (figure 2.27a). Une étude de la répartition des fibres a été faite (figure 2.27d). A l’intérieur des nids, seules des fibres fines avec un diamètre moyen de  $270\ \text{nm}$  sont présentes (figure 2.27b). Tandis que sur les parois des murs, les fibres ont une répartition bimodale de leur diamètre (figure 2.27c). La densité linéaire de charge d’un jet électrospinné est proportionnelle à la racine du diamètre. Ainsi, les portions épaisses de PCL ont une densité de charge environ dix fois plus grande que les portions fines. Les portions épaisses sont donc plus sensibles aux fluctuations du champ électrique rencontrées au voisinage du collecteur ce qui induit une déposition de ces fibres épaisses uniquement sur les murs du collecteur.

Cela explique aussi que ce dépôt sélectif entraîne une meilleure conservation du relief pour les fibres de PCL (figure 2.28 a et b) que pour les fibres de PLA.

La taille d’un motif de nid d’abeille  $D_p$  a aussi été étudiée pour observer l’influence sur le dépôt des fibres ainsi que son influence en culture cellulaire avec l’étude de l’adhésion d’ostéoblastes. Les reliefs sont plus haut pour les fibres de PCL que pour les fibres de PLA (figure 2.28). La hauteur du relief augmente avec  $D_p$ . Cet effet peut être expliqué par l’augmentation du champ électrique avec la taille du motif ce qui favorise le dépôt des fibres sur les murs du

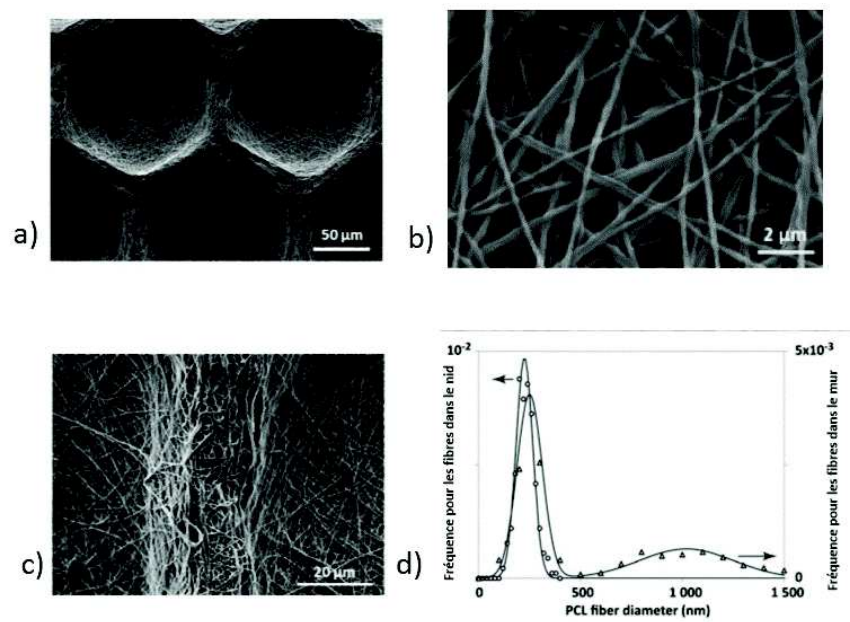


FIGURE 2.27 – Images MEB de a) fibres de PCL déposées sur un motif en nid d’abeille avec une taille de pore de 160 μm b) nanofibres de PCL à l’intérieur du nid c) nanofibres de PCL sur les murs du nid d) répartition des diamètres sur les murs et à l’intérieur des nids ; d’après Nedjari et al. [41].

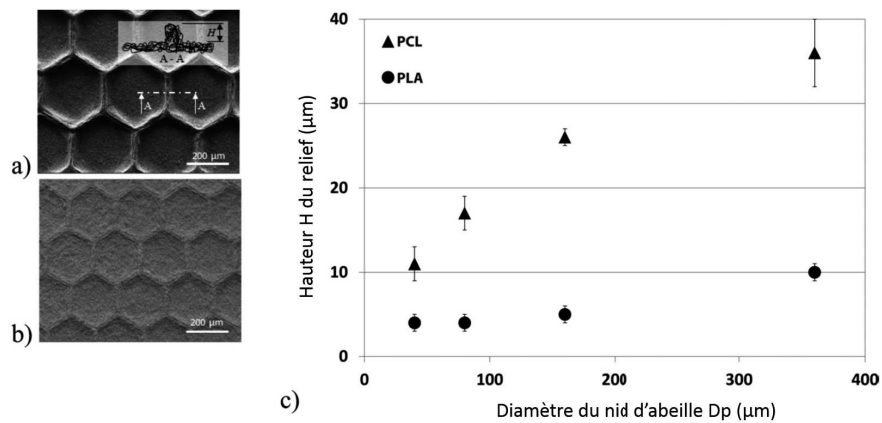


FIGURE 2.28 – a) Image MEB du scaffold de PCL obtenu avec  $D_p = 360 \mu m$  b) Image MEB du scaffold de PLA obtenu avec  $D_p = 360 \mu m$  c) Taille de la hauteur du relief en fonction de la taille du motif ; d’après Nedjari et al. [41].

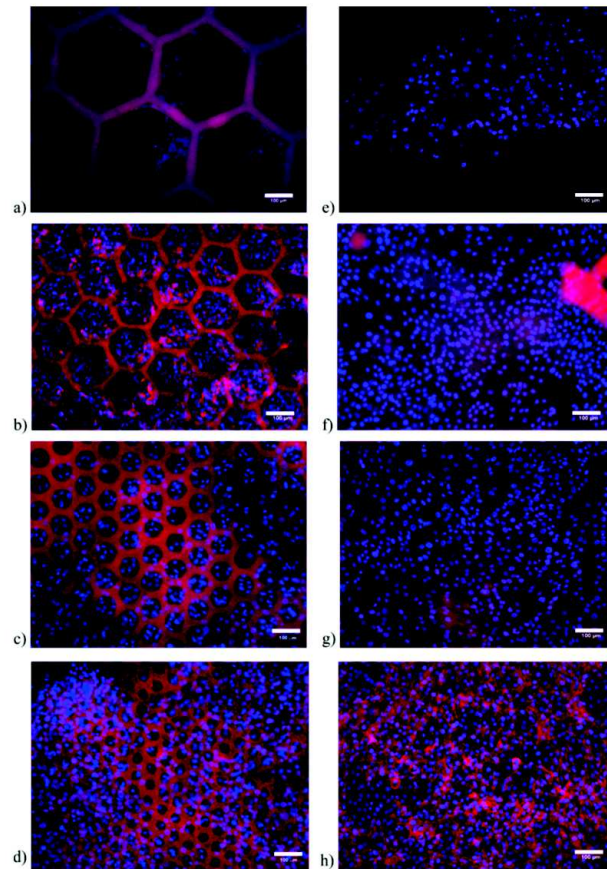


FIGURE 2.29 – Images de microscopie à fluorescence d’ostéoblastes après 14 jours (a-d) scaffolds de PCL (e-h) scaffolds de PLA ; (a) et (e)  $D_p=360\mu\text{m}$ , (b) et (f)  $D_p=160\mu\text{m}$ , (c) et (g)  $D_p=80\mu\text{m}$ , (d) et (h)  $D_p=40\mu\text{m}$  ; d’après Nedjari et al. [41].

nid d’abeille.

Des ostéoblastes ont ensuite étéensemencés pendant 14 jours sur les différents scaffolds. Les images de microscopie à fluorescence (figure 2.29) où le noyau des cellules est marqué en bleu montrent clairement que les ostéoblastes adhèrent préférentiellement à l’intérieur des nids plutôt que sur les murs pour les scaffolds de PCL (2.29a-d). Au contraire, pour les scaffolds de PLA (2.29e-h), les cellules ne semblent pas être affectées par la topographie et adhèrent aussi bien sur les murs qu’à l’intérieur des nids. Par ailleurs, pour le cas du plus petit motif ( $D_p=40\mu\text{m}$ ), le ratio entre la densité de cellules sur les murs et dans le nid est de 1 pour le scaffold de PCL. Ce ratio augmente avec la taille (et ainsi le relief) du motif. Pour le plus grand des motifs ( $D_p=360\mu\text{m}$ ), ce ratio est de 6. Il apparaît ainsi que la taille des pores influence la localisation des cellules (tant que la hauteur du relief est suffisante) et qu’elles préfèrent adhérer sur des surfaces concaves.

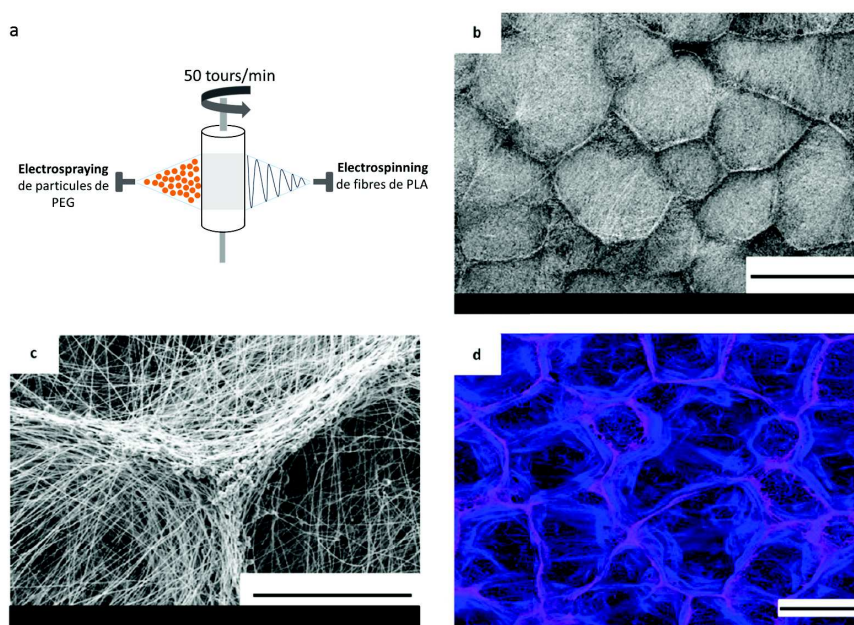


FIGURE 2.30 – (a) schéma du co-électrospinning-électrospraying (b) Image MEB de la structure composite en forme de nid d'abeille obtenue après 60 minutes (échelle=1 mm) (c) Image MEB d'un domaine élémentaire de nid d'abeille (échelle=50 μm) (d) Image de microscopie confocale avec les nanofibres de PLA marquées en bleu et les microparticules de PEG marquées en rose après 60 minutes de dépôt (échelle=500 μm), d'après Lavielle et al. [42].

Il est ainsi possible de structurer des fibres à l'aide de collecteur. Cela peut présenter un intérêt pour la culture cellulaire. Néanmoins, cette technique requiert d'avoir une distribution bimodale du diamètre des fibres.

### Structuration par co-electrospinning-electrospraying

Une autre méthode de structuration a été développée au sein de l'ICPEES pour des fibres uniformes telles que des fibres de PLA. C'est cette méthode qui sera utilisée dans nos travaux. Il s'agit d'une structuration par électrospinning et électrospraying simultanés ou co-électrospinning-électrospraying.

Cette méthode a été présentée pour la première fois en 2013 par Lavielle et al. [42]. Il s'agit d'électrosprayer d'un côté du collecteur des particules de polymère et de l'autre côté d'électrospinner des fibres de polymère. Les premiers matériaux composites ont ainsi été réalisés avec des microparticules de polyéthylène glycol (PEG) et de nanofibres de PLA (schéma figure 2.30a). Pour obtenir des particules, du PEG de poids moléculaire 15 kg/mol a été utilisé.

Comme nous l'avons vu précédemment pour le PCL, l'auto-organisation est due à une bimodalité du diamètre avec des domaines épais et des domaines fins des fibres. Dans le cas, de l'électrospinning de PLA et de l'électrospraying de microparticules de PEG, les microparticules jouent le même rôle que les domaines épais et les fibres le rôle des domaines fins. Ainsi, il est possible d'obtenir des structures auto-organisées en nid d'abeille (figure 2.30b). Sur l'agrandissement d'un domaine élémentaire (figure 2.30c), il est clairement visible que les particules se concentrent sur les murs qui forment les motifs. Cette observation est confirmée par des images de microscopie confocale à fluorescence. Sur la figure 2.30d, où les particules sont marquées en rouge et les fibres en bleu, les particules et les fibres sont déposées de manière préférentielle sur les murs tandis qu'entre les murs, seules quelques fibres étirées sont déposées.

Cette auto-organisation dépend de l'agrégation des microparticules à la surface. Quand des microparticules non agrégées sont déposées, il n'est pas possible d'organiser les fibres de PLA. Les agrégats permettent une distribution non homogène du champ électrique.

L'influence de la taille des particules et des domaines sur l'organisation a été étudiée. En faisant varier le débit d'une solution de PEG, la taille des particules et des agrégats est modifiée. Un plus grand débit entraîne de plus grosses particules et des plus gros domaines de particules agrégées (figures 2.31a,c,e).

L'influence de la taille des agrégats a ensuite été étudiée en mesurant la longueur moyenne des motifs. Il apparaît ainsi que les plus gros agrégats permettent d'obtenir des plus grands motifs. Par cette technique, il est ainsi possible de moduler la taille des motifs.

Cette technique est intéressante car elle permet d'obtenir des motifs en nid d'abeille en utilisant simplement deux solutions de polymère. Néanmoins, les motifs obtenus ne sont pas maîtrisés.

Ce travail a été optimisé par l'utilisation de collecteur afin de contrôler la taille et la forme des motifs [43]. Des collecteurs en forme de nid d'abeille ont été fabriqués par photolithographie avec des diamètres de motif ( $D$ ) différents. Puis, ils ont été fixés à un collecteur rotatif. D'un côté du collecteur, une solution de PLA à 180 kg/mol est électrospinnée et de l'autre côté une solution de PEG à 20 kg/mol a été électrosprayée (voir le schéma figure 2.30a).

L'utilisation simultanée de l'électrospinning de PLA et de l'électrospraying de PEG sur un collecteur en forme de nid d'abeille permet d'obtenir un matériau composite possédant une structure en forme de colonne (figure 2.32 c). Sur la surface de ces structures, la réplique du motif en nid d'abeille du collecteur est apparente. Cette structure est observable pour des hauteurs



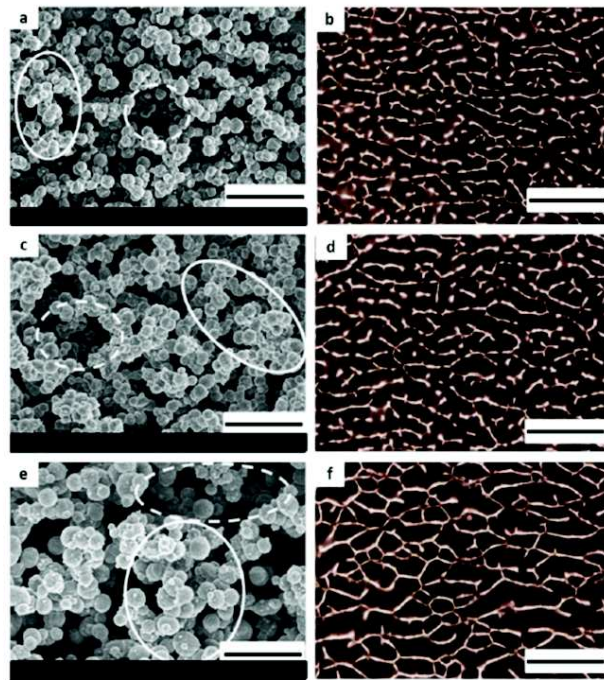


FIGURE 2.31 – Images MEB de microparticules de PEG obtenues à un débit de (a)  $0,08 \text{ mL.h}^{-1}$  (c)  $0,1 \text{ mL.h}^{-1}$  (e)  $0,2 \text{ mL.h}^{-1}$ . Les ronds en trait plein montrent les domaines pleins et les ronds en pointillés montrent les domaines vides de particules (barre d'échelle= $10 \mu\text{m}$ . Images de microscopie optique des matériaux composites auto-organisés par electrospinning et électrospraying des particules correspondantes (b, d, f) après 15 minutes de dépôts. La barre d'échelle vaut 1 mm ; d'après Lavielle et al. [42].

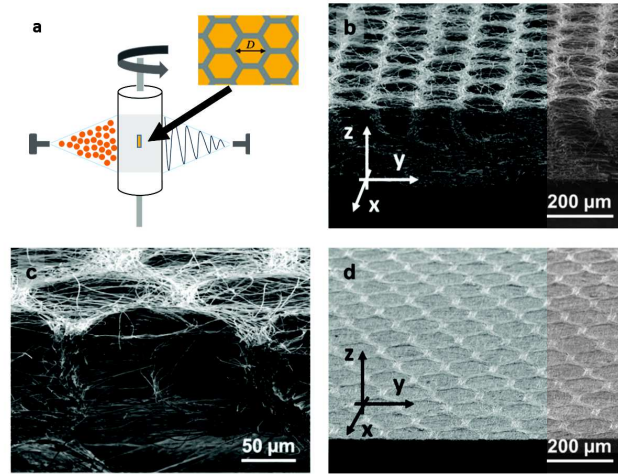


FIGURE 2.32 – (a) Schéma du montage de l'électrospinning, électrospraying simultanés (b) Structure 3D en forme de colonnes obtenue après 1h de dépôt pour  $D = 160\mu\text{m}$  (c) Structure 3D en forme de colonnes obtenue après 15 minutes de dépôt (d) Structure fibreuse obtenue dans les mêmes conditions que (b) mais sans électrospraying : aucune micro-structure 3D interne n'est obtenue ; d'après Wittmer et al. [43].

d'échantillon jusqu'à  $100\mu\text{m}$ . Au-delà de cette hauteur, le motif disparaît peu à peu comme c'est le cas sur la figure 2.32b où la taille de l'échantillon est de plus de  $220\mu\text{m}$ . Par ailleurs, dans les mêmes conditions que pour cet échantillon mais sans électrospraying, l'échantillon possède une épaisseur de seulement  $45\mu\text{m}$  et il n'y a pas de pores internes ou de structures qui se forment. Dans le cas du PLA, il est donc indispensable d'avoir de l'électrospraying pour assurer la structuration de fibres sur des collecteurs.

Pour obtenir une structuration, il est nécessaire d'avoir un dépôt des particules sur les murs des collecteurs. Les murs sont formés de paquets de fibres et de particules (figure 2.33a). Quand seul du PLA est électrospinné, après 3 minutes, les fibres sont réparties uniformément à la surface (figure 2.33b). De même, quand les particules sont électrosprayées seules, elles se déposent de manière aléatoire sur toute la surface (figure 2.33c). Une première couche de fibres est nécessaire pour que les particules se déposent uniquement sur les murs. En effet, les fibres se répartissent de manière aléatoire sur toute la surface. Les segments de fibres qui sont suspendus entre les murs ne peuvent pas décharger leurs charges électriques ce qui crée des zones de répulsion. Les particules se déposent alors sur les murs (voir schéma 2.34)

Pour étudier la possibilité de contrôler la taille des pores, des collecteurs avec des motifs de diamètre différent  $D$  ont été utilisés (figure 2.35). Pour tous les diamètres ( $40$ ;  $80$ ;  $160$  et  $360$

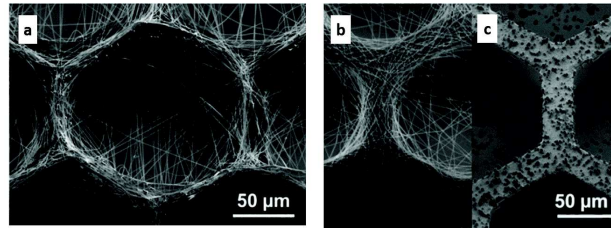


FIGURE 2.33 – (a) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospinning-électrospraying sur un collecteur  $D = 160\mu\text{m}$  (b) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospinning seul (c) Image MEB obtenue après 3 minutes d'électrospraying seul ; d'après Wittmer et al. [43].

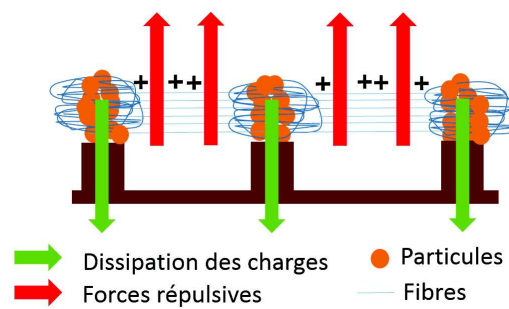


FIGURE 2.34 – Schéma résumant le procédé de structuration lors du co-électrospinning-électrospraying



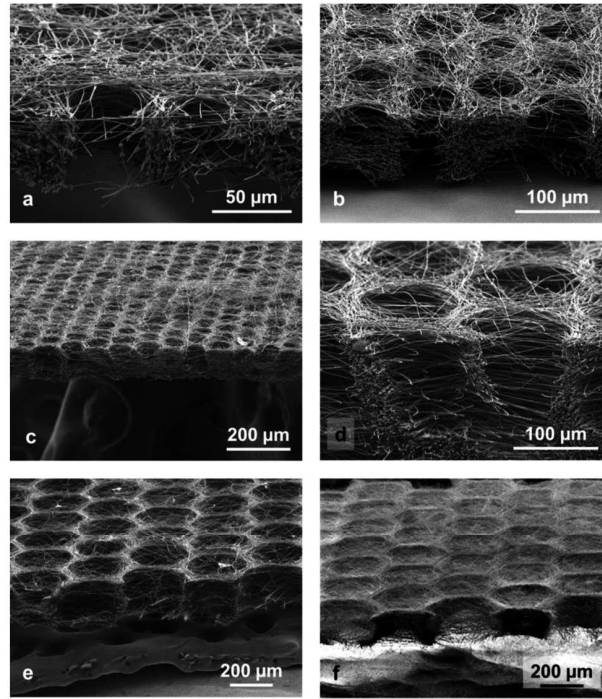


FIGURE 2.35 – Images MEB de différentes structures 3D pour des tailles de motif  $D$  différentes montrant leur section ainsi que la surface qui était en contact avec le collecteur (a)  $D = 40\text{ }\mu\text{m}$ (b et c) $D = 80\text{ }\mu\text{m}$ (d)  $D = 160\text{ }\mu\text{m}$ (e et f)  $D = 360\text{ }\mu\text{m}$ , d’après Wittmer et al. [43].

$\mu\text{m}$ ), il a été possible d’obtenir des structures en forme de colonnes conservant la morphologie des collecteurs. Par ailleurs, la hauteur des structures obtenues semblent augmenter avec  $D$ . Ainsi pour une valeur de  $D$  de 40 ; 80 et 360  $\mu\text{m}$ , des hauteurs de respectivement 25 ; 50 et 180  $\mu\text{m}$  sont obtenues. La taille du motif semble ainsi influencer la taille jusqu’à laquelle la structure peut être conservée. Une explication possible peut être qu’il y a une plus faible densité de particules à l’intérieur des murs fibreux pour les plus petits motifs. En effet, la surface du collecteur est plus grande dans ce cas. Ainsi, le contact électrique dans le mur de la structure en forme de colonne est perdu plus rapidement pour les plus petits motifs.

Les propriétés mécaniques ont été étudiées et comparées à celles d’un scaffold de PLA électrospinné seul. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.2.7 et la courbe de traction est présentée figure 2.36.

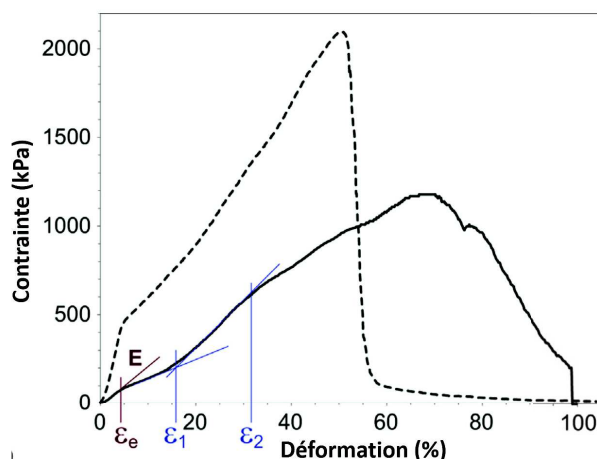


FIGURE 2.36 – Courbes caractéristiques d’un test de traction pour un scaffold de PLA électrospinné simplement (ligne en pointillés) et d’un scaffold de PLA structuré par électrospinning-électrospraying (ligne pleine) ; d’après Wittmer et al. [43].

Échantillon	Module d’Young (MPa)	Déformation à la limite élastique (%)	Déformation à la rupture (%)	Contrainte à la rupture (MPa)
Scaffold de PLA simple	$17 \pm 5$	$4 \pm 1$	$50 \pm 3$	$2,2 \pm 0,2$
Scaffold structuré de PLA obtenu avec $D = 160 \mu\text{m}$	$2 \pm 0,7$	$6 \pm 2$	$61 \pm 13$	$1,1 \pm 0,1$

La forte porosité du scaffold structuré implique une diminution conséquente, d’un facteur 8,5, du module d’Young comparé au scaffold simple. Les deux matériaux montrent un comportement élasto-plastique avec un durcissement. Pour le scaffold simple, le durcissement apparaît directement après la déformation élastique jusqu’à la rupture de l’échantillon. Ce comportement vient de la consolidation des fibres et de l’alignement des fibres selon l’axe d’étirement. Pour le scaffold structuré, après  $\epsilon_2$ , un adoucissement a lieu. Ce comportement peut être dû au fait que le dépliement des fibres est rapidement limité puisque la majorité des fibres ont un petit rayon de courbure qui correspond au rayon des nids d’abeille. De plus, les paquets de fibres

et de particules peuvent limiter l'alignement des fibres transverses. Ces scaffolds montrent des bonnes propriétés mécaniques et sont ainsi facilement manipulables.

Ces matériaux du fait de leur structuration, de leurs bonnes propriétés mécaniques ainsi que de la possibilité d'utiliser différentes particules pour donner d'autres propriétés aux fibres offrent des perspectives intéressantes pour une utilisation en ingénierie tissulaire. C'est cette technique qui a été étudiée avec l'étude de différents collecteurs et de différentes particules au cours d'un stage qui s'est déroulé durant cette thèse.

### 2.2.8 Conditions d'électrospinning utilisées

#### Cabine d'électrospinning

La cabine d'électrospinning qui a été utilisée durant les travaux est une cabine qui a été fabriquée au sein du laboratoire. Elle est composée de deux alimentations haute tension (Spellman SL 10), d'un collecteur vertical. Le collecteur est mis en rotation à l'aide d'un moteur à haute vitesse (Ika Eurostar 20). Les pousse-seringue utilisés sont de la marque Fischer Scientific. La salle d'électrospinning est maintenue à une température constante de 22°C. L'humidité relative dans la cabine d'électrospinning peut être réglée et est mesurée tout au long de l'expérience.

#### Caractérisation des fibres

Les membranes électrospinnées sont observées au MEB après électrospinning. Avant observation, elles sont métallisées avec une fine couche d'or avec un métaliseur (Quorum Q 150 R S, Quorum Technologies). Le MEB (Vega 3, Tescan) est utilisé en mode "haut vide" avec une tension de 5 kV et une distance de travail comprise en 6 et 14 mm. Quand il faut mesurer le diamètre des fibres, 5 images différentes à fort grandissement sont prises et sur chacune des images, le diamètre de 20 fibres est mesuré à l'aide du logiciel Image J.

#### Electrospinning de PLA et d'AT

Des expériences d'électrospinning de mélange PLA et AT ont été réalisées. Les solutions utilisés sont des solutions de PLA à 10%mt dans un mélange DCM, DMF avec 60% en masse de DCM et 40% en masse de DMF. Le PLA est d'abord solubilisé dans le DCM et agité toute une nuit avant d'ajouter le DMF. Le DMF est un mauvais solvant du PLA mais il permet de diminuer la volatilité de la solution. L'acide tannique est ajouté après ajout du DMF à

différentes concentrations par rapport à la concentration de PLA.

Les conditions d'électrospinning sont une distance entre l'aiguille et le collecteur de 18 cm. La tension de l'aiguille vaut 11,5 kV tandis que celle du collecteur vaut -5kV. La vitesse du collecteur est fixée à 150 tours/minutes et la vitesse du débit à 1,2 mL/h.

Ces conditions ont été définies au préalable dans des travaux précédents.

### **Electrospinning d'AT**

L'AT a été électrospinné seul. Les solutions sont préparées le matin et électrospinnées l'après-midi. L'AT est dissous dans un mélange eau/éthanol. La concentration en AT a été variée entre 30%mt à 55 %mt. Dans les solvants, le pourcentage massique de l'eau a été varié de 12,5 à 100%mt du solvant et celui de l'éthanol de 87,5 à 0 %mt respectivement.

La distance entre l'aiguille et le collecteur a été fixée à 10 cm, la tension à l'aiguille est de 10 kV tandis que celle appliquée au collecteur est de -5kV. Le débit de la solution est de 1,2 mL/h. La vitesse du collecteur est de 150 tours/minute. L'humidité relative est maintenue inférieure à 30%.

### **Co-électrospinning de PLA-électrospraying de particules**

Pour cette partie, une solution de PLA à 10% mt dans le mélange DCM/DMF (60/40 % en masse) a été utilisée pour l'électrospinning de fibres. Pour l'électrospraying, différentes solutions de PCL avec ou sans ajout d'AT ont été réalisées. Le PCL a été solubilisé dans du diméthylacétamide puis chauffé à 60° pour favoriser la solubilisation 5 h avant l'électrospinning. Une grille métallique de fils entrelacés a été utilisée pour la structuration des fibres. L'ouverture est de 265 µm x 160 µm. La grille est fixée au collecteur à l'aide d'un scotch carboné double face conducteur pour permettre un contact électrique efficace. La distance entre le collecteur et l'aiguille pour l'électrospinning de PLA a été fixée à 18 cm, le débit à 2 mL/h et la tension au niveau de l'aiguille à 18 kV. Pour l'électrospraying de particules de PCL et PCL-AT, la distance a été fixée à 18 cm, le débit à 0,2 mL/h et la tension à 20 kV. La tension de la grille est fixée à -5 kV.

## 2.3 Microscopie électronique à balayage

### 2.3.1 Principe de la microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique qui permet d'observer la topographie de surfaces [44]. L'image est obtenue grâce à un balayage de la surface par un faisceau très fin d'électrons de tension réglable, entre 0,1 et 30 kilovolts (kV). Différentes interactions entre les électrons et la matière ont alors lieu. Ce sont principalement les électrons secondaires qui sont utilisés pour reconstruire une image de la surface. Les électrons primaires provenant du faisceau entrent en collision avec les atomes de la surface de l'échantillon, une partie de l'énergie des électrons primaires peut alors être cédée aux électrons peu liés de l'atome de surface qui sont alors éjectés par ionisation. Ces électrons secondaires, provenant des couches superficielles de l'échantillon, possèdent une faible énergie et sont recueillis par un détecteur (voir schéma figure 2.37). Par l'analyse des électrons secondaires recueillis, une image de la topographie de la surface est obtenue.

D'autres interactions ont lieu comme par exemple la rétrodiffusion des électrons primaires qui permet d'obtenir un contraste de phase ou l'émission de rayon X, son analyse permet alors d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'atome à l'origine de l'émission.

### 2.3.2 Protocole

La MEB a été utilisée afin d'observer les fibres électrospinnées. Avant l'observation, les fibres sont métallisées avec une fine couche d'or à l'aide d'un métalliseur (Quorum Q 150 RS, Quorum Technologies). Le MEB (Vega 3, Tescan) est utilisé en mode haut vide avec une tension d'accélération de 5 kV et une distance de travail comprise entre 6 et 8 mm. Pour les images montrant des fibres, le diamètre de 100 fibres a été mesuré sur 5 images différentes à l'aide du logiciel ImageJ.

## 2.4 Microscopie électronique en transmission et cryo-TEM

### 2.4.1 Principe de la microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (TEM pour Transmission Electron Microscopy) a été mise au point dans les années 1930 et un de ses inventeurs a reçu le prix Nobel de physique

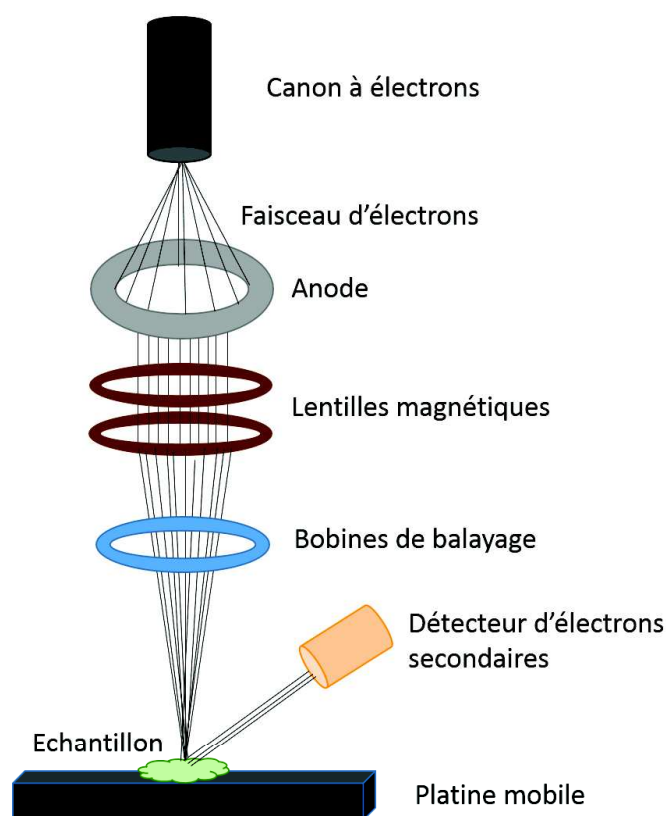


FIGURE 2.37 – Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage. Le faisceau électronique est produit par un canon à électrons entre une cathode et une anode. Le faisceau d'électrons est ensuite focalisé grâce à des lentilles magnétiques. Le faisceau interagit ensuite avec l'échantillon produisant des électrons secondaires qui sont détectés par un détecteur d'électrons secondaires

en 1986. Il s'agit d'une technique de microscopie où un faisceau d'électrons traverse un échantillon très mince (de l'ordre de la dizaine à la centaine de nm) [45]. Grâce à l'interaction entre les électrons du faisceau et l'échantillon, il est possible d'obtenir une image dont la résolution peut atteindre 0,08 nm par l'analyse du faisceau transmis. Il est aussi possible d'étudier la composition chimique de l'échantillon par l'analyse des rayons X produits lors de l'interaction entre l'échantillon et le faisceau d'électrons.

## 2.4.2 Principe de la cryo-TEM

La cryo-microscopie électronique en transmission est une technique de préparation des échantillons développée dans les années 1980. Ses inventeurs ont été récompensés par le prix

Nobel de Chimie en 2017. Les échantillons sont congelés ultra rapidement sous forme hydratés dans de l'éthane liquide. L'échantillon passe alors d'un état liquide à un état vitrifié pouvant être observé au TEM. Cette technique permet d'observer des échantillons biologiques sans fixateur ou colorant. Elle permet aussi d'observer l'assemblage moléculaire en solution.

### 2.4.3 Protocole

La cryo-TEM a été utilisée pour observer l'auto-association de l'acide tannique (AT) en solution. Une goutte de solution d'AT à 2% en masse totale dans une solution eau-éthanol (37,5-62,5% en masse) a été déposée sur une grille de TEM recouverte par une membrane de carbone hydrophobe. La taille de la goutte a été progressivement réduite de manière à obtenir un film mince qui recouvre entièrement la membrane. La grille a ensuite été plongée dans de l'éthane liquide à la température de l'azote liquide. Elle a ensuite été transférée sur un cryo-portoir et insérée dans le TEM. L'échantillon a ensuite été observé avec le TEM (JEOL 2100F, JEOL) avec une tension de 200 kV et un correcteur d'aberration, un spectromètre des pertes d'énergie (Gatan Tridiem) et un détecteur EDX (analyse dispersive en énergie). Cette installation permet d'obtenir une résolution de 0,2 nm. Pour limiter les dommages liés à l'irradiation, les images ont été acquises en utilisant un faisceau d'électrons de faible densité.

## 2.5 Spectroscopie Raman

L'effet ou diffusion Raman tient son nom du physicien indien Chandrashekhara Venkata Râman qui découvrit et expliqua pour la première fois le phénomène en 1928. Il consiste en la diffusion inélastique d'un photon par un milieu, c'est à dire que lorsque le matériau est soumis à une lumière monochromatique la lumière diffusée aura une fréquence différente de la lumière incidente. La technique d'analyse qui en découle ne prend réellement son essor qu'à partir des années 1960 avec le développement des sources laser. Elle a l'avantage d'être non destructive et d'utiliser des petites quantités d'échantillon.

### 2.5.1 Interaction rayonnement-matière : effet Raman

Une molécule peut subir des mouvements de rotation ou de vibration [46]. La spectroscopie Raman s'intéresse aux états vibrationnels d'une molécule. L'énergie de vibration est quantifiée en niveaux discrets.

Il existe différentes interactions entre une molécule se trouvant dans un état donné  $n$  et un photon d'énergie  $h\nu$  (voir figure 2.38).

Dans le cas où  $\nu = \nu_n$ , la transition  $n \rightarrow n+1$  est la plus probable. Il s'agit de l'absorption infra-rouge. La transition  $n \rightarrow n-1$  est aussi possible. Il s'agit alors de l'émission stimulée utilisée dans la technologie laser.

Dans le cas où  $\nu \gg \nu_n$ , c'est un phénomène de diffusion qui aura lieu. La molécule passe par un état virtuel puis revient à un état réel. Seul un retour aux niveaux  $n$ ,  $n+1$  et  $n-1$  est possible. Une diffusion de photon se produit alors. La diffusion Rayleigh avec une diffusion d'un photon d'énergie  $h\nu$  est la plus probable. Les diffusions de Raman Stokes (diffusion d'un photon d'énergie  $h(\nu - \nu_n)$ ) et de Raman anti-Stokes (diffusion d'un photon d'énergie  $h(\nu + \nu_n)$ ) sont peu probables.

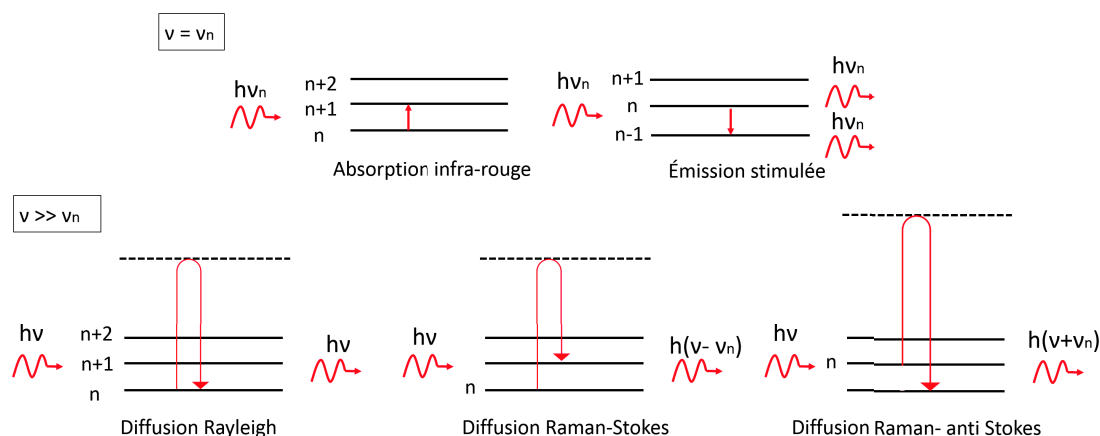


FIGURE 2.38 – Les différentes interactions rayonnement-matière

### 2.5.2 Observation de l'effet Raman

L'échantillon à étudier est éclairé par un faisceau laser dont la fréquence  $\nu_0$  est connue. Une grande partie des photons est absorbée ou réfléchi tandis qu'une plus petite partie est diffusée. La majorité des photons diffusés possèdent la même fréquence que les photons excitateurs (diffusion Rayleigh). Les autres photons (moins d'un millièème des photons diffusés) ont une fréquence différente :  $\nu_0 + \nu_n$  (diffusion Raman anti-Stokes) ou  $\nu_0 - \nu_n$  (diffusion Raman Stokes).

Pour présenter le spectre Raman, l'intensité diffusée est généralement représentée non pas en fonction de la fréquence de rayonnement mais en fonction du nombre d'onde  $\bar{\nu}$  :



$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (2.3)$$

où  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement.

Les raies Raman sont représentées par la grandeur caractéristique  $\bar{\nu}_n$ . Elles sont caractéristiques de certaines fonctions chimiques. L'étude du spectre Raman obtenu permet d'identifier les fonctions présentes dans l'échantillon.

### 2.5.3 Protocole

La spectroscopie Raman a permis d'étudier la présence d'acide tannique dans les fibres de PLA-AT électrospinnées. Le microscope confocal Raman LabRAM Aramis (Horiba) a été utilisé avec une longueur d'onde du laser fixée à 532 nm. Les spectres ont été acquis à l'aide du logiciel LabSpec5. Avant d'acquérir les spectres, la mise au point sur l'échantillon est réalisée. Des objectifs x10 ; x50 et x100 ont été utilisés.

## 2.6 Mesure de la tension superficielle et des angles de contact

### 2.6.1 Tension de surface

La tension superficielle ou encore tension de surface est un paramètre étudié en électrospinning puisque c'est grâce à elle que la goutte est maintenue au bout de l'aiguille et que les forces électrostatiques doivent la contrebalancer afin de former un jet. La tension de surface est liée aux interactions entre les molécules présentes à une interface, généralement l'interface air-liquide. La tension superficielle résulte de la cohésion entre les molécules présentes dans le liquide du fait d'une plus grande attraction entre elles qu'avec les molécules de l'air. Le système modifie sa géométrie pour diminuer l'aire de l'interface et pour atteindre la configuration de plus basse énergie. La tension superficielle est l'énergie de surface qui permet de maintenir le système à cet équilibre.

### 2.6.2 Protocole

L'appareil qui permet de mesurer la tension de surface est équipé d'une caméra. Après ajustement des paramètres de la caméra, une goutte à l'équilibre est filmée et le logiciel permet de donner une valeur de la tension de surface en fonction de la forme prise par la goutte.

La tension de surface de différentes solutions d'acide tannique a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre (Tracker, Teclis Instrument). Avant la mesure, la densité des solutions a été mesurée en pesant un volume connu de solution.

### 2.6.3 Angle de contact

La mesure des angles de contact est une technique macroscopique de caractérisation d'une surface [47]. Elle permet d'évaluer l'interaction d'un liquide (L) avec une surface solide (S) et simultanément une phase gazeuse (V). A chaque interface LS, SV et VL est associée une énergie de surface  $\gamma_{LS}$ ,  $\gamma_{SV}$  et  $\gamma_{VL}$ . Lorsqu'une goutte de liquide, qui n'est pas assez grosse pour se déformer sous son poids, est à l'équilibre sur une surface dont on néglige la rugosité (voir figure 2.39), il est alors possible d'écrire l'équation de Young :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (2.4)$$

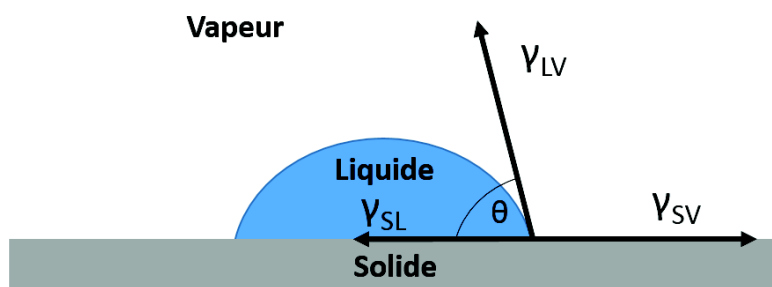


FIGURE 2.39 – Schéma d'une goutte à l'équilibre sur une surface

L'angle  $\theta$  permet ainsi de caractériser l'affinité de la surface avec le liquide utilisé. Pour un angle  $\theta < 90^\circ$ , dans le cas de l'eau, la surface est décrite comme hydrophile tandis que pour un angle  $\theta > 90^\circ$ , la surface est décrite comme hydrophobe.

### 2.6.4 Protocole

L'hydrophilie des fibres de PLA contenant ou non de l'acide tannique a été quantifiée par mesure des angles de contact avec l'eau et la surface à l'aide d'un tensiomètre optique (Attension Theta, Biolin scientific). Le volume de la goutte était compris en 5 et 10  $\mu\text{L}$ .

## 2.7 Diffusion dynamique de la lumière

### 2.7.1 Principe de la diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) est une technique non destructive qui permet d'étudier la taille de particules en solution [48]. Elle se base sur le fait que les particules sous l'effet de l'agitation thermique sont soumises au mouvement brownien. Un faisceau laser traverse la solution. Quand ce faisceau atteint les particules, la lumière est alors diffusée dans toutes les directions (avec l'hypothèse que les particules sont plus petites que la longueur d'onde utilisée). L'intensité lumineuse diffusée selon un angle donné est mesurée au cours du temps. Ce signal fluctue au cours du temps du fait du mouvement brownien des particules qui implique que la distance entre les particules ne cesse de changer. Le signal de l'intensité est ensuite autocorrélé pour permettre d'obtenir des temps caractéristiques de décroissance. Lorsque la fonction d'autocorrélation (notée  $g^{(2)}$ ) décroît rapidement, cela indique que le signal de l'intensité de la lumière diffusée fluctue rapidement et que les particules sont de petite taille (car elles sont plus mobiles) (figure 2.40).

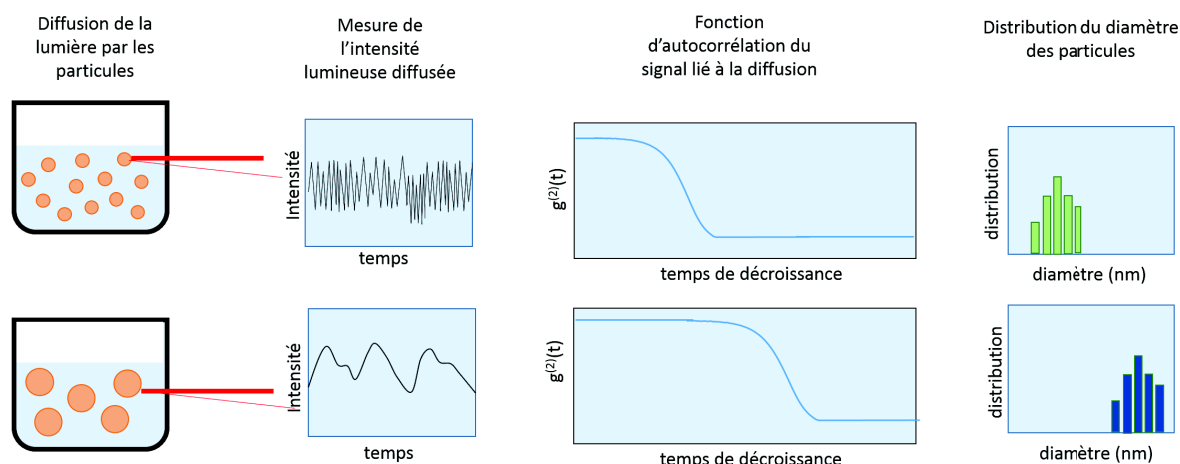


FIGURE 2.40 – Schéma du principe de la DLS. Un faisceau laser traverse une solution contenant des particules. Les particules diffusent la lumière. L'intensité de la lumière diffusée dans une certaine direction est mesurée au cours du temps. Le signal de l'intensité de la lumière diffusée est ensuite autocorrélé. Plus les particules sont petites, plus elles bougent et plus vite la fonction d'autocorrélation décroît. A partir des temps caractéristiques de décroissance de la fonction d'autocorrélation il est possible d'obtenir une distribution de la taille des particules.

### 2.7.2 Protocole

La DLS de différentes solutions d'acide tannique dans l'eau et dans un mélange eau-éthanol (37,5/62,5 masse/masse) a été étudiée à 22°C. Un goniomètre ALV CGS-3 (ALV, Langer) équipé d'un laser He-Ne (longueur d'onde de 633 nm) a été utilisé. Les mesures ont été faites avec un angle de diffusion de 90°. Le temps d'acquisition est de 1 minute et le nombre de photons collectés par unité de temps était au moins 10 fois supérieur à l'intensité diffusée par le solvant. Avant chaque mesure, les solutions ont été filtrées avec des filtres 0,20 µm (Filtropur S0.2).

