

ÉCOLE DOCTORALE Physique et Chimie-Physique

ICPEES - Institut de chimie et procédés pour l'énergie, l'environnement et la santé (UMR 7515)

THÈSE présentée par :

Morgane SEON-LUTZ

soutenue le : 17 septembre 2019

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

Discipline/Spécialité : Chimie-Physique

Élaboration et caractérisation de matériaux nanofibreux fonctionnels à base d'acide hyaluronique et de nanoparticules lipidiques pour des applications à usage biomédical

THÈSE dirigée par :

M. SCHLATTER Guy

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme LADAVIERE Catherine

Directrice de recherche, CNRS, Université Lyon-1

M. GRANDE Daniel

Directeur de recherche, CNRS, Université Paris-Est Créteil

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme VIGNOUD Séverine

Chargé de recherche, CEA-Grenoble

M. BALL Vincent

Professeur, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de Chimie et Procédé pour l'Energie, l'Environnement et la Santé (ICPEES, Université de Strasbourg, ECPM, UMR 7515) à Strasbourg sous la direction du Professeur Guy Schlatter et sous la supervision d'Anne Hébraud ainsi qu'au sein du Laboratoire (L2CB) appartement au Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) de Grenoble sous la supervision de Séverine Vignoud et de Anne-Claude Couffin.

Deux laboratoires d'accueil c'est aussi deux fois plus de belles rencontres. Je souhaite remercier toutes ces personnes qui ont pris sur leur temps (malgré leurs emplois du temps souvent chargés) pour m'aider dans mes travaux et partager leur savoir, mais aussi ceux avec qui j'ai eu la chance de partager de petits (ou grands) moments autour d'un café, d'un repas ou encore au détour d'un couloir !

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mes quatre encadrants **Guy Schlatter, Anne Hébraud, Séverine Vignoud** et **Anne-Claude Couffin** qui m'ont guidée et épaulée pendant cette thèse et qui ont toujours fait preuve de patience et de compréhension lors de périodes plus difficiles. Merci Guy pour ton encadrement tout au long de cette thèse, tu as su partager ta passion pour les polymères et pour l'électrospinning en particulier. Anne, merci pour ton accompagnement lors de cette thèse et pour avoir partagé ton savoir (notamment en caractérisation), le tout, toujours dans la bonne humeur. Anne-Claude je te remercie pour toutes les connaissances que tu m'as apportées (en particulier sur les nano) mais aussi pour ton enthousiasme et ta positivité, malgré ton départ en Espagne tu as toujours été très présente pour moi. Séverine, merci pour ton suivi tout au long de la thèse, ton énergie et ta détermination sont communicatives.

Je tiens à remercier également **Catherine Ladavière** et **Daniel Grande** d'avoir accepté le rôle de rapporteurs de cette thèse et **Vincent Ball** pour sa participation dans le jury.

Un grand merci aux équipes de l'ICPEES (et en particulier au bâtiment R1) pour l'accueil que vous m'avez réservé ! Je tiens à remercier les Mac Gyver du labo **Christophe Melart** et **Christophe Sutter** pour toute l'aide que vous m'avez apportée (même si je vous ai souvent embêté avec des problèmes d'ordi, des vis manquantes ou autres soucis d'ATG) mais aussi pour votre gentillesse au quotidien, c'étaient toujours un plaisir de vous croiser et de partager un petit moment avec vous. Un grand merci à **Thierry Djekrif** pour son aide avec le montage d'électrospinning. Je tiens également à remercier **Chheng** qui a été d'une grande aide pour tout le matériel de labo, les commandes... mais aussi pour m'avoir fait goûter le meilleur caramel au beurre salé de tous les temps ! Merci à **Catherine** qui illumine tout l'étage de sa bonne humeur, et qui, avec Chheng, a organisé les petits déjeunés d'équipe, toujours très attendus tous les mois et qui nous ont permis de partager de beaux moments ! Je tiens aussi à

remercier **Eric Pollet** et **Nicolas Leclerc** pour leur sympathie au quotidien, mais aussi pour avoir partagé de précieux conseils lors des réunions de suivi de la thèse.

Enfin, j'ai une très grosse pensée pour tous les thésards, post-docs... sans qui mes années à Strasbourg n'auraient pas été les mêmes : **Murielle**, merci d'avoir accueilli la toute nouvelle thésarde un peu perdue que j'étais, j'ai été ravie de partager le même bureau que toi pendant quelques mois. **Domitille**, copine dans les fous rires, les pleurs et autres émotions... ça a été un vrai bonheur de partager ces mois ensemble et une grosse tristesse de te laisser en repartant à Grenoble. Une grosse pensée aussi pour les « garçons de l'étage du dessus » **Thibaud, Pierre, Antoine** et **Stéphane**, avec qui j'ai partagé des repas, pauses café et diverses parties de tarot, mes journées au labo auraient été bien plus tristes sans vous (même si je ne pardonne toujours pas le « goldenpuff » à Thibaut !). Je remercie aussi mes autres compagnons de bureau, **Ibrahim** à mon arrivée à Strasbourg, **Florence** et **Caroline** avant mon départ, votre sourire et sympathie au quotidien étaient un vrai soutien !