### 2.7.3 Calcul des rayons hydrodynamiques

A partir des fonctions d'autocorrélation, il a été possible d'obtenir les temps caractéristiques  $\tau$  des modes rapides pour chaque solution. Les rayons hydrodynamiques  $R_{AT}$  des agrégats d'AT ont pu être mesurés pour différentes concentrations en AT  $C_{AT}$ .

Les paramètres suivants ont été mesurés afin de calculer  $R_{AT}$  :

$C_{AT}(\%mt)$	$\tau$ dans l'eau (ms)	$\tau$ dans le mélange eau-éthanol 37,5-62,5%ms
2	$1,91 \times 10^{-2}$	$3,53 \times 10^{-2}$
10	$4,89 \times 10^{-2}$	$1,30 \times 10^{-2}$
35	$1,00 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^{-1}$

Solvant	eau	mélange eau-éthanol 37,5-62,5%ms
n	1,332	1,360
$\eta$ (mPa.s)	0,89	2,22

Les rayons  $R_{AT}$  des agrégats d'AT ont été estimés avec la formule :

$$R_{AT} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.5)$$

avec  $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>, la constante de Boltzmann, T=295K la température et  $\eta$  la viscosité du solvant et

avec q, le vecteur de diffusion :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.6)$$

où  $n$  est l'indice de réfraction,  $\lambda$  est la longueur d'onde du laser et  $\theta$ , l'angle de diffusion, ici  $90^\circ$  et  $D$ , le coefficient de diffusion :

$$D = \frac{1}{2\tau q^2} \quad (2.7)$$

## 2.8 Rhéologie : mesure de la viscosité

### 2.8.1 Principe de la mesure de viscosité

La rhéologie étudie la déformation et l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée [49]. Dans le cadre de cette thèse, c'est particulièrement la mesure de la viscosité qui a été étudiée.

#### Définition de la viscosité

La viscosité d'un fluide, aussi appelée viscosité dynamique décrit la résistance à l'écoulement des différentes couches d'un fluide les unes sur les autres. Plus sa viscosité est faible, plus le fluide s'écoule facilement. La viscosité est définie pour un écoulement de cisaillement simple. Dans ce cas, le fluide est maintenu entre deux plans parallèles. Sous l'action d'une force tangentielle  $F_y$ , un des deux plans se déplace à une vitesse  $v_y$  tandis que l'autre plan reste immobile (voir schéma 2.41). A l'exception des couches qui sont en contact avec les plans solides, les couches du fluide vont "glisser" les unes sur les autres sans mouvement désordonné : l'écoulement est supposé laminaire. Si on considère un élément d'aire  $dA = dx dy$ , la force de frottement visqueux égale la force motrice agissant sur cet élément :

$$\frac{dF_y}{dA} = \eta \frac{dv_y}{dz} \quad (2.8)$$

Si la contrainte de cisaillement est notée  $\tau$  avec  $\tau = dF_y/dA$  et le gradient de vitesse ou vitesse de cisaillement est noté  $\dot{\gamma}$  avec  $\dot{\gamma} = dv_y/dz$ , l'équation devient :

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (2.9)$$

La viscosité ou viscosité dynamique ou bien encore viscosité de cisaillement est ainsi notée  $\eta$ . Sa dimension est : masse/(longueur x temps) et son unité est le pascal.seconde (Pa.s). Quelques fois, la viscosité peut être exprimée en poise, P avec  $1P = 10^{-1}Pa.s$ . Souvent, les sous-unités (mPa.s ou cP) sont utilisées. Par exemple, la viscosité de l'eau vaut environ 1 mPa.s ou encore 1 cP.

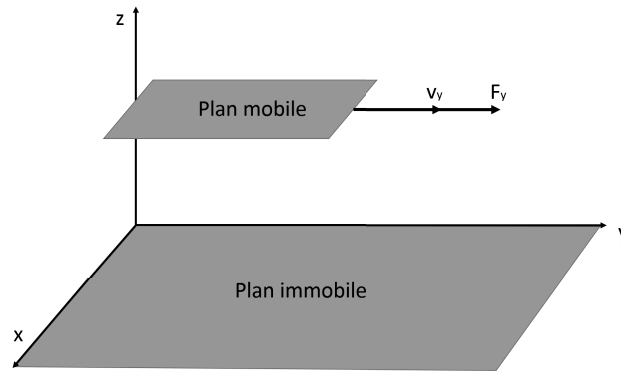


FIGURE 2.41 – Sous l'action d'une force tangentielle  $F_y$ , le plan supérieur se déplace à une vitesse  $v_y$ . Le plan inférieur reste immobile.

Pour les liquides dits newtoniens,  $\eta$  ne dépend pas de  $\dot{\gamma}$  et par conséquent pas de  $\tau$ .

D'autres viscosités sont définies à partir la viscosité de cisaillement pour des suspensions ou des solutions :

- la **viscosité relative**  $\eta_r$  avec :  $\eta_r = \eta / \eta_s$  avec  $\eta_s$  la viscosité du solvant pur ;
- la **viscosité spécifique**  $\eta_{sp}$  :  $\eta_{sp} = \eta_r - 1$
- la **viscosité réduite**  $\eta_{red} = \eta_{sp} / c$  avec  $c$  la concentration du soluté
- la **viscosité intrinsèque**  $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$
- la **viscosité intrinsèque extrapolée à contrainte de cisaillement nulle**  $[\eta]_0$

### Viscosité des polymères : influence de la concentration

La viscosité d'une solution de polymère est une caractéristique nécessaire de connaître lors de la mise en place de l'électrospinning. Nous nous intéresserons ici uniquement à l'influence de la concentration sur la viscosité et de la définition des différents domaines. La concentration est un paramètre qui influence grandement la viscosité des solutions de polymères. Il existe 3 grands domaines de concentration pour lesquels des lois de viscosité différentes s'appliquent :

- **le domaine dilué** : la place disponible pour chaque macromolécule est suffisante pour empêcher l'enchevêtrement. Dans ce domaine, la loi de Huggins peut quasiment toujours s'appliquer et dans ce cas :

$$\frac{\eta}{\eta_s} = 1 + [\eta]c + k_h[\eta]^2 c^2 \quad (2.10)$$

avec  $k_h$  est la constante de Huggins qui est obtenue de manière expérimentale et qui

décrit l'interaction polymère-polymère.

- **le domaine semi-dilué** : les solutions de polymère utilisées pour l'électrospinning se situent dans ce domaine. Les molécules de polymère commencent à s'enchevêtrer. Elles conservent cependant une certaine liberté. La concentration joue un rôle plus important sur la viscosité que dans le régime dilué (voir schéma figure 2.42)
- **le domaine enchevêtré** : dans ce domaine les molécules de polymères sont enchevêtrées. Le mouvement est alors celui d'un réseau.

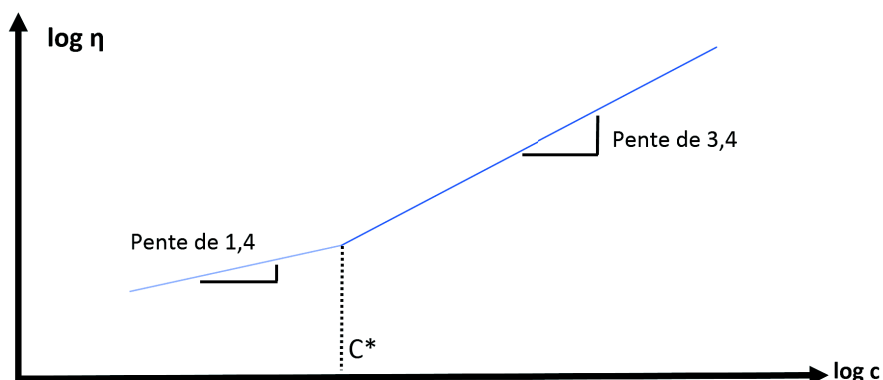


FIGURE 2.42 – Courbe caractéristique de l'influence de la viscosité en fonction de la concentration. Pour une concentration à  $C^*$ , la solution est en régime dilué. Au delà de  $C^*$ , la solution est en régime semi-dilué.

Un autre domaine peut aussi être défini : le domaine des polymères fondus. Dans ce cas, le comportement est celui d'un liquide pur non newtonien.

### Principe de la mesure de viscosité

La viscosité peut être mesurée avec un viscosimètre ou un rhéomètre. Pour ces travaux, un rhéomètre rotatif a été utilisé. La solution étudiée est placée entre un rotor et un stator. Le rotor (la partie supérieure) tourne de manière continue. La solution est alors cisailée et permet de transmettre un couple de rotation au stator. C'est le rapport entre ce couple transmis par la substance cisailée et la vitesse de rotation qui donne une mesure de la viscosité. Il existe différentes sortes de géométrie dans lesquelles la solution est placée : couette, plan-plan, cône-plan. La géométrie cône-plan a été utilisée (voir schéma figure 2.43). L'angle du cône est très faible. Cette géométrie permet d'avoir une vitesse de cisaillement  $\dot{\gamma}$  quasiment constante.

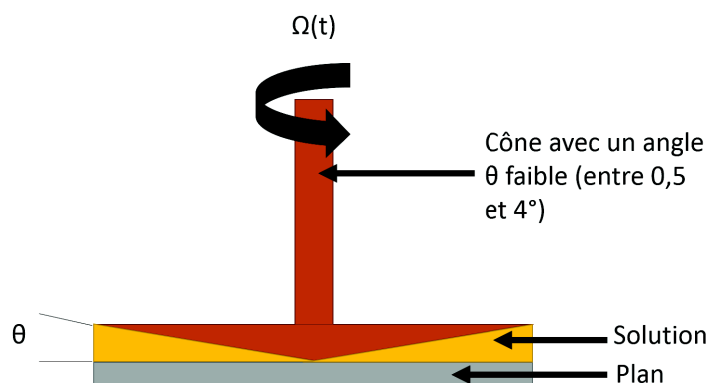


FIGURE 2.43 – Schéma d'une géométrie cône-plan

## 2.8.2 Protocole

La viscosité de solution d'acide tannique a été mesurée pour différentes concentrations en AT et pour différents ratios de mélange eau/éthanol. Le rhéomètre utilisé est le rhéomètre Physica MCR 301 de la marque Anton Paar. Une géométrie cône-plan avec un angle de  $1,009^\circ$  (CP50-1) et une cellule Pelletier ont été utilisés. Les mesures ont été réalisées à  $22^\circ\text{C}$  avec un système anti-évaporation afin d'éviter l'évaporation des solvants durant la mesure. La viscosité a été mesurée en taux de cisaillement constant en continu pour des taux de cisaillement compris entre  $10\text{ s}^{-1}$  et  $500\text{ s}^{-1}$ . Pour cette gamme, un comportement newtonien a été observé.

## 2.9 Spectroscopie UV-visible

### 2.9.1 Principe de la spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible utilise des longueurs d'onde dans le domaine proche ultra-violet (UV) entre 180 et 400 nm, dans le domaine du visible entre 400 et 700 nm et dans le domaine du très proche infra rouge entre 700 et 900 nm généralement [50]. La spectroscopie UV-vis est utilisée pour étudier la composition de solutions (plus rarement de gaz ou de solide). Un faisceau lumineux traverse une solution. Les molécules ou les ions de la solution absorbent des photons à certaines longueurs d'onde. Ceci entraîne alors des transitions électroniques qui permettent de donner des informations sur la présence de fonctions caractéristiques. Le spectre d'absorption du solvant pur est généralement mesuré pour obtenir un blanc. Ce spectre sera soustrait lors



de la mesure du spectre d'absorption du solvant avec les molécules d'intérêt.

Les spectres d'absorption sont tracés avec la transmittance (T) ou l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde où  $T = \frac{I}{I_0}$  et  $A = -\log T$  avec I l'intensité lumineuse transmise et  $I_0$  l'intensité lumineuse incidente. Par ailleurs, grâce à la loi de Beer-Lambert, l'absorption de la lumière est proportionnelle à la concentration de la molécule qui absorbe. Il est ainsi possible d'obtenir la concentration de cette molécule en solution.

## 2.9.2 Protocole

La spectroscopie UV-vis a été utilisée pour différentes parties de cette thèse. Le spectrophotomètre utilisée est un spectrophotomètre mc<sup>2</sup> de la marque Safas (Monaco).

## 2.9.3 Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline dans les films et en solution

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour mesurer l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (ALP). La phosphatase alcaline est une enzyme de type hydrolase qui clive une liaison phosphoester en libérant un groupe hydroxyle et un phosphate. Elle permet l'hydrolyse du para-nitrophénylphosphate (pNPP) en para-nitrophénol (pNP) (voir la réaction figure 2.44). Le pNP possède un maximum d'absorbance à 405 nm.

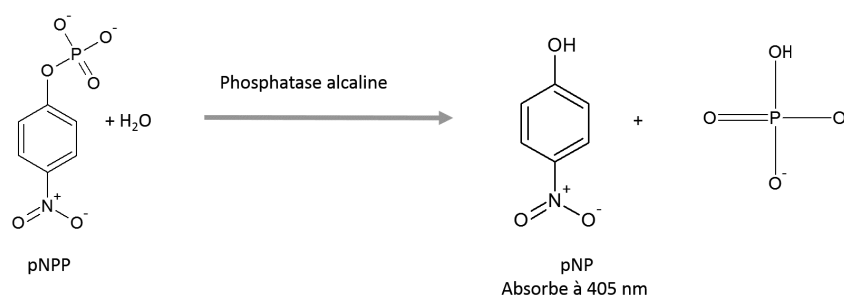


FIGURE 2.44 – La phosphatase alcaline permet l'hydrolyse de pNPP en pNP et un ion phosphate

La croissance des films multicouches  $\text{PEI}-(\text{AT-ALP})_n$  a été caractérisée à l'aide de la spectroscopie UV-visible sur des lamelles de quartz. Les films ont été construits par trempage successif dans des solutions d'AT puis des solutions d'ALP. Toutes les deux paires de couches déposées, les films ont été rincés avec de l'eau distillée puis séchés avec un flux d'air. L'activité de ces films

PEI-(AT-ALP)<sub>n</sub> a été déterminée en fonction du nombre de paires de couches déposées. Les lamelles de quartz recouvertes avec les films souhaités après rinçage et séchage ont été plongées dans une solution de pNPP commerciale diluée 20 fois avec une concentration finale de  $(4.64 \pm 0.35) \times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le tampon Tris à pH=8,5 ; le pH optimal pour la phosphatase alcaline. La production de pNP a été suivie avec le spectrophotomètre à 405 nm en réalisant une mesure toutes les 10 secondes et en prenant comme référence la solution juste après sa mise au contact avec les films à t=0.

L'activité enzymatique des films construits lors des expériences de microbalance à cristal de quartz (QCM) a aussi été mesurée. Dans ce cas, la solution de pNPP injectée dans la QCM a été recueillie et son absorbance à 405 nm a été mesurée. Cette mesure permet d'évaluer la cinétique enzymatique en divisant l'absorbance mesurée par le temps de réaction (ici 900 secondes). Dans ces expériences, une solution de pNPP à différentes concentrations [S] a été injectée pendant 15 minutes dans la cellule de QCM, puis recueillie avant la mesure de l'absorbance à 405 nm, donnant ainsi la vitesse de réaction initiale. Les données ont ensuite été représentées selon la représentation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} + \frac{K_m}{v_m} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2.11)$$

avec  $v_m$ , la vitesse maximale initiale obtenue pour une forte concentration,

Si l'inverse de la vitesse de réaction (obtenue en divisant l'absorbance après 15 minutes, dans les conditions de flux constant de la QCM, par le temps de réaction) représentée en fonction de  $\frac{1}{[S]}$  est une ligne droite, ceci est une bonne indication que le mécanisme de réaction suit une cinétique de type Michaelis-Menten. L'intersection entre cette droite et l'axe des abscisses  $\frac{1}{v}$  permet d'obtenir la constante de Michaelis-Menten  $K_m$ . L'activité enzymatique a aussi été déterminée après le traitement de certains films avec une solution de 10mM en NaIO<sub>4</sub> (dans du tampon acétate pH=5) pendant 10 minutes avant l'injection en flux continue de la solution de pNPP. La constante de Michaelis-Menten de l'enzyme en solution a aussi été mesurée.

#### 2.9.4 Mesure de la libération d'acide tannique au cours du temps dans les fibres PLA+AT

La libération d'AT dans les fibres de PLA+AT a aussi été suivie par spectroscopie UV-vis. Pour ce faire, des fibres PLA+AT ont été plongées dans de l'eau ou dans du tampon (tampon bicine, 100 mM, pH=7,4). Avant immersion, les fibres ont été pesées et pour 1 mg de fibres, 1

mL de tampon a été ajouté. L'AT possède un pic caractéristique à 277 nm (voir spectre figure 2.45) correspondant aux groupes phényl. 100  $\mu$ L de surnageant ont été prélevés et dilués 10 fois avant les différentes mesures et l'absorbance de la solution à 277 nm a été mesurée. Au préalable, une courbe d'étalonnage a été réalisée afin de connaître la concentration en AT du surnageant et pouvoir calculer le pourcentage d'AT qui s'est libéré des fibres.

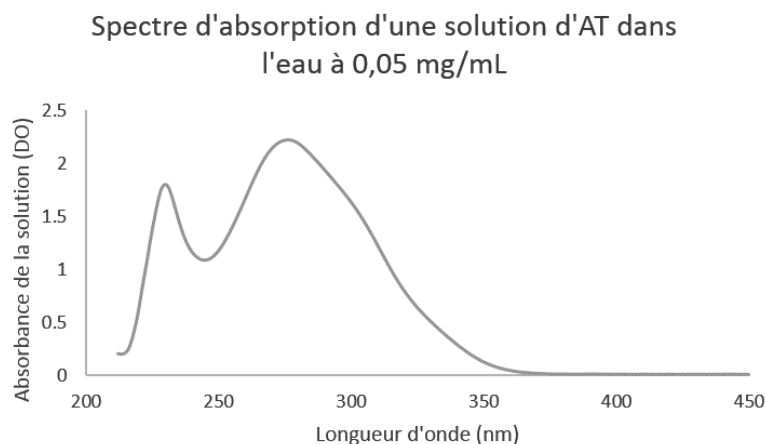


FIGURE 2.45 – Spectre d'absorption d'une solution d'AT dans l'eau à 0,05 mg/mL. Le spectre de l'AT présente deux maxima d'absorption un à 230 nm et un à 277 nm

### 2.9.5 Mesure de la libération d'acide tannique des matrices structurées

La libération de l'AT permettant la structuration de fibres de PLA a aussi été suivie par spectro-UV. Les matrices structurées ont été découpées à l'aide d'un punch de biopsie de diamètre 8 mm et mises au contact d'un volume de 200  $\mu$ L de tampon acide citrique-hydrogénophosphate de sodium à pH=7 pendant 24 heures. Après 24 h, la concentration d'AT dans le milieu a été mesurée et quantifiée à l'aide d'une courbe étalon.

### 2.9.6 Mesure de l'adsorption de protéines sur les fibres de PLA

La spectroscopie UV-visible a aussi été étudiée pour suivre l'adsorption de protéines sur des fibres de PLA traitées ou non au plasma. La première protéine modèle a avoir été étudiée est l'hémoglobine. Pour cela, des fibres de PLA traitées ou non traitées au plasma ont été

pesées. Pour 10 mg de fibres, 1 mL d'une solution d'hémoglobine à différentes concentrations dans un tampon Tris 50 mM NaCl 100 mM à pH=7,4 a été ajouté. Le spectre de la solution a été mesuré après un temps donné au contact des fibres. La diminution du maximum de l'absorbance à 406 nm (voir le spectre de l'hémoglobine figure 2.46) permet de mesurer la diminution de la concentration de la solution et ainsi la masse d'hémoglobine absorbée sur les fibres. Pour prendre en compte l'hémoglobine adsorbée sur les parois du tube, un même volume de solution d'hémoglobine a été placé dans un tube sans aucune fibre. Le spectre de cette solution a ainsi été soustrait à celui du spectre de la solution en présence de fibres après le même temps d'adsorption.

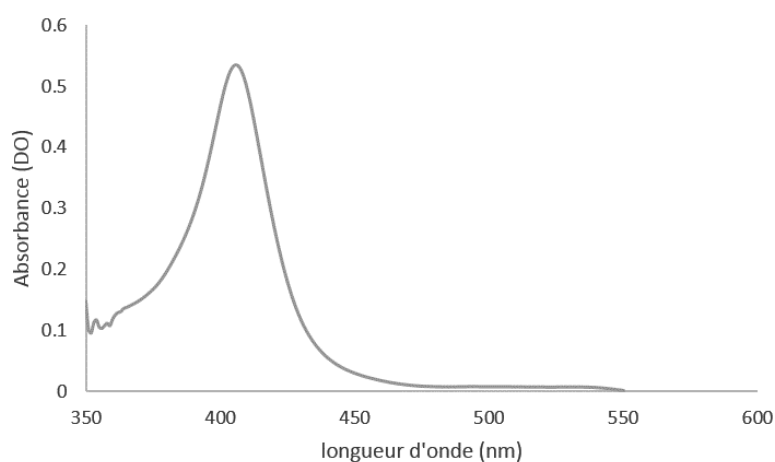


FIGURE 2.46 – Spectre d'une solution d'hémoglobine dans un tampon Tris 50 mM NaCl 100 mM à pH=7,4 pour une concentration de 0,1 mg/mL. Le spectre présente un pic à 406 nm.

## 2.10 Traitement plasma

### 2.10.1 Principe du traitement plasma

Le plasma, en physique, est défini comme un gaz ionisé. Il est créé en soumettant le gaz à un fort courant électrique. Le plasma permet de modifier la chimie de surface par la création de radicaux libres qui ont assez d'énergie pour casser des liaisons organiques de polymère par exemple. Les radicaux libres peuvent ensuite réagir entre eux ou avec les espèces présentes dans le plasma. Le traitement plasma peut être utilisé pour nettoyer les surfaces mais aussi

pour augmenter l'énergie de surface du matériau en favorisant l'incorporation de groupements polaires à la surface [51].

### 2.10.2 Protocole

Le traitement plasma a été réalisé à l'aide du Plasma Cleaner PDC-32-G-2 (Harrick Plasma) et d'une pompe IDP-3 (Agilent Technologies). Le traitement plasma a été utilisé pour nettoyer les substrats utilisés pour déposer les films multicouches. Il a aussi été utilisé pour augmenter l'hydrophilie de fibres d'acide poly-lactique (PLA) dans le chapitre sur la fonctionnalisation et la structuration des fibres de PLA. Pour cela, les matériaux fibreux ont été traités au plasma pendant 30 secondes.

## 2.11 Microbalance à cristal de quartz

### 2.11.1 Principe de la microbalance à cristal de quartz

La microbalance à cristal de quartz (QCM, pour Quartz Crystal Microbalance) est une technique facilement accessible pour étudier les interfaces entre surfaces solides et liquides ainsi que le dépôt de matière sur une surface. La QCM est basée sur l'effet piézo-électrique inverse de certains cristaux : l'application d'une tension électrique induit la déformation mécanique du matériau. Généralement, le cristal utilisé est un cristal hexagonal de quartz[52].

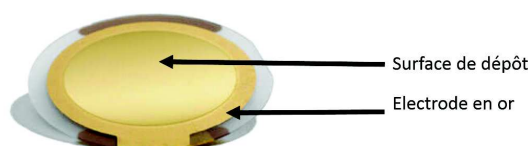


FIGURE 2.47 – Cristal de QCM du côté de la surface de dépôt

Le cristal est excité grâce à un signal électrique sinusoïdal, à l'aide de 2 électrodes situées chacune sur une surface du cristal (voir figure 2.47). Cette excitation induit l'apparition d'ondes de cisaillement acoustiques, les deux surfaces du cristal oscillant dans des directions opposées. La longueur d'onde de cisaillement  $\lambda$  vaut  $2e$  avec  $e$  l'épaisseur du cristal (voir figure 2.48).

La fréquence de résonance  $f_r$  est la fréquence d'excitation pour laquelle l'amplitude d'oscillation du cristal est maximale. C'est un paramètre caractéristique du cristal et c'est le changement de cette valeur qui est suivi pour étudier un dépôt sur une surface. Sans aucun dépôt à la surface du quartz :  $f_r = c/e$ , avec  $c$  la vitesse de l'onde de cisaillement qui vaut  $\sqrt{G/\rho}$  avec  $G$ , le module élastique de cisaillement du cristal de quartz (29 GPa) et  $\rho$ , la densité du quartz (2.7 kg/m<sup>3</sup>). Dans ce cas,  $f_r$  vaut 5.4 MHz.

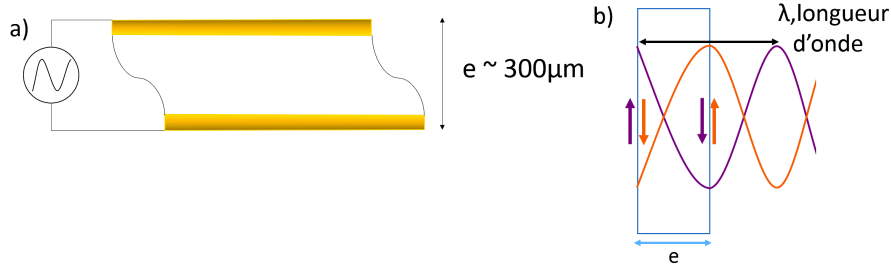


FIGURE 2.48 – a) Représentation schématique du cristal de quartz excité électriquement : les deux faces bougent dans des sens opposés b) Les deux faces du cristal oscillent dans des sens opposés de manière alternative. La longueur d'onde de cisaillement vaut  $2e$ .

Si le cristal est excité à différentes harmoniques, c'est à dire des multiples  $n$  de la fréquence de résonance, on a alors  $\lambda = 2e/n$ . Pour que les faces du cristal bougent dans des sens opposés,  $n$  doit être impair. Dans ce cas, la fréquence pour une harmonique de rang  $n$  donné  $f_n$  vaut :

$$\frac{n}{2e} \sqrt{\frac{G}{\rho}}.$$

Si un film d'épaisseur  $\Delta e$  se dépose sur une des surfaces du cristal, la longueur d'onde (voir figure 2.49) et la fréquence de résonance sont modifiées. La fréquence de résonance avec un dépôt d'épaisseur  $\Delta e$  est notée  $f_{\Delta e}$  et alors :

$$f_{\Delta e} = \frac{n}{2(e + \Delta e)} \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (2.12)$$

Si l'épaisseur  $\Delta e$  est négligeable par rapport à  $e$  et que la densité et le module de cisaillement du cristal ne sont pas modifiés par le dépôt de film, c'est à dire que le film est supposé avoir les mêmes propriétés mécaniques que le cristal :

$$\frac{\Delta f}{f_n} = -\frac{\Delta e}{e} \quad (2.13)$$

où  $\Delta f = f_{\Delta e} - f_n$ . Le dépôt d'une masse à la surface du quartz entraîne ainsi une diminution de la fréquence de résonance du quartz.

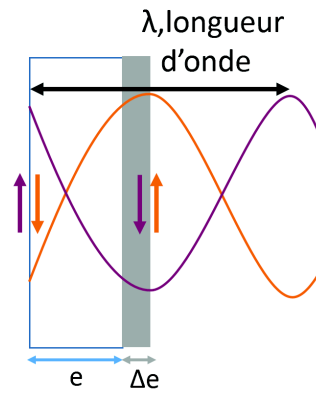


FIGURE 2.49 – Modification de la longueur d'onde  $\lambda$  lorsqu'un film est déposé à la surface du cristal

Si cette équation est multipliée par la densité et l'aire du cristal, on obtient l'équation de Sauerbrey (5.1) définie en 1959 [53] :

$$\frac{\Delta f}{n} = -\frac{m_{film}}{C} \quad (2.14)$$

$m_{film}$  est la masse surfacique du film déposé à la surface du quartz et  $C$  est la constante de Sauerbrey. Elle vaut, pour les cristaux ayant une fréquence de résonance de 5 MHz : 18 ng/(cm<sup>2</sup> Hz). La QCM mesure ainsi la variation de fréquence de résonance qu'engendre le dépôt d'un matériau à la surface du cristal de quartz. Elle permet de déduire la masse déposée par unité de surface avec une précision proche du ng.cm<sup>-2</sup>.

### 2.11.2 Principe de la microbalance à cristal de quartz avec dissipation

Pour appliquer l'équation de Sauerbrey (5.1), il faut que  $\frac{\Delta f}{n}$  ait la même valeur quelque soit  $n$ . En effet, la masse déposée sur le cristal ne dépend en aucun cas de  $n$  et  $C$  est une constante. Cette équation n'est valable que pour des films fins, rigides et uniformes. Lorsque le film déposé présente un comportement visco-élastique, ce qui est généralement le cas pour les films multicouches, un phénomène de dissipation apparaît et l'équation de Sauerbrey n'est alors plus applicable. La QCM avec mesure de la dissipation (QCM-D) est alors utilisée. Elle permet de suivre le facteur de dissipation  $D$  (voir 2.50) qui dépend des propriétés visco-élastiques du film. Grâce à des modèles développés, notamment par Voinova et al [54], il est ensuite possible de déterminer l'épaisseur des films.

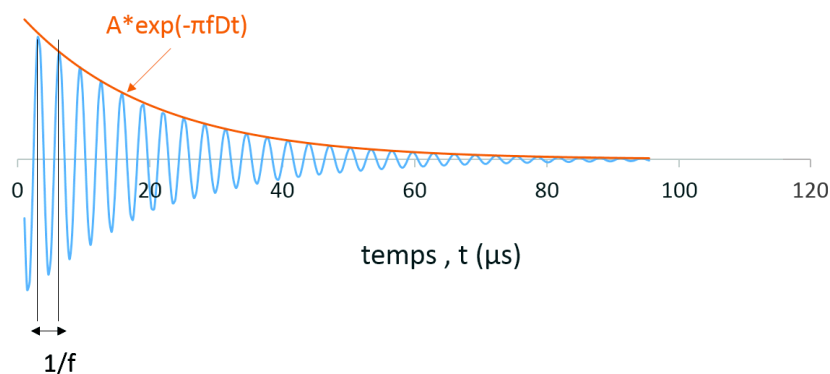


FIGURE 2.50 – Représentation d’une onde amortie (en bleu). L’enveloppe (en orange) de la sinusoïde permet de retrouver le facteur  $D$  puisque son équation est proportionnelle à  $\exp(-\pi fDt)$

### 2.11.3 QCM-D utilisée

La QCM-D utilisée pour étudier la construction de films à base d’acide tannique est de la marque Q-sense (Q-sense, Göteborg, Suède) de type QCM-D E1. Elle possède une cellule de mesure qui est régulée par un système Pelletier (la température doit rester très stable :  $\pm 0.01^\circ\text{C}$  au cours de l’expérience car la mesure est extrêmement sensible aux changements de température). La cellule permet d’utiliser des liquides (Flow Module). En parallèle, une pompe péristaltique permet d’injecter un liquide avec un débit contrôlé. Les cristaux utilisés (QX 301, QSense) sont des cristaux de quartz recouverts d’une couche de dioxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) de fréquence de résonance fondamentale approchant 5 MHz. Un générateur électrique excite le cristal avec une tension de fréquence proche de la fréquence de résonance (et successivement des 3ème, 5ème, 7ème et 9ème harmoniques) pendant un temps bref, de l’ordre de la  $\mu\text{s}$ . Le cristal oscille ensuite librement. Les oscillations mécaniques engendrent alors des oscillations électriques aux bords du cristal qui sont analysées pour suivre le changement de fréquence de résonance ainsi que l’amortissement.



### 2.11.4 Protocole

La QCM-D a été utilisée pour étudier la construction des films à base d'AT et d'enzyme. Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé successivement dans une solution d'Hellmanex (2%v/v), rincé à l'eau, plongé dans une solution de HCl à 1 mol.L<sup>-1</sup> et rincé à l'eau. Après séchage, le cristal est nettoyé au plasma cleaner. Le cristal est ensuite inséré dans la cellule. Pour favoriser l'adsorption d'enzyme ou d'AT, une première couche de polyéthylène imine (PEI) est déposée. Ensuite de manière successive, les solutions d'enzyme (phosphatase alcaline ou lysozyme) puis d'AT sont injectées. Entre chaque étape de dépôt, un rinçage est effectué avec du tampon acétate à 50 mM à pH=5. L'enzyme et l'AT sont dissous dans ce même tampon à une concentration de 1 mg/mL. Les solutions sont injectées dans la QCM à un débit de 0,25 ml.min<sup>-1</sup> pendant 5 minutes. La température est maintenue constante et égale à 25°C.

## 2.12 Microscopie à force atomique

### 2.12.1 Principe de la microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique [55] (AFM pour Atomic Force Microscopy) est une technique d'imagerie introduite en 1986 qui dérive de la microscopie à effet tunnel [56]. Au début, elle permettait d'étudier à l'air libre la surface d'échantillons, qu'ils soient conducteurs ou non, avec une résolution verticale inférieure à 1Å et une résolution latérale de 30Å. Grâce à un développement considérable, les conditions d'utilisation de l'AFM se sont multipliées et il est possible aujourd'hui de travailler dans différents environnements tels que le milieu liquide, ce qui est très intéressant pour les tissus biologiques. D'autres applications sont aussi apparues comme la possibilité de mesurer des forces magnétiques ou électriques.

Le principe de fonctionnement repose sur les interactions entre un capteur de force et la surface de l'échantillon. Le capteur de force ou encore "cantilever" est composé d'un levier de raideur  $k$  connue et d'une micropointe à son extrémité. Les interactions entre la pointe et la surface de l'échantillon modifient la déflexion du cantilever. La mesure de cette déflexion s'effectue, majoritairement, par la déviation d'un faisceau laser réfléchi par l'extrémité du levier sur une photodiode à plusieurs quadrants. La différence de potentiel entre les différents quadrants permet de mesurer la déflexion du cantilever précisément. Un tube piézo-électrique permet de déplacer l'échantillon dans les 3 directions x,y,z (voir schéma figure2.51).

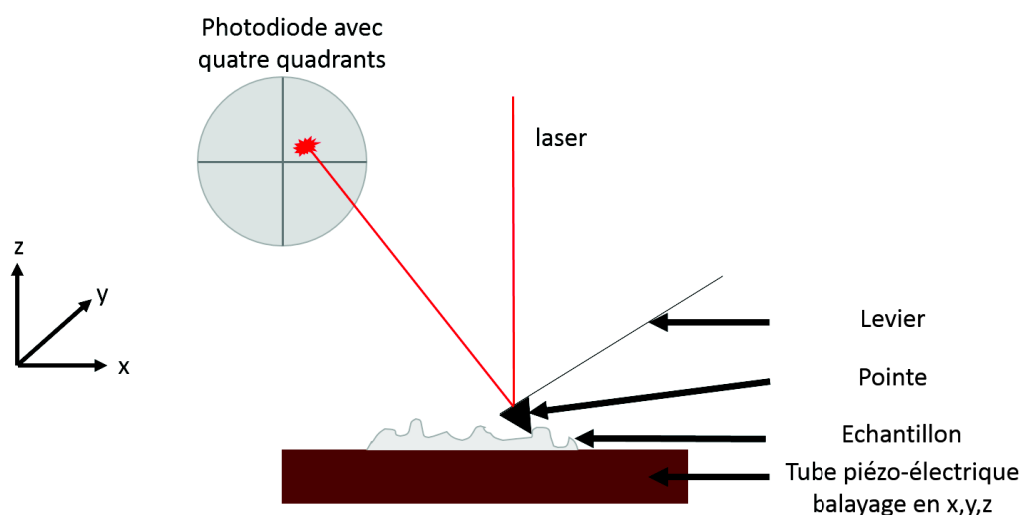


FIGURE 2.51 – Schéma du principe de fonctionnement de l'AFM. La surface de l'échantillon est balayée grâce à la pointe du cantilever. Leurs interactions entraînent la déflexion du levier. Cette déflexion est mesurée grâce à un faisceau laser dévié par l'extrémité du levier sur une photodiode

Il existe différents modes de fonctionnement de l'AFM. Le premier mode développé est le mode "contact". C'est ce mode qui a été utilisé pour l'observation des films multicouches. Dans ce mode, la pointe touche la surface de l'échantillon. Même si ce mode est facile à utiliser, il peut engendrer de l'usure et des déformations sur l'échantillon ce qui diminue la qualité de l'image.

### 2.12.2 Protocole

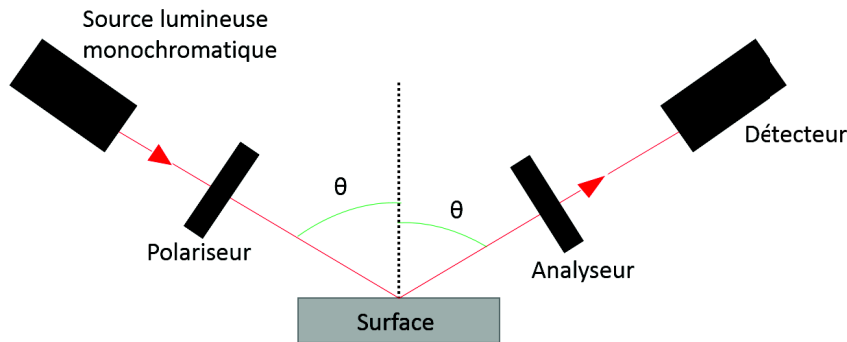
L'AFM a été utilisée pour étudier la topographie ainsi que l'épaisseur des films multicouches PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub>. Le microscope utilisé est un Nanoscope III de la marque Bruker, les mesures ont été réalisées en mode contact à sec à une fréquence de 1 Hz. Les cantilevers utilisés sont de type MLCT avec une constante de raideur élastique de 0,1 N.m<sup>-1</sup>

Des films de 4 et 6 paires de couches ont été déposés sur des lames de silicium puis séchés. Une rayure à l'aide d'une aiguille a été faite sur ces films afin de mesurer leur épaisseur. Des images de la taille de 256 x 256 pixels sur des surfaces de 20 x 20 μm<sup>2</sup> ont été prises dans les zones rayées. Pour déterminer la topographie de la surface ainsi que la rugosité moyenne des films, des images sur des surfaces de 20 x 20 μm<sup>2</sup>, 10 x 10 μm<sup>2</sup> et 5 x 5 μm<sup>2</sup> ont été réalisées.

## 2.13 Ellipsométrie

### 2.13.1 Principe de la technique d'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation de surface permettant de mesurer l'épaisseur d'un dépôt [57]. La technique repose sur le changement de polarisation d'une onde lumineuse après réflexion sur une surface plane. Le changement après réflexion est mesuré à l'aide d'un polariseur et d'un analyseur (voir schéma figure 2.13.1).



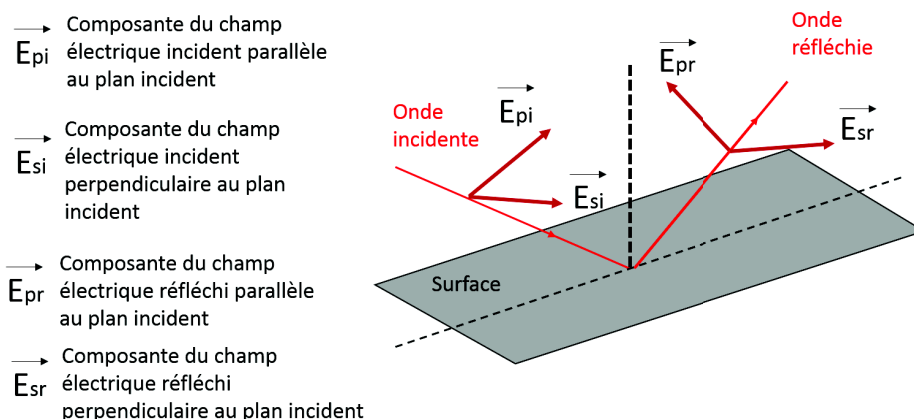
Le changement de la polarisation est caractérisée par deux angles appelés angles ellipso-métriques  $\Psi$  et  $\Delta$  qui sont définis de la manière suivante  $\tan\Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$ , le rapport des modules des coefficients et  $\Delta = \delta_p - \delta_s$  la différence de phases induite par la réflexion ; avec  $r_p$  et  $r_s$  les coefficients de réflexion de l'échantillon pour une polarisation parallèle et perpendiculaire respectivement au plan d'incidence (voir schéma figure 2.13.1), définis comme suit :

$$r_p = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} = |r_p| \exp(j\delta_p) \quad (2.15)$$

$$r_s = \frac{E_{sr}}{E_{si}} = |r_s| \exp(j\delta_s) \quad (2.16)$$

### 2.13.2 Protocole

L'ellipsométrie a été utilisée pour mesurer l'épaisseur des films multicouches enzymatiques à base d'acide tannique. L'ellipsomètre utilisé (P22000, Horiba, Japon) réalise les mesures pour



une longueur d'onde de 632,8 nm et un angle d'incidence de 70°. Les films ont été déposés sur des lames de silicium. Avant la mesure, l'épaisseur de SiO<sub>2</sub> qui se forme spontanément à la surface des lames, a été mesurée en fixant son indice de réfraction à 1,457. L'indice de réfraction des films multicouches a été fixé à 1,50 en se basant sur la composition attendue des films secs. L'épaisseur des films a été mesurée à sec : après dépôt, les films ont été rincés à l'eau puis séchés avec un jet d'air.

## 2.14 Spectroscopie par dichroïsme circulaire

### 2.14.1 Principe de la spectroscopie par dichroïsme circulaire

La spectroscopie par dichroïsme circulaire est une technique de spectroscopie qui permet, entre autre, d'étudier la structure secondaire d'une protéine[58]. Cette technique repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives comme les feuillets  $\beta$  et les hélices  $\alpha$ , d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche.

Une lumière polarisée peut se décomposer en lumière polarisée circulaire droite (c'est à dire que la projection de l'extrémité du champ électrique sur un plan perpendiculaire à la direction de propagation de la lumière décrit un cercle dans le sens des aiguilles d'une montre) et en lumière polarisée circulaire gauche. Quand ces deux ondes traversent un milieu optiquement actif, elles vont être absorbées de manière différente (voir schéma figure 2.52). Les appareils commerciaux se basent sur la mesure de cette variation d'absorbance.

La différence d'absorbance entre la polarisation circulaire droite et la polarisation circulaire

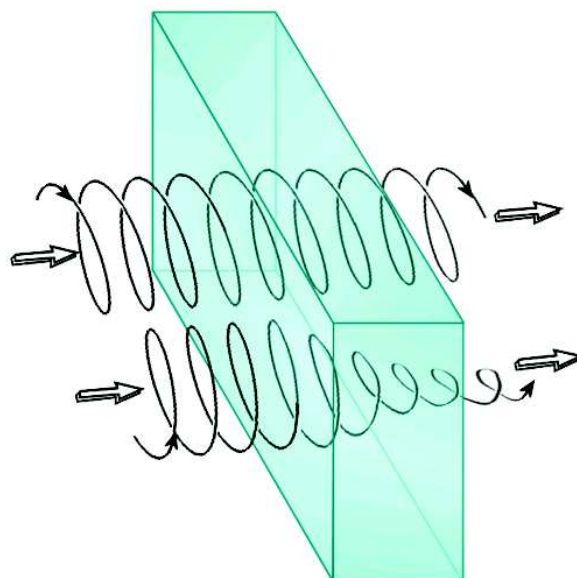


FIGURE 2.52 – Lorsqu’une lumière polarisée circulairement gauche et une lumière polarisée circulairement droite traversent un milieu optiquement actif, elles ne sont pas absorbées de la même manière.

gauche dépend de la longueur d’onde utilisée. Pour les protéines, la gamme de longueur d’onde utilisée se situe dans l’UV-proche (180-260 nm) ce qui correspond à la zone d’absorbance de la liaison peptidique et permet de donner des informations sur les structures secondaires ainsi que dans l’UV-proche (250-320 nm) qui correspond à l’absorbance des acides aminés aromatiques.

### 2.14.2 Protocole

La spectroscopie par dichroïsme circulaire a été utilisée pour étudier la conformation des enzymes dans les films multicouches  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ . Le spectre de dichroïsme circulaire de l’ALP a été mesurée dans du tampon Tris et du tampon Tris avec 10 mM de  $\text{NaIO}_4$  avec une résolution de 1 nm entre 190 et 300 nm avec un spectropolarimètre Jasco J710. Le spectre du tampon Tris et du tampon Tris avec ajout de 10 mM de  $\text{NaIO}_4$  ont été soustraits de ces spectres. De la même manière, le spectre de dichroïsme circulaire d’un film  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_6$  déposé sur une lamelle de quartz et le spectre du même film après un contact de 5 minutes avec le tampon Tris avec 10 mM de  $\text{NaIO}_4$  ont été mesurés. Dans ce cas, le spectre de la lamelle de quartz a été soustrait du spectre obtenu.

## 2.15 Microscopies utilisant la fluorescence

### 2.15.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence est un processus au cours duquel un atome absorbe de l'énergie généralement sous forme de photon à une certaine longueur d'onde puis réémet un photon de longueur d'onde différente [59]. Au départ, la molécule fluorescente appelée fluorophore ou fluorochrome, est dans l'état d'énergie fondamentale  $E_0$  (voir figure 2.53). Lorsqu'elle est excitée par un photon de longueur d'onde précise, elle atteint alors un état vibrationnel du niveau d'énergie  $E_1$ . La relaxation vibrationnelle de la molécule entraîne une perte de l'énergie absorbée. La molécule passe alors à un état vibrationnel plus faible du niveau  $E_1$ . Lorsque la molécule revient ensuite à son état d'énergie fondamentale, un photon d'énergie lumineuse plus faible et donc de longueur d'onde plus grande que le photon initial est émis.

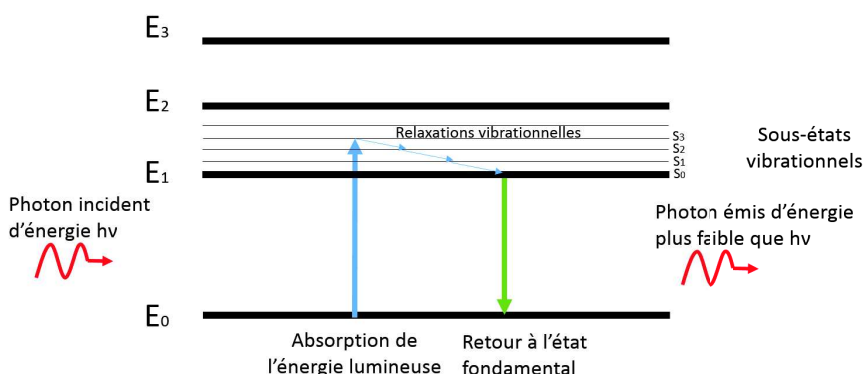


FIGURE 2.53 – Diagramme du processus de fluorescence

Les fluorophores sont généralement cycliques et rigides. Ils sont caractérisés par la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission ainsi que par leur rendement quantique, c'est à dire le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons reçus. Ces fluorophores sont greffés à des molécules d'intérêt afin de visualiser ces molécules.

## 2.15.2 Microscopie à épifluorescence

### Principe de la microscopie à épifluorescence

Un microscope à épifluorescence est un microscope optique (il possède ainsi un pouvoir de résolution de  $0,2 \mu\text{m}$ ) mais qui en plus de visualiser des objets par l'absorption ou la réflexion de la lumière visible permet de visualiser la fluorescence des objets. Ces microscopes possèdent des "cubes" interchangeables. Chaque cube est composé de 2 filtres et d'un miroir dichroïque (voir figure 2.54) . Après la source lumineuse se trouve le filtre d'excitation qui permet d'obtenir une longueur d'onde unique qui correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore que l'on veut observer. Le filtre barrière est situé du côté de l'observateur. Le miroir dichroïque permet de réfléchir certaines longueurs d'onde. Chaque cube correspond à une longueur d'onde excitatrice donnée. Avec cette microscopie, pour obtenir une image nette, il faut que l'échantillon soit dans le plan focal du système optique.

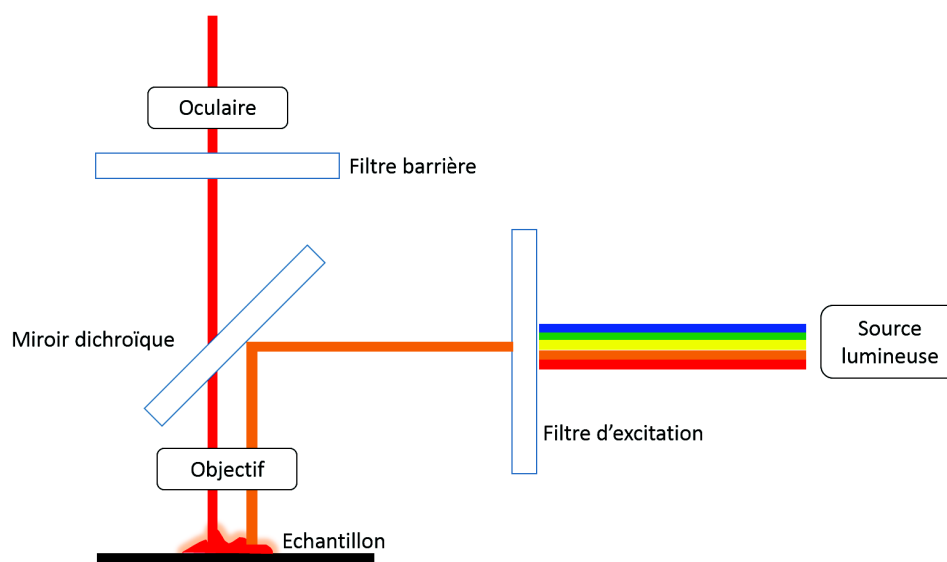


FIGURE 2.54 – Schéma d'un microscope à épifluorescence

### Protocole

La microscopie à épifluorescence a été utilisée pour observer des cellules sur les matrices électrofilées ainsi que des bactéries sur des films multicouche. Pour ce faire, le microscope Nikon Ellipse TE200 a été utilisé. La source lumineuse émettant un spectre caractéristique dans le visible est une lampe à arc HBO (remplie de mercure à haute pression). Le microscope

est équipé de cubes pour la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) : excitation à 488 nm et émission à 520 nm, pour la rhodamine : excitation à 560 nm et émission à 590 nm et pour le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) : excitation à 377 nm et émission à 447 nm. Les images sont capturées à l'aide d'une caméra numérique (DMX1200, Nikon). Les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ.

### 2.15.3 Microscopie confocale à balayage laser

#### Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe de la microscopie confocale à balayage laser a été énoncé pour la première fois dans les années 1950 par Marvin Minsky [60]. Elle permet d'acquérir des images avec une faible profondeur de champ et d'obtenir, grâce à l'acquisition d'images à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, des images tridimensionnelles de l'objet observé.

Pour obtenir des images avec une faible profondeur de champ, l'échantillon n'est pas éclairé par un faisceau de lumière, mais par un éclairage ponctuel (S) grâce à un faisceau laser focalisé par une première lentille, un miroir dichroïque ainsi que l'objectif (voir sur le schéma 2.55, le chemin représenté par la ligne bleue). L'excitation de l'échantillon par le faisceau laser induit l'émission de fluorescence parasite par la zone non éclairée (voir sur le schéma 2.55, le chemin représenté par la ligne verte en pointillés). Pour permettre l'observation de la zone éclairée uniquement, un pin hole ou sténopé permet d'arrêter cette fluorescence parasite et de ne laisser passer que la lumière en provenance du point focal S. Le laser balaye, grâce à un système de miroirs motorisés toute la surface de l'échantillon pour obtenir une image du plan focal. Cette technique permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit.

Le laser peut aussi balayer dans l'axe vertical. Pour cela, l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir l'image de différents plans focaux et à l'aide d'un logiciel, il est possible de réaliser une image en 3 dimensions de l'échantillon.

#### Protocole

Le microscope confocal utilisé est le LSM 510 de chez Zeiss. Il est monté sur un microscope AxioObserver Z1 (Zeiss). Il peut exciter avec 6 longueurs d'onde différentes :

- 405 nm (utilisée pour le DAPI ou le Hoechst 33258) ;
- 458/488/514 nm (produites à l'aide d'un laser argon et utilisées pour les marqueurs tels que la green fluorescent protein ou la FITC) ;



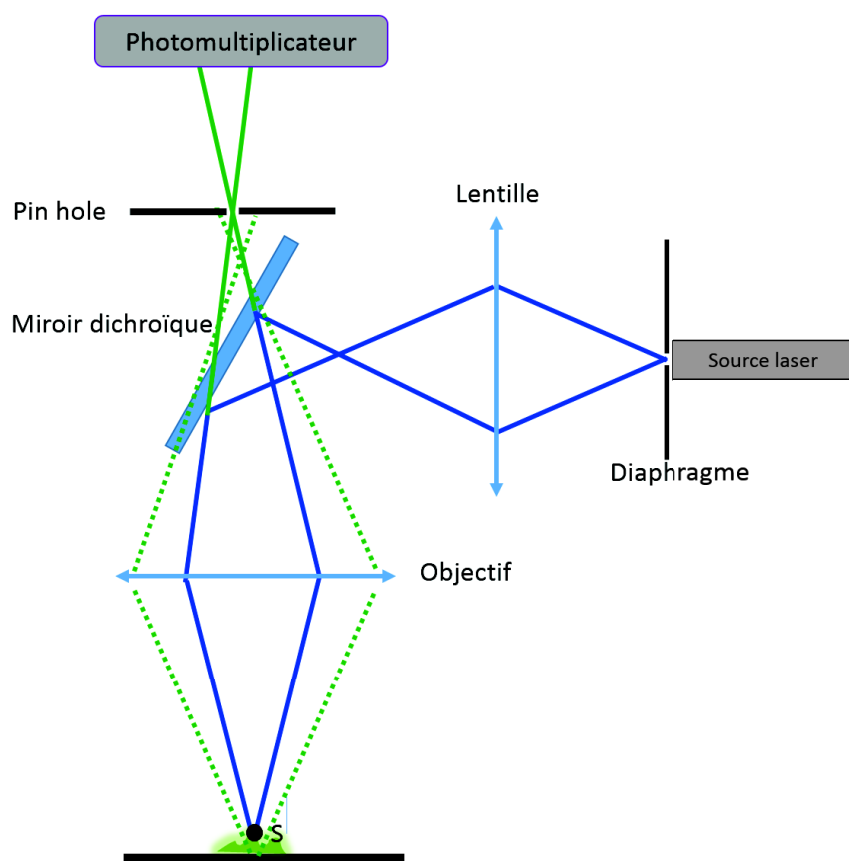


FIGURE 2.55 – Schéma d'un microscope confocal. La ligne bleue représenté le chemin du faisceau laser focalisé qui éclaire l'échantillon. La ligne en pointillés verte représente la fluorescence parasite induite par l'éclairement de l'échantillon. Elle est arrêtée grâce au pin hole et seule la fluorescence émise par le point éclairé par le laser est observée (ligne verte continue).

- 561 nm ;
- 633 nm (produite à l'aide d'un laser hélium-néon et utilisée pour les marqueurs tels que la cyanine 5).

Le microscope a été utilisé pour visualiser des cellules sur les matrices électrofilées. Les cellules ont été marquées avec du Hoechst 3342 (excitation/émission : 361 nm/497 nm) et de la phalloïdine-FITC (excitation/émission : 495/521 nm).

### 2.15.4 Recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment

Le microscope confocal a aussi été utilisé pour réaliser des expériences de recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment ou FRAP pour Fluorescence recovery after photobleaching.

#### Principe du recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment

Les réactions photochimiques provoquées lors de la fluorescence entraînent un « blanchiment » des molécules fluorescentes. Les molécules perdent ainsi leur propriété de fluorescence. Ce phénomène est utilisé pour étudier la mobilité de certaines molécules. Dans le cadre de cette thèse, c'est la mobilité des enzymes dans des films multicouches composés d'acide tannique et d'enzyme qui nous a intéressés. Une zone de l'échantillon est photoblanchie. Puis, la fluorescence de cette zone est mesurée au cours du temps pour voir si la fluorescence augmente ce qui indique que l'enzyme est mobile (voir schéma figure 2.54) dans le film ou bien qu'au contraire, la zone ne voit pas sa fluorescence changer ce qui signifie que l'enzyme est immobile.

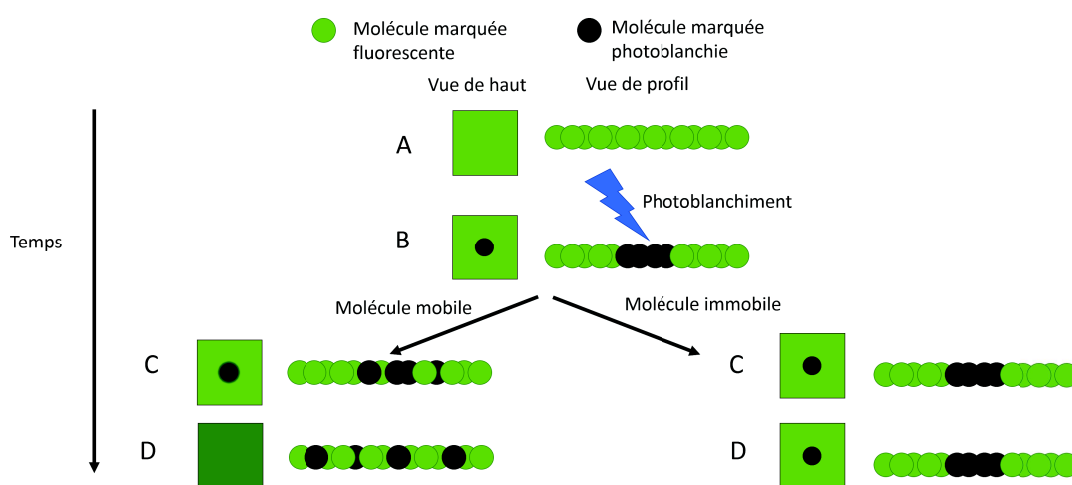


FIGURE 2.56 – Schéma d'une expérience de FRAP au cours du temps.

#### Protocole

La FRAP a été utilisée pour étudier la mobilité de la phosphatase alcaline dans les films multicouches à base d'acide tannique et de phosphatase. La phosphatase a été préalablement marquée à la FITC. Les expériences de FRAP sont réalisées avec le microscope confocal Zeiss.

Les films ont été déposés sur des lamelles en verre (diamètre de 12 mm). Les lamelles ont ensuite été insérées sur un portoir et mises au contact avec 500  $\mu\text{L}$  de tampon Tris à pH 8,5 afin de maintenir les films hydratés durant l'observation. Des images de 211,7  $\mu\text{m}$  x 211,7  $\mu\text{m}$  ont été acquises à l'aide d'un objectif x20. Une zone circulaire d'un rayon de 24,5  $\mu\text{m}$  a été photoblanchie à l'aide du laser argon à son intensité maximum et avec la longueur d'onde de 488 nm. L'intensité moyenne de cette zone est mesurée au cours du temps. L'intensité de trois autres zones circulaires de même diamètre est aussi mesurée afin de mesurer le photoblanchiment induit par l'observation du film et de normaliser l'intensité de la zone photoblanchie.

## 2.16 Tests biologiques

### 2.16.1 Tests cellulaires

Des tests de prolifération et d'adhésion cellulaire ont été réalisés sur des matrices électrospinnées structurées avec et sans AT (PLA/PCL-AT ou PLA/PCL). Il a été choisi de travailler dans un premier lieu avec des fibroblastes humains (BJ ATCC CRL-2522). Les cellules sont cultivées à 37°C dans du milieu de culture EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC) dans lequel est ajouté 1% en volume d'antibiotique Pénicilline/Streptomycine (Gibco, Thermo Fischer Scientific) et 10% en volume de sérum de veau fœtal (Dutscher). Lors de l'ensemencement, les cellules étaient au maximum au 8ème passage.

Les matrices étant hydrophobes, un pré traitement des plaques 6 puits au Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) à 0,5% dans de l'éthanol a été effectué afin de limiter l'adhésion des cellules sur la plaque lors de l'ensemencement. Les matrices ont été découpées à l'aide d'un scalpel pour obtenir des rectangles d'environ 2x1  $\text{cm}^2$ . Les matrices ont ensuite été maintenues dans du milieu à l'aide d'un poids en PTFE pendant 2 jours avant le début du test afin qu'elles adhèrent à la surface de la plaque et ne flottent plus après retrait du poids.

#### Test de cytotoxicité

Pour étudier l'effet de la libération de l'acide tannique ou d'autres éléments de la matrice sur les cellules, des tests de cytotoxicité ont été réalisés. Les matrices structurées ont été découpées à l'aide d'un punch de biopsie d'un diamètre de 8mm. Chaque morceau ainsi découpé a été placé dans un puits d'une plaque 48 puits. 200  $\mu\text{L}$  de milieu ont ensuite été placés au contact des matrices. En même temps, dans une autre plaque 48 puits, 15 000 cellules ont été déposées

par puits. Après 24h, le milieu des cellules est changé et remplacé par le milieu d'extraction. 24 heures plus tard, la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'une solution à 75  $\mu\text{M}$  de résazurine (Resazurin Sodium Salt, Acros Organics 189900050) dans le milieu EMEM. 230  $\mu\text{L}$  de solution ont été mis au contact des cellules pendant 30 minutes puis la production de résouflurine, témoin de la viabilité cellulaire, a été mesurée par fluorescence (longueur d'onde d'excitation/émission : 560 nm/590 nm). Un contrôle est réalisé dans des puits avec du milieu de culture.

### Test d'adhésion cellulaire

Pour étudier l'adhésion des cellules sur les matrices structurées PLA/PCL-AT ou PLA/PCL, les fibroblastes ont étéensemencés à une densité cellulaire d'environ  $5,1 \times 10^{-5}$  cellules/ $\mu\text{m}^2$  soit 50 000 cellules par puits. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 10 minutes puis elles ont été marquées à l'aide de Hoechst 33342 et de phalloïdine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine puis rincées au PBS 2 fois. Les matrices ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon Ellipse TE200) et un objectif x10. Les images ont ensuite été traitées avec image J. Les cellules adhérant soit aux fibres soit aux plots ont été comptées et la surface occupée par les fibres ou par les plots a été mesurée.

### Test de prolifération cellulaire

La prolifération des fibroblastes sur les matrices PLA/PCL ou PLA/PCL-AT a été suivie sur plusieurs jours à l'aide d'une solution de résazurine dans des plaques 6 puits. 2 mL de solution de résazurine ont été mis au contact des cellules pendant 30 minutes les jours de la mesure de l'activité cellulaire. 100 000 cellules ont étéensemencées au début de l'expérience.

## 2.16.2 Tests antibactériens

### Tests antibactériens avec les matrices structurées

L'inhibition de la croissance de bactéries en solution due notamment à la libération d'acide tannique présent dans les matrices structurées a été mesurée avec les souches *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherischia coli* (ATCC 25922) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Les bactéries ont été cultivées en aérobie à 37 ° C dans du milieu Mueller Hinton Broth

(MHB)(Merck, Germany), pH 7,4 sauf *E. faecalis* qui a été cultivée dans du milieu Brain Heart Infusion (BHI). Une colonie a été transférée dans 10 mL de milieu et incubée toute la nuit à 37°C. L'absorbance de la solution après culture a été mesurée à 620 nm. 500 000 bactéries dans 200 µL de milieu ont ensuite été placées au contact d'une matrice découpée avec un punch de biopsie de 8 mm de diamètre. La densité optique a été mesurée après 24 heures. Le contrôle négatif est réalisé dans un puits sans matrice.

### Tests antibactériens sur les films multicouches

L'activité antibactérienne sur les films multicouches PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub> a été étudiée avec la souche *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*, ATCC 29212). Les tests évaluent la propriété antibactérienne de type "contact-killing" des films. *E. faecalis* a été cultivé durant la nuit dans du milieu MH. Ensuite, la solution a été diluée au dixième et les bactéries ont été mis en contact avec les lamelles de verre recouvertes des films LbL PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub> pendant 1 heure. Un contrôle négatif est réalisé avec une lamelle de verre non recouverte du film. Après 1 heure, les bactéries ont été marquées à l'aide du kit de viabilité : BacLight Redox Sensor CTC Vitality Kit (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur et fixées avec du PFA. Le kit permet de marquer en vert toutes les bactéries à l'aide du syto 24 (excitation à 490 nm et émission à 515 nm) tandis que le CTC (excitation à 450 nm et émission à 630 nm) permet de ne marquer que les bactéries vivantes. Les lamelles ont ensuite été observées en microscopie à épifluorescence. Le nombre de bactéries totales et vivantes ont ensuite été comptées à l'aide du logiciel Image J sur les images obtenues.

## Bibliographie

- [1] N. Tucker. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7 :63–73, 2012.
- [2] W. Gilbert. De Magnete Magneticisque Corporibus, et de Magno Magnete Tellure (On the Magnet, Magnetick Bodies also, and on the Great Magnet the Earth ; a new Physiology, demonstrated by many arguments & Experiments). 1960.
- [3] G.M. Bose. Die Electricitat nach ihrer Entdeckung und Fortgang, mit Poetischer Feder entworfen. *Wittenberg : Johann Joachim Ahlfeld*, 1744.
- [4] J.W. Strutt (Lord Rayleigh). On the instability of jets. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 1878.
- [5] J.W. Strutt (Lord Rayleigh). On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, pages 184–186, 1882.
- [6] J.F. Cooley. Apparatus for electrically dispersing fluids, 1902.
- [7] A. Formhals. Process and apparatus for preparing artificial threads, 1934. Classification aux États-Unis 264/10, 425/174, 425/174.80E, 425/8 ; Classification internationale D01D5/00 ; Classification coopérative D01D5/0076 ; Classification européenne D01D5/00E4D.
- [8] A. Formhals. Method and apparatus for spinning, 1944. Classification aux États-Unis 264/10, 425/6, 425/174.4 ; Classification internationale D01D5/04 ; Classification coopérative D01D5/0092 ; Classification européenne D01D5/00E4E.
- [9] B. I. Ogorodnikov. On the 100th anniversary of the birth of Igor' Vasil'evich Petryanov-Sokolov. *Colloid Journal*, 69(3) :396–398, June 2007.
- [10] Sir Taylor and F. R. S. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 280(1382) :383–397, July 1964.
- [11] J. Doshi and D. H. Reneker. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35(2) :151–160, August 1995.
- [12] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, and G. E. Wnek. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions : good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer*, 46(10) :3372–3384, April 2005.

- [13] M. S. Wilm and M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136(2) :167–180, September 1994.
- [14] N. Bhardwaj and S. C. Kundu. Electrospinning : A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3) :325–347, May 2010.
- [15] A. Koski, K. Yim, and S. Shivkumar. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58(3) :493–497, January 2004.
- [16] N. Lavielle, A-M Popa, M. de Geus, A Hébraud, G. Schlatter, L. Thöny-Meyer, and R. M. Rossi. Controlled formation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) ultrathin electrospun nanofibers in a hydrolytic degradation-assisted process. *European Polymer Journal*, 49(6) :1331–1336, June 2013.
- [17] A. K. Haghi and M. Akbari. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *physica status solidi (a)*, 204(6) :1830–1834, June 2007.
- [18] P. Gupta, C. Elkins, T. E. Long, and G. L. Wilkes. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate) : exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46(13) :4799–4810, June 2005.
- [19] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, and M. P. Brenner. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids*, 13(8) :2221–2236, July 2001.
- [20] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, and J. Sheng. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3) :423–432, March 2005.
- [21] L. Yao, T. W. Haas, A. Guiseppi-Elie, G. L. Bowlin, D. G. Simpson, and G. E. Wnek. Electrospinning and Stabilization of Fully Hydrolyzed Poly(Vinyl Alcohol) Fibers. *Chemistry of Materials*, 15(9) :1860–1864, May 2003.
- [22] C. J. Luo, M. Nangrejo, and M. Edirisinghe. A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer*, 51(7) :1654–1662, March 2010.
- [23] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43(16) :4403–4412, July 2002.

- [24] S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase, and J. F. Rabolt. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*, 35(22) :8456–8466, October 2002.
- [25] O. S. Yördem, M. Papila, and Y. Z. Menceloğlu. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter : An investigation by response surface methodology. *Materials & Design*, 29(1) :34–44, January 2008.
- [26] C. S. Ki, D. H. Baek, K. D. Gang, K. H. Lee, I. C. Um, and Y. H. Park. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*, 46(14) :5094–5102, June 2005.
- [27] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, and P. Supaphol. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers : Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205(17) :2327–2338, November 2004.
- [28] C. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase, and J. F. Rabolt. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers : Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules*, 37(2) :573–578, January 2004.
- [29] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, and K. De Clerck. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*, 44(5) :1357, March 2009.
- [30] S. N. Reznik, A. L. Yarin, E. Zussman, and L. Bercovici. Evolution of a compound droplet attached to a core-shell nozzle under the action of a strong electric field. *Physics of Fluids*, 18(6) :062101, June 2006.
- [31] Y. Lu, J. Huang, G. Yu, R. Cardenas, S. Wei, E. K. Wujcik, and Z. Guo. Coaxial electrospun fibers : applications in drug delivery and tissue engineering. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(5) :654–677, September 2016.
- [32] Z. C. Sun, E. Zussman, A. L. Yarin, J. H. Wendorff, and A. Greiner. Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials*, 15(22) :1929–+, November 2003. WOS :000186820500011.
- [33] D. Li and Y. Xia. Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning. *Nano Letters*, 4(5) :933–938, May 2004.



- [34] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, and S. Ramakrishna. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15) :2603–2610, May 2005.
- [35] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia. Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Letters*, 3(8) :1167–1171, August 2003.
- [36] J. M Deitzel, J Kleinmeyer, D Harris, and N. C Beck Tan. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1) :261–272, January 2001.
- [37] S. Thandavamoorthy, N. Gopinath, and S. S. Ramkumar. Self-assembled honeycomb polyurethane nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(5) :3121–3124, September 2006.
- [38] G. Yan, J. Yu, Y. Qiu, X.i Yi, J. Lu, X. Zhou, and X. Bai. Self-Assembly of Electrospun Polymer Nanofibers : A General Phenomenon Generating Honeycomb-Patterned Nanofibrous Structures. *Langmuir*, 27(8) :4285–4289, April 2011.
- [39] D. Ahirwal, A. Hébraud, R. Kádár, M. Wilhelm, and G. Schlatter. From self-assembly of electrospun nanofibers to 3d cm thick hierarchical foams. *Soft Matter*, 9(11) :3164–3172, February 2013.
- [40] S. Nedjari, G. Schlatter, and A. Hébraud. Thick electrospun honeycomb scaffolds with controlled pore size. *Materials Letters*, 142 :180 – 183, 2015.
- [41] S. Nedjari, S. Eap, A. Hébraud, C. R. Wittmer, N. Benkirane-Jessel, and G. Schlatter. Electrospun honeycomb as nests for controlled osteoblast spatial organization. *Macromolecular Bioscience*, 14(11) :1580–1589, November 2014.
- [42] N. Lavielle, A. Hébraud, G. Schlatter, L. Thöny-Meyer, R. M. Rossi, and A.-M. Popa. Simultaneous Electrospinning and Electrospraying : A Straightforward Approach for Fabricating Hierarchically Structured Composite Membranes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(20) :10090–10097, October 2013.
- [43] C. R. Wittmer, A. Hébraud, S. Nedjari, and G. Schlatter. Well-organized 3d nanofibrous composite constructs using cooperative effects between electrospinning and electrospraying. *Polymer*, 55(22) :5781–5787, October 2014.
- [44] J. Ruste. Techniques d’analyse par imagerie. *Techniques de l’ingénieur Techniques d’analyse par imagerie*, base documentaire : TIB387DUO.(ref. article : p865), 2013.

- [45] D. Danino. Cryo-TEM of soft molecular assemblies. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(6) :316 – 329, 2012.
- [46] J. Barbillat, D. Bougeard, G. Buntinx, M. Delhayé, P. Dhamelincourt, and F. Fillaux. Spectrométrie raman. *Techniques de l'ingénieur CND : méthodes surfaciques*, base documentaire : TIB586DUO.(ref. article : p2865), 1999.
- [47] D. Quéré. Wetting and roughness. *Annual Review of Materials Research*, 38(1) :71–99, 2008.
- [48] R. Pecora. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2 :123–131, 06 2000.
- [49] D Dupuis. Mesure de la viscosité- principes généraux. *Techniques de l'ingénieur Métrologie relative aux fluides - Vitesses et débits*, base documentaire : TIB402DUO.(ref. article : r2350), 2008.
- [50] F. Rouessac and A. Rouessac. *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod, 6ème édition edition, 2004.
- [51] E. M. Liston. Plasma Treatment for Improved Bonding : A Review. *The Journal of Adhesion*, 30(1-4) :199–218, January 1989.
- [52] I. Reviakine, D. Johannsmann, and R. P. Richter. Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear : Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Analytical Chemistry*, 83(23) :8838–8848, December 2011.
- [53] G. Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wugung dünner Schichten und zur Mikrowugung. *Zeitschrift für Physik*, 155(2) :206–222, April 1959.
- [54] M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces : Continuum Mechanics Approach. *Physica Scripta*, 59(5) :391, 1999.
- [55] J.-C. Rivoal and C. Frétiigny. Microscopie à force atomique (afm). *Techniques de l'ingénieur Mesures tridimensionnelles et états de surface*, base documentaire : TIB409DUO.(ref. article : r1394), 2005.
- [56] G.I. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9) :930–933, March 1986.

- [57] F. Bernoux, J.-P. Piel, B. Castellon, C. Defranoux, J.-H. Lecat, P. Boher, and J.-L. Stehlé. Ellipsométrie théorie. *Techniques de l'ingénieur Métrologie optique et photonique*, base documentaire : TIB143DUO(r6490), 2003.
- [58] J.-C. MAURIZOT. Activité optique : dichroïsme circulaire. *Techniques de l'ingénieur Fondamentaux de l'optique*, base documentaire : TIB448DUO.(ref. article : r6470), 2009.
- [59] L. Espinosa, , and Y. Tourneur. Microscopie de fluorescence biomédicale. *Techniques de l'ingénieur Analyse et mesure en biotechnologie*, base documentaire : TIB160DUO.(ref. article : bio7200), 2015.
- [60] M. Minsky. Microscopy apparatus, 1961.



# Chapitre 3

## Fonctionnalisation et structuration à l'aide d'acide tannique de fibres électrospinnées de PLA pour l'ingénierie de la pulpe dentaire

### Sommaire

---

3.1	Introduction . . . . .	143
3.2	Fonctionnalisation de fibres de PLA à l'aide d'acide tannique . . .	153
3.3	Structuration de fibres électrospinnées de PLA à l'aide d'acide tannique . . . . .	164
3.4	Conclusion et perspectives . . . . .	182
	Bibliographie . . . . .	184

---

### 3.1 Introduction

#### 3.1.1 Présentation du projet Mica ElectrATPulpe

Cette partie de la thèse s'inscrit dans un projet financé par l'Institut Carnot Mica, le projet ElectrAtPulpe. Ce projet a pour but de mettre au point un matériau électrospinné structuré pouvant servir de scaffold afin de permettre la régénération de la pulpe dentaire. La technique de l'électrospinning a été choisie car elle permet de réaliser des matrices fibreuses ressemblant

à la structure de la matrice extra-cellulaire avec des bonnes propriétés mécaniques comparé par exemple aux hydrogels [1]. Un des inconvénients de l'électrospinning, néanmoins, est la taille des pores des matériaux électrospinnés qui sont généralement trop petits pour permettre une migration des cellules à l'intérieur des matériaux. Ce projet a ainsi pour but de travailler sur la structuration de matrices électrospinnées mise au point par l'équipe de G. Schlatter au sein du laboratoire ICPEES (Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé) avec l'acide poly-lactique (PLA). Un autre élément d'étude essentiel du projet est la fonctionnalisation des fibres de PLA à l'aide d'acide tannique (AT) pour augmenter l'hydrophilie et de faciliter la greffe de facteurs de croissance sur les fibres de PLA afin de permettre la migration cellulaire. Un des éléments du projet est de réaliser un gradient de protéines afin de favoriser le chimiotactisme le long du scaffold.

### 3.1.2 La pulpe dentaire : anatomie, pathologie et traitement

La pulpe dentaire est la partie la plus interne de la dent (voir schéma figure 3.1). Il s'agit d'un tissu mésenchymateux recouvert de tissu minéral : la dentine avec qui elle forme le complexe pulpo-dentaire. La pulpe est hautement vascularisée et innervée. Elle assure un rôle de protection puisque grâce à elle, des températures extrêmes seront perçues comme une douleur par exemple. Elle joue aussi un rôle de réparation puisque ce sont les odontoblastes présents dans la pulpe qui assurent la formation de dentine en cas d'agression.

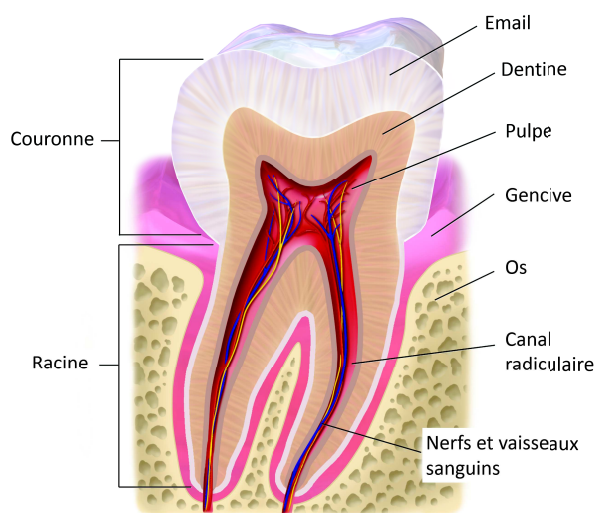


FIGURE 3.1 – Schéma de la dent

## Cellules de la pulpe dentaire

La pulpe dentaire abrite les odontoblastes [2], cellules hautement spécialisées qui produisent de la dentine même après la formation de la dent, diminuant ainsi le volume pulpaire au fil du temps. Ces odontoblastes sont présents à la frontière de la dentine sous forme de strate. Dans le centre de la pulpe, sont présents des fibroblastes dont le rôle essentiel est d'assurer le renouvellement de la matrice extra-cellulaire (MEC). Il a aussi été montré qu'ils pouvaient aussi avoir un rôle dans la cicatrisation du tissu pulpaire avec notamment la production de facteurs angiogéniques [3]. La pulpe contient également des cellules immunitaires principalement des cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'antigènes, des macrophages qui participent à l'élimination des cellules mortes et des lymphocytes T.

La pulpe dentaire contient aussi des cellules souches nommées DPSC pour Dental Pulp Stem Cells. Les DPSC constituent une population hétérogène de cellules. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 2000[4] et sont obtenues par digestion enzymatique de dents définitives. Il a été montré *in vitro* que les DPSC pouvaient se différencier dans différentes lignées cellulaires comme la lignée neuronale par exemple [5]. Quand elles sontensemencées sur des surfaces de dentine, elles se différencient en cellules odontoblastes [6].

## Matrice extra-cellulaire

La matrice extra-cellulaire (MEC) de la pulpe dentaire est composée à 34% de collagène, principalement de type I (à 56%) et de type III (à 41%) et à 50% de protéoglycanes [7] [8]. La fibronectine est présente dans la MEC pulpaire et permet l'adhésion des fibroblastes au réseau des fibres de collagène. Des métalloprotéases principalement de la collagénase et de la gélatinase sont aussi présentes dans la pulpe et permettent la dégradation des protéines de la MEC dans le processus de remodelage pulpaire. De l'élastine est aussi présente au niveau des artérioles de la pulpe pour assurer l'élasticité des parois[9].

## Vascularisation

La pulpe dentaire est vascularisée grâce à une ou deux artérioles de 35 à 45  $\mu\text{m}$  de diamètre qui proviennent des artères dentaires. Ces artérioles qui pénètrent par le foramen apical se ramifient en artérioles secondaires qui se ramifient ensuite pour former un réseau de capillaires.

Des veinules collectrices permettent le retour veineux via le foramen.

## Innervation

La pulpe dentaire est un tissu richement innervé (une canine par exemple contient environ 2 600 fibres nerveuses) [9]. Au niveau du canal radiculaire, les fibres forment des faisceaux qui se ramifient en nerfs à proximité de la périphérie pulpaire. Au niveau de l'apex, la moitié des fibres contiennent une gaine de myéline. Cette gaine de myéline est progressivement perdue à l'approche de la périphérie pulpaire.

## Pathologies de la pulpe dentaire et traitements associés

La pulpe est entourée d'éléments minéraux qui, en principe, la protègent des agressions extérieures et tout particulièrement des bactéries. Mais dans le cas de caries ou d'autres événements permettant la pénétration de bactéries comme des fractures, une inflammation appelée pulpite a alors lieu et peut entraîner la nécrose du tissu pulpaire [10].

La carie s'attaque, dans un premier temps, à la dentine induisant une réaction inflammatoire au niveau de la pulpe. Pour limiter la progression de la carie, la sclérose dentinaire est la réponse habituelle à la carie. Elle permet d'obturer les tubules dentinaires (micro-canaux qui partent de la limite pulpo-dentinaire jusqu'à la proximité de l'émail) et de diminuer ainsi la perméabilité de la dentine aux irritants bactériens. L'autre mécanisme qui rentre en jeu est la formation de dentine réactionnelle pour permettre une augmentation de l'épaisseur de la dentine face à l'agression. Si la défense face aux agressions n'est pas assez efficace, le tissu se nécrose. La forme la plus courante est la nécrose liquéfiante qui est due à des micro-organismes pyogènes.

Dans le cas d'une pulpite réversible, le traitement consiste à traiter la carie dentaire. Dans le cas d'une pulpite irréversible où l'évolution vers la nécrose est inévitable, la pulpe doit être retirée (biopulpectomie) et le système endodontique doit être obturé, le plus souvent avec du gutta percha, un thermoplastique bioinerte.

### 3.1.3 Ingénierie de la pulpe

Malgré les campagnes de prévention, les caries dentaires restent un problème de santé publique. En France, par exemple, selon un rapport de la Haute Autorité de Santé de 2008, près de 5 millions d'exérèses de pulpes ont été réalisées en 2004. Du fait d'une mauvaise désinfection ou d'un défaut dans l'obturation finale, les traitements échouent dans 7% des cas [11]. Par ailleurs, le traitement présente des inconvénients puisque la dent est dévitalisée et ne peut plus répondre



biologiquement à une infection et elle est fragilisée. La possibilité de régénérer ce tissu est ainsi de plus en plus étudiée en odontologie afin de réduire les coûts de traitement des pulpites et de diminuer ses effets négatifs pour le patient.

L'ingénierie de la pulpe repose sur l'utilisation de cellules souches [12]. Deux approches sont étudiées. La première consiste en la transplantation de cellules souches exogènes ce qui engendre des coûts élevés ainsi qu'une procédure complexe. La seconde appelée en anglais "cell homing" [13] se base sur les cellules endogènes de l'hôte pour assurer la régénération pulpaire.

L'utilisation de cellules endogènes pour la régénération de la pulpe a été étudiée dès 1996 par l'équipe de Rutherford et al. [14] où des fibroblastes humains de la pulpe ont été cultivés sur des fibres d'acide polyglycolique (PGA). À la suite de la découverte des cellules souches pulpaires (DPSCs) dans les années 2000 [4], les travaux se sont concentrés sur l'utilisation de ces cellules. En 2010, par exemple Huang et al. ont réussi à régénérer une pulpe dentaire vascularisée recouverte de dentine grâce à la culture de cellules souches pulpaires humaines et de cellules de la papille apicale (SCAPs) sur des scaffolds de PGA/PLA (acide polyglycolique/acide poly-lactique)[15]. En 2011, une pulpe dentaire a été recréée après la pulpectomie totale chez le chien grâce à l'injection de DPSC préalablement sélectionnées avec du collagène dans la racine canalaire [16]. Cependant, ces approches peuvent rencontrer des obstacles lors du passage en clinique. En effet, des procédures complexes doivent être suivies : extraction de dents, exérèse de la pulpe, culture des cellules, choix de la population cellulaire, expansion des cellules *ex vivo*, stockage. De plus, d'autres problèmes tels que de potentielles contaminations ou le développement de tumeurs au cours de la manipulation de cellules *ex vivo* peuvent apparaître [17].

En 2010, Kim et al[18] ont présenté une première étude n'utilisant pas de cellules souches exogènes. Un gel de collagène dopé avec des facteurs de croissance avait été injecté dans une dent humaine de laquelle la pulpe avait été enlevée. Après 3 semaines d'implantation dans le dos d'une souris, un nouveau tissu ressemblant à de la pulpe dentaire s'était formé. Depuis l'approche du "cell homing" est étudiée en parallèle de l'utilisation de cellules souches exogènes. Cette technique est définie comme un recrutement actif de cellules endogènes dans un compartiment anatomique [19]. Ce recrutement se fait par chimiotactisme à l'aide de molécules signal biologiques. Il s'agit ainsi dans le cadre de la régénération pulpaire d'injecter, dans le canal radiculaire duquel a été extrait la pulpe, un scaffold contenant des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance doivent :

- promouvoir l'angiogenèse dans le canal,
- favoriser la migration des cellules souches endogènes,
- induire la minéralisation.

De nombreux facteurs de croissance impliqués dans le développement ou la régénération du tissu dentaire ont été identifiés [20], [21], tels que les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) qui stimulent la production de dentine [22], la cytokine TGF- $\beta$  qui permet la différenciation en odontoblastes [23], la protéine DMP-1 ou le facteur de croissance FGF qui joue un rôle dans l'angiogenèse [24] et qui permet de stimuler le recrutement de cellules [22].

Dans le tissu dentaire, différents types de cellules souches sont présents; tout d'abord les DPSCs mais aussi les cellules souches de la papille apicale (SCAPs) qui ne sont présentes néanmoins que lors de la formation de la racine, les cellules souches de la moelle osseuse présentes dans l'os orofacial (BMSCs) ou bien encore les cellules souches du tissu parodontal (PDLSCs) (figure 3.2). Des cellules souches sont aussi présentes dans la dent temporaire, elles sont nommées SHEDs pour Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth.

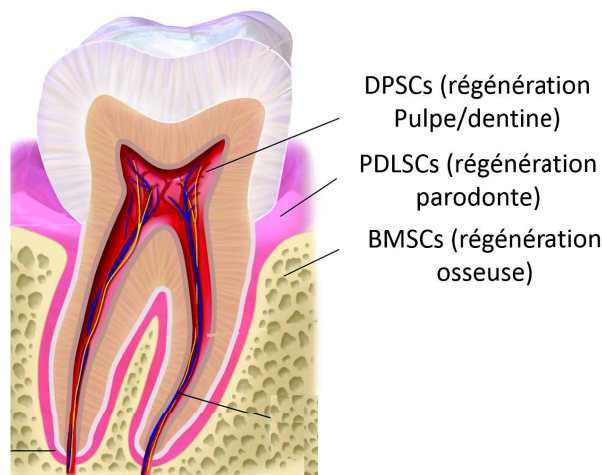


FIGURE 3.2 – Sources de cellules souches du tissu dentaire chez l'adulte humain : **BMSCs** : cellules souches de la moelle osseuse ; **DPSCs** : cellules souches de la pulpe dentaire ; **PDLSCs** : cellules souches du parodonte.

Afin de régénérer la pulpe dentaire via le recrutement des cellules souches, il faut développer le scaffold qui sera fonctionnalisé avec les molécules signal. Différents matériaux ont été utilisés pour l'ingénierie de la pulpe et sont présentés dans le tableau suivant :



Classification	Matériaux	Résultats	Référence
Polymère naturel	Collagène	Adhésion et prolifération des cellules et différenciation en odontoblastes des DPSC <i>in vitro</i> mais pas <i>in vivo</i> <i>In vitro</i> , adhésion d'odontoblastes sur des éponges de collagène. <i>In vivo</i> , prolifération des cellules et invasion de vaisseaux sanguins. L'effet de la triade : scaffold de collagène de type 1, DMP-1 et DPSC a été évaluée <i>in vivo</i> . Seuls les scaffolds comprenant les 3 éléments ont permis la formation d'un tissu ressemblant à la pulpe Comparaison <i>in vitro</i> des 4 types de matériaux avec des DPSCs. Pour	Zhang et al. 2006 [25]  Inuyama et al. 2010 [26]  Prescott et al. 2008 [27]
	Collagène I, collagène III, chitosan, gélatine	l'adhésion et la prolifération cellulaire, l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et la minéralisation, le collagène I présente de meilleurs résultats suivis du collagène III et de la gélatine. Le chitosan ne permet pas une bonne croissance cellulaire	Kim et al. 2009 [28]
	Chitosan	Possibilité d'utiliser des monomères de chitosan comme médicament de la coiffe de la pulpe : <i>in vitro</i> , augmentation de l'activité de l'ALP et de l'expression de la BMP-2, diminution des facteurs d'inflammation. <i>In vivo</i> , les monomères de chitosan favorisent la prolifération des fibroblastes de la pulpe.	Matsunage et al. 2006 [29]
	Alginate	Des hydrogels d'alginate contenant du TGF- $\beta$ permettent la différenciation en odontoblastes et stimulent la sécrétion de dentine. Des DPSCs cultivées sur des scaffolds d'alginate avec du milieu contenant de la $\beta$ -glycérophosphate se différencient en odontoblastes et minéralisent le scaffold <i>in vivo</i>	Dobie et al. 2002 [23]  Fujiwara et al. 2006 [30]
	Acide hyaluronique	Les odontoblastes adhèrent au scaffold <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> , des vaisseaux pénètrent dans le scaffold et un nouveau tissu riche en cellules se réorganise autour du scaffold.	Inuyama et al. 2010 [26]

Classification	Matériaux	Résultats	Référence
Polymère naturel	Fibrine	Après implantation dans le calvarium de souris, d'une dent humaine sans pulpe contenant un gel de fibrine sans aucun facteur de croissance, un tissu ressemblant à la pulpe s'est formé et des cellules similaires aux odontoblastes ont été observées.	Ruangsawasdi et al. 2016 [31]
	Soie	Avec l'ajout de SDF (Stromal cell-derived Factor)1- $\alpha$ sur des scaffolds de fibroïnes de soie, la migration des DPSCs et la formation de contacts focaux sont favorisées <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> , un tissu ressemblant à la pulpe avec vascularisation et un dépôt de dentine ont été observés.	Vang et al. 2015 [32]
	Matrice décellularisée	La MEC de la pulpe dentaire humaine peut être décellularisée. <i>In vitro</i> , la MEC décellularisée permet la prolifération de SCAPs et leur différenciation en cellules de type odontoblaste	Song et al. 2017 [33]
Polymère synthétique	Acide polylactique (PLA)	Après transplantation chez la souris d'un scaffold poreux de PLA ensemencé de SHED, un tissu vascularisé ressemblant à la pulpe s'est formé. Les SHED se sont différenciées en cellules de type odontoblastes mais aussi en cellules endothéliales.	Cordeiro et al. 2008 [34] ; Sakai et al. 2010 [35]
	Acide poly-glycolique (PGA)	Des SHEDs ont été ensemencées sur des scaffolds de PLA avec et sans BMP-2 et TGF- $\beta$ puis implantées dans des dents dépulpées. Les cellules adhèrent au canal radiculaire et peu de différence sont visibles avec ou sans la présence de facteurs de croissance.	Gotlieb et al. 2008 [36]
		Des fibroblastes humains cultivés sur des fibres de PGA adhèrent et prolifèrent en formant un tissu proche histologiquement de la pulpe native.	Mooney et al. 1996 [14]

Classification	Matériaux	Résultats	Référence
Polymères synthétiques	PGA/PLA	Après implantation chez la souris de scaffolds de PLA/PGA ensemencés avec des SCAPs et des DPSCs, un tissu bien vascularisé et ressemblant à la pulpe est observée après 4 mois.  Des scaffolds de PLA/PGA sur lesquels ont été ensemencées des cellules dentaires de rat ont permis après implantation dans une mâchoire de rat ont permis de régénérer un tissu similaire à la dent avec de la dentine, de l'émail, de la pulpe mais aussi de ligament périodontal.	Huang et al. 2010 [15]  Duailibi et al. 2008 [37]
Céramique	Hydroxyapatite (HYA)/Phosphate tricalcique (TCP)	Après implantation d'un mélange de poudre HYA/TCP et de DPSCs dans le dos d'une souris, les DPSCs ont formé une structure ressemblant à de la dentine tapissée avec des cellules de type odontoblastes dans un tissu interstitiel ressemblant à de la pulpe.  Des DPSCs ont été cultivées sur des disques d'HYA/TCP <i>in vitro</i> dans du milieu de différenciation. Les cellules permettent le dépôt d'une matrice minérale. In vivo, un tissu avec une faible minéralisation qui ressemble plus à un tissu conjonctif qu'à la pulpe est formé. En comparaison avec du collagène et du titane, c'est le seul scaffold qui montre un résultat de calcification.  Des DPSCs ont été cultivées sur des fibres de titane in vitro dans du milieu de différenciation. Les cellules permettent le dépôt d'une matrice minérale. In vivo, un tissu qui ressemble plus à un tissu conjonctif qu'à la pulpe est formé.	Gronthos et al. 2000 [4]  Zhang et al. 2006 [25]
Métal	Titane	Des DPSCs ont été cultivées sur des fibres de titane in vitro dans du milieu de différenciation. Les cellules permettent le dépôt d'une matrice minérale. In vivo, un tissu qui ressemble plus à un tissu conjonctif qu'à la pulpe est formé.	Zhang et al 2006 [25]

Une large gamme de matériaux, pourvu que les bons facteurs de croissance et les bonnes conditions soient réunis, est ainsi utilisable pour la régénération de la pulpe dentaire.

## 3.2 Fonctionnalisation de fibres de PLA à l'aide d'acide tannique

Dans le cadre de cette thèse, le polymère choisi pour réaliser les scaffolds est l'acide polylactique (PLA pour poly-lactic acid, voir figure 3.3). Il a été choisi car il est biodégradable et biocompatible [38], largement utilisé en ingénierie tissulaire [39], [40] notamment pour la régénération pulpaire (voir tableau précédant) et est facilement électrospinnable.

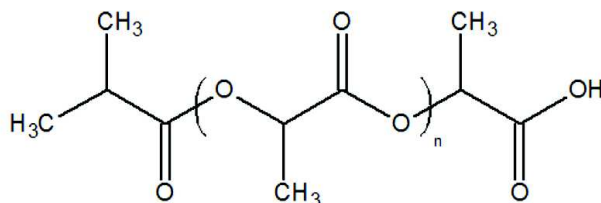


FIGURE 3.3 – Molécule de PLA

Un des inconvénients du PLA est qu'il est hydrophobe et qu'il est difficile d'y greffer des protéines telles que des facteurs de croissance. L'utilisation de l'acide tannique (AT) pourrait être une bonne solution pour rendre le PLA hydrophile et pour faciliter la fonctionnalisation grâce à ses groupes hydroxyles. Une des premières approches étudiées était de plonger des fibres de PLA électrospinnées dans une solution d'AT afin qu'il se fixe sur le PLA. Cependant, cette technique ne permettait pas de s'assurer d'une répartition homogène de l'AT sur les fibres de PLA. Il a ainsi été choisi d'électrospinner un mélange de PLA et d'AT.

### 3.2.1 Electrospinning de PLA et d'AT

Pour électrospinner un mélange de PLA et d'AT, il a été choisi de travailler à une concentration en PLA de 10% en masse totale (%mt) dans un mélange de dichlorométhane/diméthylformamide (DCM/DMF) avec 60% en masse de DCM et 40% en masse de DMF. Les conditions de préparation et d'électrospinning de solution de PLA avaient été déjà optimisées au sein du laboratoire. Dans la solution de PLA, une masse d'AT correspondant à 5%, 10%, 15% ou 20% de la masse

de PLA a été ajoutée. Les échantillons électrospinnés correspondant à ces solutions seront notés PLA+5% d'AT, PLA+10% d'AT, PLA+15% d'AT ou PLA+20% d'AT.

### Diamètre des fibres

Dans les mêmes conditions d'électrospinning, des échantillons PLA+5% d'AT, PLA+10% d'AT, PLA+15% d'AT ou PLA+20% d'AT ont été produits (voir figure 3.4). Un de premiers paramètres étudiés est l'influence de l'ajout d'AT sur le diamètre des fibres. Les graphes de la figure 3.5 représentent les diamètres moyens pour différentes solutions de PLA et d'AT électrospinnées dans les mêmes conditions. Les fibres obtenues avec l'ajout d'AT sont homogènes et le diamètre des fibres augmente avec la masse d'AT ajoutée dans la solution de PLA ce qui montre une incorporation de l'AT dans les fibres de PLA.

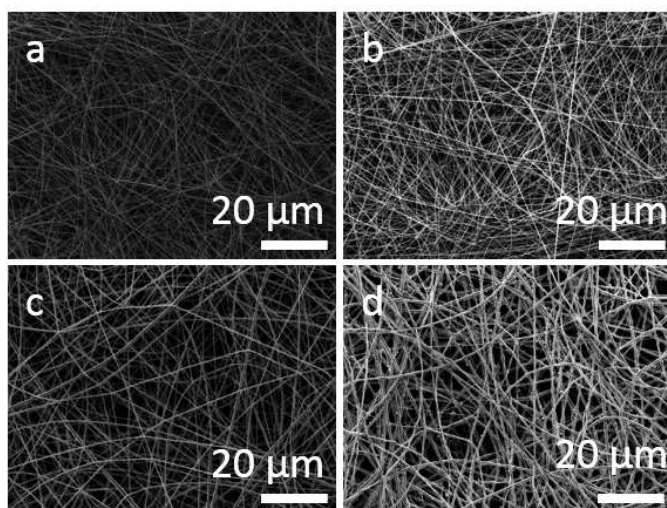


FIGURE 3.4 – Images MEB de fibres de PLA+AT a)sans AT b) avec 5% d'AT c)avec 10% d'AT et d) avec 20% d'AT

Pour des solutions avec au moins 30% d'AT, le mélange PLA et AT n'est plus homogène. La solution est trouble et des fibres avec des particules d'AT sont obtenues (figure 3.6).

### Présence de l'acide tannique dans les fibres

Afin de confirmer la présence d'AT dans les fibres, les spectres Raman de fibres électrospinnées ont été mesurés. Le spectre Raman de l'AT (figure 3.7A) comporte de nombreux pics caractéristiques dont le plus intense à  $1615\text{ cm}^{-1}$  qui est attribué aux elongations des liaisons



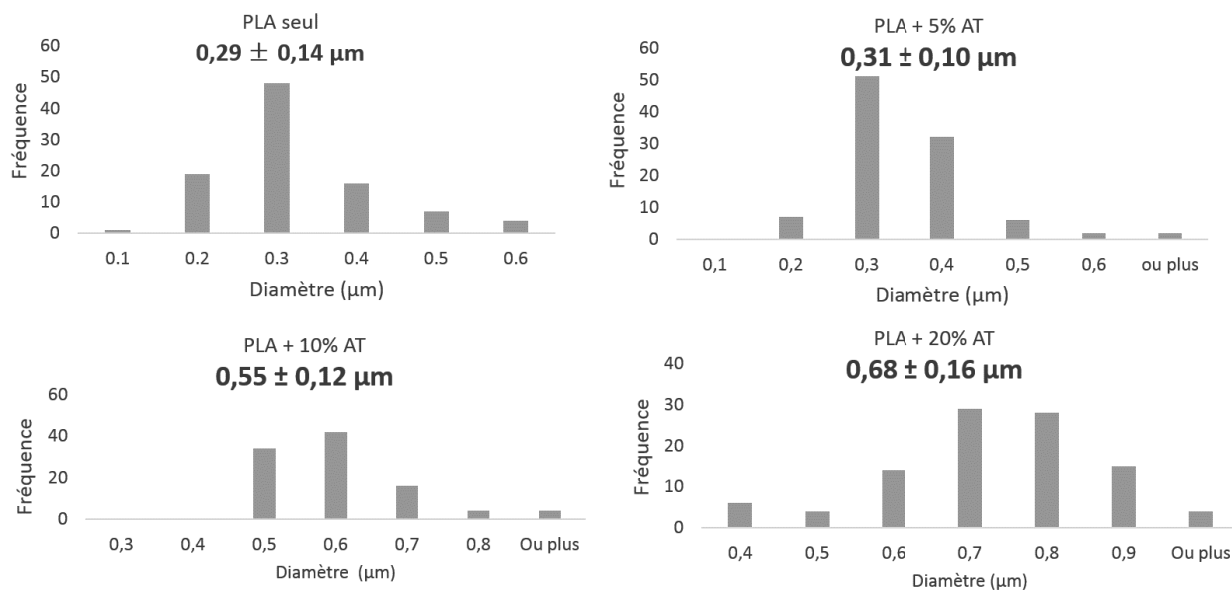


FIGURE 3.5 – Diamètre moyen et répartition de diamètres de fibres pour au moins 100 fibres obtenues à partir de solutions PLA et AT.

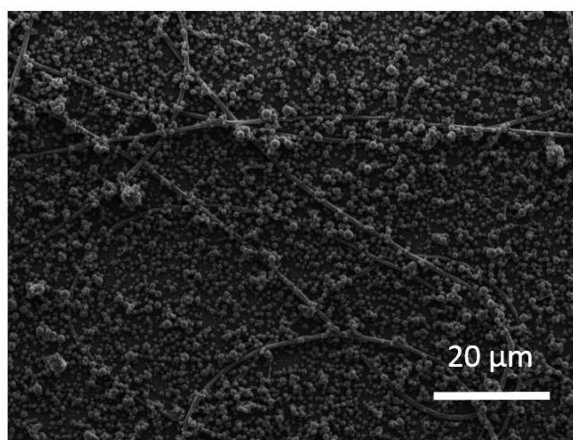


FIGURE 3.6 – Image MEB d’une solution de PLA + 30% d’AT électrospinnée. Un mélange de fibres et de particules est obtenu. L’AT et le PLA ne forme plus un mélange homogène pour une concentration en AT au delà de 20% d’AT.

C-C des cycles aromatiques. Le spectre Raman du PLA présente, lui, un pic caractéristique vers  $875 \text{ cm}^{-1}$  qui correspond à une elongation des groupes C-COO (figure 3.7B). Le spectre des fibres PLA+20% d’AT comprend ces deux pics caractéristiques ainsi que d’autres pics présents

pour l'AT ou le PLA seuls. Les fibres obtenues à partir de solution de PLA et d'AT contiennent bien de l'AT.

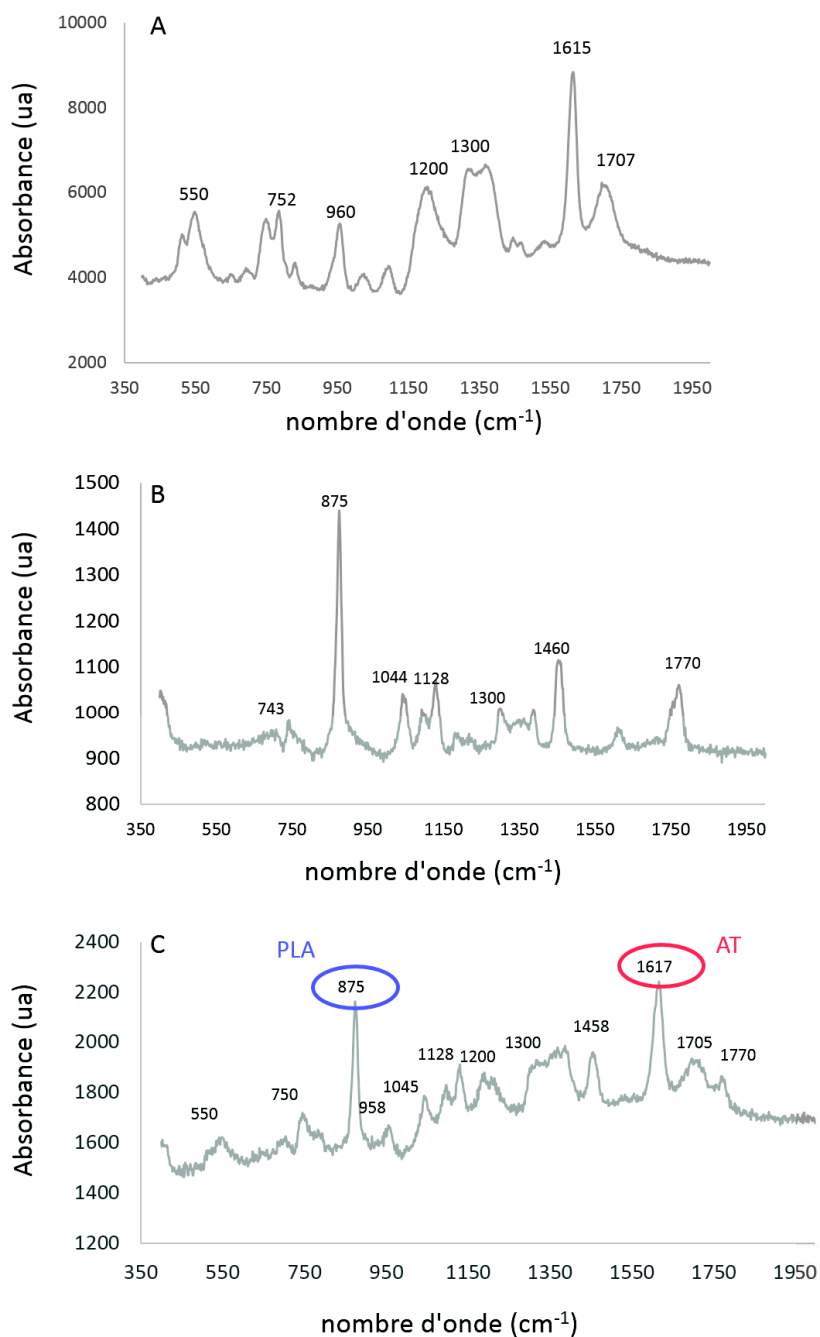


FIGURE 3.7 – A : spectre Raman de l'acide tannique B : spectre Raman de fibres de PLA seul C : spectre Raman de fibres PLA+20% d'AT

### Libération de l'acide tannique au cours du temps

La libération de l'AT a été étudiée dans différentes conditions. Pour les premières expériences, les fibres PLA+AT ont été plongées dans l'eau où le pH n'était pas contrôlé. Comme le montre la figure 3.8, la libération de l'AT au cours du temps est biphasique. Une première phase de libération a lieu dès les premiers instants où les fibres sont mises en contact avec l'eau où la libération est très rapide. Ensuite, au cours du temps l'AT est libéré continuellement. Après 2 jours dans l'eau, très peu de l'AT initialement présent dans les fibres est encore présent dans les fibres.

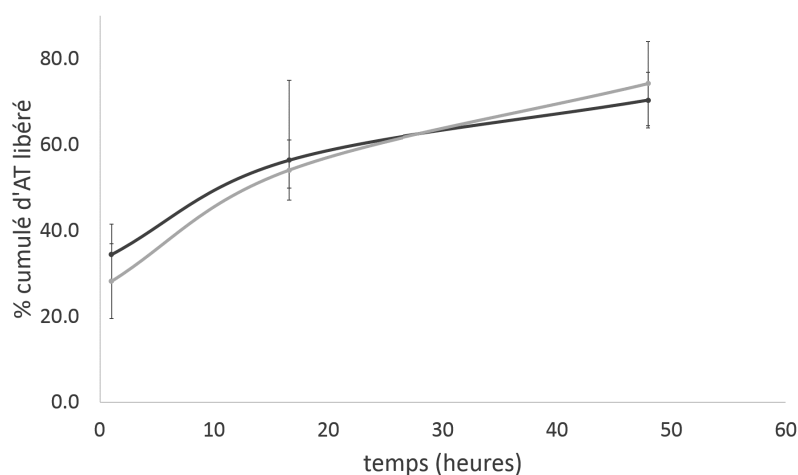


FIGURE 3.8 – AT libéré au cours du temps pour des matériaux PLA+10% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes (—) et PLA+15% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes (—)

Cette libération rapide n'est pas avantageuse pour la fonctionnalisation des fibres de PLA à l'aide de l'AT. Dans la littérature, des polyphénols ont été utilisés pour fonctionnaliser des fibres électrospinnées. De l'acide cafféique (AC) et de l'épigallocatechine-gallate (EGCG) ont été incorporés dans des fibres de poly-caprolactone (PCL) avec une concentration à 1,1%mt [41] en polyphénol. La libération a été suivie et au bout de 9 jours, 20% de l'EGCG et 10% de l'AC ont été libérés. La différence de libération avec l'AT est peut être liée à la taille des polyphénols puisque l'AC et l'EGCG sont beaucoup plus petits que l'AT avec des masses molaires de 180 g/mol (AC), 460 g/mol (EGCG) et 1700 g/mol (AT). De l'AT a aussi été incorporé dans des fibres électrospinnées de PCL [42]. Dans ce cas, au bout 68 heures jusqu'à 99% de l'AT étaient libérés. Par ailleurs, des films de PCL-AT ont aussi été préparés par évaporation du solvant. Au bout de 15 jours seuls 20% de l'AT étaient libérés.

Des alternatives ont été envisagées afin de ralentir la cinétique de libération de l'AT. Les fibres ont par exemple été chauffées à 70°C pendant 1h, 2h et 17h afin de favoriser une réaction d'estérification entre les groupes carboxyliques terminaux du PLA et les groupes hydroxyles de l'AT. Malheureusement, du fait du faible nombre de groupes carboxyliques dans le PLA de haut poids moléculaire, chauffer les fibres n'a pas ralenti la cinétique de libération (voir le graphique figure 3.9).

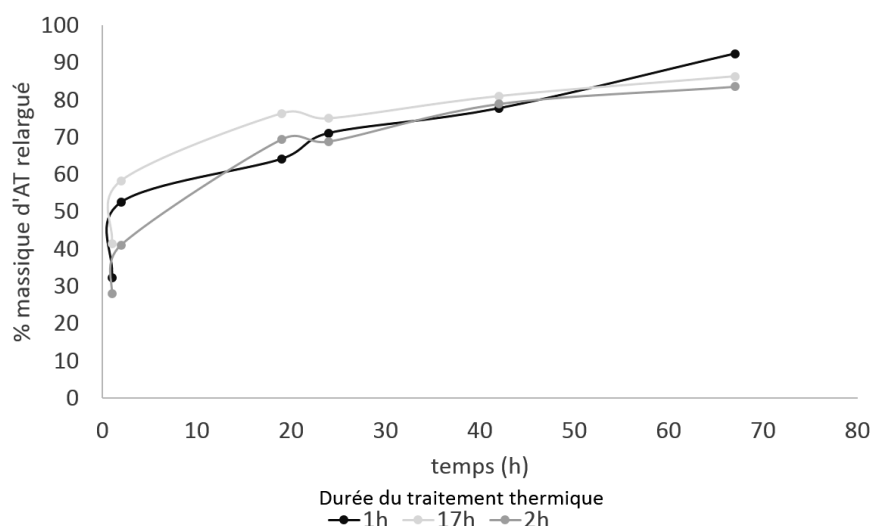


FIGURE 3.9 – AT libéré au cours du temps pour des matériaux PLA+15% d'AT électrospinnés pendant 10 minutes pour différents temps de traitement thermique

Une autre alternative étudiée est l'utilisation du périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) afin d'oxyder l'AT dans le mélange PLA et AT et de le réticuler afin de retarder sa libération. Pour une solution PLA+10% d'AT, du  $\text{NaIO}_4$  a été ajouté afin d'avoir un ratio molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 2. En solution, l'AT est bien oxydé comme l'indique le changement de couleur de la solution sur la photo figure 3.10A. Pour un rapport molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 10, la solution est encore plus foncée. Dans le cas du rapport de 2, l'électrospinning est facile à mettre en place, ce qui n'est pas le cas pour le rapport molaire de 10. Pour le rapport molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 2, des fibres homogènes ont été obtenues avec un diamètre moyen de  $0,35 \pm 0,06 \mu\text{m}$  (figure 3.10B). Pour la solution où il y a plus de  $\text{NaIO}_4$ , l'électrospinning n'est pas stable et seules quelques fibres avec de gros défauts sont obtenues comme le montre la figure 3.11B. La libération de l'AT présent dans les fibres obtenues à partir de la solution de PLA+10% d'AT avec du  $\text{NaIO}_4$  pour un rapport molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 2 a été suivie. L'ajout de  $\text{NaIO}_4$  ne ralentit pas la libération de l'AT et après 1 jour dans l'eau, 50% de l'AT environ a été libéré comme le montre le graphe

sur la figure 3.10C.

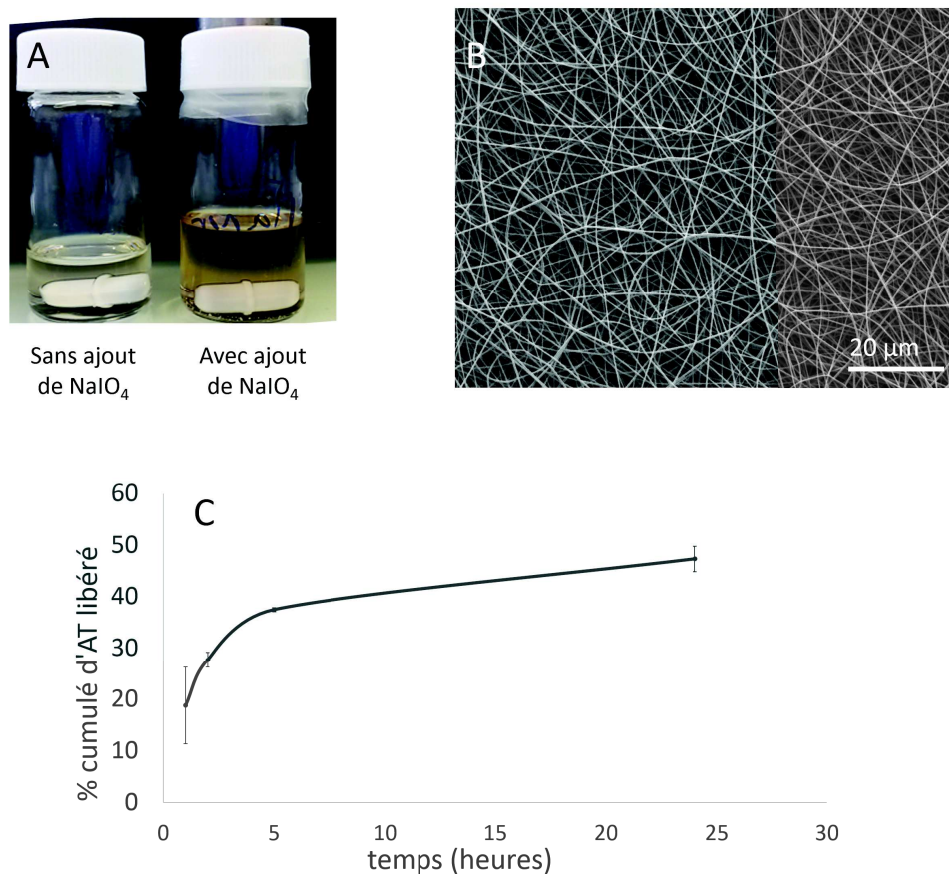


FIGURE 3.10 – A : Photo des solutions de PLA+10% d'AT sans et avec NaIO<sub>4</sub> pour avoir un rapport molaire NaIO<sub>4</sub>/AT de 2. L'oxydation de l'AT provoque un changement de couleur de la solution. B : Image MEB de fibres électrospinnées obtenues à partir de la solution de PLA+10% d'AT contenant du NaIO<sub>4</sub>. Les fibres obtenues sont homogènes. C : Libération de l'AT quand les fibres sont plongées dans l'eau.

Une dernière tentative pour ralentir la libération de l'AT a été de mesurer la libération non plus dans l'eau mais dans du tampon bicine avec un pH basique de 7,4 proche du pH physiologique. Dans ce cas, la libération n'est pas ralentie et semble encore plus rapide que dans l'eau puisqu'après 1 jour, environ 80% de l'AT a été libéré. De plus, l'AT libéré s'oxyde au cours du temps et il devient compliqué de mesurer correctement sa libération au delà.

Malgré différents essais, la libération de l'AT quand les fibres sont plongées dans l'eau est rapide et la majorité de l'AT est libérée. Par ailleurs, l'AT qui reste dans les fibres n'est



FIGURE 3.11 – A : Photo d'une solutions de PLA+10% d'AT avec du  $\text{NaIO}_4$  pour avoir un rapport molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 10. B : Image MEB de fibres électrospinnées obtenues à partir de la solution de PLA+10% d'AT contenant du  $\text{NaIO}_4$  avec un rapport molaire  $\text{NaIO}_4/\text{AT}$  de 10. Il n'est plus possible d'obtenir des fibres homogènes

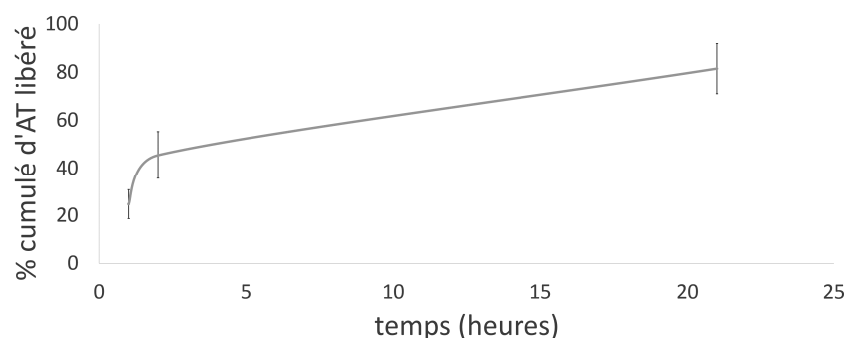


FIGURE 3.12 – Libération de l'AT quand les fibres PLA+10% d'AT sont plongées dans du tampon bicine  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  à  $\text{pH}=7,4$

certainement pas présent à la surface et ne permet alors pas de fonctionnaliser les fibres de PLA par l'adsorption de protéines.

### Mesure de l'hydrophilie des fibres de PLA et d'AT

L'ajout d'AT dans les fibres de PLA devait permettre de rendre les fibres plus hydrophiles pour permettre une meilleure adhésion des cellules [43], une meilleure adsorption des protéines [44] une meilleure mouillabilité des matériaux lors des expériences.

Les angles de contact ont ainsi été mesurés (figure 3.13). L'ajout d'AT ne modifie pas l'hydrophobie des fibres de PLA puisque l'angle de contact reste proche de  $120^\circ$ . Par ailleurs,

il est à noter que pour les fibres de PLA+20% d'AT pour lesquelles certaines présentaient des petites particules d'AT (figure 3.14A), le matériau présentait une bonne hydrophilie (3.14B et C) due aux particules d'AT. Après une première mesure d'angle de contact, le matériau devenait hydrophobe du fait de la solubilisation dans la première goutte des particules d'AT.

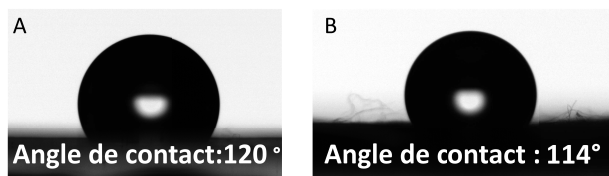


FIGURE 3.13 – Images de mesure d'angle de contact pour A : des fibres de PLA seul, B :des fibres PLA + 15% d'AT

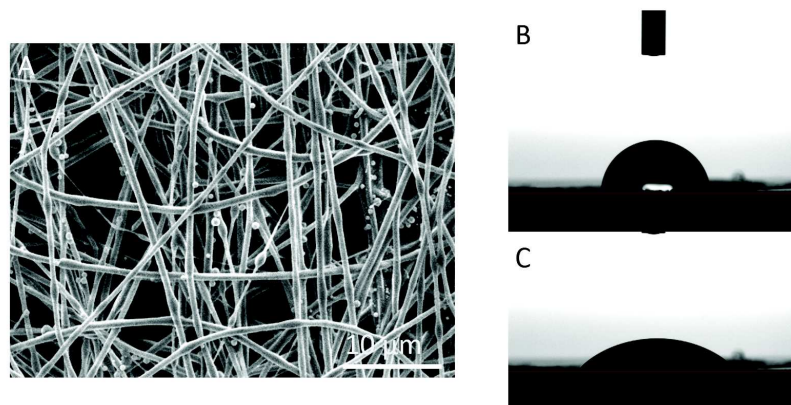


FIGURE 3.14 – A : Image MEB de fibres PLA+20% d'AT présentant des petites particules d'AT. B et C : Etalement d'une goutte d'eau sur les mêmes fibres, la photo C a été prise 20 secondes après la photo B.

### 3.2.2 Alternative et perspectives : traitement plasma des fibres de PLA

L'ajout d'AT dans les fibres de PLA n'a pas permis d'envisager son utilisation pour la fonctionnalisation des fibres : il est libéré trop rapidement et dans des trop grandes quantités et il ne modifie pas l'énergie de surface des fibres. Dans le cadre du projet, il était nécessaire de

trouver une alternative afin d'envisager la possibilité de greffer des protéines et de réaliser un gradient de protéines. Pour ce faire, la possibilité d'utiliser le traitement plasma a été proposée.

### Modification de l'hydrophilie des fibres de PLA

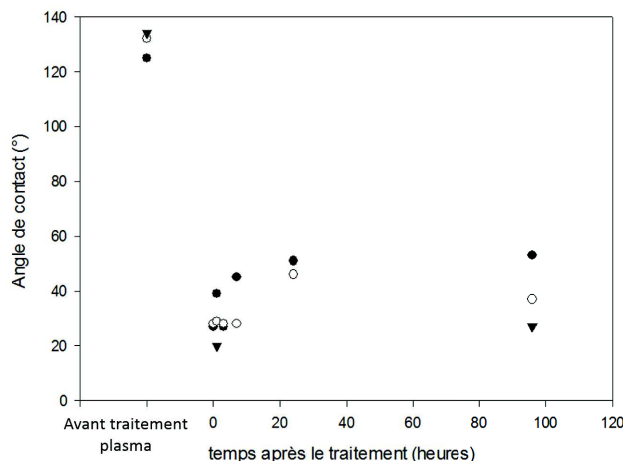


FIGURE 3.15 – Angles de contact de fibres de PLA électrospinnées pendant 10 minutes après traitement plasma en fonction du temps après le traitement. Les angles à -5 heures correspondent au temps avant traitement plasma.

Un traitement plasma de 30 secondes a été appliqué aux fibres de PLA seul. Les angles de contact ont été mesurés sur ces fibres avant et après traitement. Comme le montre la figure 3.15, après traitement les fibres deviennent hydrophiles avec un angle passant de  $120^\circ$  avant traitement à environ  $30^\circ$  juste après traitement. L'hydrophilie diminue ensuite quelques heures après traitement mais les fibres restent hydrophiles 4 jours après le traitement.

### Adsorption d'hémoglobine sur les fibres de PLA traitées au plasma

Il a d'abord été choisi de travailler avec l'hémoglobine (Hb) comme protéine modèle et de suivre son adsorption sur les fibres par le suivi de la diminution de sa concentration quand des fibres sont plongées dans une solution d'Hb. L'Hb possède un pic caractéristique à 406 nm dû à la présence de fer dans cette métalloprotéine. Ceci permet un suivi par spectroscopie UV-visible.

L'influence de la concentration en Hb sur l'adsorption a d'abord été étudiée lorsque des fibres de PLA traitées ou non au plasma sont immergées dans une solution d'Hb solubilisée dans un tampon Tris 50 mM NaCl 100 mM à pH=7,4 pendant 4 heures. Il est à noter qu'au



delà de 0,5 mg/mL, l'Hb est difficilement solubilisée dans le tampon. Par ailleurs, comme le montre la photo 3.16A, les fibres de PLA traitées au plasma sont bien gonflées tandis que les fibres non traitées restent à la surface et la solution semble très peu pénétrer à l'intérieur du matériau.

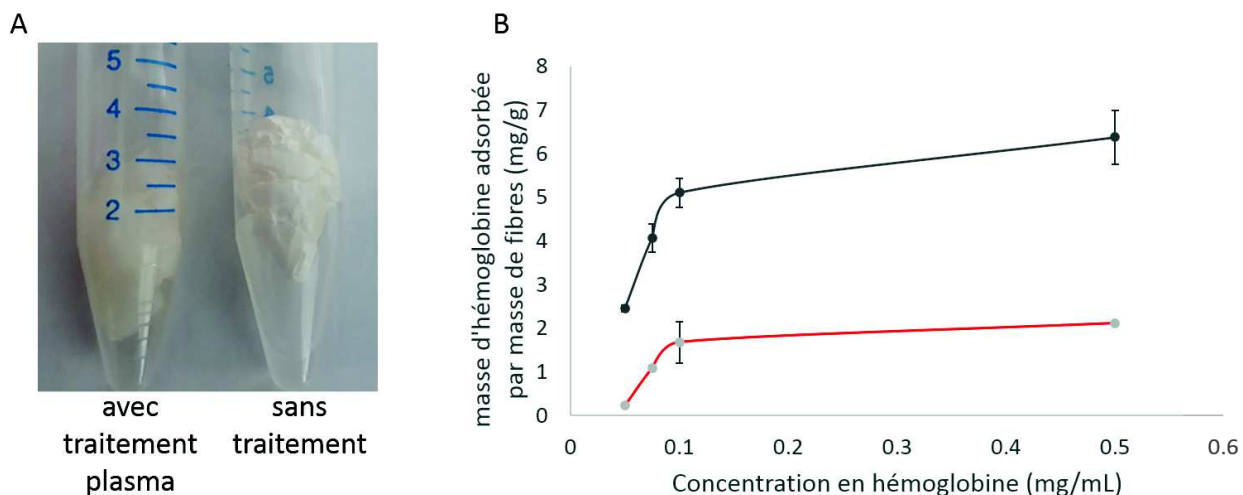


FIGURE 3.16 – A : Photo des fibres immergées dans une solution d'Hb. Pour le cas des fibres traitées au plasma, le matériau est tout de suite imprégnée de solution tandis que pour les fibres non traitées, le matériau reste à la surface ne gonfle pas du tout. B : masse d'Hb adsorbée par masse de fibres (mg/g) en fonction de la concentration en Hb après une immersion pendant 4 heures des fibres de PLA non traitées au plasma (—) et traitées au plasma (—).

Le graphe 3.16B, montre la masse d'Hb adsorbée par masse de fibres de PLA sur des fibres traitées ou non au plasma en fonction de la concentration en Hb. Tout d'abord, il peut être observé une différence notable entre la masse d'Hb adsorbée sur des fibres PLA traitées et non traitées puisque dans ce cas, 3 fois plus de protéines sont adsorbées sur les fibres traitées au plasma que sur celles non traitées. Ensuite, les deux courbes suivent la même allure et un plateau semble être atteint pour la concentration la plus élevée, particulièrement pour les fibres non traitées. Il a été malheureusement impossible d'augmenter la concentration en Hb puisqu'elle est difficilement solubilisable au delà de 0,5 mg/mL dans le tampon utilisé.

Comme il est apparu qu'au bout de 4 heures l'adsorption n'était pas terminée, des mesures de cinétique d'adsorption ont été réalisées avec une solution concentrée à 0,1 mg/mL en Hb (voir le graphe figure 3.17). Pour les fibres de PLA non traitées au plasma, le temps d'immersion n'influe

pas réellement sur la masse de protéines adsorbées. Pour les fibres traitées en revanche, plus les fibres sont immergées, plus l'Hb s'adsorbe sur les fibres. Cette cinétique permet d'entrevoir la possibilité de réaliser un gradient de protéines par simple trempage du matériau et un gradient de temps d'immersion du matériau.

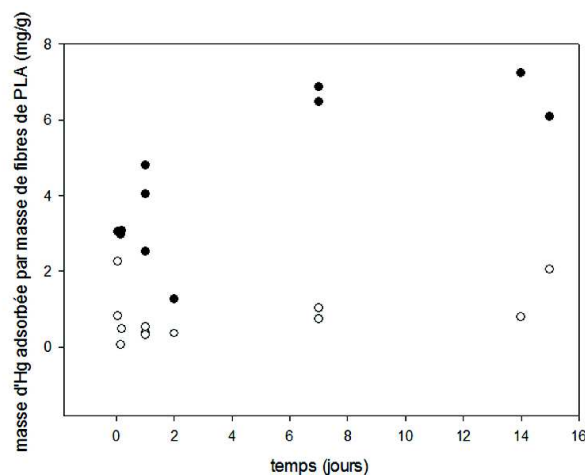


FIGURE 3.17 – Cinétique d'adsorption de l'Hb sur des fibres de PLA traitées (●) et non traitées (○) au plasma pour une solution d'Hb à 0,1 mg/mL.

La possibilité d'utiliser le traitement plasma semble une bonne alternative afin de créer un gradient de protéines. L'hémoglobine n'était qu'une protéine modèle et il faudrait bien sûr étudier l'adsorption d'autres protéines sur les fibres électrospinnées et entre autre d'enzymes afin de vérifier si leur activité est conservée une fois adsorbée sur la surface des fibres.

### 3.3 Structuration de fibres électrospinnées de PLA à l'aide d'acide tannique

Bien que l'ajout d'AT dans les fibres de PLA n'ait pas permis d'améliorer l'hydrophilie des fibres de PLA, nous nous sommes interrogés dans cette partie sur la possibilité de l'utiliser afin de structurer les fibres de PLA. Des travaux réalisés précédemment dans la littérature et au sein de l'ICPEES sur la structuration des fibres sont résumés dans la partie Electrospinning du chapitre Matériel et Méthode. Cette technique a pour but de contrôler le dépôt de fibres afin d'augmenter la taille des pores pour faciliter la migration des cellules au sein du matériau électrospinné.

### 3.3.1 Optimisation des conditions d'obtention de la première couche

Des membranes de très faible épaisseur, appelées membranes 2 dimensions (2D), ont été obtenues en électrospinnant une première couche de fibres de PLA puis en électrosprayant des particules de PCL (polycaprolactone) ou de PCL-AT. Il a été choisi de travailler avec des particules de PCL car ce polymère possède une température de fusion faible de l'ordre de 60 °C tandis que le PLA a une température de fusion d'environ 150 °C. Cette différence de température peut permettre par traitement thermique à une température proche de la température de fusion du PCL, la fusion du PCL avec l'AT et permettre un renforcement de la membrane en évitant la fusion des fibres de PLA. De plus, l'utilisation de particules d'AT seules présentait une trop forte solubilisation des molécules d'AT pour envisager de l'utiliser seul dans des particules.

Comme précédemment, le PLA est solubilisé dans un mélange DMF/DCM à 10%mt. Le PCL de faible poids moléculaire est solubilisé à différentes concentrations dans du diméthylacétamide. La masse d'AT ajoutée est en % de la masse de PCL dans la solution.

#### Fibres de PLA seules

Pour déterminer les conditions optimales pour obtenir la première couche de PLA, des fibres de PLA ont été électrospinnées sur une grille pendant des temps différents.

Pour des temps d'électrospinning de 15 et 30 secondes (figures 3.18a-b), l'auto-organisation des fibres de PLA sur la grille est bonne avec l'apparition de "plots" composés de fibres enchevêtrées sur les sommets de la grille et des fibres tendues entre les plots. A partir de 45 secondes, l'auto-organisation commence à se perdre (figures 3.18c-d).

Pour la suite des expériences, il a été choisi de travailler avec un temps d'électrospinning de la première couche de PLA de 15 secondes.

#### Fibres de PLA avec des particules de PCL

L'effet de la concentration en PCL sur l'organisation des fibres de PLA a été étudiée pour des particules obtenues à partir de solution en PCL à 10, 15, 20, 25 et 30%mt et est résumée dans le tableau 3.1.

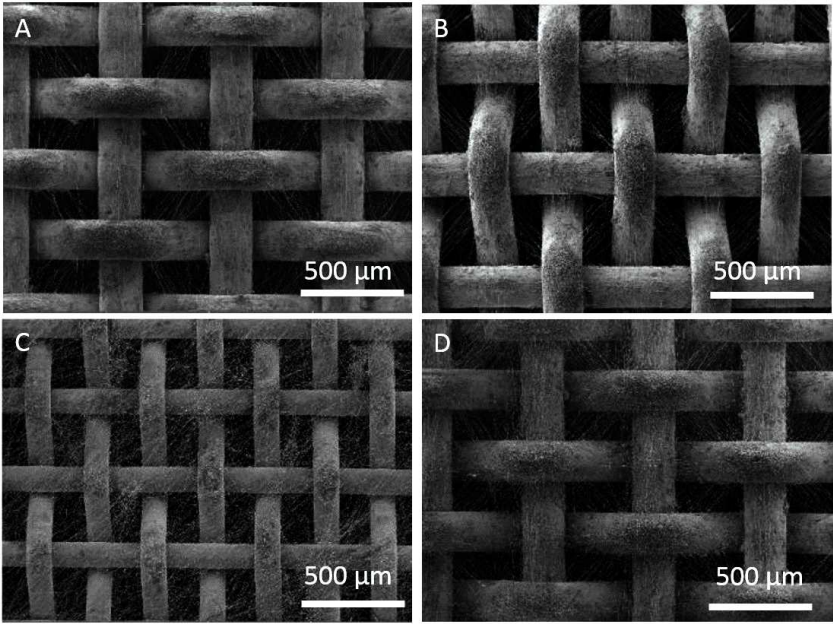


FIGURE 3.18 – Images MEB de fibres de PLA électrospinnées sur une grille pendant a : 15 secondes, b : 30 secondes, c : 45 secondes, d : 1minutes

	10%mt PCL	15%mt PCL	20%mt PCL	25%mt PCL	30%mt PCL
10% mt PLA	+++	+++	+++	+	-

TABLE 3.1 – Organisation des fibres de PLA en fonction de la concentration en PCL pour des fibres de PLA électrospinnées pendant 15 secondes et des particules de PCL électrosprayées pendant 2 minutes. +++ : très bonne répartition ; + : quelques défauts de positionnement ; - : mauvaise répartition et apparition de gros défauts.

Les particules obtenues pour des concentrations en PCL de 10; 15 et 20%mt sont celles qui permettent d’obtenir une meilleure agrégation. L’image 3.19A montre que les particules obtenues à partir d’une solution à 10%mt en PCL sont bien positionnées sur les sommets de la grille et qu’il n’y a pas de défauts de positionnement. Pour les particules obtenues à partir d’une solution à 30%mt de PCL en revanche, la solution semble trop concentrée et trop visqueuse entraînant la fusion des particules ainsi qu’une mauvaise répartition (figure 3.19B)

Il a ainsi été choisi de travailler avec une solution de PCL à 10%mt.

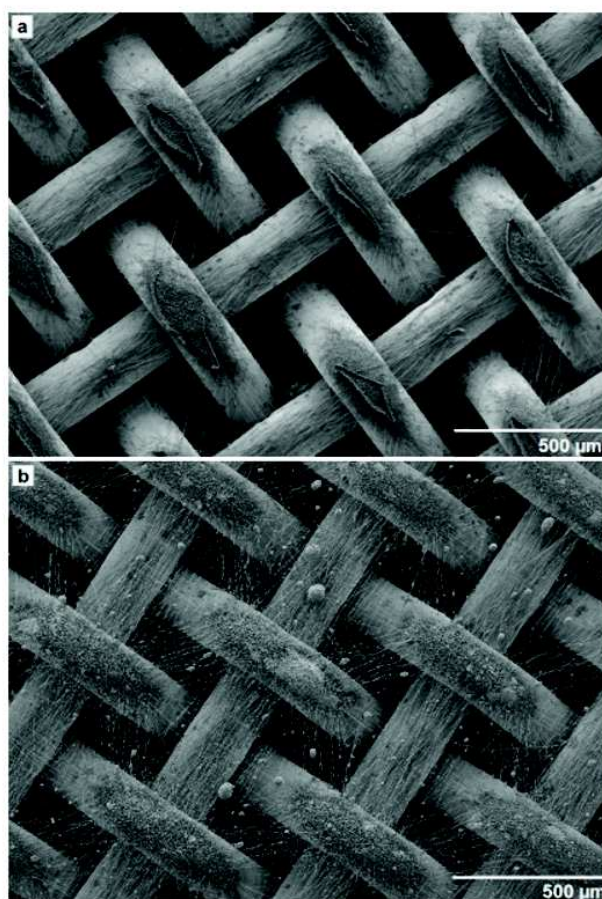


FIGURE 3.19 – Fibres de PLA obtenues à partir d’une solution à 10%mt avec A : des particules de PCL obtenues à partir d’une solution à 10%mt et B : des particules de PCL obtenues à partir d’une solution à 30%mt

### Fibres de PLA avec des particules PCL-AT

Des particules PCL-AT ont été électrosprayées sur une surface en l’absence de grille. Aux solutions de PCL à 10%mt ont été ajoutés entre 5 et 40% d’AT (% par rapport à la masse de PCL). Pour les solutions contenant entre 5 et 30% d’AT, les particules sont sphériques (figure 3.20A). En revanche, pour une concentration supérieure à 35% d’AT, des fibrilles commencent à apparaître donnant aux particules une forme de têtard (3.20B).

Des fibres de PLA ont par la suite été électrospinnées puis des particules PCL-AT ont été électrosprayées (figure 3.21). Pour les solutions dont la concentration est supérieure à 30% d’AT, quelques défauts de positionnements des particules apparaissent (figure 3.21D).

Pour la suite, il a été choisi de travailler avec une solution de PCL à laquelle est ajouté 30% de la masse de PCL en AT. Il s’agit en effet de la solution la plus concentrée en AT qui ne



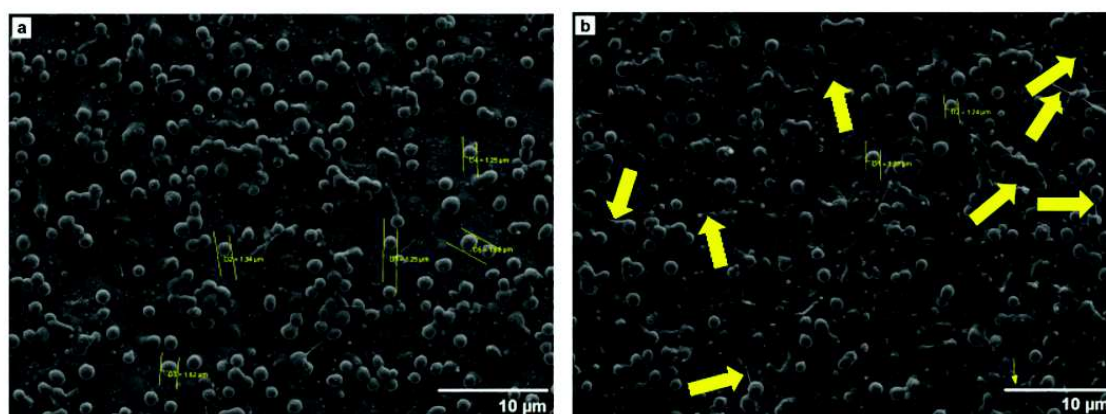


FIGURE 3.20 – Images MEB de particules obtenues à partir d’une solution A : à 10%mt de PCL et 30% d’AT B : à 10%mt de PCL et 40% d’AT, des fibrilles apparaissent (flèches jaunes).

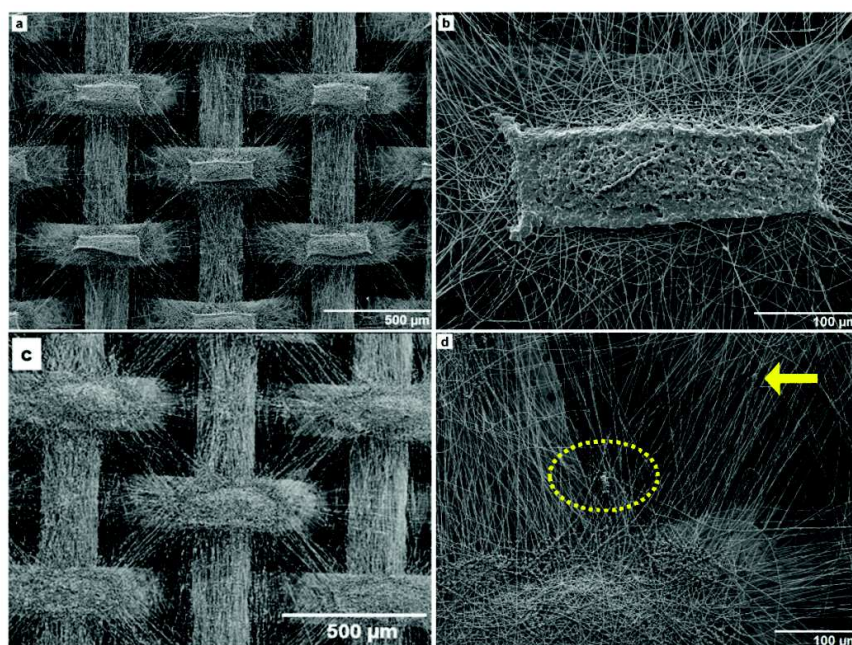


FIGURE 3.21 – A et B : Images MEB de fibres de PLA et de particules PCL-AT obtenues à partir de solution de 10%mt de PCL et 30% d’AT. C et D : Images MEB de fibres de PLA et de particules PCL-AT obtenues à partir de solution de 10%mt de PCL et 40% d’AT. La flèche et le cercle indiquent les rares défauts de positionnement.

donne pas de défauts dans la répartition des particules.

### Mécanisme de structuration de la première couche

De ces expériences, il a été possible de développer le mécanisme de structuration de la première couche qui est schématisé figure 3.22. Les schémas a, b et c présentent la structuration pour une quantité optimale de particules pour différentes quantités de fibres déposées tandis que les schémas d, e et f présentent la structuration pour une quantité optimale de fibres et une quantité variable de particules déposées.

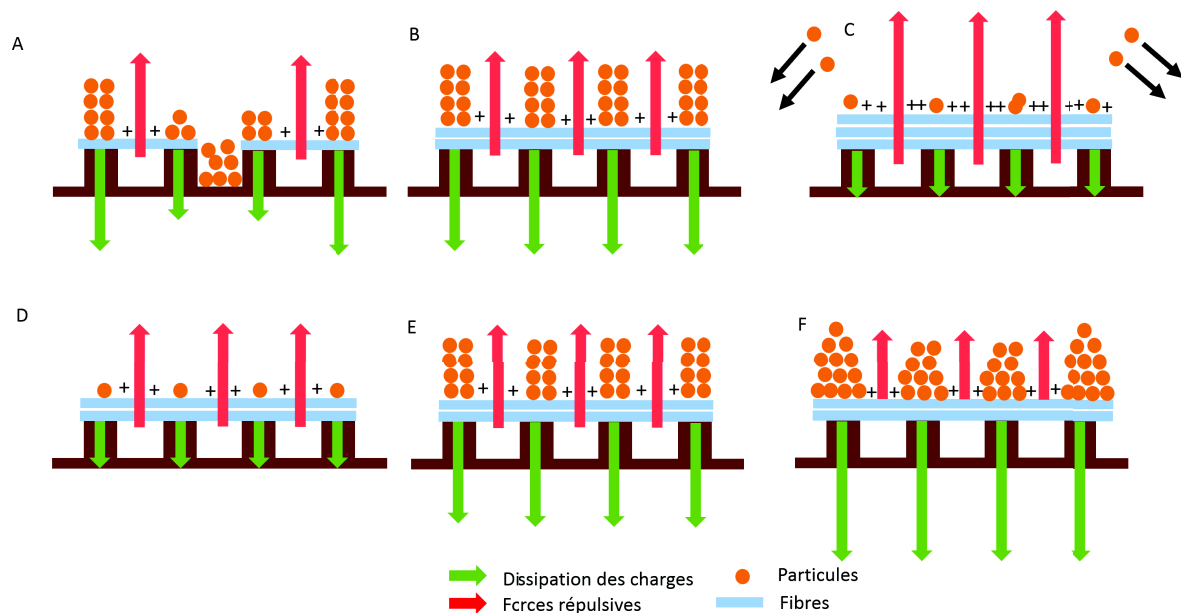


FIGURE 3.22 – Schéma de la structuration de la première couche. Les schémas a, b et c représentent la structuration pour une même quantité de particules déposées et une quantité de fibres déposées différentes tandis que les schémas d, e et f représentent la structuration pour une même quantité de fibres déposées et une quantité de particules déposées différentes. Les flèches en noir représentent l'éjection des particules hors du collecteur dû à un trop fort champ électrostatique répulsif.

Pour une quantité trop faible de fibres déposées (3.22a), certaines zones situées entre les sommets de la grille ne sont pas recouvertes de fibres. Ces zones vont alors attirer par la suite un dépôt important de particules entraînant la perte de la structure. Pour des quantités optimales de fibres et de particules, (schéma 3.22 b et e), les fibres recouvrent la surface du collecteur et un équilibre apparaît entre les zones chargées et les zones non chargées électriquement. Les particules sont alors correctement guidées sur les zones déchargées correspondant aux sommets

des grilles. Quand une couche très épaisse de fibres est déposée (schéma 3.22 c), la dissipation des charges ne s'effectue pas de manière optimale et les fibres forment une couche isolante. Quand les particules sont électrosprayées, elles sont repoussées par ces forces de répulsion électriques. Peu de particules se déposent alors sur le collecteur et les autres se déposent hors du collecteur. La structuration est alors perdue.

Dans le cas d'un dépôt optimal de fibres mais d'une quantité faible de particules, (schéma 3.22d) les fibres forment une bonne structure pour le dépôt des particules qui se déposent sur les zones déchargées. Par la suite, un trop faible dépôt ne pourra pas assurer l'apparition de strate de fibres et entraînera la perte du schéma.

### 3.3.2 Optimisation des conditions d'électrospinning pour obtenir un matériau en 3D

Pour cette partie où les conditions pour obtenir un matériau structuré en 3D ont été étudiées, une solution à 10%mt en PLA a été utilisée pour obtenir des fibres et une solution à 10%mt de PCL et 30% d'AT a été utilisée pour obtenir des particules.

Deux manières de fabriquer les matériaux ont été étudiées : la première une en "multicouches" et l'autre appelée "en continu".

Pour la réalisation de matériaux structurés réalisés en multicouches, le collecteur a été placé en face de l'aiguille de la solution de PLA puis après le dépôt d'une couche de PLA, le collecteur a été tourné et placé en face de l'aiguille de la solution de PCL-AT et ce 8 fois pour obtenir 8 bicouches. L'influence du ratio du temps d'électrospinning/temps électrospraying a été étudiée pour un dépôt constant de fibres de 15 secondes. Les ratios étudiés sont :

- 1/1 : 15 secondes d'électrospinning-15 secondes d'électrospraying ;
- 1/3 : 15 secondes d'électrospinning-45 secondes d'électrospraying ;
- 1/9 : 15 secondes d'électrospinning-135 secondes d'électrospraying.

Pour le ratio 1/1, l'organisation des fibres de PLA est bonne (figure 3.23a). Les fibres sont tendues entre les différents plots formés par les particules PCL-AT et forment des motifs en nid d'abeille. Les dimensions de ces motifs varient entre 570 et 770  $\mu\text{m}$ . Les particules se déposent exclusivement sur les sommets de la grille (figure 3.23b).

Pour le ratio 1/9, une structure fibreuse dense est obtenue. Des pores circulaires difficilement observables avec le dépôt très dense de fibres entre les sommets de la grille (figure 3.23c). Des défauts de positionnements apparaissent avec le dépôt de particules sur les fibres tendues



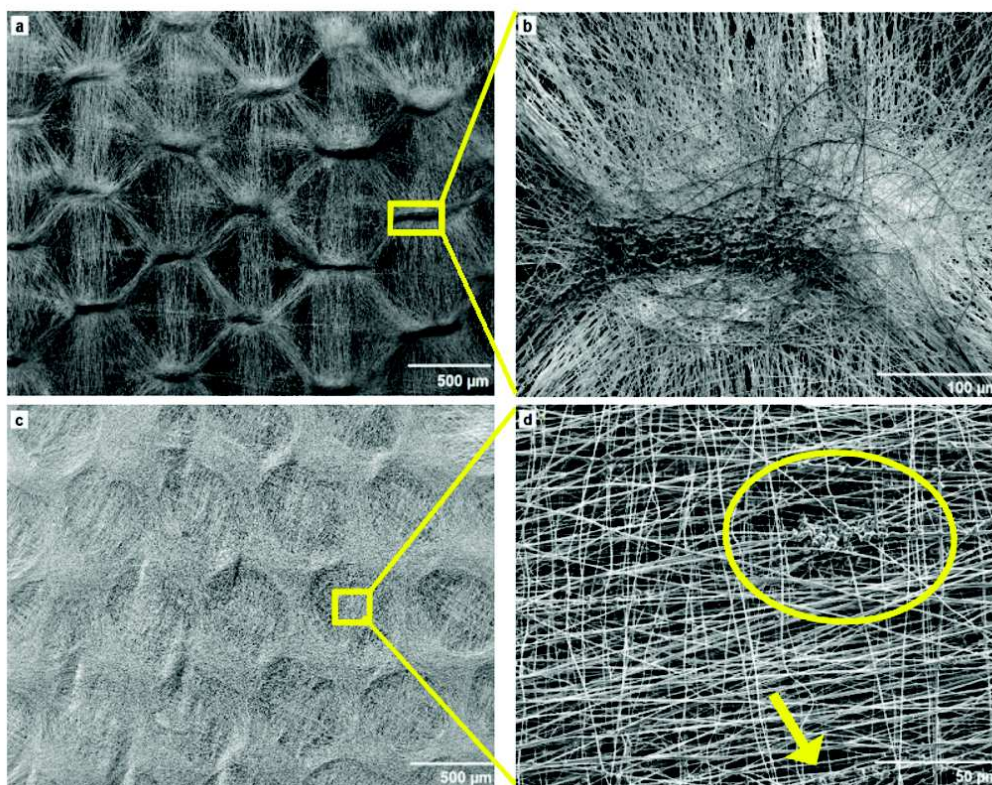


FIGURE 3.23 – Images MEB de matrices structurées en multicouches avec un ratio 1/1 (a et b) et un ratio 1/9 (c et d). La flèche et le cercle indique des particules sur les fibres.

(figure 3.23d). Le temps d'électrospraying apparaît beaucoup trop grand pour obtenir un dépôt satisfaisant des particules et entraîne un dépôt de fibres beaucoup trop dense à l'intérieur des pores.

Pour le ratio 1/3, en alternant l'électrospraying et l'électrospinning comme précédemment, des matériaux bien structurés avec des pores bien définis sont obtenus (figure 3.24 d-e). La taille des pores varie entre 650 et 720  $\mu\text{m}$ . Les particules sont bien déposées sur les sommets de la grille et les murs formés par les fibres.

Pour obtenir des matrices 3D bien structurées en continu, il a ensuite été étudié la possibilité d'électrosprayer des particules PCL-AT non plus avec une seule aiguille mais avec 3 aiguilles pour augmenter la quantité de particules déposées (voir photo figure 3.25).

Ce montage permet d'obtenir des matrices de fibres de PLA-particules PCL-AT très bien structurées avec des particules correctement déposées sur les sommets des grilles et l'obtention de pores en forme de nid d'abeille avec un diamètre variant entre 560 et 720  $\mu\text{m}$  (figure 3.26).

Avec les mêmes conditions, des matrices structurées avec des particules de PCL ont aussi



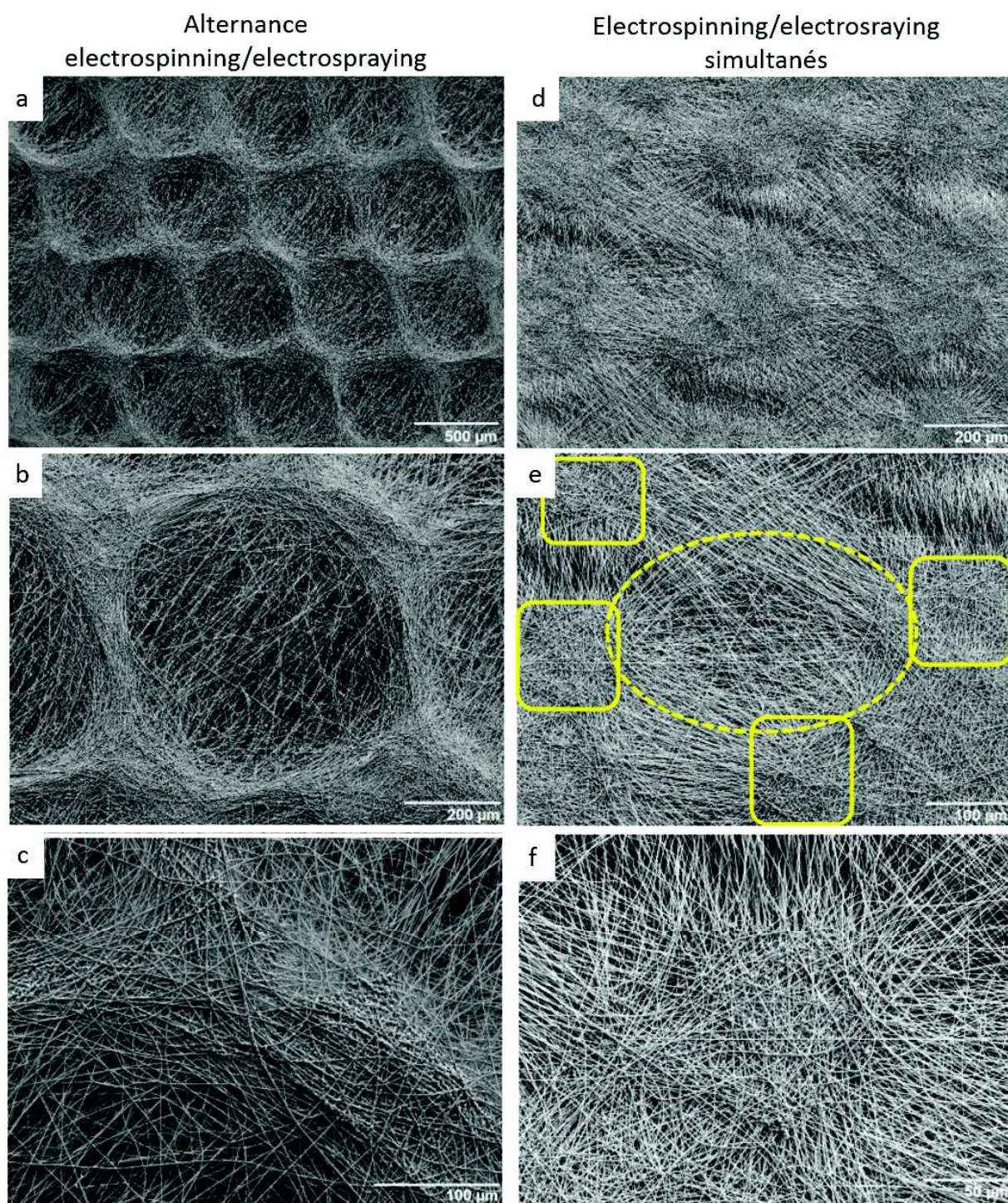


FIGURE 3.24 – Images MEB de matrices structurées en multicouches avec un ratio 1/3 en alternant l'électrospinning de PLA et l'électrospraying de particules de PCL-AT (a-c) et en réalisant en continu l'électrospinning et l'électrospraying (d-f)



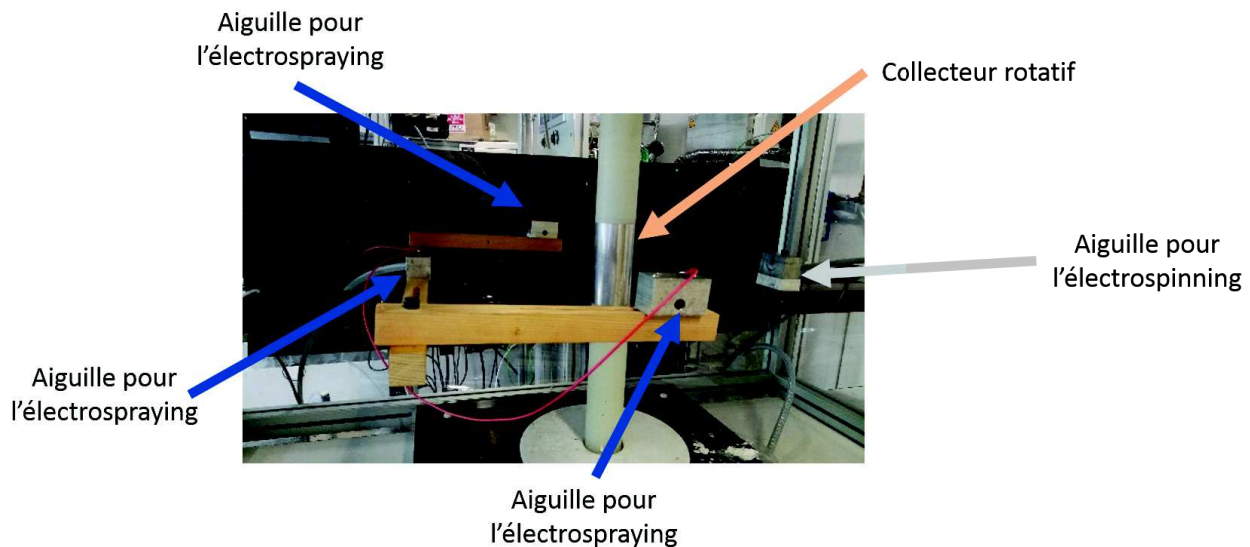


FIGURE 3.25 – Photo du montage comportant les 3 aiguilles pour l'électrospraying et l'aiguille pour l'électrospinning

été préparées. Comme le montre la figure 3.27, la présence d'AT améliore la structuration des fibres. Les plots et les murs des pores sont beaucoup mieux définis avec la présence d'AT. De plus, beaucoup plus de fibres sont présentes dans les pores sans la présence d'AT.

Ce sont ces conditions qui ont été utilisées par la suite pour produire des échantillons pour les tests de culture cellulaire et les tests antibactériens. Les échantillons sont notés PLA/PCL et PLA/PCL-AT.

### Mécanisme de la structuration en 3D

De ces expériences, il a été établi un mécanisme de structuration des fibres en 3D qui est schématisé figure 3.28 en fonction de la quantité de fibres déposées pour une quantité de particules déposées constantes et en fonction de la quantité de particules déposées pour une quantité de fibres déposées constantes.

Lorsque la première couche de fibres est fine, comme il l'a été dit précédemment, des sommets de la grille ne sont pas recouverts de fibres. Des trous dans la première couche de fibres apparaissent et le dépôt de particules se fait alors directement sur le collecteur. Ceci a pour effet une perte de l'augmentation de l'épaisseur du matériau lors du dépôt des fibres ainsi qu'une perte partielle de la structure (schéma 3.28a). Pour des conditions optimales (schéma 3.28b et e), tous les sommets de la grille sont recouverts par des fibres. La dissipation des charges se

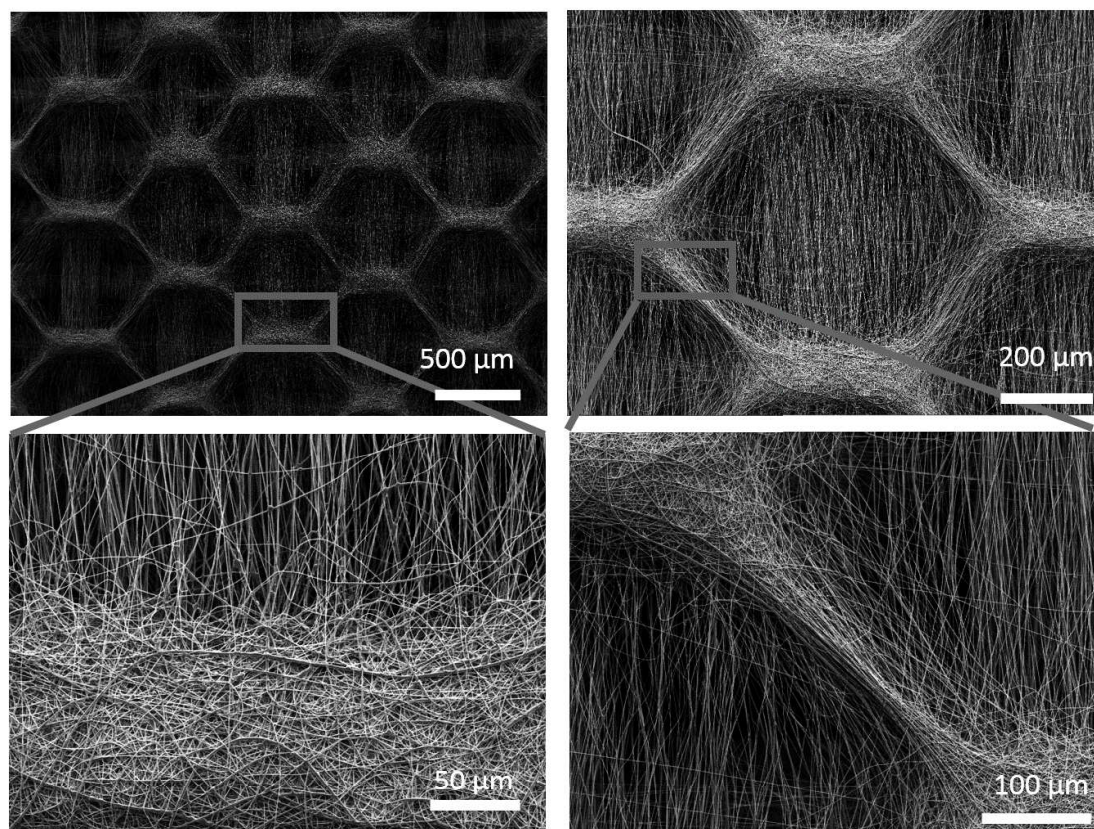


FIGURE 3.26 – Images MEB d’une matrice structurée à l’aide de 3 aiguilles d’électrospraying de PCL-AT et d’une aiguille d’électrospinning de PLA avec une rotation en continue du collecteur à 1 tour/minute.

fait de manière efficace et les particules se déposent en agrégats sur les sommets de la grille ce qui permet là aussi une bonne dissipation des charges permettant ensuite d’obtenir une bonne croissance de l’épaisseur du matériau tout en gardant la structure poreuse verticale et horizontale.

Quand le dépôt de la première couche de fibres est trop épais (figure 3.28c), la dissipation des charges ne se fait pas correctement. Ceci entraîne la formation d’une couche de fibres isolante qui perturbe le dépôt des particules. Quelques particules sont déposées sur les couches de fibres tandis que les autres sont déposées hors du collecteur. Ce dépôt de particules induit une perte dans la structure ainsi que dans la croissance de l’épaisseur du matériau avec les couches suivantes.

Dans le cas d’un dépôt de fibres optimal mais d’une faible quantité de particules déposées (schéma 3.28d), l’augmentation de l’épaisseur est fortement compromise. Les particules ne sont

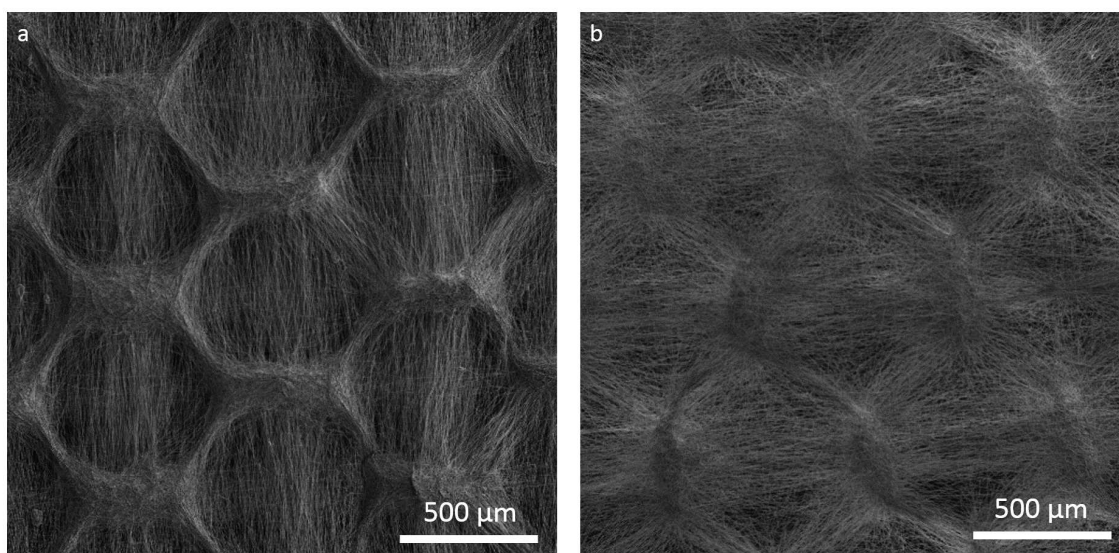


FIGURE 3.27 – Images MEB de matrices structurées à l’aide de 3 aiguilles d’électrospraying et d’une aiguille d’électrospinning de fibres de PLA en rotation continue avec a : des particules PCL-AT ; b : des particules de PCL seul sans ajout d’AT.

pas assez nombreuses pour assurer l’apparition et l’espacement de strates de fibres et pour permettre d’obtenir une porosité horizontale dans le matériau et d’assurer un bon modèle de réplication pour les couches suivantes.

Si trop de particules sont déposées (schéma 3.28f), les gros agrégats de particules auront tendance à se déposer au delà des limites des sommets de la grille. Ces conditions entraînent une grande dissipation des charges, diminuant les forces électrostatiques répulsives liées aux fibres tendues. Dans ce cas, là encore, le modèle électrostatique imposé par la grille est perdue couche après couche.

Finalement, tandis que pour l’obtention de membranes en 2D, seul le dépôt des fibres jouait un rôle essentiel dans la structuration, pour les matériaux en 3D, il est important de trouver les conditions pour avoir un ratio fibres/particules déposées pour assurer la conservation du motif lié à la grille et obtenir un matériau en 3D structuré.

### 3.3.3 Tests cellulaires sur les matrices structurées

L’interaction des matériaux avec des cellules humaines a été étudiée ici. Les matériaux utilisés sont des matrices PLA/PCL et PLA/PCL-AT. Les fibres de PLA sont obtenues à partir d’une solution de PLA à 10%mt dans un mélange DMF/DCM (60/40 : masse/masse). Les

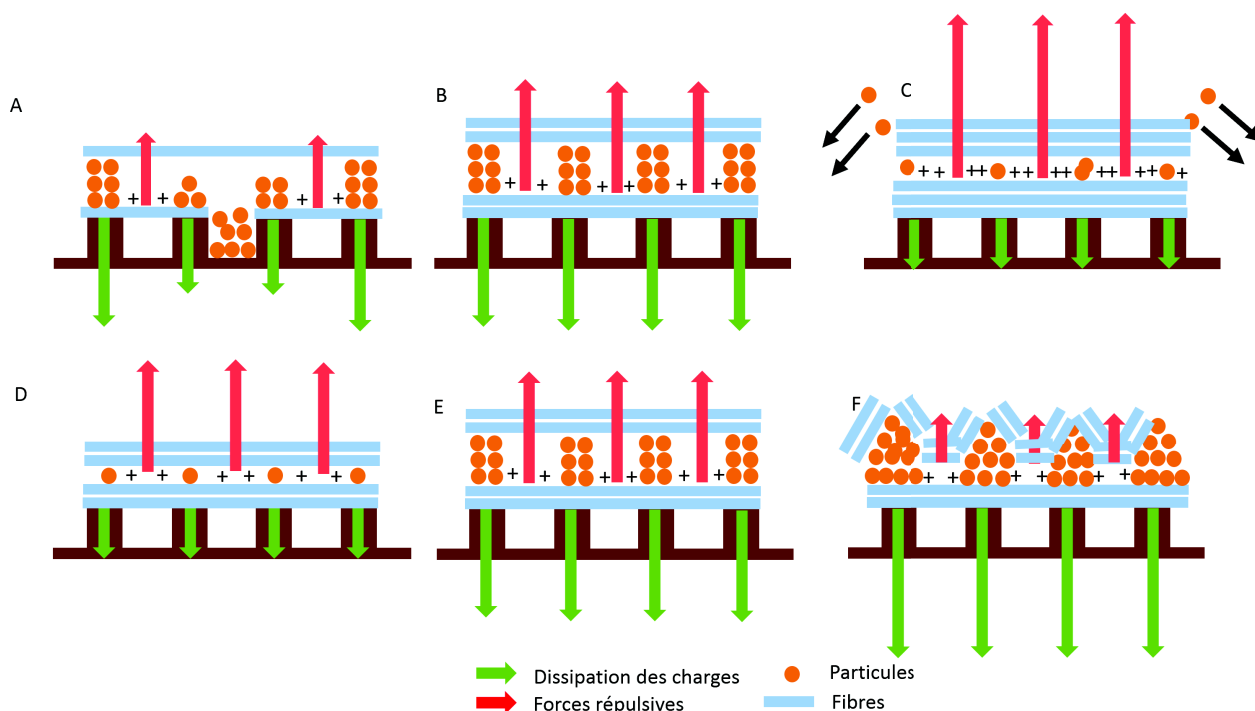


FIGURE 3.28 – Schéma de la structuration du matériau en 3 dimensions. Les schémas a, b et c représentent la structuration pour une même quantité de particules déposées et une quantité de fibres déposées différentes tandis que les schémas d,e et f représentent la structuration pour une même quantité de fibres déposées et une quantité de particules déposées différentes. Les flèches en noir représentent l'éjection des particules hors du collecteur dû à un trop fort champ électrostatique répulsif.

particules sont obtenues à partir d'une solution à 10%mt de PCL dans du diméthylacétamide avec ou non ajout de 30% de la masse de PCL en AT. L'électrospinning se fait en simultané avec l'électrospraying après dépôt d'une première couche de PLA. 3 aiguilles assurent l'électrospraying de particules. Les matrices contenant de l'AT sont notées PLA//PCL-AT ; celles sans AT : PLA//PCL.

### Libération de l'acide tannique

Avant d'effectuer les premiers tests en présence de cellules ou de bactéries, des mesures de la libération d'acide tannique en solution ont été effectuées dans un tampon composé d'acide citrique et d'hydrogénophosphate de sodium pour des échantillons de matrice de 8 mm de diamètre, dans des conditions similaires à celles utilisées pour les tests de cytotoxicité ou de

mesure de l'inhibition de croissance des bactéries. Après 24h, la concentration obtenue dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon est de  $22 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ .

### Etude de la cytotoxicité des matrices

La cytotoxicité liée à la libération de l'AT ainsi que d'autres éléments pouvant être libérés par les matrices a été étudiée à l'aide d'un milieu d'extraction. Un morceau de matrice de 8 mm de diamètre a été incubé à 37°C pendant 24 heures dans du milieu de culture qui a ensuite été mis au contact de fibroblastes de type BJ. Comme le montre le graphe figure 3.29, la libération de l'AT ou d'autres éléments présents dans la matrice ne présente pas de cytotoxicité pour les cellules.

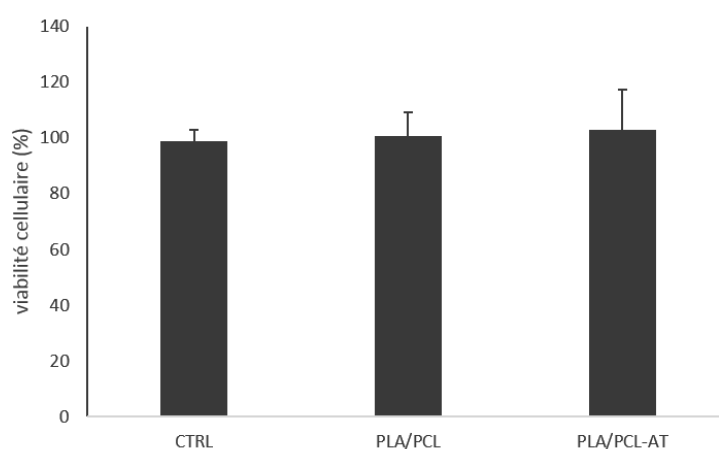


FIGURE 3.29 – Viabilité des cellules dans un milieu activé par les matrices PLA/PCL et matrices PLA/PCL-AT par rapport à un milieu sans activation. L'écart-type représente l'erreur sur la moyenne.

### Répartition des cellules sur les matrices structurées dans les premiers instants au contact avec les matrices

Dans ces tests, il a été choisi de voir si lorsque des cellules, des fibroblastes humains BJ, étaient ensemencées sur les matrices structurées, elles adhéraient de manière préférentielle sur les plots ou sur les fibres et si la présence d'AT changeait l'adhésion des cellules. Les cellules ont été ensemencées avec une densité de  $5,1 \cdot 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ . Après 24h, les fibroblastes sur les plots ou sur les fibres ont été comptés. La surface occupée par les fibres et celle occupée par les plots ont ensuite été mesurées afin d'obtenir la densité cellulaire sur chacune des surfaces :



Densité cellulaire ( $\times 10^4$ cellules/cm <sup>2</sup> )	Fibres	Plots
PLA//PCL	4,8 $\pm$ 1,3	3,9 $\pm$ 2,5
PLA//PCL-AT	4,3 $\pm$ 1,5	3,7 $\pm$ 2,3

TABLE 3.2 – Densité cellulaire sur les matrices structurées avec et sans AT dans les particules de PCL après 24h d'incubation

Les tests statistiques de Mann Whitney n'ont montré aucune différence sur l'adhésion des cellules, que ce soit de différence concernant la présence d'AT ou concernant l'adhésion soit sur les fibres soit sur les particules.

### Prolifération des cellules sur les matrices structurées

Après les expériences d'adhésion, la prolifération des fibroblastes BJ a été suivie grâce aux tests à la résazurine pendant plusieurs jours.

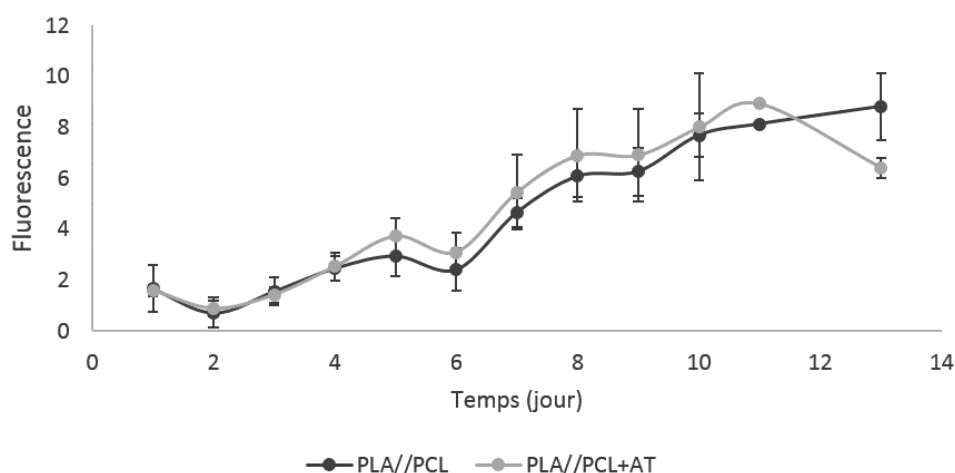


FIGURE 3.30 – Suivi de la prolifération cellulaire de fibroblastes sur des matrices de PLA//PCL-AT et PLA//PCL au cours du temps.

Les cellules prolifèrent correctement sur les fibres. La présence d'AT dans les plots ne modifie pas la prolifération des fibroblastes (figure 3.30). L'AT ne présente ainsi pas de cytotoxicité et ne modifie pas la prolifération cellulaire.

Après le suivi de la prolifération, les cellules ont ensuite été fixées, et les noyaux ont été marqués avec de l'Hoechst et les filaments d'actine avec de la phalloïdine-FITC et observées en



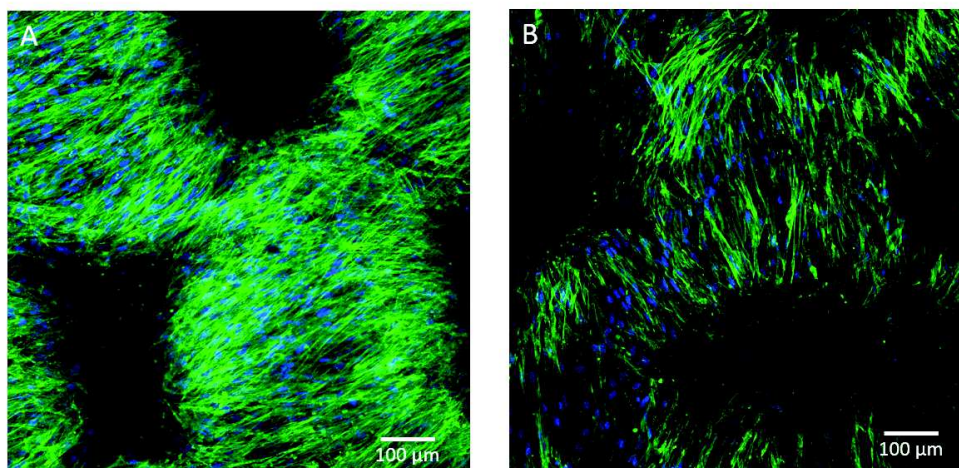


FIGURE 3.31 – Image en microscopie confocale des fibroblastes sur les fibres après 12 jours de culture A : sur des matrices PLA/PCL; B : sur des matrices PLA/PCL-AT. En vert, les filaments d’actine marqués avec la phalloïdine-FITC; en bleu, les noyaux cellulaires marqués avec de l’Hoechst : les filaments d’actine semblent s’aligner sur les fibres de PLA.

microscopie confocale. Sur les images de la figure 3.31, les cellules forment un tissu uniforme sur les fibres et les filaments d’actine sont bien étendus et semblent suivre l’alignement des fibres de PLA. Les matrices structurées permettent ainsi une bonne colonisation cellulaire.

### Migration des cellules à travers les matrices

Un autre paramètre essentiel à connaître pour l’utilisation des matrices structurées et de savoir si les pores entre les fibres sont assez grands et lâches afin que les cellules puissent migrer à travers les matrices. Pour cela, un premier protocole a été mis en place. Des inserts composés d’une membrane poreuse avec des pores de 8  $\mu\text{m}$ , laissant passer les cellules ont été utilisés. Les fibroblastes BJ ont été cultivés dans des puits afin d’obtenir un tapis cellulaire. Une fois, le tapis cellulaire obtenu, un échantillon de matrice a été déposé au milieu du puits et sur la matrice a été déposé l’insert. Pour favoriser la migration cellulaires à travers les matrices, du milieu de culture cellulaire contenant du sérum a été mis dans l’insert tandis que dans le reste du puits, du milieu sans sérum a été placé (figure 3.32). Un témoin a été réalisé sans matrice déposée entre l’insert et le fond du puits. Après 15 jours, les cellules ont été fixées et les noyaux et les filaments d’actine ont été marquées. Cette première expérience a permis de montrer que dans le puits témoin, les cellules avaient bien migré sur la membrane de l’insert mais en revanche, pour les

puits contenant une matrice, aucune cellule n'était observable sur la matrice. Les matrices ont ensuite été observées (figure 3.33A.). La densité cellulaire est faible notamment en comparaison avec les tests de prolifération. De plus, tandis que des cellules étaient observées dans les zones du puits non recouvertes par l'insert et la matrice, aucune cellule n'était observable dans le fond du puits à l'endroit où la matrice et l'insert avaient été posés. Il est possible que le protocole avec l'empilement de la matrice et de l'insert ne permette pas une bonne viabilité des cellules.

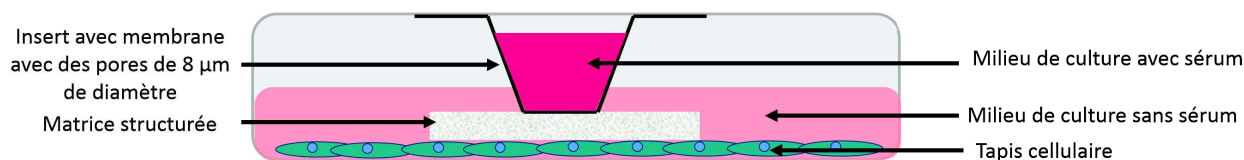


FIGURE 3.32 – Schéma du montage du premier protocole de migration : après obtention d'un tapis cellulaire, un échantillon de matrice a été déposé au milieu du puits et un insert avec une membrane laissant passer les cellules a ensuite été déposé sur la matrice. Dans l'insert, du milieu de culture pourvu de sérum a été injecté tandis que dans le reste du puits, du milieu de culture sans sérum est ajouté afin de favoriser la migration des cellules, du puits vers l'insert

D'autres protocoles sont en cours d'étude pour permettre d'étudier la migration cellulaire

### 3.3.4 Etude des propriétés antibactériennes des matrices

Des tests préliminaires pour savoir si les matrices contenant de l'AT ont des propriétés antibactériennes ont été réalisés avec la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Les bactéries ont été ensemencées avec du milieu de culture et un morceau de matrice de diamètre de 8 mm pendant 24 heures. L'inhibition de la croissance en solution a ensuite été mesurée. Comme le montre le graphique 3.34, la présence d'AT dans les fibres structurées inhibe la croissance des bactéries en solution.

L'AT présent dans les matrices inhibe la croissance de *S. aureus* en solution. A la suite de ces résultats, il a été choisi de réaliser des expériences avec *Escherichia coli* (*E. coli*), une bactérie Gram-négative alors que *S. aureus* est Gram-positif ainsi qu'*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) une bactérie Gram-positive qui est souvent responsable des échecs dans le traitement de racine.

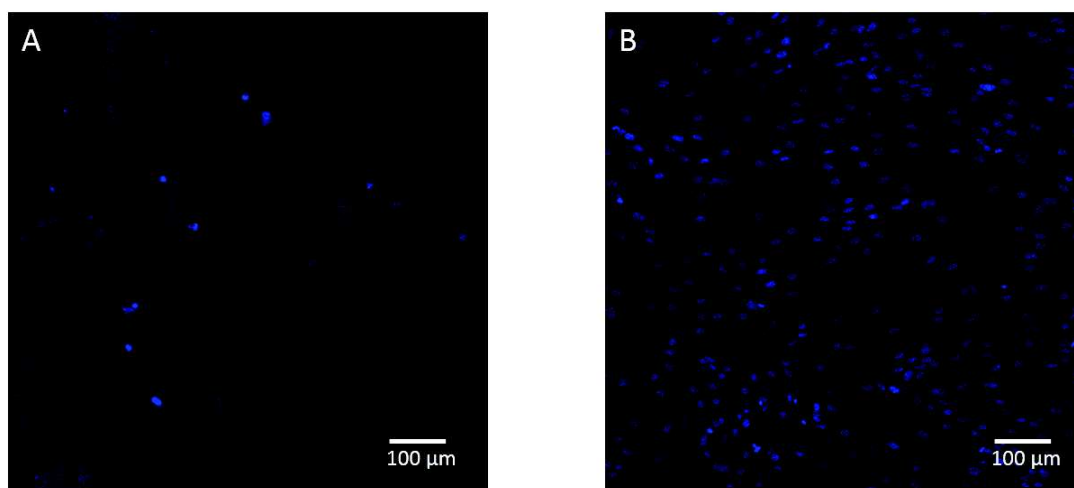


FIGURE 3.33 – A : image de microscopie confocale d’une matrice PLA/PCL-AT après 15 jours, les noyaux des cellules ont été marqués à l’Hoechst : peu de cellules sont présentes sur la matrice. B : image de microscopie confocale d’une zone de puits n’ayant pas été recouverte par une matrice

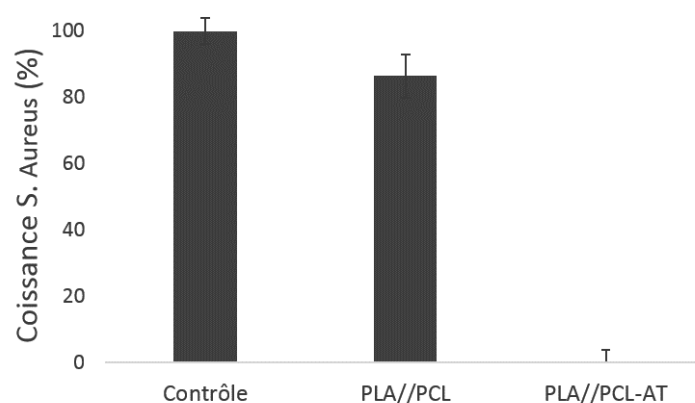


FIGURE 3.34 – Croissance de *S. aureus* dans du milieu de culture contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. Le graphique est celui obtenu pour une expérience représentative. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante et ont montré les mêmes tendances.

Comme le montre le graphe A de la figure 3.35, la présence d’AT inhibe la croissance de *E. coli* entre 50 et 60%. En revanche, contre *E. faecalis*, la présence d’AT ne semble avoir aucun effet sur la croissance d’*E. faecalis*. Ceci est peut être dû au fait de la présence de tannase, enzyme

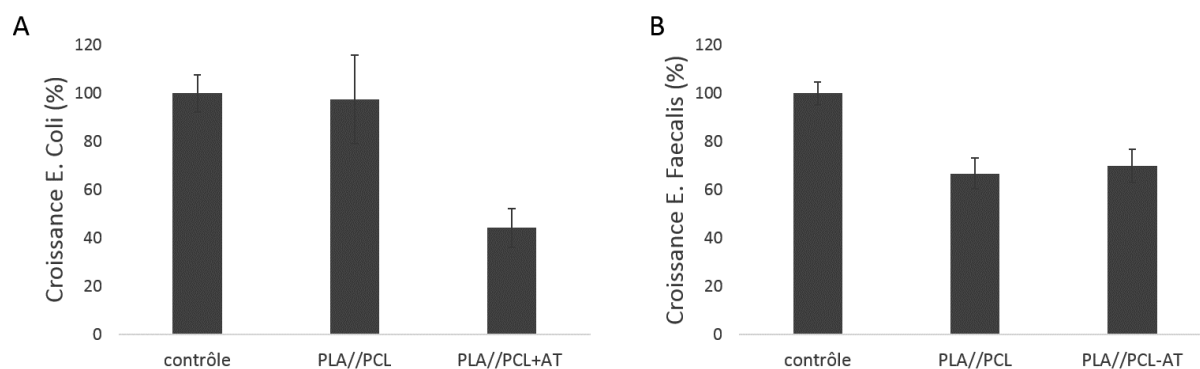


FIGURE 3.35 – A : Croissance de *E. coli* dans du milieu de culture contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. B : Croissance de *E. faecalis* dans du milieu de culture BHI contenant des matrices PLA/PCL et des matrices PLA/PCL-AT. Les graphiques sont ceux obtenus pour une expérience représentative. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante et ont montré les mêmes tendances.

qui hydrolyse l'acide tannique en acide gallique chez *E. faecalis* [45]. Une autre hypothèse est l'utilisation de milieu BHI pour la croissance de *E. faecalis* qui est un milieu beaucoup plus riche que le milieu MH utilisé pour *E. coli* et *S. aureus*. Il est possible que l'AT libéré dans le milieu BHI ait précipité avec les protéines du milieu.

### 3.4 Conclusion et perspectives

Cette partie de la thèse a permis d'étudier la possibilité d'utiliser l'acide tannique afin de fonctionnaliser et de structurer des fibres de PLA pour la mise au point d'un scaffold pour l'ingénierie pulpaire. La première partie de ce travail a consisté à électrospinner un mélange d'AT et de PLA. L'AT était correctement intégré aux fibres qui étaient homogènes pour une concentration en AT inférieure à 30% de la masse de PLA. Par la suite, il a été montré que l'AT était libéré quand les fibres étaient mises en contact avec un milieu aqueux et qu'il ne modifiait pas l'hydrophilie des matrices. Il a ainsi été envisagé des alternatives pour favoriser la fonctionnalisation des fibres de PLA. Le traitement plasma des fibres, modifiant grandement l'hydrophilie des fibres et favorisant l'adsorption d'une protéine modèle semble une alternative envisageable pour la suite du projet.

Ensuite, la structuration de fibres de PLA à l'aide d'AT a été étudiée grâce à la technique du

co-électrospinning-électrospraying. L'AT mélangé à des particules de PCL permet de structurer les fibres de PLA. Une meilleure organisation est obtenue avec les particules PCL-AT que pour les particules PCL seules. Par ailleurs, l'ajout d'AT ne modifie pas l'adhésion ou la prolifération de fibroblastes humains. Une partie de l'AT présent dans les plots est libéré. Cette libération n'est pas cytotoxique pour des fibroblastes humains et permet l'inhibition de la croissance bactérienne en solution de *S. Aureus* et dans une moindre mesure *E. Coli*. En revanche, la présence d'AT n'a pas eu d'effet sur la croissance de *E. Faecalis*.

Ces premiers travaux sont prometteurs et d'autres études sont en cours. L'influence d'un traitement thermique sur les propriétés mécaniques et la structure des matrices est ainsi étudiée. En parallèle, des essais de "perçage" des fibres avec un laser sont également en cours de réalisation (figure 3.36) afin de réaliser des trous dans les matrices structurées entourées autour d'un tuteur afin d'obtenir des matrices avec des pores encore mieux contrôlés. Ce travail se fait en collaboration avec l'entreprise Irepa Laser.

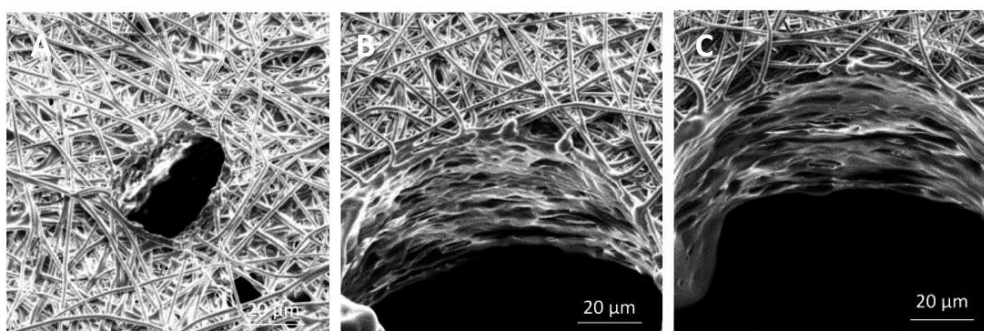


FIGURE 3.36 – Images MEB d'essais préliminaires de perçage laser sur des matrices électrospinnées de PLA pour une puissance de 8,83 watts et une fréquence de A : 50 kHz ; B : 500 kHz et C : 1000 kHz.

## Bibliographie

- [1] M. Zafar, S. Najeeb, Z. Khurshid, M. Vazirzadeh, S. Zohaib, B. Najeeb, and F. Sefat. Potential of Electrospun Nanofibers for Biomedical and Dental Applications. *Materials*, 9(2) :UNSP 73, February 2016.
- [2] J. V. Ruch, H. Lesot, and C. Bègue-Kirn. Odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 39(1) :51–68, February 1995.
- [3] L. Tran-Hung, S. Mathieu, and I. About. Role of Human Pulp Fibroblasts in Angiogenesis. *Journal of Dental Research*, 85(9) :819–823, September 2006.
- [4] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P. Gehron Robey, and S. Shi. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25) :13625–13630, December 2000.
- [5] A. Arthur, G. Rychkov, S. Shi, S. A. Koblar, and S. Gronthos. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26(7) :1787–1795, 2008.
- [6] G. T.-J. Huang, K. Shagramekova, and S. W. Chan. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *Journal of Endodontics*, 32(11) :1066–1073, November 2006.
- [7] M. Goldberg and A. J. Smith. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp : A biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(1) :13–27, January 2004.
- [8] A. Linde. Session II : Cells and Extracellular Matrices of the Dental Pulp — C.T. Hanks, Chairman : The Extracellular Matrix of the Dental Pulp and Dentin. *Journal of Dental Research*, 64(4) :523–529, April 1985.
- [9] J.-C. Farges and H. Magloire. Complexe pulpodentinaire. In *La dent normale et pathologique*. De Boeck Université, de boeck université edition, 2001.
- [10] J. Vreken and H. Noël. Pulpite et nécrose pulpaire. In *La dent normale et pathologique*, De Boeck Université. De boeck université edition, 2001.
- [11] A. Gesi, M. Hakeberg, J. Warfvinge, and G. Bergenholz. Incidence of periapical lesions and clinical symptoms after pulpectomy—a clinical and radiographic evaluation of 1- versus 2-session treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 101(3) :379–388, March 2006.

- [12] E. P. Chalisserry, S. Y. Nam, S. H. Park, and S. Anil. Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal of Tissue Engineering*, 8, May 2017.
- [13] S. Eramo, A. Natali, R. Pinna, and E. Milia. Dental pulp regeneration via cell homing. *International Endodontic Journal*, 51(4) :405–419, April 2018.
- [14] D. J. Mooney, C. Powell, J. Piana, and B. Rutherford. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnology Progress*, 12(6) :865–868, December 1996.
- [15] G. T.-J. Huang, T. Yamaza, L. D. Shea, F. Djouad, N. Z. Kuhn, R. S. Tuan, and S. Shi. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2) :605–615, February 2010.
- [16] K. Iohara, K. Imabayashi, R. Ishizaka, A. Watanabe, J. Nabekura, M. Ito, K. Matsushita, H. Nakamura, and M. Nakashima. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Engineering. Part A*, 17(15-16) :1911–1920, August 2011.
- [17] J. J. Mao, S. G. Kim, J. Zhou, L. Ye, S. Cho, T. Suzuki, S. Y. Fu, R. Yang, and X. Zhou. Regenerative endodontics : barriers and strategies for clinical translation. *Dental Clinics of North America*, 56(3) :639–649, July 2012.
- [18] J. Y. Kim, X. Xin, E. K. Moioli, J. Chung, C. H. Lee, M. Chen, S. Y. Fu, P. D. Koch, and J. J. Mao. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Engineering. Part A*, 16(10) :3023–3031, October 2010.
- [19] D. J. Laird, U. H. von Andrian, and A. J. Wagers. Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell*, 132(4) :612–630, February 2008.
- [20] B. Hashemi-Beni, M. Khoroushi, M. R. Foroughi, S. Karbasi, and Abbas A. Khademi. Tissue engineering : Dentin - pulp complex regeneration approaches (A review). *Tissue & Cell*, 49(5) :552–564, October 2017.
- [21] T. Srisuwan, D. J. Tilkorn, J. L. Wilson, W. A. Morrison, H. M. Messer, E. W. Thompson, and K. M. Abberton. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontology 2000*, 41(1) :88–108.
- [22] T. Suzuki, C. H. Lee, M. Chen, W. Zhao, S. Y. Fu, J. J. Qi, G. Chotkowski, S. B. Eisig, A. Wong, and J. J. Mao. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *Journal of Dental Research*, 90(8) :1013–1018, August 2011.

- [23] K. Dobie, G. Smith, A. J. Sloan, and A. J. Smith. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connective Tissue Research*, 43(2-3) :387–390, 2002.
- [24] N. Ferrara and T. Davis-Smyth. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18(1) :4–25, February 1997.
- [25] W. Zhang, X. Frank Walboomers, T. H. van Kuppevelt, W. F. Daamen, Z. Bian, and J. A. Jansen. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27(33) :5658–5668, November 2006.
- [26] Y. Inuyama, C. Kitamura, T. Nishihara, T. Morotomi, M. Nagayoshi, Y. Tabata, K. Matsuo, K.-K. Chen, and M. Terashita. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, 92B(1) :120–128, 2010.
- [27] R. S. Prescott, R. Alsanea, M. I. Fayad, B. R. Johnson, C. S. Wenckus, J. Hao, A. S. John, and A. George. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *Journal of Endodontics*, 34(4) :421–426, April 2008.
- [28] N. R. Kim, D. H. Lee, P.-H. Chung, and H.-C. Yang. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 108(5) :e94–100, November 2009.
- [29] T. Matsunaga, K. Yanagiguchi, S. Yamada, N. Ohara, T. Ikeda, and Y. Hayashi. Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 76(4) :711–720, March 2006.
- [30] S. Fujiwara, S. Kumabe, and Y. Iwai. Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 83(1) :15–24, May 2006.
- [31] N. Ruangsawasdi, M. Zehnder, R. Patcas, C. Ghayor, and F. E. Weber. Regenerative Dentistry : Animal Model for Regenerative Endodontology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(5) :359–364, September 2016.



- [32] J.-W. Yang, Y.-F. Zhang, C.-Y. Wan, Z.-Y. Sun, S. Nie, S.-J. Jian, L. Zhang, G.-T. Song, and Z. Chen. Autophagy in SDF-1- $\alpha$ -mediated DPSC migration and pulp regeneration. *Biomaterials*, 44 :11–23, March 2015.
- [33] J.S. Song, K. Takimoto, M. Jeon, J. Vadakekalam, N.B. Ruparel, and A. Diogenes. Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. *Journal of Dental Research*, 96(6) :640–646, June 2017.
- [34] M. M. Cordeiro, Z. Dong, T. Kaneko, Z. Zhang, M. Miyazawa, S. Shi, A. J. Smith, and J. E. Nör. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics*, 34(8) :962–969, August 2008.
- [35] V. T. Sakai, Z. Zhang, Z. Dong, K. G. Neiva, M. a. a. M. Machado, S. Shi, C. F. Santos, and J. E. Nör. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *Journal of Dental Research*, 89(8) :791–796, August 2010.
- [36] E. L. Gotlieb, P. E. Murray, K. N. Namerow, S. Kuttler, and F. Garcia-Godoy. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139(4) :457–465, April 2008.
- [37] S. E. Duailibi, M. T. Duailibi, W. Zhang, R. Asrican, J. P. Vacanti, and P. C. Yelick. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of Dental Research*, 87(8) :745–750, August 2008.
- [38] J. M. Anderson and M. S. Shive. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1) :5–24, October 1997.
- [39] I. Armentano, N. Bitinis, E. Fortunati, S. Mattioli, N. Rescignano, R. Verdejo, M. A. Lopez-Manchado, and J. M. Kenny. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11) :1720–1747, November 2013.
- [40] M. Santoro, S. R. Shah, J. L. Walker, and A. G. Mikos. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107 :206–212, December 2016.
- [41] Y.-J. Kim, M. R. Park, M. S. Kim, and O. H. Kwon. Polyphenol-loaded polycaprolactone nanofibers for effective growth inhibition of human cancer cells. *Materials Chemistry and Physics*, 133(2-3) :674–680, April 2012.

- [42] P. Thitiwongsawet, N. Wichapeng, and Adjimaporn Waiyaroj. Electrospun Polycaprolactone Fiber Mats as Carriers for Tannic Acid. *Advanced Technologies in Manufacturing, Engineering and Materials, Pts 1-3*, 774-776 :896–900, 2013.
- [43] Y. Arima and H. Iwata. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 28(20) :3074–3082, July 2007.
- [44] P. Roach, D. Farrar, and C. C. Perry. Interpretation of Protein Adsorption : Surface-Induced Conformational Changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(22) :8168–8173, June 2005.
- [45] P. Belur and G. Mugeraya. Microbial production of tannase : State of the art. *Research Journal of Microbiology*, 6 :25–40, 01 2011.

# Chapitre 4

## Electrospinning d'acide tannique

### Sommaire

---

4.1	Electrospinning de non-polymères . . . . .	189
4.2	Electrospinning de l'acide tannique . . . . .	197
4.3	Conclusion et perspectives . . . . .	210
	Bibliographie . . . . .	213

---

Cette partie a fait l'objet d'une publication : Allais, M. ; Mailley, D. ; Hebraud, P. ; Ihia-wakrim, D. ; Ball, V. ; Meyer, F. ; Hebraud, A. ; Schlatter, G. Polymer-free electrospinning of tannic acid and cross-linking in water for hybrid supramolecular nanofibres. *Nanoscale*, 2018.

### 4.1 Electrospinning de non-polymères

Comme nous l'avons vu précédemment, le procédé d'électrospinning est généralement utilisé pour des polymères. En effet, il faut que les interactions entre les molécules soient assez fortes pour empêcher le jet de se rompre entre l'aiguille et le collecteur. Le régime semi-dilué enchevêtré permet de former un jet stable [1] et semble une condition idéale pour l'électrospinning. Néanmoins, dans la littérature, quelques rares cas d'électrospinning de non-polymère ont été décrits.

### 4.1.1 Electrospinning de phospholipides

#### Electrospinning de lécithine

Le premier cas d'électrospinning de non polymères a été rapporté en 2006 par Mc Kee et al [2]. Il s'agissait de l'électrospinning de la lécithine aussi appelée phosphatidylcholine (figure 4.1), un ensemble de phospholipides produits par le foie.

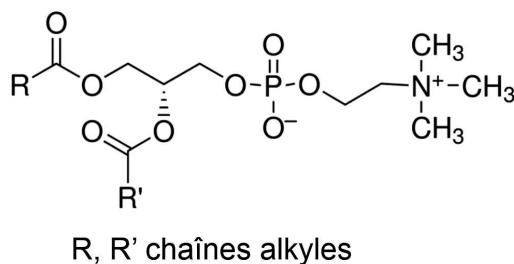


FIGURE 4.1 – Schéma du groupe des phosphatidylcholines

À partir d'une solution de lécithine dans un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{DMF}$  (chloroforme/diméthylformamide), il a été possible d'obtenir des fibres homogènes pour une concentration minimum de lécithine de 43% en masse totale (%mt). L'électrospinning de la lécithine est expliqué par un comportement similaire de ce phospholipide en solution non aqueuse à celui des polymères en solution [3]. A faible concentration, les molécules de lécithine sont indépendantes les unes des autres. Quand la concentration augmente pour atteindre la concentration micellaire critique (CMC), les lécithines forment des micelles sphériques. Si on augmente encore la concentration, les micelles deviennent cylindriques. Ensuite, si la concentration augmente encore jusqu'à atteindre la concentration d'enchevêtrement ( $C_e$ ), les micelles cylindriques s'enchevêtrent entre elles (voir figure 4.2).

Dans le cas de l'électrospinning, des fibres homogènes apparaissent pour une concentration en lécithine supérieure à  $C_e$  (voir figure 4.3). En dessous de  $C_e$ , des particules sont obtenues. Pour une concentration en lécithine égale à  $C_e$ , des fibrilles commencent à apparaître sur les particules de lécithine. Le diamètre moyen varie entre 3,3  $\mu\text{m}$  (pour une concentration de 43%mt) et 5,9  $\mu\text{m}$  (pour une concentration de 50%mt). Les auteurs ont montré une dépendance entre le diamètre des fibres obtenues et la viscosité des solutions. Le modèle développé pour prédire le diamètre des fibres pour différents polymères, Eq. (4.1), sous-estime le diamètre obtenu, du fait de la présence d'associations intermoléculaires entre les micelles de lécithine.

$$D(\mu m) = 0.18 \left( \frac{C}{C_e} \right)^{2.7} \quad (4.1)$$

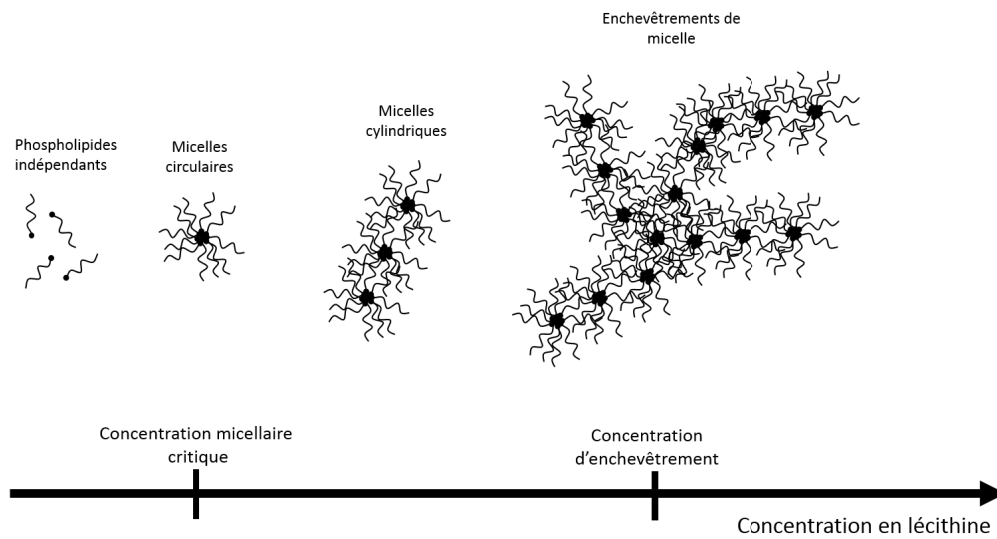


FIGURE 4.2 – Schéma du comportement de la phosphatidylcholine en solution

### Electrospinning de surfactant géminé

Un autre type de phospholipides a été électrospinné par Cashion et al [4] : les tensio-actifs géminés. Ces tensio-actifs ont une structure dimérique composée de deux queues hydrophobes et deux têtes hydrophiles reliées par un espaceur. Ils possèdent une CMC faible.

L'électrospinning et le comportement d'un surfactant géminé (voir la structure figure 4.4) ont été étudiés dans de l'eau pure ainsi que dans un mélange eau/méthanol (1/1 en volume). L'auto-association des surfactants géminés dans les deux solutions est différente. Dans l'eau, les surfactants géminés passent d'une structure en forme de micelles enchevêtrées cylindriques en forme de filaments à un réseau hyper ramifié de micelles cylindriques (voir figure 4.5). Dans le mélange eau/méthanol, les surfactants géminés s'auto-associent à faible concentration en micelles globulaires puis à une concentration, dite de chevauchement  $C^*=11\%mt$ , ces micelles se chevauchent (voir figure 4.6).

Pour le mélange eau/méthanol, il a été possible d'obtenir des fibres continues à partir d'une concentration supérieure à  $2C^*$ , le diamètre des fibres variant alors entre 0,9 et  $7\mu m$  pour une concentration comprise entre 28%mt et 44%mt.

En revanche, il n'a pas été possible d'obtenir des fibres lorsque le surfactant géminé était

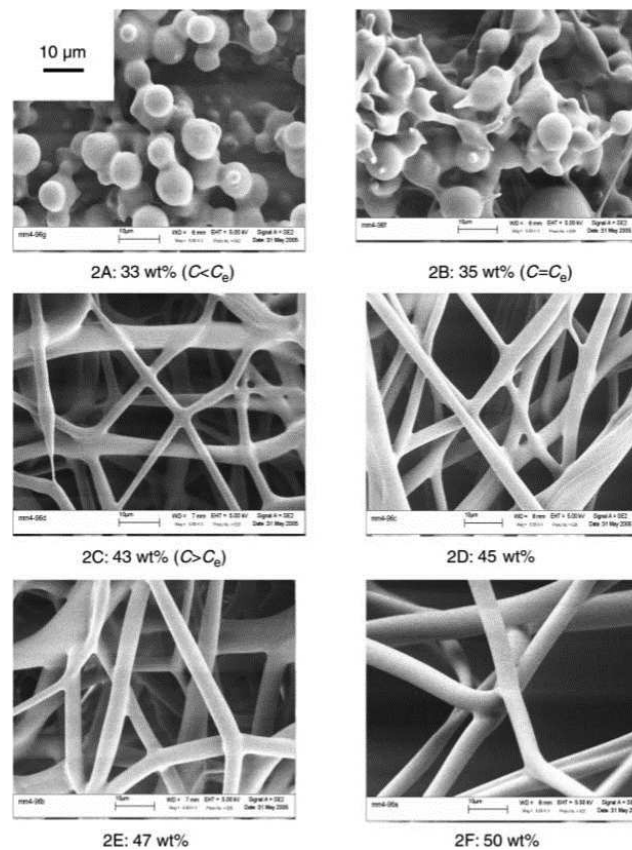


FIGURE 4.3 – Images MEB des différentes morphologies obtenues pour différentes concentrations en lécithine, d'après Mc Kee et al. [2]

dissous dans l'eau, quelque soit sa concentration. Les auteurs ont étudié la tension de surface de l'interface solution/eau et la conductivité pour tenter d'expliquer ce phénomène mais les valeurs étaient dans une gamme compatible avec l'obtention de fibres homogènes. Par ailleurs, à faible concentration de surfactant géminé dans l'eau, la solution est très visqueuse : à 2.8 %mt de géminé dans l'eau, la viscosité  $\eta_0$  est de 0,0348 Pa.s alors que pour obtenir une viscosité similaire dans un mélange eau/méthanol, il faut une concentration en géminé de 42%mt. Cette trop forte viscosité empêche certainement la formation d'un jet continu.

#### 4.1.2 Electrospinning de peptides

Les peptides sont une autre catégorie de molécules non polymériques qui ont été électrospinnées. En 2008, Singh et al. [5] ont rapporté le cas de l'électrospinning de la diphenylalanine (Phe-Phe, voir figure 4.7). Ces petits dipeptides aromatiques peuvent s'autoassembler en solution sous forme de nanotubes [6] grâce à des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les noyaux aromatiques.

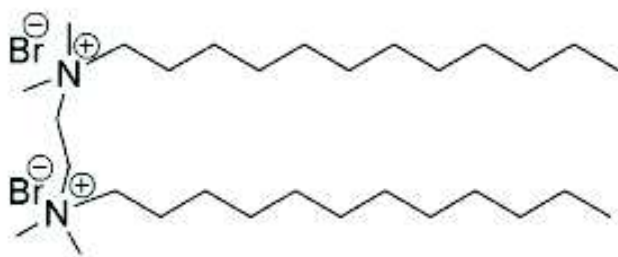


FIGURE 4.4 – Structure du surfactant étudié : bromure de N,N'-Didodecyl-N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-ethanediyldiammonium

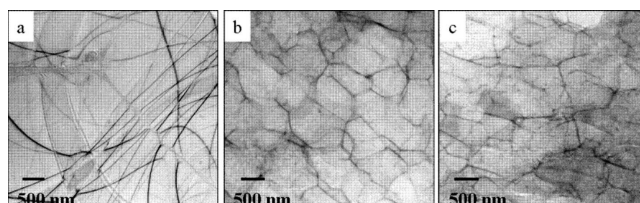


FIGURE 4.5 – Images de Cryo-MET d'une solution de tensio-actif géminé dans de l'eau (a) 1.0 %mt, micelles linéaires en forme de filament enchevêtrées (b) 2.4 %mt, micelles en forme de filaments ramifiés, (c) 4.1 %mt, réseau hautement ramifié de micelles enchevêtrées en forme de filaments, d'après Cashion et al.[4]

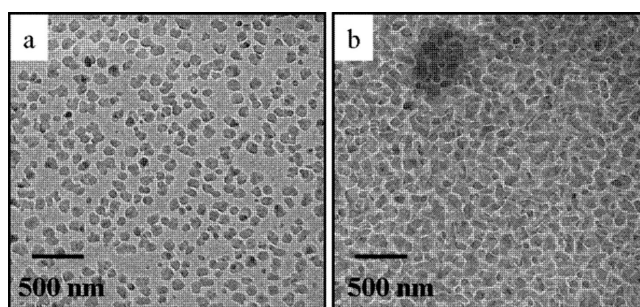


FIGURE 4.6 – Images de Cryo-MET d'une solution de tensio-actif géminé dans un mélange eau :methanol (1 :1 en volume) (a) 10 %mt, micelles globulaires indépendantes, (b) 12 %mt micelles se chevauchant, d'après Cashion et al.[4]

La Phe-Phe a été électrospinnée dans de l'hexafluoro-2 propanol (HFIP), un solvant hautement polaire avec une forte pression de vapeur saturante. Un jet continu est obtenu à partir d'une concentration en diphénylalanine de 6%mt où un mélange de fibres et fibres perlées est obtenu. Des fibres homogènes sans perle sont obtenues pour une concentration supérieure à

13,2%mt. De manière assez surprenante, le diamètre des fibres varie très peu lorsque la concentration en diphénylalanine augmente. Les auteurs expliquent ce phénomène par une probable augmentation de la viscosité qui induit une plus grande résistance de la solution à l'étirement par les forces électrostatiques lors de l'émission du jet.

Les fibres de Phe-Phe obtenues par electrospinning et celles obtenues par auto-association en solution ont été comparées. Les fibres électrospinnées sont courbées, de longueur "infinie" et ont un diamètre homogène (voir figure 4.8A). Au contraire, les fibres auto-assemblées sont droites, avec un diamètre variable et une longueur discontinue (voir figure 4.8B). De plus, les fibres auto-assemblées sont beaucoup plus rigides que les fibres électrospinnées.

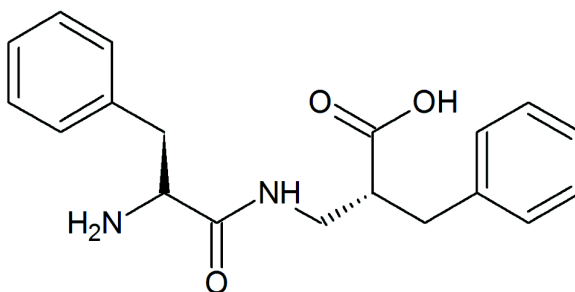


FIGURE 4.7 – Structure de la diphénylalanine

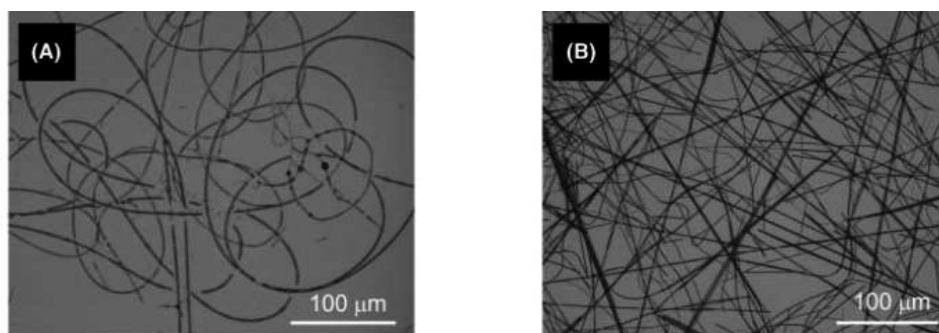


FIGURE 4.8 – A) Image de microscope optique de fibres électrospinnées de Phe-Phe pour une concentration de 17,5%mt B) Image de microscopie optique de fibres auto-assemblées pour une concentration à 0,08%mt (2,9mM) dans un mélange HFIP/eau, d'après Singh et al.[5]



### 4.1.3 Electrospinning de cyclodextrines

Le dernier cas que nous aborderons ici pour l'électrospinning de non polymères est celui de la cyclodextrine, électrospinnée pour la première fois en 2010 par Uyar et al[7].

La cyclodextrine (CD) est un oligosaccharide qui peut être composé de 6, 7 ou 8 glucopyranoses. Elle a alors respectivement le nom de  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -CD (voir les structures figure 4.9A). C'est une molécule "cage" en forme de cône (voir figure 4.9B). La partie intérieure hydrophobe est composée de chaînes carbonées tandis que la partie extérieure, hydrophile, est constituée de groupements hydroxyles. Elle est souvent utilisée pour l'encapsulation de médicaments peu solubles dans l'eau.

La CD peut former des agrégats en solution. Même si le phénomène d'agrégation est favorisé lorsque la CD est utilisée comme complexe d'inclusion, elle peut s'auto-associer seule en solution aqueuse à des fortes concentrations [8]. Dans la littérature, de nombreuses formes d'agrégats ont été mis en évidence (particules globulaires, organisation en feuillet, lamelles pliées, particules sphériques...). Cependant, l'auto-association des CD est liée à seulement 2 types d'organisations moléculaires [9] : un dit en colonne ou "channel" et l'autre dit "cage" (voir figure 4.10).

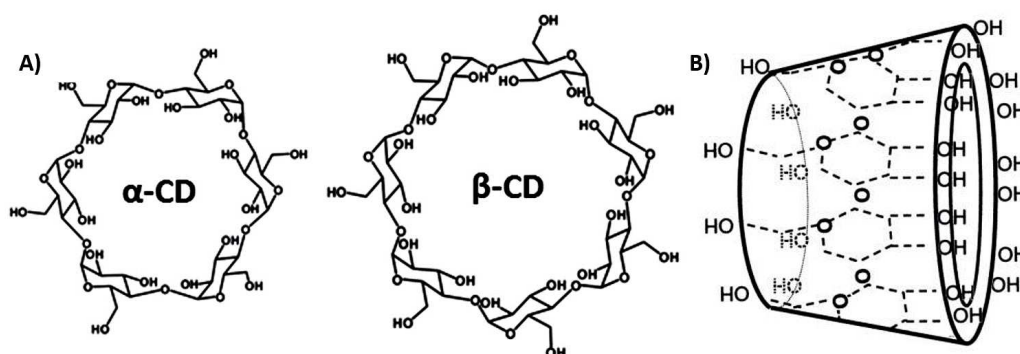


FIGURE 4.9 – A) Structure des  $\alpha$  et  $\beta$ -CD B) Représentation schématique de la CD

Grâce à ce phénomène d'auto-association, il a été possible d'obtenir des fibres sans perle à partir de solutions de  $\alpha$  ou de  $\beta$ -CD dans de l'eau avec ajout de soude [10]. Les deux CD ont un comportement similaire : les fibres sans défaut sont obtenues à partir d'une concentration en  $\alpha$ -CD de 160% en masse par volume de solvant (m/v), soit environ 62%mt et pour la  $\beta$ -CD à une concentration de 150% m/v, soit environ 60%mt (voir figure 4.11). Les fibres ont alors respectivement un diamètre moyen de  $375 \pm 150$  nm et  $220 \pm 90$  nm.

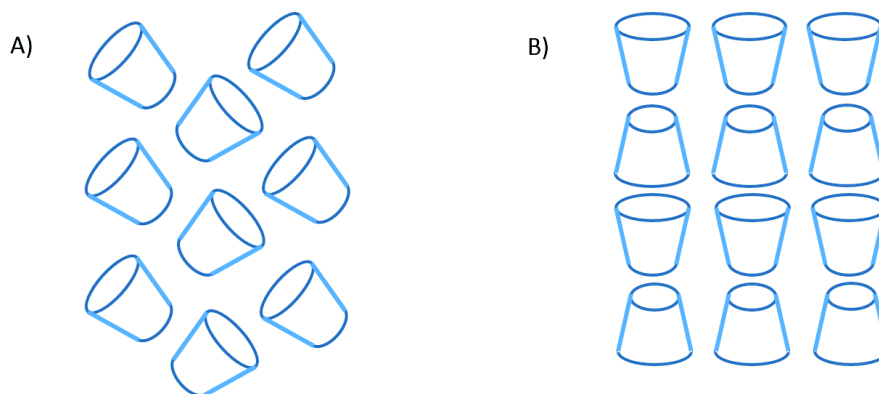


FIGURE 4.10 – A) Organisation de la CD sous forme de "cage" B) Organisation de la CD de type "colonne"

Les liaisons hydrogènes jouent un rôle clé dans l'auto-association de la CD en solution. En ajoutant de l'urée aux solutions permettant d'obtenir des fibres homogènes (ajout d'une masse d'urée égale à 20% de la masse de CD), l'organisation en fibres homogènes est perdue et des perles sont obtenues (voir figure 4.11 d) et e)). Lorsque de l'urée est ajoutée, la viscosité diminue de 0,43 (sans urée) à 0,33 Pa.s (avec urée) pour la  $\alpha$ -CD et de 0,33 à 0,15 Pa.s pour la  $\beta$ -CD. Cette diminution montre bien que l'agrégation des CD est perturbée par l'ajout d'urée. Par conséquent, la présence de suffisamment d'agrégats est indispensable pour obtenir des fibres homogènes.

La structure cristalline des CD en poudre et dans les fibres a été étudiée par diffraction des rayons X. En poudre, la CD possède une structure de type cage. Dans les fibres en revanche, aucune structure cristalline n'a été observée. Les CD sont réparties de manière aléatoire dans les fibres. Il est probable que les CD ne peuvent pas s'arranger en structure cristalline du fait de l'évaporation rapide du solvant et de l'étirement rapide et continu du jet durant le procédé d'électrospinning.

#### 4.1.4 Perspectives pour l'électrospinning de l'acide tannique

Ces quelques rares exemples issus de la littérature montrent qu'il est possible d'électrospinner des molécules qui ne soient pas des polymères. Toutes les études ont révélé l'importance de l'auto-association en solution des molécules pour permettre l'obtention de fibres. Il en res-

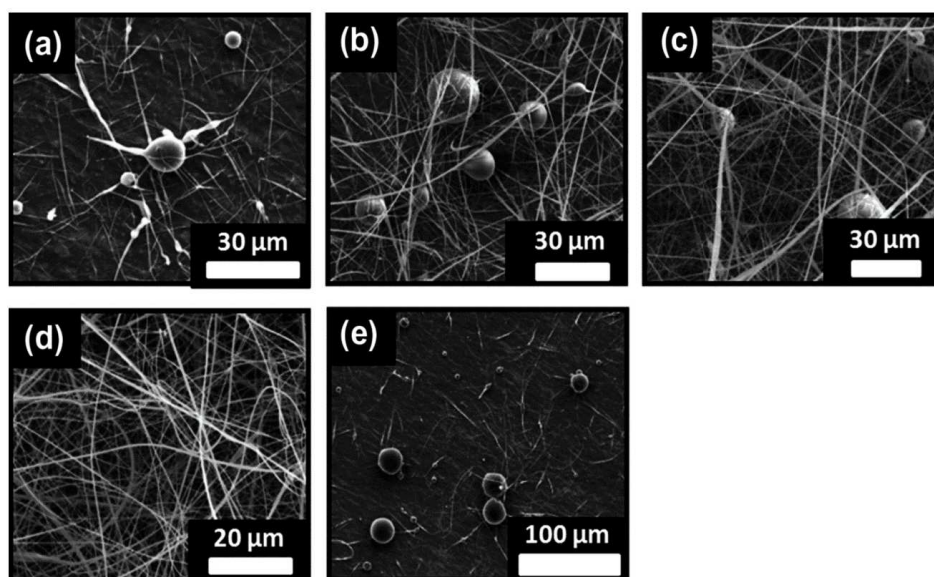


FIGURE 4.11 – Images MEB des fibres de  $\beta$ -CD dans une solution aqueuse avec 10% m/v de NaOH. Pour différentes concentrations en CD (a) 120% (m/v), (b) 130% (m/v), (c) 140% (m/v), (d) 150% (m/v) and (e) fibres avec des perles après ajout d'urée représentant 20% de la masse d'urée dans une solution à 150% (m/v) en  $\beta$ -CD, d'après Celebioglu et al.[7]

sort que des forces intermoléculaires (liaison  $\pi$ - $\pi$ , liaisons hydrogènes...) suffisamment fortes permettent le maintien d'un jet stable. Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'électrospinner de l'acide tannique seul, sans l'utilisation d'aucun polymère porteur.

## 4.2 Electrospinning de l'acide tannique

### 4.2.1 Electrospinning de l'acide tannique : influence de la concentration en AT et du solvant

Des solutions d'acide tannique (AT) dans l'eau pure, dans l'éthanol (EtOH) pur ainsi que dans des mélanges eau-EtOH ont été électrospinnées. Différentes concentrations en AT ainsi que différents ratios eau-EtOH ont été étudiés.

Dans l'eau pure, il est possible d'obtenir des fibres régulières quand la concentration en AT ( $C_{AT}$ ) est supérieure à 50% en masse relative à la masse totale de la solution (%mt) (voir figure 4.12a-c). Ce résultat est très important pour des perspectives de « green electrospinning »

puisque'un solvant non toxique peut être utilisé pour obtenir des fibres. Cependant, il est difficile d'obtenir des conditions d'électrospinning stables dans l'eau pure pour une production plus grande que 10 minutes. Par ailleurs, il n'a pas été possible d'obtenir des fibres électrospinnées dans l'éthanol pur. En effet, la solubilité de l'AT dans l'éthanol donnée par le fournisseur est de 100 mg/mL tandis que dans l'eau, elle est de 2,8 g/mL. Pour la concentration de saturation d'AT dans l'EtOH, seulement des particules ont été obtenues (figure 4.13).

Il a ainsi été choisi d'étudier l'électrospinning dans différents mélanges eau-EtOH pour travailler avec des concentrations élevées en AT et pour obtenir des conditions d'électrospinning stables. En effet, la production de fibres continues à partir de mélanges d'eau et d'EtOH est très stable et plus efficace que dans l'eau. La gamme de concentration optimale pour le procédé a été trouvée entre 30 et 55 %mt et pour des mélanges eau-EtOH contenant entre 12,5% à 87,5%ms d'eau (% de la masse d'eau relative à la masse totale du solvant). La morphologie des fibres a été étudiée en fonction de la concentration en AT et en fonction du ratio eau-EtOH.

Comme il était attendu, la morphologie des fibres évolue avec la concentration en AT. Cette observation est détaillée pour un mélange contenant 37,5%ms d'eau sur les images MEB 4.12i-m. Trois sortes de morphologies peuvent être observées :

- des particules (figure 4.12i) pour des faibles concentrations en AT ( $\leq 35\%$ mt) ;
- des fibres perlées pour une concentration de 40%mt (figure 4.12j) ;
- des fibres régulières pour une concentration en AT  $\geq 45\%$ mt (figure 4.12k-m).

Le diamètre des fibres augmente avec la concentration en AT de  $0,79 \pm 0,43 \mu\text{m}$  pour  $C_{AT}=45\%$ mt à  $1,22 \pm 0,36 \mu\text{m}$  lorsque  $C_{AT}$  vaut 55%mt.

Il est aussi observé que la morphologie des fibres ainsi que leur diamètre dépendent aussi de la composition du solvant (figures 4.12 et 4.14). Les transitions particules-fibres perlées et fibres perlées-fibres régulières apparaissent pour des concentrations en AT plus grandes lorsque le solvant est plus concentré en eau. Par exemple, les solutions avec une  $C_{AT}$  de 45%mt forment des fibres pour un concentration en eau de 12,5 %ms(figure 4.12) tandis que seules des particules sont obtenues dans de l'eau pure (figure 4.12a) avec une même concentration en AT. De plus, pour les fibres régulières et une  $C_{AT}$  donnée, le diamètre moyen diminue quand la quantité d'eau dans le mélange de solvants augmente, comme il l'est résumé sur le graphe figure 4.14a pour une  $C_{AT}$  de 55%mt.

Pour étudier si ce résultat pouvait dépendre de la viscosité de la solution, la viscosité de solutions avec une  $C_{AT}$  de 55 %mt et pour des quantités différentes d'eau dans le solvant a

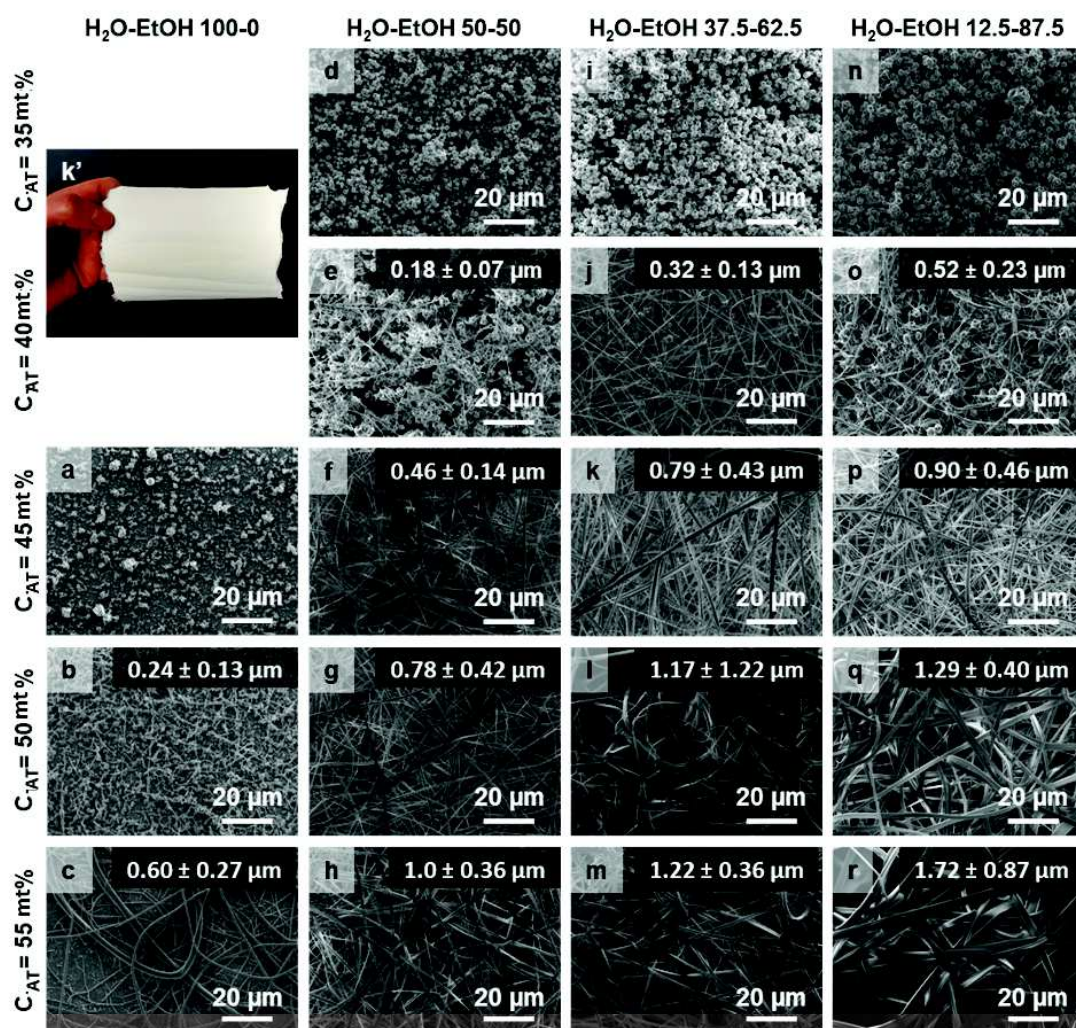


FIGURE 4.12 – Images MEB de fibres d'AT obtenues dans des mélanges eau-EtOH(100-0%ms ; 50-50%ms ; 37,5-62,5%ms ; 12,5-87,5%ms) à des concentrations en AT de 35%, 40%, 45%, 50% et 55% dans les mélanges et les diamètres moyens associés. La photo k' montre le matériau électrospinné qui a été obtenu à partir des conditions de l'image k. Le matériau est facilement manipulable.

été mesurée (figure 4.14b). La viscosité est presque constante quel que soit la concentration en eau hormis pour les mélanges les plus riches en eau pour lesquels une augmentation est même observée. Un tel résultat n'est pas en accord avec une diminution du diamètre des fibres avec la diminution de la concentration en eau dans le solvant. Ainsi, la différence en volatilité entre l'eau et l'éthanol apparaît comme un paramètre dominant. En effet, les mélanges contenant les plus



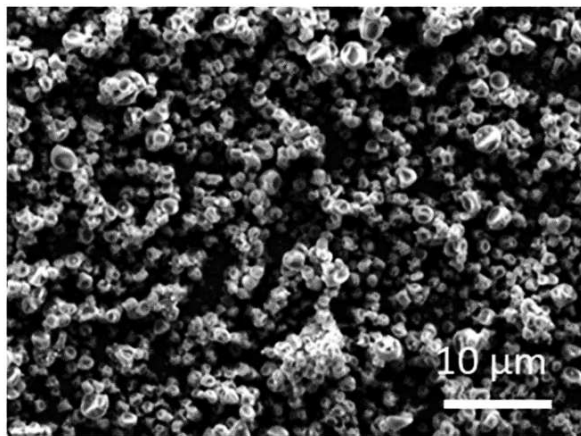


FIGURE 4.13 – Images MEB de particules obtenues avec une solution en AT dans l'éthanol à 100 mg/mL, la concentration limite de solubilité de l'AT dans l'EtOH.

faibles quantités d'eau et donc les plus grandes concentrations en éthanol entraînent une plus grande évaporation durant l'électrospinning du fait du fort taux d'évaporation de l'éthanol. Une évaporation rapide entraîne ainsi une solidification plus rapide du jet ce qui limite les effets du mouvements de fouet qui sont connus pour allonger efficacement le jet. De manière contrastée, les solutions qui possèdent la plus grande concentration en eau sont soumises à des mouvements de fouet efficaces durant presque tout le temps du vol du jet ce qui induit des diamètres plus fins. Pour conclure cette partie, des fibres régulières et continues d'AT ont été fabriquées dans des mélanges eau-EtOH sans aucun ajout de polymères. De plus, le procédé est stable pendant plusieurs heures sans intervention extérieure. L'électrospinning dans l'eau pure est possible mais avec une moins bonne stabilité du procédé. Enfin, les matrices électrospinnées d'AT sont mécaniquement stables et peuvent être facilement manipulées ce qui est important pour leurs applications potentielles.

#### 4.2.2 Agrégation et propriétés d'auto-associations de l'acide tannique dans un mélange eau-éthanol : mécanismes de formation des fibres

##### Mesure de la conductivité et de la tension de surface

Les trois principaux paramètres physiques de la solution qui impactent généralement le procédé d'électrospinning sont la conductivité, la tension de surface et la viscosité. Dans le

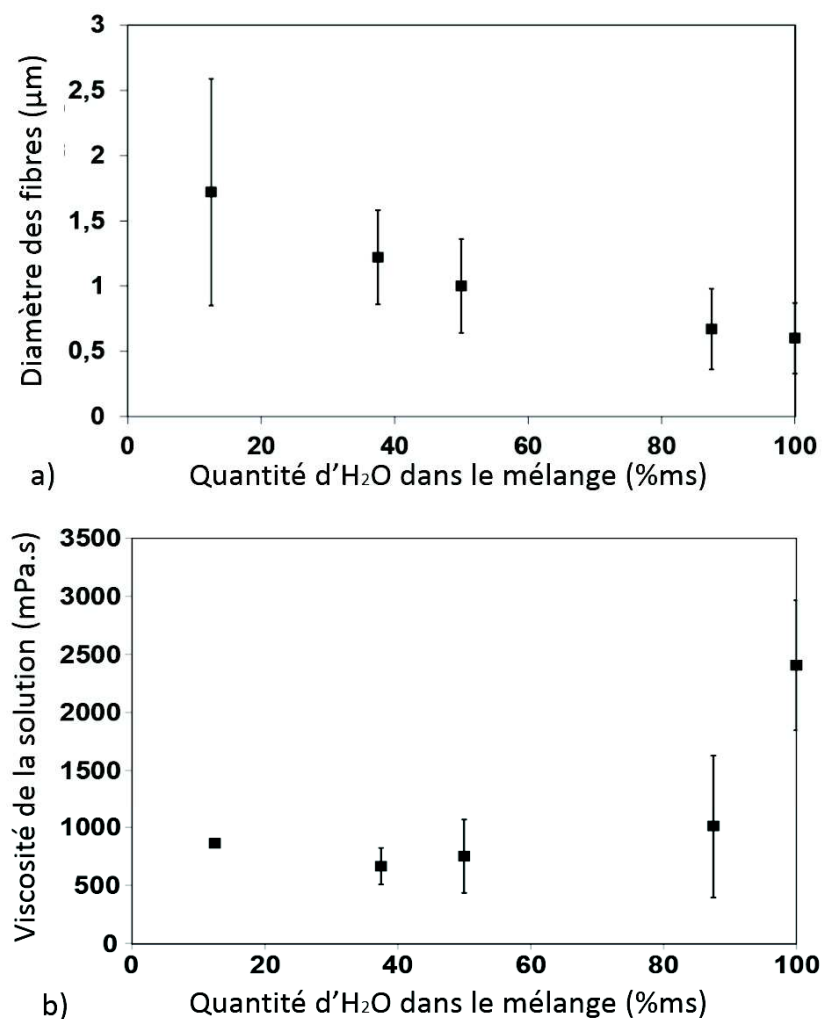


FIGURE 4.14 – a) Evolution du diamètre des fibres en fonction de la concentration en eau dans des mélanges eau-EtOH pour une  $C_{AT}$  de 55%. b) Viscosité de solutions d'AT en fonction de la quantité d'eau dans les mélanges eau-EtOH pour une  $C_{AT}$  de 55%mt.

but de comprendre plus en détail les mécanismes qui rentrent en jeu dans la formation des fibres, nous avons étudié les effets de ces paramètres pour des mélanges de solvants avec une concentration en eau de 37,5%ms. Quand la concentration en AT augmente de 30 à 55%mt, une augmentation d'environ 10% de la tension de surface et une diminution de la conductivité de 55 à 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$  ont été observées (graphe a) figure 4.15).

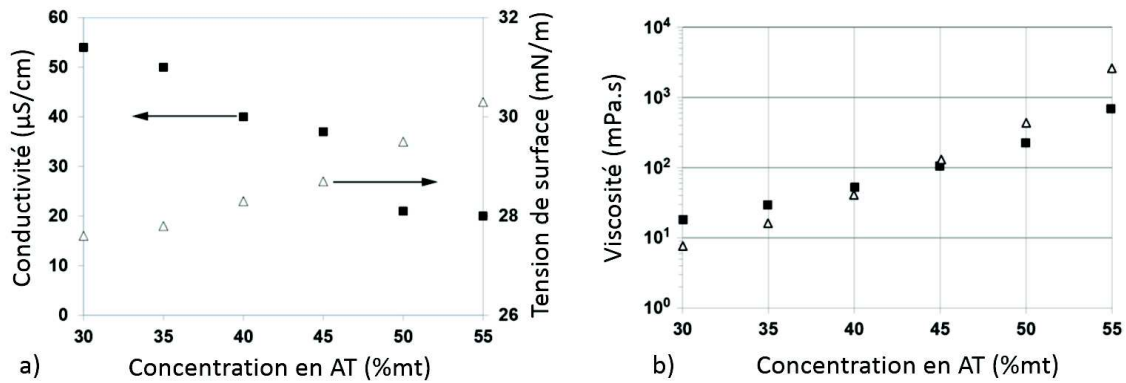


FIGURE 4.15 – a) Conductivité (■) et tension de surface (Δ) et b) viscosité en fonction de concentration en AT dans l'eau pure (Δ) et dans un mélange eau-EtOH 37,5-62,5%ms (■).

### Etude de la viscosité spécifique

Ainsi, la conductivité et la tension de surface ne semblent pas être des paramètres prévalant pour la fabrication des fibres. Par contre, la viscosité des solutions augmente d'un rapport de 100 quand la concentration en AT augmente de 30 à 55%mt (figure 4.16b). Ceci suggère que la viscosité joue un rôle clé dans la formation des fibres. Dans le but de comprendre le mécanisme derrière la formation des fibres d'AT, la viscosité spécifique  $\eta_{sp}$  de la solution a été analysée pour une gamme plus large de concentration en AT pour les deux systèmes suivants : le mélange eau-EtOH avec 37,5%ms d'eau et l'eau pure.

Comme il peut être observé figure 4.16a, quatre régimes différents peuvent être distingués. Pour chaque régime, la viscosité spécifique suit une loi puissance où  $\eta_{sp} \sim C_{AT}^\alpha$ , avec  $\alpha$  l'exposant caractéristique de chaque régime de concentration.

Un **régime dilué**, aux concentrations en AT les plus faibles ( $C_{AT} < C^*$ ) est obtenu. La viscosité spécifique suit alors la loi d'Einstein puisqu'elle augmente linéairement avec  $C_{AT}$  avec  $\alpha=1$ . Un tel comportement révèle la présence d'agrégats isolés d'AT qui n'interagissent pas entre eux [11][12]. La présence de tels agrégats a été confirmée par la cryo-TEM d'une solution où  $C_{AT}$  vaut 2%mt. Sur la figure 4.16b, des agrégats isolés de diamètre moyen :  $4,1 \pm 0,5$  nm sont observables. La présence de ces agrégats est certainement due à des liaisons hydrogènes entre les molécules d'AT comme il l'est représenté sur la figure 4.16c. En effet, bien que l'AT soit connu pour être soluble dans l'eau et dans l'éthanol, il ne se comporte pas comme un soluté idéal lorsqu'il est ajouté dans un mélange eau-EtOH mais comme une suspension d'agrégats auto-



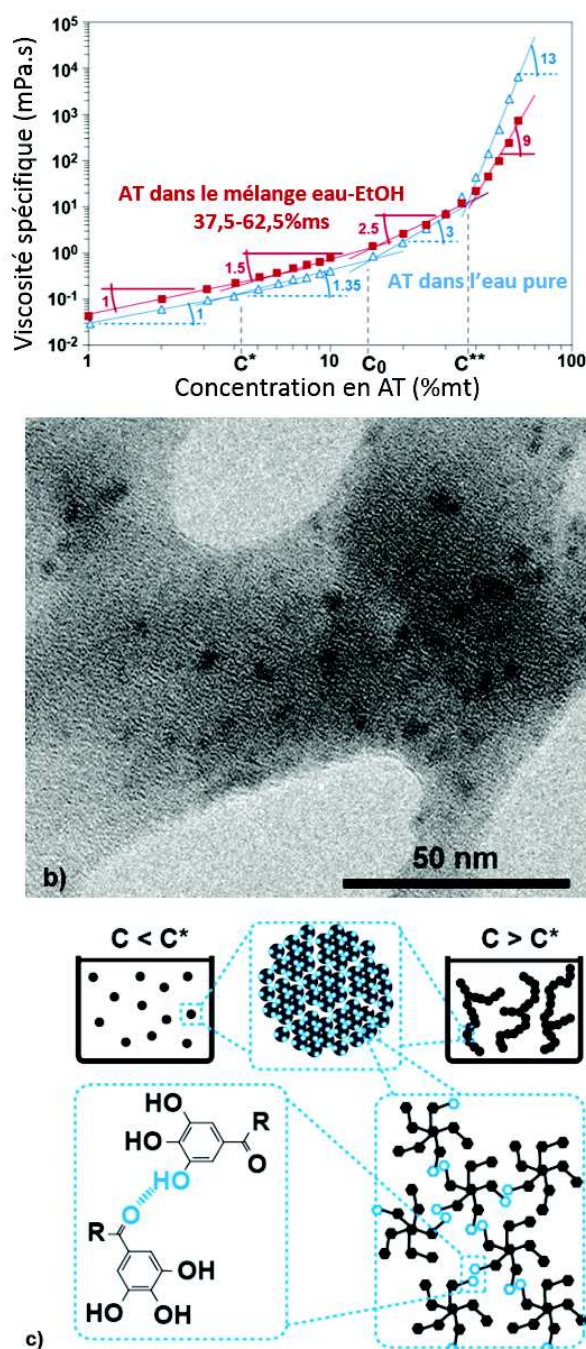


FIGURE 4.16 – a) Viscosité spécifique de solutions d'AT en fonction de la concentration à 22 °C dans l'eau pure (triangle bleu) et dans le mélange eau-EtOH 37,5-62,5%mt (triangle rouge). b) Image de cryo-TEM obtenue pour une solution en AT dans un mélange eau-EtOH 37,5-62,5%mt et pour une  $C_{AT}$  de 2%mt qui montre dans les domaines noirs des agrégats d'AT

assemblés comme il l'a été mentionné pour les cyclodextrines [9]. En effet, il a été montré que des polyphénols du vin hydrophobes et non hydrolysables formaient des particules sphériques

ou des agrégats en forme de peigne [13] lors d'ajout d'eau dans la solution éthanolique. Par analogie, ce phénomène doit aussi se produire pour l'AT pour lequel des liaisons hydrogènes sont envisageables.

Ensuite, deux autres **régimes intermédiaires** ou régimes semi dilués définis par  $\alpha=1,5$  pour  $C^* < C_{AT} < C_0$  et  $\alpha=2,5$  pour  $C_0 < C_{AT} < C^{**}$  sont observés.

Enfin, un **régime concentré** pour lequel  $\alpha=9$  pour  $C_{AT} > C^{**}$  apparaît.

L'augmentation de  $\alpha$  avec  $C_{AT}$  suggère la croissance des agrégats d'AT qui finalement interagissent entre eux pour former un réseau de structures connectées d'AT aux plus fortes concentrations. Cela rappelle l'évolution de la viscosité spécifique des solutions de polymère ainsi que des solutions micellaires. Pour les solutions de polymère, quatre régimes sont aussi observés en fonction de la masse molaire du polymère  $M_w$  [14][15]. Pour une valeur assez élevée de  $M_w$ , les deux régimes intermédiaires correspondent au régime semi-dilué non enchevêtré et au régime semi-dilué enchevêtré. Une plus faible valeur de  $M_w$  est associé à un régime dilué non enchevêtré. Pour cette raison, l'électrospinning de polymères est généralement réalisé avec des masses molaires suffisamment élevées dans le but de favoriser l'enchevêtrement. En pratique pour les chaînes linéaires de polymère, des fibres homogènes sont obtenues pour une concentration seuil de  $2,5C_e$  (concentration d'enchevêtrement) qui correspond à une moyenne de 2,5 enchevêtrements par chaîne. Pour de telles concentrations, la densité d'enchevêtrements des chaînes est assez élevée pour empêcher que le jet se rompe ainsi que pour éviter l'apparition d'instabilités responsables de morphologie de fibres de type fibres perlées [1]. De la même manière, la viscosité spécifique des tensio-actifs géminés montrent des régimes différents avec une augmentation de l'exposant  $\alpha$  en fonction de la concentration ( $\eta_{sp} \sim C_{AT}^\alpha$ ) qui est attribué à la formation de structures de surfactants ramifiées et super-ramifiées. La formation de fibres non perlées a été observée quand la concentration en tensio-actif est 2 à 3 fois plus grande que la concentration de ramification  $C_0$  [4].

Dans notre cas, l'augmentation de l'exposant  $\alpha$  indique la croissance des agrégats d'AT dans le premier régime semi-dilué qui interagissent pour former un réseau plus ou moins enchevêtré et des agrégats connectés d'AT pour les plus hautes concentrations.

Le comportement de l'AT dans l'eau pure est le même que celui observé dans le mélange eau-EtOH avec les mêmes transitions  $C^*$ ,  $C^0$  et  $C^{**}$ . Des légères différences sont néanmoins observées pour les valeurs de l'exposant  $\alpha$ .  $\alpha$  vaut ainsi 1,35 et 3 pour les deux régimes semi-dilués et augmente jusqu'à 13 pour le régime concentré. Le fait que  $\alpha$  soit plus faible dans l'eau pure que

dans le mélange eau-EtOH pour  $C^* < C^{AT} < C^0$  suggère un plus faible taux d'agrégation dans l'eau certainement dû à la meilleure solubilité de l'AT de l'eau que dans l'éthanol. Cependant, pour les plus grandes concentrations  $C^{AT}$  ( $C^{AT} > C^{**}$ ), la valeur de l'exposant est plus grande dans l'eau ( $\alpha \sim 13$ ) que dans le mélange eau-EtOH ( $\alpha \sim 9$ ). Ce comportement indique que les interactions entre les agrégats d'AT sont favorisées et plus denses dans l'eau que dans le mélange eau-EtOH.

### Diffusion dynamique de la lumière

Dans le but d'étudier plus en détails l'agrégation de l'AT, des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) ont été menées. La fonction d'auto-corrélation normalisée  $g^{(2)}$  est présentée figure 4.17. Quelque soit le solvant et la concentration en AT, deux régimes de décorrélation sont observés. Le mode rapide correspond à la diffusion des petits agrégats d'AT pour lesquels le diamètre moyen  $D_{AT}$  a été calculé (voir table 4.1 et voir la méthode de calcul dans la partie matériel et méthode sur la DLS).

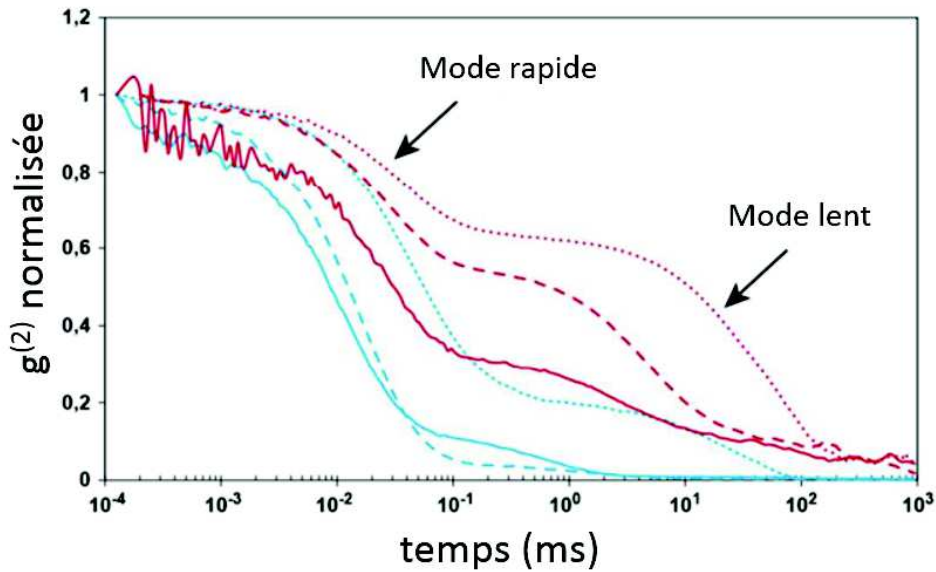


FIGURE 4.17 – Fonction d'autocorrélation  $g^{(2)}$  mesurée par DLS dans l'eau pure (en bleu) et dans le mélange eau-EtOH 37,5-62,5%ms (en rouge) avec  $C_{(AT)}=2\%mt$  (lignes continues),  $C_{(AT)}=10\%mt$  (lignes avec les tirets) et  $C_{(AT)}=35\%mt$  (lignes pointillées).

Les diamètres augmentent avec la concentration en AT et sont quasiment les mêmes dans

$C_{AT}$ (%mt)	2	10	35
$D_{AT}$ dans l'eau pure (nm)	6	17	34
$D_{AT}$ dans le mélange eau-EtOH (nm)	5	19	29

TABLE 4.1 – Diamètre moyen  $D_{AT}$  des agrégats d'AT calculés à partir des modes rapides de  $g^2$ .

l'eau et dans le mélange eau-EtOH. Pour la plus petite concentration étudiée  $C_{AT}=2\%$ mt, un diamètre moyen des agrégats d'AT de 5 nm a été calculé. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle observée en cryo-TEM.

Le mode de relaxation le plus lent peut être attribué soit à la diffusion d'agrégats plus gros ou à de la relaxation interne de structures moins denses. Il apparaît ainsi clairement que de très grosses structures d'AT se développent. De plus, l'amplitude relative du mode le plus lent augmente quand la concentration en AT augmente prouvant que la concentration en grosses structures par rapport à la concentration des petits agrégats, augmente fortement quand la concentration en AT augmente. Ce phénomène est en accord avec l'hypothèse d'une croissance de réseau d'agrégats d'AT présentée précédemment.

### Mécanisme d'auto-association en solution

Des fibres homogènes et sans défaut ont été obtenues pour des concentrations  $C_{AT}>40-45\%$ mt dans le mélange eau-EtOH 37,5-62,5%ms. Dans l'eau pure, des fibres homogènes et régulières n'ont été obtenues qu'avec des solutions ayant une concentration en AT plus élevée ( $C_{AT}>50-55\%$ mt). Bien que la structure associée aux agrégats d'AT ne soit pas connue, le fait que des fibres continues électrospinnées puissent être obtenues avec l'AT montre que le réseau supramoléculaire formé grâce à l'auto-association des molécules d'AT est suffisamment fort pour empêcher la rupture du jet lors de l'électrospinning.

La différence de comportement dans l'eau pure et dans le mélange eau-EtOH peut être lié à la topologie du réseau d'AT supramoléculaire formé dans les deux types de solvant ainsi que de leur énergie d'association. Dans le cas de l'électrospinning de polymère, il a été montré que pour des polymères d'une masse molaire donnée, la concentration limite pour obtenir des fibres homogènes dépendaient de la topologie du polymère (linéaire, en peigne avec une longueur et un nombre de chaînes latérales contrôlés) [16]. Dans notre cas, la topologie du réseau supramoléculaire d'AT peut être différente dans l'eau et dans le mélange eau-EtOH. En effet, pour des  $C_{AT}$  élevées, dans des mélanges eau-EtOH, les agrégats d'AT peuvent être distribués

de manière non homogène avec une concentration locale  $>C_{AT}$  dans les domaines riches en eau et une concentration locale  $<C_{AT}$  dans les domaines riches en éthanol. Une telle hétérogénéité peut entraîner une séparation de phase partielle avec des réseaux fortement connectés dans les domaines riches en éthanol. Dans le cas de l'eau pure, les agrégats sont peut être distribués de manière plus homogène formant un hydrogel avec un fort degré d'interconnexion entre les agrégats d'AT. Une telle différence de topologie dans le réseau peut expliquer la différence dans les concentrations seuils permettant l'obtention de fibres homogènes et de manière plus importante le fait que l'électrospinning d'AT dans les mélanges eau-EtOH soit plus efficace et plus stable que dans l'eau pure.

### 4.2.3 Réticulation des fibres d'acide tannique

L'acide tannique peut être facilement réticulé, contrairement à d'autres petites molécules pour lesquelles l'électrospinning est possible. La réticulation des fibres est cruciale avant d'envisager des applications. En effet, lorsqu'elles sont plongées dans l'eau, les fibres sont immédiatement solubilisées.

Pour étudier la possibilité de réticulation, deux stratégies ont été adoptées. La première est l'**oxydation des groupes galloyl en quinones** à l'aide de périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ), ce qui crée des liaisons covalentes irréversibles entre les molécules d'AT [17] (voir le schéma du mécanisme figure 4.18). La seconde approche utilisée pour la réticulation des matrices d'AT est la **complexation** avec des ions  $\text{Fe}^{3+}$ .

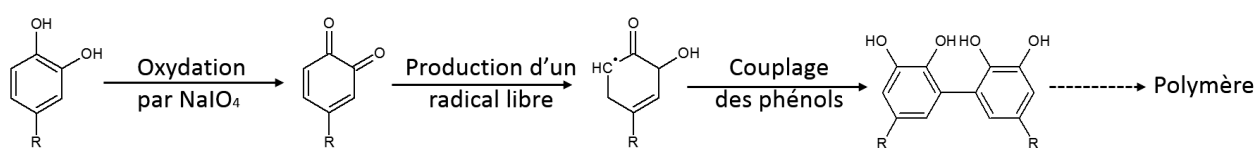


FIGURE 4.18 – Mécanisme possible menant à la production de polymère d'AT

### Réticulation avec le périodate de sodium

Pour cette approche de réticulation où les groupes galloyl sont oxydés en quinones, les matrices d'AT ont été immergées dans des solutions aqueuses composées de 1;3; 5; 7 et 9%mt de périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) pendant 10 secondes puis rincées pendant 6 heures. Cette

étape de rinçage est nécessaire afin d'enlever les molécules qui n'ont pas réagi et qui forment un film entre les fibres (voir figure 4.19a).

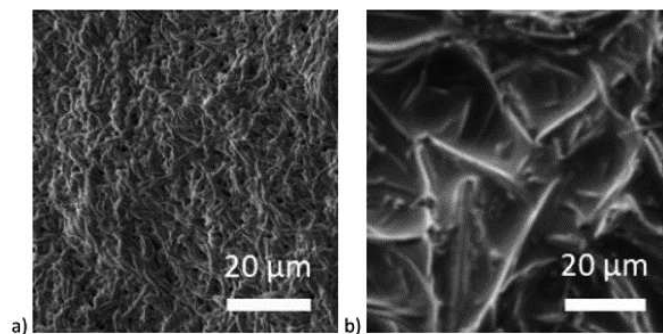


FIGURE 4.19 – Image MEB des fibres obtenues juste après réticulation a) dans une solution aqueuse de  $\text{NaIO}_4$ , b) dans une solution de nitrate de fer III.

L'étape de réticulation est réalisée dans l'eau alors que l'AT est fortement hydrosoluble, il y a ainsi compétition entre la dissolution de la matrice et la réticulation. Ainsi, pour la solution à 1%mt en  $\text{NaIO}_4$ , la matrice est immédiatement solubilisée. Pour la solution à 3%mt, la matrice devient noire ce qui indique la présence de quinones. Bien que macroscopiquement, elle semblait intacte, les images MEB montrent que la structure fibreuse est perdue après 6h de rinçage (voir figure 4.20a).

Pour les concentrations entre 5 et 9%mt, la structure fibreuse est conservée (figure 4.20) après un rinçage de 6 heures dans l'eau. Par ailleurs, l'étape de réticulation rend les matrices beaucoup plus cassantes. De plus, quand les matrices sont plongées dans l'eau pendant plus d'un jour, une dégradation progressive est observée et après une semaine, la matrice a complètement disparu (voir figure 4.21).

### Réticulation avec une solution d'ions $\text{Fe}^{3+}$

Cette approche de réticulation a été inspirée par les interactions du  $\text{Fe}^{III}$  avec les catéchols qui se produisent dans les filaments de la moule et qui permettent une grande adhésion aux surfaces. Ces interactions sont une combinaison de liaisons covalentes obtenues par des réactions d'oxydation et des liaisons réversibles de coordinations [18] (voir le schéma figure 4.22). Les matrices ont été immergées dans des solutions de nitrate de fer III avec des concentrations de 30%mt et 40%mt pendant 10 secondes. Le pH de ces solutions est inférieur à 2. Un large excès

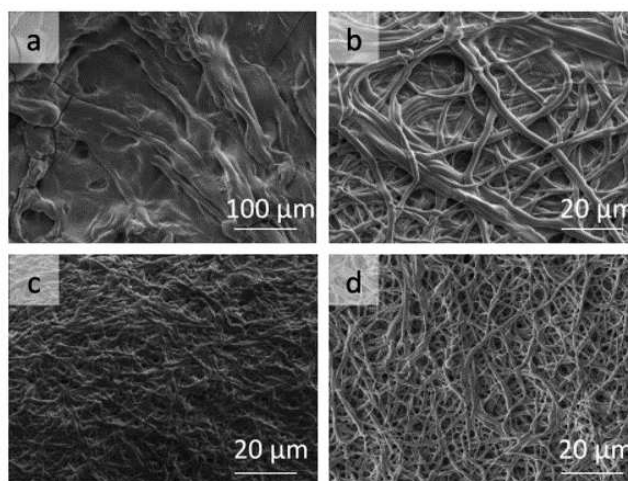


FIGURE 4.20 – Image MEB des fibres obtenues après réticulation dans des solutions aqueuses de  $\text{NaIO}_4$  avec différentes concentrations a) 3%mt b) 5%mt c) 7%mt d) 9%mt.

de  $\text{Fe}^{3+}$  par rapport aux groupes galloyl est nécessaire pour obtenir une réticulation rapide. Ainsi, à 30%mt, la solubilisation de la matrice est plus rapide que la réticulation et la matrice est désintégrée. À 40%mt en revanche, la matrice reste intacte et devient noire du fait de l'oxydation des groupes galloyl en quinone et de la formation de liaisons covalentes. La matrice a ensuite été plongée dans du tampon phosphate à un pH de 8 pendant 6 heures dans le but de favoriser la complexation entre les galloyl non oxydés et les ions  $\text{Fe}^{3+}$ . Comme lors de la réticulation avec le  $\text{NaIO}_4$ , une étape de rinçage a été nécessaire pour retirer les molécules qui n'avaient pas réagi et qui formaient un film entre les fibres (figure 4.19b).

Les matrices réticulées de cette manière conservent une structure fibreuse avec quelques fibres cassées (voir figures 4.23a-b) et ce même après une semaine dans l'eau (voir 4.21).

L'AT peut se coordonner avec une large variété de métaux [19]. Selon le choix du métal, de nombreuses applications sont envisageables.

### 4.3 Conclusion et perspectives

Des nanofibres régulières d'acide tannique ont pu être obtenues par électrospinning à partir de solutions d'AT dans des mélanges eau-EtOH ainsi que dans l'eau pure. Un réseau supramoléculaire d'agrégats d'AT se forme dans le solvant certainement grâce à des liaisons hydrogènes entre les groupes galloyl de l'AT. Ces interactions sont assez fortes pour empêcher le jet de se




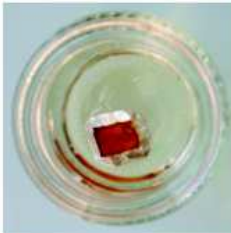
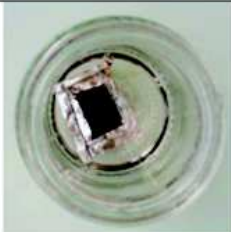
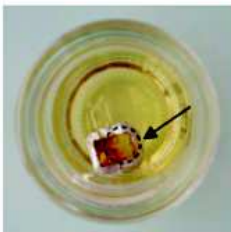
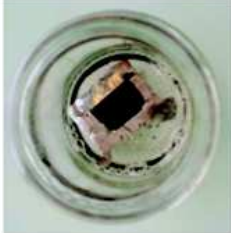
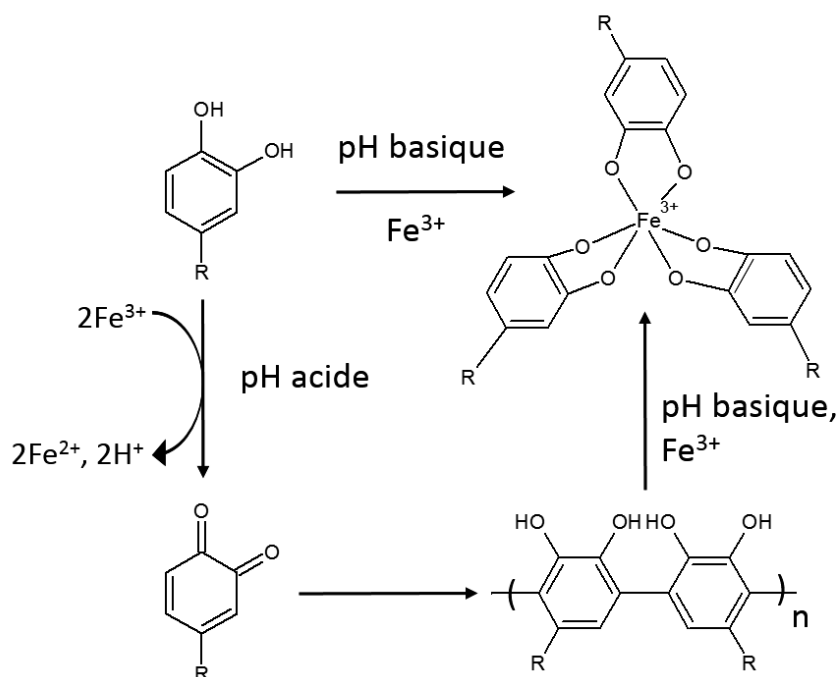
Temps dans l'eau	Réticulation avec Fe(III)	Réticulation avec NaIO <sub>4</sub>
1 jour	 <p>La matrice est encore intacte. La matrice est noire due à l'oxydation des groupes galloyl et la formation de liaisons covalentes</p>	 <p>La matrice est intacte</p>
3 jours	 <p>La matrice est intacte</p>	 <p>La matrice se dégrade (flèche)</p>
7 jours	 <p>La matrice est intacte</p>	<p>La matrice s'est entièrement dégradée</p>

FIGURE 4.21 – Photographie des échantillons réticulés avec une solution de nitrate de fer III et de NaIO<sub>4</sub> au cours du temps. Au bout d'une semaine, la matrice réticulée avec le NaIO<sub>4</sub> est totalement dégradée tandis que la matrice réticulée avec Fe(III) reste intacte

rompre lors de l'électrospinning et permettent d'obtenir des fibres régulières pour une concentration en AT  $\sim 45\%$ mt dans un régime semi-dilué enchevêtré. L'électrospinning est plus stable dans le mélange eau-EtOH que dans l'eau pure.

Contrairement aux autres molécules non-polymères qui ont été électrospinnées (comme par exemple les surfactants géminés et les cyclodextrines), il est possible de réticuler les fibres d'AT. La première approche utilisée est la réticulation par l'oxydation des groupes galloyl en quinone avec un oxydant, le périodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>). Par simple trempage dans une solution assez concentrée en NaIO<sub>4</sub> (au moins 5%mt en NaIO<sub>4</sub>), les fibres sont réticulées et maintiennent leur structure fibreuse alors que lorsque les fibres sont plongées dans l'eau, les fibres sont immédiatement solubilisées. L'autre voie de réticulation proposée est une combinaison de liaisons covalentes grâce à l'oxydation des groupes galloyls en quinones à pH acide et à une complexation avec les ions Fe<sup>3+</sup> à pH basique, imitant les filaments produits par les moules pour leur



FIGURE 4.22 – Schéma des interactions des catéchols avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$ .

permettre d'adhérer à de nombreuses surfaces.

Grâce à leur faible coût, leur facilité de production, l'utilisation de solvants non toxiques et la possibilité de les réticuler, les fibres d'AT électrospinnées ouvrent la voie à de nombreuses applications. De plus, il est fortement envisageable d'utiliser d'autres polyphénols ainsi que d'autres métaux afin d'optimiser les propriétés désirées.

En 2013, des nanoparticules de différentes formes ont été produites avec de l'AT et des ions  $\text{Fe}^{3+}$  [20]. Ces particules étaient non cytotoxiques. Les matériaux sont aussi fortement dépendants du pH avec une stabilité pour les pH basiques et une désintégration pour les pH acides. En 2015, des revêtements composés d'AT et de  $\text{Fe}^{3+}$  ont été réalisés. Il a été montré qu'ils permettaient de protéger des cellules contre les radiations UV [21]. Ainsi, des applications pour le biomédical ainsi que pour la fabrication de matériaux répondant aux pH sont fortement envisageables pour les fibres d'AT réticulées. D'autres applications comme la catalyse sont aussi possibles. Par exemple, des particules de complexes de  $\text{Rh}^{III}$ -AT ont montré de meilleures propriétés de catalyse pour l'hydrogénation de la quinoline que le catalyseur commercial couramment utilisé [19].

Pour continuer ces travaux, il serait intéressant d'étudier plus profondément le mécanisme

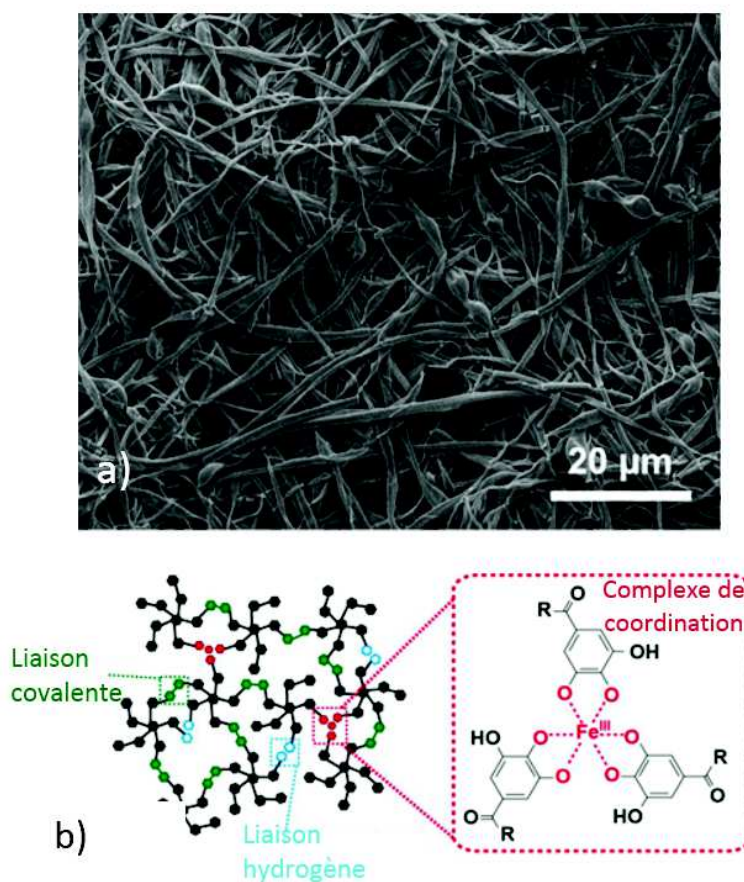


FIGURE 4.23 – a) Image MEB de matrice d'AT après réticulation avec une solution aqueuse à 40%mt en nitrate de fer pendant 10 secondes suivie d'une complexation à pH=8 pendant 6 heures. b) Schéma des interactions entre les molécules d'AT après réticulation avec une solution contenant des ions  $\text{Fe}^{3+}$

d'auto-association de l'AT. Par ailleurs, la possibilité d'utiliser d'autres polyphénols ainsi que d'autres métaux pour la réticulation doit être étudiée afin de tester des applications pour ces fibres. Enfin, pour des applications il est nécessaire d'améliorer les propriétés mécaniques des fibres réticulées.

## Bibliographie

- [1] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, and G. E. Wnek. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions : good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer*, 46(10) :3372–3384, April 2005.
- [2] M. G. McKee, J. M. Layman, M. P. Cashion, and T. E. Long. Phospholipid Nonwoven Electrospun Membranes. *Science*, 311(5759) :353–355, January 2006.
- [3] P. Schurtenberger, R. Scartazzini, L. J. Magid, M. E. Leser, and P. L. Luisi. Structural and dynamic properties of polymer-like reverse micelles. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(9) :3695–3701, May 1990.
- [4] M. P. Cashion, X. Li, Y. Geng, M. T. Hunley, and T. E. Long. Gemini Surfactant Electrospun Membranes. *Langmuir*, 26(2) :678–683, January 2010.
- [5] G. Singh, A. M. Bittner, S. Loscher, N. Malinowski, and K. Kern. Electrospinning of Diphenylalanine Nanotubes. *Advanced Materials*, 20(12) :2332–2336, 2008.
- [6] M. Reches. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science*, 300(5619) :625–627, April 2003.
- [7] A. Celebioglu and T. Uyar. Cyclodextrin nanofibers by electrospinning. *Chemical Communications*, 46(37) :6903, 2010.
- [8] A. Ryzhakov, T. Do Thi, J. Stappaerts, L. Bertoletti, K. Kimpe, A. R. Sá Couto, P. Saokham, G. Van den Mooter, P. Augustijns, G. W. Somsen, S. Kurkov, S. Inghelbrecht, A. Arien, M. I. Jimidar, K. Schrijnemakers, and T. Loftsson. Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(9) :2556–2569, September 2016.
- [9] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S. M. Smith, and T. Takaha. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. *Chemical Reviews*, 98(5) :1787–1802, July 1998.
- [10] A. Celebioglu and T. Uyar. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems : Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 404 :1–7, August 2013.
- [11] Einstein A. Zur Theorie der Brownschen Bewegung. *Annalen der Physik*, 324(2) :371–381, March 2006.

- [12] T. Jiang and C. F. Zukoski. Role of Particle Size and Polymer Length in Rheology of Colloid–Polymer Composites. *Macromolecules*, 45(24) :9791–9803, December 2012.
- [13] D. Zanchi, A. Vernhet, C. Poncet-Legrand, D. Cartalade, C. Tribet, R. Schweins, and B. Cabane. Colloidal Dispersions of Tannins in Water–Ethanol Solutions. *Langmuir*, 23(20) :9949–9959, September 2007.
- [14] Y. Heo and R. G. Larson. The scaling of zero-shear viscosities of semidilute polymer solutions with concentration. *Journal of Rheology*, 49(5) :1117–1128, August 2005.
- [15] W. W. Graessley. Polymer chain dimensions and the dependence of viscoelastic properties on concentration, molecular weight and solvent power. *Polymer*, 21(3) :258–262, March 1980.
- [16] K. Riazi, J. Kübel, M. Abbasi, K. Bachtin, S. Indris, H. Ehrenberg, R. Kádár, and M. Wilhelm. Polystyrene comb architectures as model systems for the optimized solution electrospinning of branched polymers. *Polymer*, 104 :240–250, November 2016.
- [17] B. P. Lee, J. L. Dalsin, and P. B. Messersmith. Synthesis and gelation of DOPA-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules*, 3(5) :1038–1047, October 2002.
- [18] D. E. Fullenkamp, D. G. Barrett, D. R. Miller, J. W. Kurutz, and P. B. Messersmith. pH-dependent cross-linking of catechols through oxidation via  $\text{Fe}^{3+}$  and potential implications for mussel adhesion. *RSC advances*, 4(48) :25127–25134, 2014.
- [19] J. Guo, Y. Ping, H. Ejima, K. Alt, M. Meissner, J. J. Richardson, Y. Yan, K. Peter, D. von Elverfeldt, Christoph E. H., and F. Caruso. Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal-phenolic networks. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(22) :5546–5551, May 2014.
- [20] H. Ejima, J. J. Richardson, Kang Liang, J. P. Best, M. P. van Koeven, G. K. Such, J. Cui, and F. Caruso. One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6142) :154–157, July 2013.
- [21] J. Lee, H. Cho, J. Choi, D. Kim, D. Hong, J. H. Park, S. H. Yang, and I. S. Choi. Chemical sporulation and germination : cytoprotective nanocoating of individual mammalian cells with a degradable tannic acid- $\text{Fe}^{III}$  complex. *Nanoscale*, 7(45) :18918–18922, December 2015.

# Chapitre 5

## Films multicouches à base d'enzymes et d'acide tannique

### Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Introduction . . . . .</b>	<b>215</b>
<b>5.2</b>	<b>Films multicouches à base de phosphatase alcaline et d'acide tannique . . . . .</b>	<b>217</b>
<b>5.3</b>	<b>Films multicouches contenant du lysozyme et de l'acide tannique</b>	<b>228</b>
<b>5.4</b>	<b>Conclusion . . . . .</b>	<b>230</b>
	<b>Bibliographie . . . . .</b>	<b>232</b>

---

### 5.1 Introduction

Les films couche-par-couche sont une des spécialités du laboratoire Biomatériaux et bio-ingénierie. Ils ont été décrits pour la première fois en 1991 par G. Decher [1]. Le principe est simple : il s'agissait alors de l'adsorption successive de polyanions puis de polycations intercalée avec des étapes de rinçage afin de créer des films grâce aux interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes. Cette technique de dépôt couche par couche (LbL pour Layer-by-Layer) permet d'obtenir des films fonctionnels d'une manière très simple avec une épaisseur contrôlée [2, 3, 4, 5]. L'épaisseur peut être finement modifiée en fonction du nombre de paires de couches déposées ainsi que des paramètres physico-chimiques qui régissent les interactions entre les deux sortes d'espèces qui sont déposées [6, 7]. Grâce à de substantiels changements des paramètres tels que la température ou la nature du solvant (la force ionique dans le cas d'espèces chargées), le

régime de croissance peut changer de linéaire (avec une augmentation identique de l'épaisseur pour chaque paire de couches déposées) à une croissance exponentielle [8, 9] entraînant un changement dans les propriétés du film [7]. La présence de solvants dans les films multicouches confère un environnement qui est a priori favorable pour contenir des biomolécules actives. Par exemple, la température de dénaturation de l'albumine de sérum bovin ou de fibrinogène augmente significativement quand elles sont incorporées dans un film comparées à la solution [10]. Puisque les enzymes sont des composants majeurs dans les films LbL pour fabriquer des capteurs [11, 12] et sont impliquées dans des interactions avec les polyphénols, il peut être intéressant d'étudier si les enzymes dans des films multicouches conservent leur conformation ainsi que leur activité.

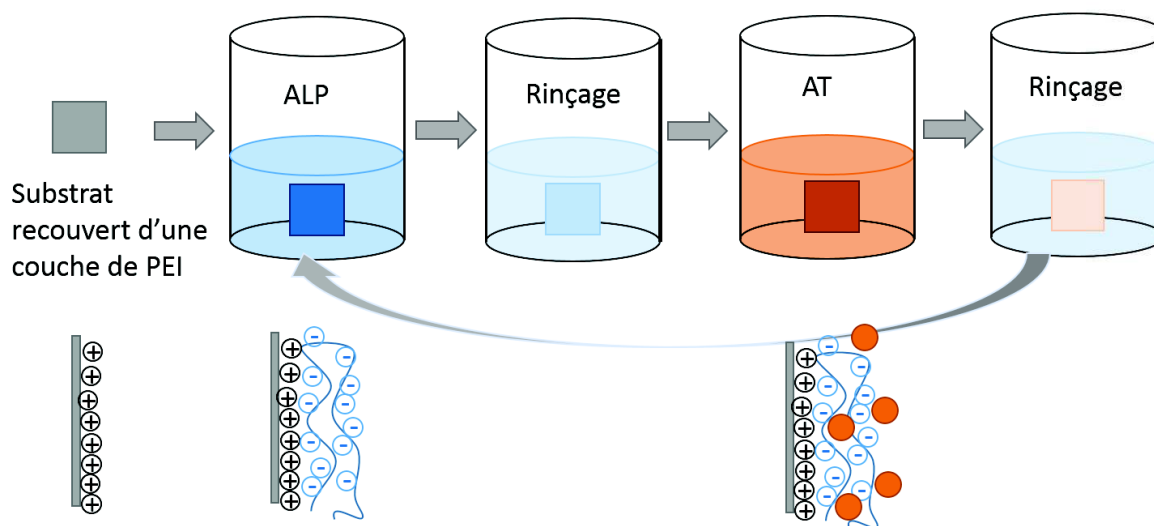


FIGURE 5.1 – Schéma du principe du dépôt couche par couche 'LbL' des films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub>. Le substrat est recouvert de PEI puis est plongé successivement dans une solution de phosphatase alcaline puis est rincé dans du tampon puis est plongé dans une solution d'acide tannique puis rincé de nouveau. Ceci produit une paire de couches. Cette succession d'étapes est répétée n fois pour obtenir un film PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub>

## 5.2 Films multicouches à base de phosphatase alcaline et d'acide tannique

Pour répondre à la question de savoir si des enzymes dans des films multicouches composés de polyphénols conservent leur activité et leur conformation, il a été choisi d'étudier le comportement de la phosphatase alcaline (ALP) en présence d'acide tannique (AT) dans des films PEI-(ALP-AT) $_n$ . Le poly-éthylèneimine (PEI) est utilisé comme une couche d'ancrage et  $n$  est le nombre de couches déposées. Un des paramètres majeurs étudié est le nombre de paires de couches. De plus, l'influence du périodate de sodium, qui induit l'oxydation de l'AT, sur l'activité de l'ALP dans les films sera évaluée. De même, l'activité électrochimique de l'AT en tant que réducteur sera mesurée.

Cette partie a fait l'objet d'une publication : Allais M. et al. Multilayered films made from tannic acid and alkaline phosphatase with enzymatic activity and electrochemical behavior, *J. Colloid Interface Sci.*, 512, 722-729, Octobre 2017.

### 5.2.1 Caractérisation de la construction du film

#### Etude de la croissance des films par microbalance à cristal de quartz

Le dépôt des films PEI-(ALP-AT) $_n$  a d'abord été suivi par microbalance à cristal de quartz (QCM). Le dépôt de l'enzyme et de l'AT est fini en moins de 5 minutes (voir figure 5.2). Comme le montre le graphe figure 5.2b, le changement de fréquence à la fin de chaque étape de rinçage après un dépôt est une fonction exponentielle du nombre de paires de couches déposées  $n$ . Ce résultat est en opposition avec les films (gélatine-AT) $_n$  pour lesquels l'épaisseur du film est une fonction linéaire du nombre de couches déposées dans les mêmes conditions (c'est à dire dans un tampon acétate 50 mM à pH=5) [13]. De la même manière, la croissance de films (polyallamine-AT) $_n$  est une fonction linéaire du nombre de paires déposées [14]. Par ailleurs, le dépôt de films (gélatine-épigallocatechine gallate) $_n$  avec de la gélatine de type A et de type B a été étudié. Une croissance exponentielle des films avec le nombre de paires de couches a été observé avec la gélatine A tandis qu'avec la gélatine B, les films présentaient une croissance linéaire [15].

Dans le cas des films PEI-(ALP-AT) $_n$ , la possibilité de construire des films LbL avec de l'ALP chargée négativement et de l'AT non chargé avec un pKa proche de 8,5 [16] montre clairement que les interactions électrostatiques ne sont pas les forces qui permettent la construction du

film. Il est fortement probable que ce soient les liaisons hydrogènes qui jouent un rôle dans le dépôt des films. Une autre observation à relever est le fait que le changement de fréquence lors du dépôt d'AT devient plus grand que le dépôt d'ALP. Ceci est probablement lié à une auto-association de l'AT à l'interface film-solution. Par ailleurs, il est à noter que le changement de fréquence associé au dépôt d'ALP augmente légèrement et de manière régulière durant tout le temps de dépôt jusqu'à la 10<sup>me</sup> paire de couches.

### Topographie des films par microscopie à force atomique

La topographie des films séchés a été étudiée par microscopie à force atomique (AFM) pour un nombre de paires de couches  $n=4$  et  $n=6$  (figure 5.3). Des images (256 \* 256 pixels) de différentes tailles ont été acquises afin de déterminer le changement de la rugosité des films. La moyenne quadratique de la rugosité augmente avec le nombre de couches (figure 5.4A) et de manière moins marquée avec la taille de l'image. La légère augmentation de la moyenne quadratique de la rugosité avec la taille de l'image, pour des images plus grande que 5 x 5  $\mu\text{m}^2$  indique que les agrégats présents à la surface des films sont plus grands que quelques micromètres. L'augmentation marquée de la rugosité avec le nombre de couches peut être liée au mécanisme qui se joue durant le dépôt. De tels résultats sont en faveur de l'hypothèse d'agrégats ALP-AT qui grossissent lors des dépôts successifs.

### Mesure de l'épaisseur des films

Lors des expériences de QCM, l'énergie mécanique dissipée par les films augmente avec le nombre de couches déposées (ligne en rouge figure 5.2a ). D'un autre côté, les différents changements d'harmonique se superposent (voir les courbes en gris figure 5.2a ). Ceci est une bonne condition pour appliquer l'équation de Sauerbrey (5.1) pour calculer la masse du film déposé (voir la partie Matériel et Méthodes sur la QCM) à partir du changement de fréquence avec  $C=18 \text{ ng}/(\text{cm}^{-2}.\text{Hz})$  :

$$\frac{\Delta f}{n} = -\frac{m_{film}}{C} \quad (5.1)$$

Pour cela, la densité massique du film a été estimée à 1,2  $\text{g.cm}^{-3}$ , une valeur arbitraire intermédiaire entre la densité de l'eau et la densité de l'AT et de l'ALP de 1,4  $\text{g.cm}^{-3}$ . Ce choix induit ainsi une incertitude de seulement 20% dans l'épaisseur du film. L'épaisseur obtenue à



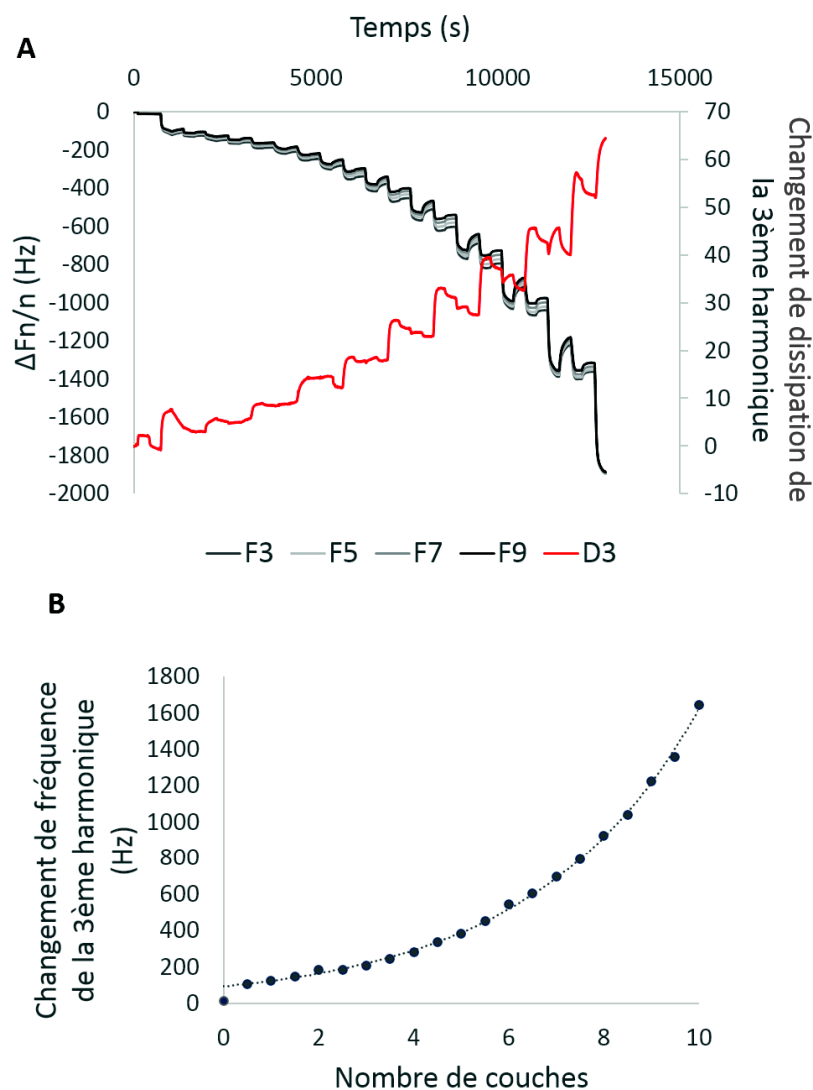


FIGURE 5.2 – A : Suivi de la construction des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  au cours du temps avec en gris les changements pour les 3<sup>me</sup>, 5<sup>me</sup>, 7<sup>me</sup> et 9<sup>me</sup> harmoniques (en gris) et le changement de dissipation (en rouge) de la 3<sup>me</sup> harmonique au cours du temps. B : Changement de fréquence pour la 3<sup>me</sup> harmonique après chaque étape de rinçage suivant le dépôt de PEI, d'ALP ou d'AT en fonction du nombre de paires de couches. En ligne pointillé, la fonction exponentielle qui décrit parfaitement le dépôt en fonction du nombre de couches.

partir des expériences de QCM a ensuite été comparée avec les mesures obtenues en ellipsométrie (figure 5.5).

La croissance exponentielle des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  est aussi confirmée par les résultats d'ellipsométrie (figure 5.5a) et par la mesure de l'absorbance liée à l'AT des films (figure 5.5b)

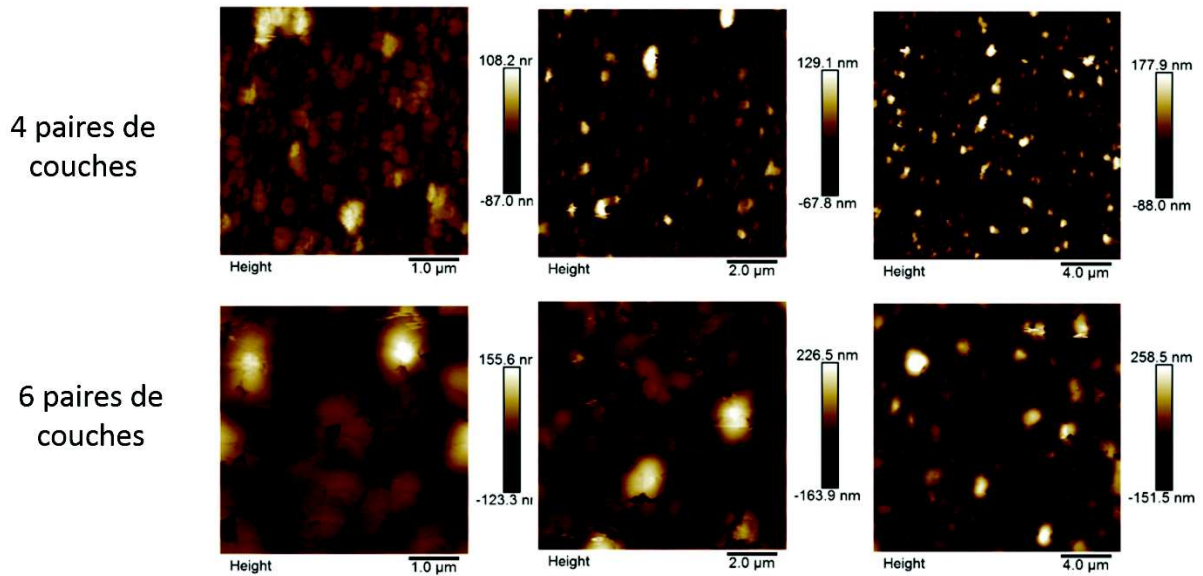


FIGURE 5.3 – Topographie de la surface de films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  pour  $n = 4$  (première ligne) et  $n=6$  (seconde ligne) en AFM en mode contact après séchage. La taille des images vaut  $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$  ( $1^{\text{re}}$  colonne),  $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$  ( $2^{\text{me}}$  colonne),  $20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$  ( $3^{\text{me}}$  colonne).

ainsi qu'en AFM (figure 5.3C). Il est à noter que l'ellipsométrie et les mesures en spectro-UV et en AFM ont été réalisées après séchage des films tandis que la mesure en QCM est effectuée en temps réel sur les films hydratés.

Pour les expériences d'ellipsométrie, l'épaisseur a été obtenue en modélisant les données avec un modèle de Fresnel et en fixant l'indice de réfraction du film à 1,50. Les valeurs d'épaisseurs obtenues en ellipsométrie et en AFM sont très proches (figure 5.4c) ce qui indique le bon choix de l'indice de réfraction du film.

De manière surprenante, l'épaisseur des films obtenue grâce à l'AFM et à l'ellipsométrie sont également proches de l'épaisseur obtenue lors des expériences de QCM, en utilisant l'équation de Sauerbrey et en définissant une densité du film de  $1,2\text{ g.cm}^{-3}$  (5.5a). Ceci est intéressant et assez différent du comportement des films multicouches de polyélectrolytes qui croissent de manière exponentielle. Dans ces cas là, le haut degré d'hydratation induit une plus grande masse mesurée en QCM comparée à la masse (et donc à l'épaisseur) déterminée en ellipsométrie à sec [17]. Ceci indique une faible hydratation des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ .

La croissance exponentielle des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  peut être due à un procédé de diffu-

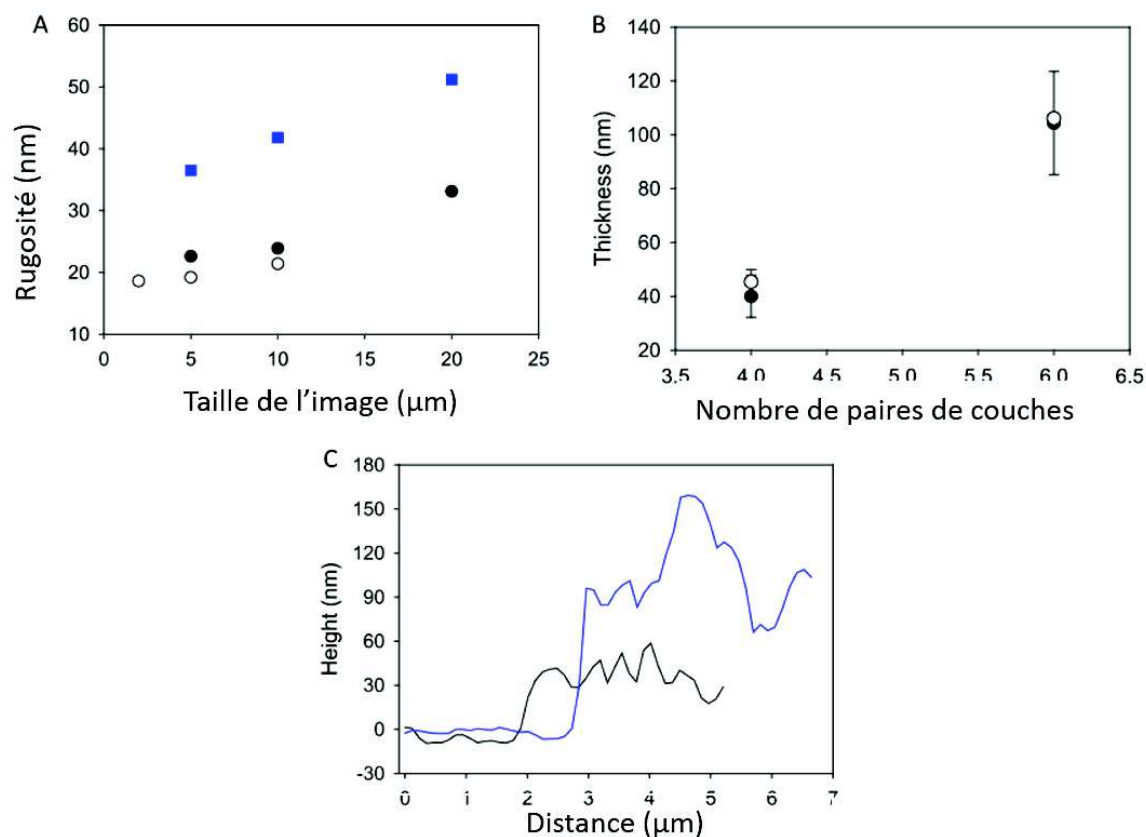


FIGURE 5.4 – A : Evolution de la rugosité en fonction de la taille de l'image pour  $n=4$  pour deux films indépendants (●) et (○) et pour un film avec  $n=6$  (■) B : comparaison de l'épaisseur des films déterminés par la mesure de la hauteur du profil déterminée en AFM (●) et l'épaisseur obtenue en ellipsométrie (○). C : Lignes des profils obtenus sur des films rayés à l'aide d'une aiguille avec  $n=4$  (en noir) et  $n=6$  (en bleu)

sion de l'AT ou bien de l'ALP à travers l'épaisseur du film comme il l'a été montré pour la combinaison d'autre polycations et polyanions [6, 8] mais l'augmentation de la rugosité avec le nombres de couches déposées (figure 5.3C) peut aussi contribuer de manière significative à une augmentation non linéaire de l'épaisseur du film car le nombre de site d'adsorptions augmente avec la rugosité du film. Ceci peut être d'importance pour les petites molécules comme l'AT. De plus, le fait que l'hydratation des films soit faible va en faveur de l'hypothèse de la faible mobilité des molécules dans le film et ainsi à une probable contribution de la rugosité dans le mécanisme de croissance. De plus, l'analyse des lignes de profil obtenues en AFM ne montre aucun petit trou dans le film au moins jusqu'à 4 paires de couches (figure 5.4C).

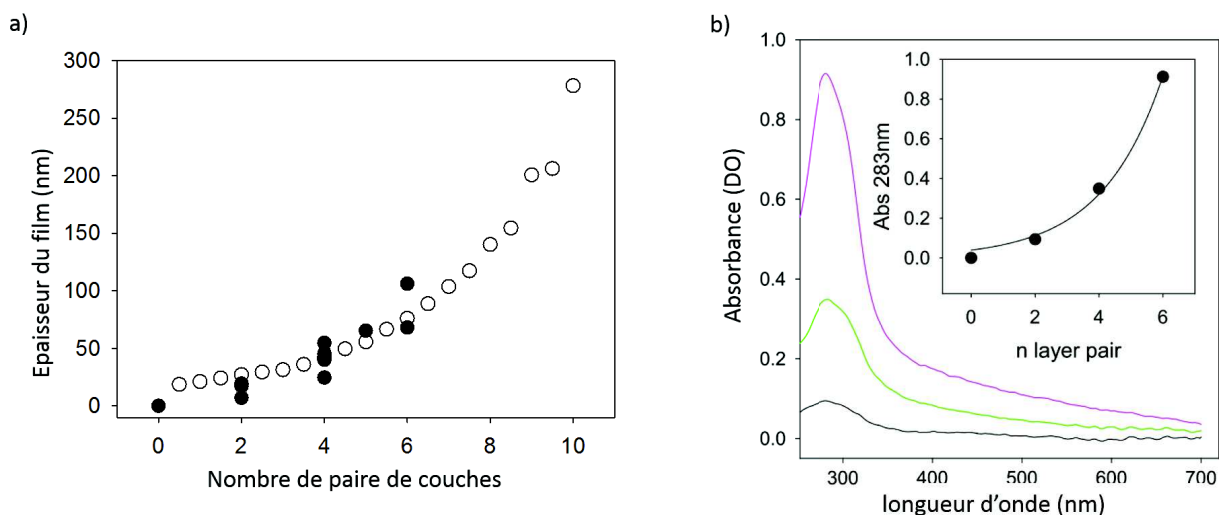


FIGURE 5.5 – a) Epaisseur des films mesuré en ellipsométrie (●) et à partir des données de la QCM (○) b) Spectres UV-vis de films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> pour n=2 en noir, n=4 en vert et n=6 en rose.

### Mobilité de l'enzyme

Des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont été réalisées afin de confirmer que l'enzyme n'est pas mobile dans le film. La phosphatase a été marquée à la FITC et des films PEI-(ALP-AT)<sub>10</sub> construits avec cette enzyme. 10 minutes après le photoblanchiment (figure 5.6), la fluorescence n'est pas recouvrée. Ceci indique comme nous l'envisagions auparavant que l'ALP n'est pas mobile dans le film.

### 5.2.2 Propriétés électrochimiques et activité enzymatique du film

Après avoir étudié la construction du film contenant deux molécules aux activités distinctes : l'acide tannique est électroactif tandis que la phosphatase alcaline est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'ester de phosphate, nous avons souhaité savoir si l'activité à la fois de l'acide tannique et de la phosphatase alcaline était maintenue dans le film.

#### Propriétés électrochimiques du film

L'électro-activité de l'AT a été étudiée par voltamétrie cyclique (figure 5.7).

Les résultats de voltamétrie cyclique montrent que le courant d'oxydation sature avec le nombre de paires de couches déposées et ne suit pas l'augmentation de l'épaisseur du film.

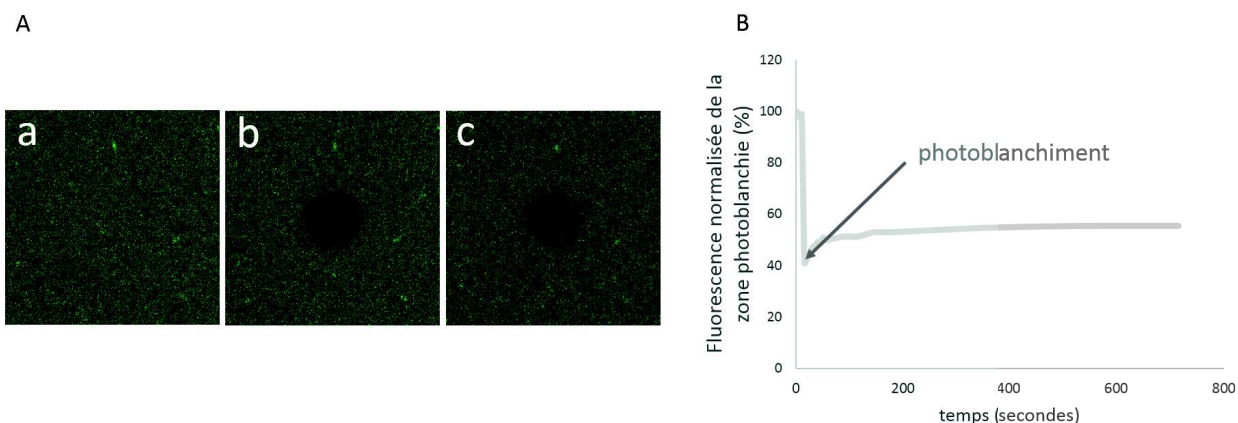


FIGURE 5.6 – A : Images des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_{10}$  contenant l'ALP marquée à la FITC a : avant photoblanchiment, b : après photoblanchiment, c : 12 minutes après photoblanchiment  
B : Intensité de fluorescence de la zone photoblanchie au cours du temps.

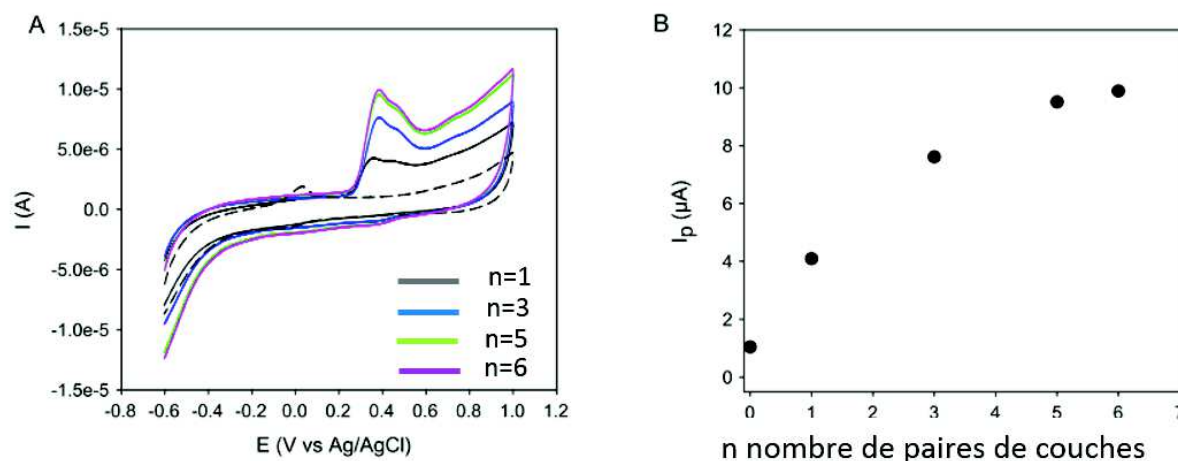


FIGURE 5.7 – A : Voltamogrammes cycliques (réalisé à  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ ) des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  pour des nombres de paires de couches différents en absence de sonde rédox. La ligne en pointillés correspond à la courbe capacitive de l'électrode sans film déposé. B : Évolution de l'intensité du pic d'oxydation avec le nombre de paires de couches

Ainsi, les molécules d'AT qui sont situées loin de l'électrode, c'est à dire celles déposées dans les dernières couches ne sont pas activées électrochimiquement. Cela signifie que la phosphatase présente dans le film entrave le passage des électrons entre les molécules d'AT.

### Activité enzymatique du film

En ce qui concerne l'activité enzymatique des films (figure 5.8), elle apparaît quasiment constante avec le nombre de paires de couches déposées. Si toutes les enzymes présentes dans le film étaient actives, une augmentation, idéalement exponentielle, de l'activité enzymatique avec le nombre de paires de couches aurait été attendue. Or, que ce soit dans les conditions statiques ou dans les conditions dynamiques (avec la solution de pNPP circulant sur le cristal de quartz recouvert du film dans la cellule de QCM), l'activité enzymatique des films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$  est quasiment égale à l'activité mesurée sur les films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_1$  c'est à dire un film dans lequel l'enzyme n'est quasiment pas enfouie dans le film mais proche de l'interface film-solution.

Il est aussi à noter que la vitesse initiale d'hydrolyse est plus grande dans les conditions dynamiques que dans les conditions statiques avec un facteur de 2,5 (figure 5.8B), ceci est potentiellement lié au fait que le substrat est plus rapidement transporté vers l'enzyme en conditions dynamiques.

Dans le cas des films déposés sur les cristaux de QCM, des injections successives de solutions de pNPP à différentes concentrations ont été réalisées afin de mesurer la vitesse d'hydrolyse du pNPP pour une concentration fixe en enzyme. L'inverse de la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à l'inverse de la concentration de pNPP dans la représentation de Lineweaver-Burk (figure 5.9A) selon l'équation (5.2) décrite plus en détail dans la partie Matériel et Méthodes-Spectroscopie UV. Ceci indique que l'activité enzymatique dans le film suit une cinétique de type Michaelis-Menten. La constante de Michaelis-Menten  $K_m$  vaut alors  $7 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Cette valeur est proche de la constante de Michaelis-Menten déterminée avec la même enzyme solubilisée dans le tampon Tris (5.9B) de  $4,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} + \frac{K_m}{v_m} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (5.2)$$

La faible différence entre la constante de Michaelis-Menten  $K_m$  pour l'enzyme immobilisée, au contact avec l'AT, et l'enzyme solubilisée suggèrent fortement que l'enzyme au contact avec l'AT n'est active que quand elle est proche de l'interface film-solution. Le même phénomène a été observé dans le cas de la  $\beta$ -galactosidase immobilisée sur des gels de polyacrylamide [18] ainsi que dans le cas de la glucoamylase et la  $\beta$ -galactosidase immobilisées sur des particules colloïdales sphériques [19].

L'enzyme à l'intérieur du film est soit inactivée soit inaccessible pour le substrat. Quand le film est mis au contact avec une solution de 10 mM de périodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ), l'activité de

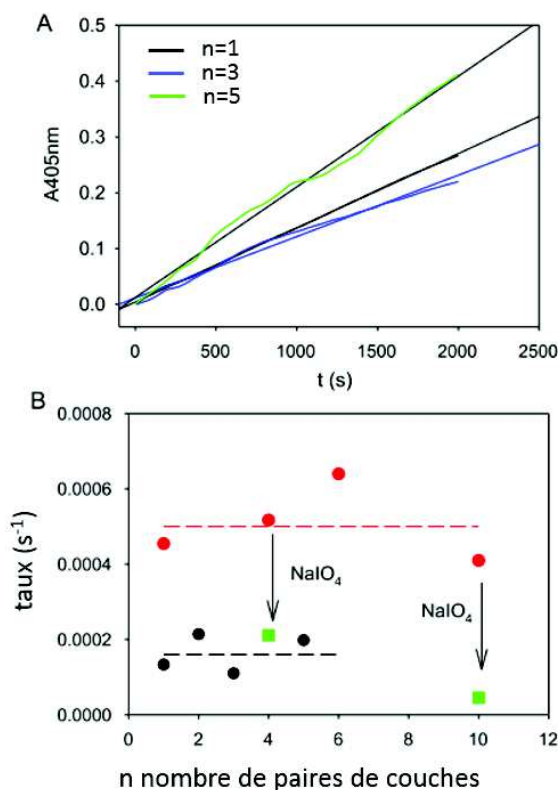


FIGURE 5.8 – A Cinétique de l’hydrolyse de pNPP suivie pour  $\lambda=405$  nm pour des films PEI-(ALP-AT) $_n$  dans des conditions statiques où les lamelles de quartz ont été immergées dans une solution de pNPP à  $2,3 \times 10^{-5}$  mol.L $^{-1}$  pour  $n=1$ ,  $n=3$  et  $n=5$ . Les lignes noires correspondent aux régressions linéaires modélisant la cinétique de réaction. B Évolution de la vitesse de réaction en fonction du nombre de paires de couches en conditions statiques (●) et en flux continu lors des expériences de QCM avant (●) contact et après contact (■) avec une solution de  $NaIO_4$  à 10mM dans tampon acétate pH=5 pendant 10 minutes. Les lignes en pointillés indiquent l’activité enzymatique moyenne de chaque sorte d’expérience tandis que les flèches indiquent la diminution de l’activité après le traitement au  $NaIO_4$ .

l’enzyme est fortement réduite (figure 5.8B). L’anion périodate est un fort oxydant qui permet d’oxyder et de réticuler les molécules d’AT présentes dans le film mais qui peut aussi changer la conformation des protéines et établir des liaisons entre les groupes amines des protéines [20]. Cependant, quand l’ALP solubilisée dans le tampon Tris 50 mM est en contact avec la solution à 10 mM de  $NaIO_4$ , le spectre de dichroïsme circulaire (DC) n’est quasiment pas changé comparé à l’ALP solubilisée dans le tampon seul (5.10A).

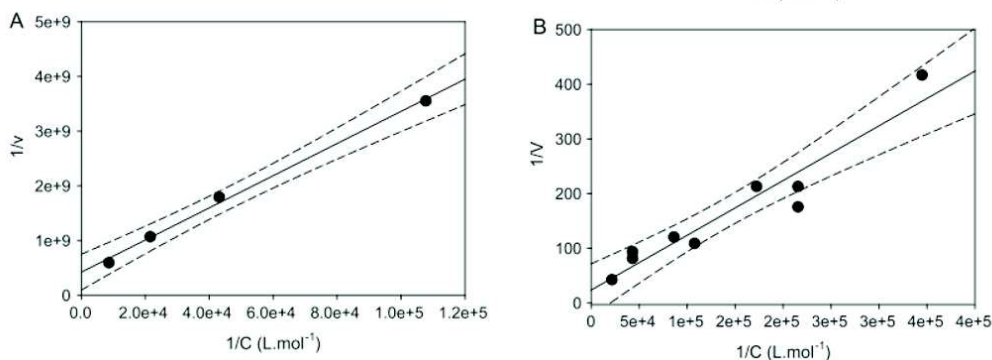


FIGURE 5.9 – Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité de l'ALP dans les films PEI-(ALP-AT)<sub>6</sub> (A) et en solution (B). Les traits pleins correspondent à la régression linéaire des données tandis que les lignes en pointillés représentent l'intervalle de confiance à 95%.

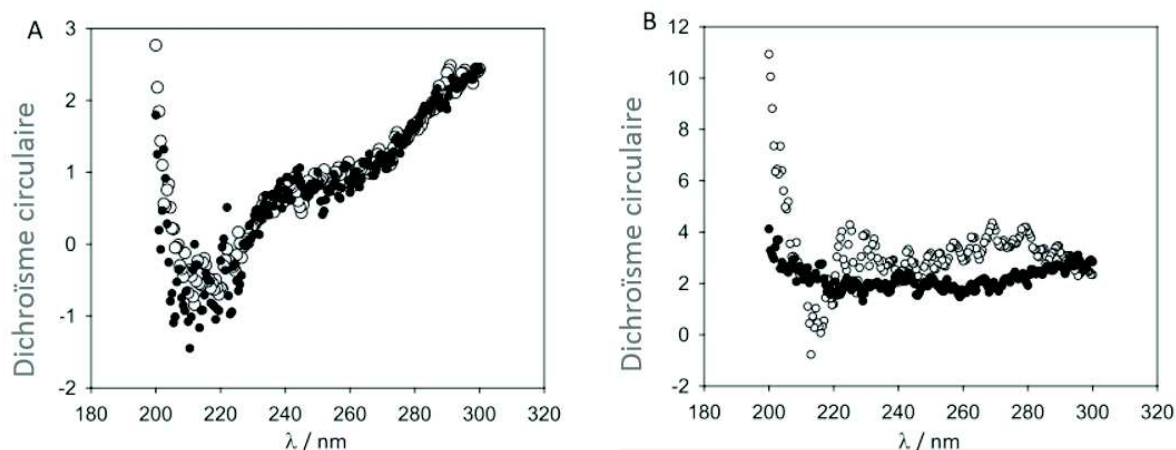


FIGURE 5.10 – A : Spectre DC de l'ALP dans le tampon (○) and spectre DC de l'ALP au contact avec une solution de NaIO<sub>4</sub> 10 mM dans le même tampon (●). B : Spectre DC de films PEI-(ALP-AT)<sub>6</sub> (○) et spectre DC de ces mêmes films après traitement avec une solution de NaIO<sub>4</sub> 10 mM pendant 5 minutes (●).

En revanche, la situation est différente dans les films PEI-(ALP-AT)<sub>6</sub> (figure 5.10B). L'enzyme a perdu une part de sa conformation native mais un signal résiduel à 208 nm dû aux hélices  $\alpha$  [21] est toujours présent. L'hypothèse faite est que l'hélicité résiduelle provient des enzymes présentes dans la couche supérieure qui est active. Cependant, après traitement avec la solution de NaIO<sub>4</sub> 10 mM, toute l'absorbance du DC est perdue (figure 5.10B), ce qui signifie que la réaction entre l'ALP et l'AT oxydé produit une perte significative de l'activité due au fait



d'un changement de conformation. Nous pensons que ce changement conformationnel est dû à une réaction entre les nucléophiles présents dans la protéine (les résidus lysine en particulier) avec les quinones des molécules d'AT oxydées.

De ces résultats présentés, le film optimal contenant de l'AT et de l'ALP devrait être constitué de 4 paires de couches puisque ces films sont sans défauts et des films plus épais contiennent plus de molécules sans aucune augmentation de l'activité électrochimique ou enzymatique.

### 5.2.3 Conclusion

Une quantité contrôlée de phosphatase et d'acide tannique peut être déposé à l'interface solide-liquide en utilisant la technique de dépôt "couche par couche". La croissance du film est exponentielle en fonction du nombre de paires de couches déposées et des films enrobant peuvent être obtenus pour un petit nombre de paires de couches déposées. Même si les films sont électro-actifs par la présence d'acide tannique et même si une activité enzymatique est présente, seulement une part des molécules est active. En effet, l'activité électrochimique est liée à l'acide tannique présent dans les premières couches déposées (jusqu'à 4 paires de couches) tandis que l'activité enzymatique est la même quelque soit l'épaisseur du film, même si la quantité d'enzymes déposées augmente fortement avec le nombre de paires de couches. Les expériences réalisées en présence de concentrations différentes en substrats ont montré que la constante de Michaelis-Menten pour l'hydrolyse de pNPP par l'enzyme immobilisée est la même que pour l'enzyme solubilisée. Ceci suggère fortement que seule la phosphatase proche de l'interface film-tampon reste active. Ainsi, contrairement aux enzymes enfouies dans des films multicouches de polyélectrolytes, qui sont stabilisées dans un tel environnement, la phosphatase alcaline perd sa conformation et son activité quand elle est enfouie dans les films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> et seule l'enzyme dans la dernière couche reste active. L'influence délétère des polyphénols sur l'activité enzymatique, déjà connue en solution, est aussi présente dans les films multicouches. Ces résultats montrent que l'acide tannique peut être une espèce peu chère pour créer des revêtements de surface en association avec des protéines mais au prix d'une baisse significative de l'activité biologique due aux interactions polyphénol-protéine.

## 5.3 Films multicouches contenant du lysozyme et de l'acide tannique

Ceci est une ébauche d'un travail commencé sur l'étude film PEI-(LYS-AT)<sub>n</sub>. Il a été choisi d'étudier une autre enzyme que la phosphatase : le lysozyme. Cette enzyme à pH=5 est chargée positivement, contrairement à la phosphatase et possède une activité antimicrobienne.

### 5.3.1 Caractérisation de la construction de film PEI-(LYS-AT)<sub>n</sub>

La possibilité de construire des films contenant du lysozyme (lys) dans des films PEI-(LYS-AT)<sub>n</sub> a été étudiée. A pH=5, le lysozyme est chargé positivement ce qui diffère des films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> pour lesquels la phosphatase était chargée négativement. Bien que les enzymes soient chargées différemment, le film PEI-(LYS-AT)<sub>n</sub> se construit tout aussi bien (figure 5.11). Ceci confirme l'hypothèse que les charges électrostatiques ne jouent pas un rôle prépondérant dans la construction des films.

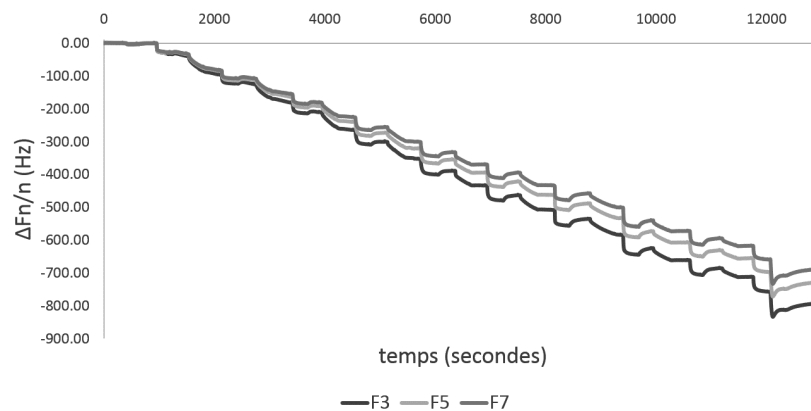


FIGURE 5.11 – Suivi de la construction du film PEI-(LYS-AT)<sub>5</sub> au cours du temps avec en gris les changements pour les 3<sup>me</sup>, 5<sup>me</sup>, 7<sup>me</sup> harmoniques (en gris)

Néanmoins, contrairement aux films contenant de la phosphatase, la croissance des films n'est pas exponentielle mais linéaire comme le montre le graphique figure 5.12. Les films sont ainsi plus épais avec la phosphatase alcaline que le lysozyme. Ce type de différence dans la croissance avait été observée [15] avec l'épigallocatechine-gallate et les deux types de gélatine A et B. Avec la gélatine A chargée négativement, la croissance des films était exponentielle tandis qu'elle était linéaire avec la gélatine B chargée positivement. Une croissance linéaire avait aussi

été montrée avec l'AT et des polycations [22]. Il semble ainsi que le mécanisme de croissance soit différent entre l'utilisation d'une enzyme chargée négativement et d'une enzyme chargée positivement avec l'AT.

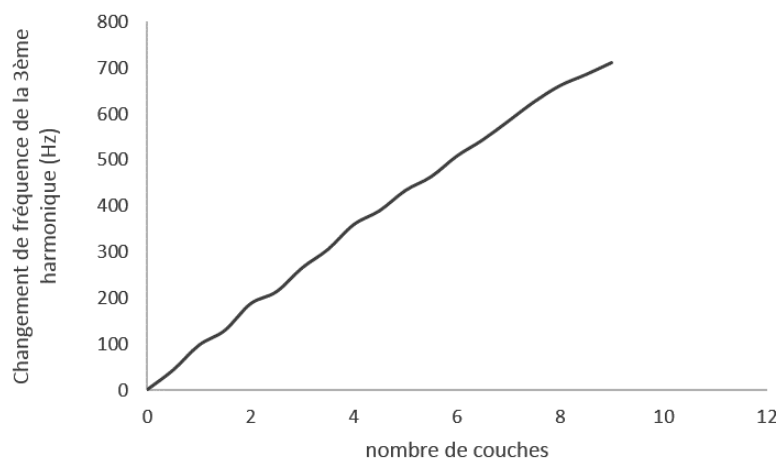


FIGURE 5.12 – Changement de fréquence pour la 3<sup>me</sup> harmonique après chaque étape de rinçage suivant le dépôt de PEI, de LYS ou d'AT en fonction du nombre de paires de couches.

### 5.3.2 Mesure de l'activité antimicrobienne des films

Le lysozyme est une enzyme qui permet de cliver la liaison entre les acides N-acétylmuramiques et les N-acétylglucosamines des peptidoglycanes, les constituants majeurs de la paroi des bactéries Gram-positives [23]. L'activité antibactérienne des films a été étudiée avec *Enterococcus faecalis*, une bactérie gram-positive. Pour voir si la dernière couche des films a une influence sur l'activité : des films PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub>-LYS et PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub> ont ainsi été réalisés.

Les premières expériences pour évaluer l'activité antimicrobienne (figure 5.13), ont permis de montrer une activité des films contre *E. faecalis*. En revanche, la répétabilité des expériences par la suite n'a pas été possible. Une des raisons envisagées est que contrairement aux films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> qui ont été construits et dont l'activité enzymatique a été mesurée tout de suite après, les films PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub> ont été construits par un robot durant la nuit dans une pièce où la température est difficilement contrôlable. Il est ainsi envisageable que les films aient pu être dégradés au cours du temps avant l'utilisation en bactériologie. Par ailleurs, d'autres tests antibactériens peuvent être envisagés, notamment des tests en solution afin d'étudier la

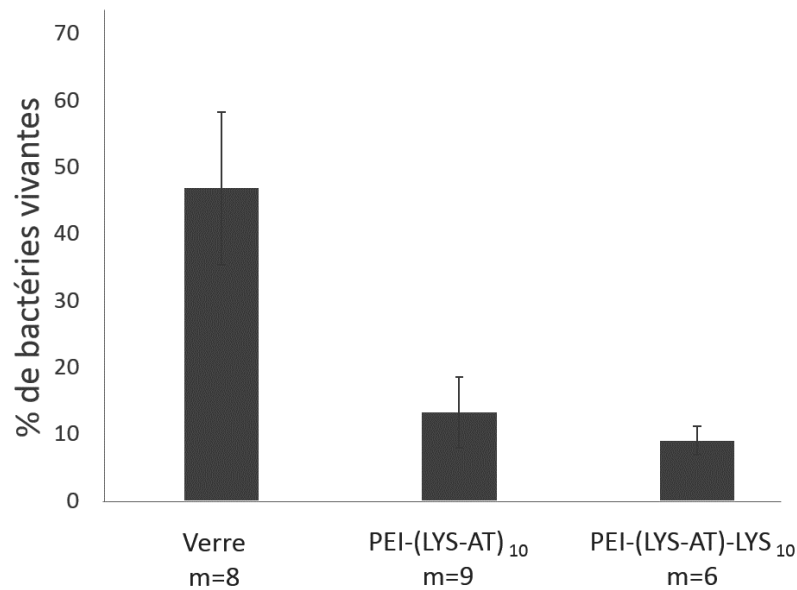


FIGURE 5.13 – Activité microbienne des films multicouches PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub> et PEI-(LYS-AT)<sub>10</sub>-LYS après 1h et marquage de toutes les bactéries et marquage des bactéries vivantes sur la surface. m est le nombre d’images traitées pour chaque type d’échantillon. La barre d’erreur représente l’erreur standard sur la moyenne

possibilité d’une libération contrôlée de l’AT ou du lysozyme au cours du temps.

## 5.4 Conclusion

Que ce soit avec une enzyme chargée positivement telle que le lysozyme ou une enzyme chargée négativement comme la phosphatase alcaline, il a été possible de construire des films multicouches avec de l’acide tannique. Ceci montre que les liaisons électrostatiques ne jouent pas un rôle majeur dans la construction de ces films mais que d’autres interactions telles que les liaisons hydrogènes interviennent. La croissance de ces films est exponentielle avec le nombre de couches déposées dans le cas des films contenant de la phosphatase alcaline. La mesure de l’épaisseur des films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> en QCM à l’état hydraté et en AFM ou en ellipsométrie à l’état séché n’a pas montré de différences significatives démontrant que les films sont peu hydratés. L’activité enzymatique des films PEI-(ALP-AT)<sub>n</sub> n’augmente pas avec le nombre de paires de couches déposées mais reste constante, ainsi seule la dernière couche d’enzyme est active.

Pour les films  $\text{PEI}-(\text{LYS-AT})_n$ , la construction est linéaire. Il existe ainsi une différence dans le mécanisme de croissance dans l'utilisation molécule chargée négativement ou positivement avec l'acide tannique. Pour les films  $\text{PEI}-(\text{LYS-AT})_{10}$ , il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir des résultats répétables de l'activité antibactérienne. Pour les films  $\text{PEI}-(\text{ALP-AT})_n$ , l'activité électrochimique lié au caractère réducteur de l'AT croît avec le nombre de paires de couches déposées jusqu'à 4 paires de couches. Ces résultats sont satisfaisants pour fabriquer des revêtements à base d'enzyme et de polyphénols à faible coût avec quatre paires de couches.

Cette partie a ainsi permis d'utiliser un polyphénol comme élément essentiel dans la construction de films multicouches.

## Bibliographie

- [1] G. Decher and J.-D. Hong. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 46(1) :321–327, June 1991.
- [2] J. J. Richardson, J. Cui, M. Björnmalm, J. A. Braunger, H. Ejima, and F. Caruso. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chemical Reviews*, 116(23) :14828–14867, December 2016.
- [3] G. Rydzek, Q. Ji, M. Li, P. Schaaf, J. P. Hill, F. Boulmedais, and K. Ariga. Electrochemical nanoarchitectonics and layer-by-layer assembly : From basics to future. *Nano Today*, 10(2) :138–167, April 2015.
- [4] F.-X. Xiao, M. Pagliaro, Y.-J. Xu, and B. Liu. Layer-by-layer assembly of versatile nanoarchitectures with diverse dimensionality : a new perspective for rational construction of multilayer assemblies. *Chemical Society Reviews*, 45(11) :3088–3121, May 2016.
- [5] K. Ariga, J. P. Hill, and Q. Ji. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(19) :2319–2340, May 2007.
- [6] J. Borges and J. F. Mano. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chemical Reviews*, 114(18) :8883–8942, September 2014.
- [7] P. Lavalley, J.-C. Voegel, D. Vautier, B. Senger, P. Schaaf, and V. Ball. Dynamic Aspects of Films Prepared by a Sequential Deposition of Species : Perspectives for Smart and Responsive Materials. *Advanced Materials*, 23(10) :1191–1221, March 2011.
- [8] C. Picart, J. Mutterer, L. Richert, Y. Luo, G. D. Prestwich, P. Schaaf, J.-C. Voegel, and P. Lavalley. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20) :12531–12535, October 2002.
- [9] P. Kujawa, P. Moraille, J. Sanchez, A. Badia, and F. M. Winnik. Effect of Molecular Weight on the Exponential Growth and Morphology of Hyaluronan/Chitosan Multilayers : A Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 127(25) :9224–9234, June 2005.

- [10] P. Schwinté, V. Ball, B. Szalontai, Y. Haikel, J.-C. Voegel, and P. Schaaf. Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 3(6) :1135–1143, December 2002.
- [11] M. Onda, Y. Lvov, K. Ariga, and T. Kunitake. Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(2) :163–167, July 1996.
- [12] V. Zucolotto, A. P. A. Pinto, T. Tumolo, M. L. Moraes, M. S. Baptista, A. Riul, A. P. U. Araújo, and O. N. Oliveira. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7) :1320–1326, January 2006.
- [13] C. Ringwald and V. Ball. Step-by-step deposition of type B gelatin and tannic acid displays a peculiar ionic strength dependence at pH 5. *RSC Advances*, 6(6) :4730–4738, January 2016.
- [14] V. Ball. Stabilization of [poly(allylamine)–tannic acid]<sub>n</sub> multilayer films in acidic and basic conditions after crosslinking with NaIO<sub>4</sub>. *RSC Advances*, 5(69) :55920–55925, June 2015.
- [15] T. G. Shutava, S. S. Balkundi, and Y. M. Lvov. (–)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330(2) :276–283, February 2009.
- [16] I. Erel-Unal and S. A. Sukhishvili. Hydrogen-Bonded Multilayers of a Neutral Polymer and a Polyphenol. *Macromolecules*, 41(11) :3962–3970, June 2008.
- [17] T. J. Halthur and U. M. Elofsson. Multilayers of Charged Polypeptides As Studied by in Situ Ellipsometry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. *Langmuir*, 20(5) :1739–1745, March 2004.
- [18] S. Sun, X. Li, S. Nu, and X. You. Immobilization and Characterization of -Galactosidase from the Plant Gram Chicken Bean (*Cicer arietinum*). Evolution of Its Enzymatic Actions in the Hydrolysis of Lactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3) :819–823, March 1999.
- [19] B. Haupt, Th. Neumann, A. Wittemann, and M. Ballauff. Activity of Enzymes Immobilized in Colloidal Spherical Polyelectrolyte Brushes. *Biomacromolecules*, 6(2) :948–955, March 2005.

- [20] K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin, and F. Turecek. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 57(2) :385–392, January 2001.
- [21] Y.-H. Chen, J. T. Yang, and H. M. Martinez. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, 11(22) :4120–4131, October 1972.
- [22] T. Shutava, M. Prouty, D. Kommireddy, and Y. Lvov. pH Responsive Decomposable Layer-by-Layer Nanofilms and Capsules on the Basis of Tannic Acid. *Macromolecules*, 38(7) :2850–2858, April 2005.
- [23] L. Callewaert and C. W. Michiels. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35(1) :127–160, March 2010.



# Conclusion générale et perspectives

Le titre de cette thèse avait été choisi délibérément de façon large afin de pouvoir développer différentes utilisations de l'acide tannique. Le travail s'est ainsi axé autour de trois grandes directions :

- la fonctionnalisation et la structuration de fibres d'acide poly-lactique
- le développement de fibres électrospinnées d'acide tannique pur et réticulées avec des ions métalliques
- la construction de films multicouches enzymatiques

La revue bibliographique au début de ce manuscrit présente différentes études qui ont été menées sur les polyphénols aux interfaces. Les polyphénols et les protéines tout d'abord, peuvent s'associer pour former des particules colloïdales via des interactions de type hydrophobe avec du stacking ou des liaisons hydrogènes. Ces interactions ont été utilisées pour former des particules avec des polyphénols et des protéines telles que l'albumine. Les polyphénols peuvent aussi s'adsorber sur de nombreuses surfaces et former des films minces. Cette capacité a été montrée simplement par réduction d'ions métalliques sur des surfaces ayant été mises au contact avec du thé ou du vin. Les polyphénols ont été aussi étudiés pour l'élaboration de films multicouches. Les interactions qui rentrent en jeu sont multiples, elles peuvent être électrostatiques, hydrophobes ou hydrophiles. Néanmoins, le pH semble être un paramètre influent sur la construction et la "déconstruction" de ces films permettant d'envisager des matériaux contenant des polyphénols et répondant au pH. De par leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes ou anticarcinogéniques, les polyphénols sont des molécules de choix dans l'élaboration de matériaux pour la santé. En plus des nombreux matériaux à base de polyphénols développés pour ce domaine, d'autres applications ont aussi été étudiées telles que la peinture anti-fouling ou les cellules photovoltaïques pour convertir l'énergie solaire en énergie électrique. Les polyphénols dans ces applications permettent d'entrevoir une synthèse plus écologique de ces matériaux. C'est dans ces différents contextes qu'il a ainsi été choisi de travailler avec l'acide tannique afin de déve-

lopper de nouveaux matériaux fonctionnels.

Le chapitre 3 a présenté des travaux sur la fonctionnalisation et la structuration de fibres d'acide poly-lactique (PLA) par l'acide tannique pour l'ingénierie de la pulpe dentaire. Après avoir présenté une mini revue sur l'ingénierie de la pulpe dentaire, la possibilité d'utiliser l'acide tannique pour fonctionnaliser des fibres de PLA a été étudiée. Le PLA est un polymère largement étudié pour l'ingénierie tissulaire que nous avons choisi car il est biocompatible, biodégradable et facilement électrospinnable. Néanmoins, le PLA est hydrophobe et difficilement fonctionnalisable avec des protéines telles que des facteurs de croissance. L'acide tannique aurait pu être une solution pour rendre les fibres de PLA moins hydrophobes et permettre leur fonctionnalisation. Des essais ont ainsi été menés en électrospinnant des mélanges de PLA et d'acide tannique. Celui-ci est correctement incorporé aux fibres. Malheureusement, il ne modifie pas l'hydrophilie des fibres qui restent très hydrophobes et il est libéré dans de grandes quantités et trop rapidement pour envisager une fonctionnalisation avec des protéines. Pour favoriser la fonctionnalisation, une autre possibilité a alors été étudiée : le traitement plasma. Il permet de rendre les fibres hydrophiles et favorise ainsi l'adsorption de l'hémoglobine, choisie comme protéine modèle.

L'autre partie de ce projet s'est concentrée sur la possibilité de structurer les fibres de PLA avec l'AT et des particules de poly-caprolactone (PCL). L'électrospinning peut être une technique intéressante pour l'ingénierie tissulaire du fait de l'obtention d'une structure proche de la matrice extra-cellulaire. Néanmoins, les fibres électrospinnées sont déposées aléatoirement et souvent les pores obtenus, du fait de leur trop petite taille, ne permettent pas une migration à l'intérieur par les cellules. La technique de co-électrospinning de fibres et d'électrospraying de particules sur des grilles métalliques a été utilisée afin d'obtenir des fibres structurées. Dans les conditions étudiées, la présence d'acide tannique avec le PCL a permis d'obtenir une meilleure structuration des fibres de PLA qu'en absence d'acide tannique. Une structure en nid d'abeille est obtenue avec des plots composés de PCL, d'AT et de PLA et entre ces plots, des fibres de PLA sont tendues. La présence d'acide tannique ne s'est pas avérée cytotoxique pour les cellules et les cellules prolifèrent sur les matrices structurées. De plus, la libération d'acide tannique a permis de montrer une inhibition totale de *Staphylococcus Aureus* et une inhibition de 40% de la croissance pour *Escherichia Coli*. Des tests de migration sont encore en train d'être mis au point afin de vérifier ou d'infirmer la possibilité de migration des cellules à travers les matrices

structurées.

Le chapitre 4 s'est concentré sur la possibilité d'obtenir des fibres électrospinnées à partir d'acide tannique pur dans de l'eau ou dans un mélange eau-éthanol. L'électrospinning est une technique qui permet d'obtenir des fibres à partir de solutions de polymères de hautes masses moléculaires, l'enchevêtrement entre les molécules permettant au jet de ne pas se briser. Néanmoins, quelques rares cas de non-polymères ont été électrospinnés grâce aux forces intermoléculaires en solution. Nous avons voulu dans ce travail étudier la possibilité d'obtenir pour la première fois des fibres électrospinnées à partir d'un polyphénol. Des fibres d'acide tannique ont été obtenues dans de l'eau, ce qui peut être intéressant pour des perspectives de "green electrospinning", mais aussi dans un mélange eau-éthanol. Plus le solvant est riche en éthanol et moins il faut d'acide tannique pour obtenir des fibres, ce qui est lié au fait que l'acide tannique est plus soluble dans l'eau que l'éthanol. Des expériences de rhéologie, de diffusion dynamique de la lumière et de cryo-TEM ont permis de mettre en évidence la formation d'agrégats d'acide tannique même à des faibles concentrations. Au delà d'une certaine concentration, les agrégats forment un réseau interconnecté qui permet l'obtention de fibres continues et homogènes électrospinnées. Les fibres d'acide tannique sont solubles dans l'eau et pour les rendre insolubles, deux approches ont été utilisées :

- l'oxydation à l'aide de périodate de sodium pour permettre la polymérisation des molécules d'acide tannique
- la complexation avec des ions métalliques  $\text{Fe}^{3+}$

Les fibres, par simple trempage dans une solution de périodate de sodium ou de nitrate de fer, ont été réticulées. De cette façon, des applications telles que la filtration ou la catalyse sont envisageables. Par la suite, il serait intéressant d'étudier plus profondément les différentes interactions de l'acide tannique dans l'eau et dans le mélange eau-éthanol mais aussi de trouver un moyen d'améliorer les propriétés mécaniques des fibres réticulées.

Enfin le chapitre 5 a permis d'utiliser l'acide tannique dans les films multicouches, une des spécialités du laboratoire Inserm 1121 Biomatériaux et Bio-ingénierie. Des films multicouches contenant de l'acide tannique et une enzyme : soit la phosphatase alcaline, soit le lysozyme ont ainsi été étudiés. Dans les conditions des expériences, c'est à dire à pH acide, l'AT est non chargé tandis que la phosphatase alcaline est chargée négativement et le lysozyme chargé

positivement. Dans les deux cas, les films se construisent, montrant que les interactions électrostatiques rentrent peu en jeu dans la construction. Néanmoins, tandis que la croissance est exponentielle avec la phosphatase, elle est linéaire avec le lysozyme et les films produits avec la phosphatase sont ainsi beaucoup plus épais. Cette différence doit être liée à des interactions différentes dans les deux cas. Pour mieux comprendre la différence de comportement entre les deux enzymes, il faudrait mesurer la rugosité des films par microscopie à force atomique des films contenant du lysozyme. En effet, la rugosité des films contenant la phosphatase a été mesurée et elle augmente avec le nombre de paires de couches. Par contre, l'épaisseur des films contenant le lysozyme n'a pas été mesurée. Pour les films avec la phosphatase, l'épaisseur des films trouvée en ellipsométrie, en microscopie à force atomique et celle calculée en utilisant l'équation de Sauerbrey à la suite des expériences de microbalance à cristal de quartz sont similaires, il semble ainsi que les films soient peu hydratés. L'activité enzymatique de la phosphatase a été étudiée et il en résulte que l'activité n'augmente pas avec le nombre de couches. Seule la dernière couche est ainsi active. L'électro-activité de l'acide tannique en revanche, augmente avec le nombre de paires de couches jusqu'à 4-5 paires de couche puis sature, la phosphatase présente dans le film entravant le passage des électrons. La réticulation des films contenant la phosphatase alcaline a ensuite permis de mettre en évidence une perte de la conformation ainsi que de l'activité de l'enzyme. Ces travaux ont ainsi permis de montrer la possibilité de construire des films ayant à la fois les propriétés d'une enzyme et l'électro-activité de l'acide tannique. Le travail sur le lysozyme était une ébauche et il faudrait ainsi réaliser les mêmes expériences qu'avec la phosphatase alcaline et étudier plus en détails les différents mécanismes de construction.

Ces travaux de thèse ont ainsi permis d'étudier l'acide tannique dans différentes formes et applications :

- même s'il n'a pas permis d'être utilisé pour la fonctionnalisation de fibres électrospinnés, il a pu servir à la structuration, apportant des propriétés antibactériennes aux fibres d'acide poly-lactique,
- pour la première fois, des fibres électrospinnées de polyphénol pur ont pu être obtenues puis par la suite réticulées pour de potentielles applications,
- l'acide tannique a permis la construction de films multicouches enzymatiques .

Le travail autour de l'acide tannique va être poursuivi au sein du laboratoire : certains des

résultats présentés dans ce manuscrit vont être approfondis et d'autres utilisations vont être développées tout particulièrement l'utilisation de l'acide tannique dans des gels de gélatine.





# Manon ALLAIS

## Matériaux fonctionnels à base de polyphénols

### Résumé

Les polyphénols, métabolites essentiels des végétaux, possèdent des propriétés intéressantes pour la santé : antioxydants, antimicrobiens ou anticarcinogéniques mais aussi pour la physico-chimie : amphiphiles, donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes, complexation avec les ions métalliques. Cette thèse a pour but d'utiliser un polyphénol : l'acide tannique (AT) afin de fonctionnaliser des matériaux sous différentes formes. Tout d'abord, l'AT a permis de structurer des fibres électrospinnées d'acide poly-lactique à l'aide de la technique de co-électrospinning-électrospraying pour la régénération de la pulpe dentaire. Ensuite, il a été possible de réaliser pour la première fois des fibres électrospinnées d'AT pur et de les réticuler ouvrant la porte à une synthèse « verte » de fibres pour la catalyse notamment. Enfin, des films multicouches à l'aide d'enzymes ont été construits permettant d'obtenir des films ayant à la fois une activité enzymatique et une électro-activité.

Mots-clés : polyphénol, acide tannique, électrospinning, électrospraying, ingénierie tissulaire, film multicouche

### Résumé en anglais

Polyphenols are essential metabolites in vegetal kingdom. They have interesting properties both for healthcare and physical-chemistry : they are antioxidant, antimicrobial or anticarcinogenic and they are amphiphilic, hydrogen-bond acceptors and donors and they can chelate with metallic cations. This thesis aims to use a polyphenol : tannic acid (TA) to design functional materials. To begin, for a dental pulp engineering purpose, TA was used to structure electrospun fibers of poly-lactic acid by using the technics of co-electrospinning-electrospraying. Then, for the first time, it was possible to electrospin fibres from a solution of pure TA. To consider applications, it was possible to cross-link these fibres. This result paves the way for a green synthesis of electrospun membranes. To finish, multilayer enzymatic films were made with TA and alkaline phosphatase or lysozyme. Films have both enzymatic properties and electro-activity due to TA.

Key-words : polyphenol, tannic acid, electrospinning, electrospraying, tissue engineering, multilayer film