Un déménagement pour Grenoble m'a ensuite fait rencontrer (ou retrouver pour certains) une toute nouvelle équipe qui, encore une fois, m'a réservé un superbe accueil. Je tiens à remercier **Pascal Maillet** qui m'a d'abord accueilli comme chef de laboratoire dans la joie et la bonne humeur et qui a aussi participé à la correction de la bibliographie du manuscrit. Je remercie aussi **Thomas** et **Charlie** qui m'ont beaucoup, beaucoup aidé à mettre en place le montage d'électrospinning avec de grands sourires et de bonnes blagues (même quand je vous embêtais pour un câble ou un tournevis). Je tiens aussi à remercier **Magali Miolet**, qui a passé du temps pour assurer la sécurité du montage. Un grand merci à **Guillaume Nonglaton** qui a pris le temps de me former sur plusieurs équipements de la salle blanche tout en partageant les meilleures chansons d'Oldelaf ! Merci également à **Marie Escudé** pour toute son aide dans le labo à la recherche de produits ou autres verreries mais aussi pour les analyses IR (et pour avoir partagé une formation IR inoubliable !). Je remercie aussi **Fabrice Navarro** et **Mathilde Menneteau** pour avoir mis au point et réalisés les essais de cytotoxicité et **Fanny Caputo** pour les résultats de SEC. J'ai aussi une grosse pensée pour **Raphaël**, responsable de la bonne musique du labo, qui a accepté de partager son lot de LNP avec moi pour que je réalise des premières manips et qui était toujours présent (avec **Dorothée Jary**) pour répondre à toutes mes questions concernant les nanoparticules. Je ne sais pas même comment remercier **Guillaume Costa** qui était toujours là pour répondre à toutes mes questions à mon arrivée au CEA ou pour partir en recherche d'un équipement ou d'un produit. Très contente de te voir de nouveau à Grenoble ! Je tiens aussi à remercier **David Rabaud** pour m'avoir expliqué en détail le fonctionnement des microscopes en fluorescence, ce qui m'a bien aidé par la suite. Un grand merci à **Constantin Matei** de m'avoir formé sur le MEB (et d'avoir répondu à mes nombreuses questions sur le sujet) mais également d'avoir passé de longues heures

sur le MEB environnemental, le tout dans la bonne humeur ! Merci également à **Lionel Picard** qui m'a permis d'utiliser le rhéomètre du C2 avant l'arrivée de celui du DTBS. Enfin, je remercie **Didier Gasparutto** et **Christine Saint-Pierre** qui ont pris sur leur temps pour réaliser des essais de spectrométrie de masse et m'expliquer la théorie associée.

Encore une fois, j'ai été entourée de nombreux thésards, post-docs,... qui ont rendu ces journées de thèse inoubliables et que j'étais toujours heureuse de retrouver en arrivant le matin ! J'ai tout d'abord une grosse pensée pour **Julie** et **Gaëtan** qui était là à mon arrivée en début de thèse : merci pour votre amitié au quotidien, je vous dois en grosse partie ma bonne intégration à la vie grenobloise ! J'ai aussi une pensée toute particulière pour **Emilie Perret** qui a commencé sa thèse en même temps que moi, je te souhaite tout le meilleur pour la suite à Bordeaux. Je remercie aussi **Lisa, Claire, Julien**, pour leur accueil lors de ces premières semaines. A mon retour de Strasbourg, les amis du début de thèse étaient pour la plupart partis mais j'ai eu la chance de rencontrer une toute nouvelle team : **Mathilde** ma binôme acide hyaluronique, **Clémentine** avec qui j'ai partagé les galères du CO₂ et bien d'autres beaux moments, **Prisca**, alias fashion week, partenaire de brunchs et goûters, **Claire** notre spécialiste musique, **Emilie** qui nous manquait toujours lors de ses semaines de cours, **Eloïse** ma voisine de bureau dont le sourire m'accueillait tous les matins, **Maxime** ancien « presque voisin » (avec une pensée pour **Eloïdie** avec qui j'ai partagé une année de yoga !), mais aussi **Juliette, Roxane, Thibault, Thomas, Simon, Emeric, Maxime, Perrine...** et tous les stagiaires de passages : **Bastien** (voleur de première place au pronon !), **Alex, Anatole, David, Brunelle...** Merci à tous pour la bonne ambiance des repas et pauses cafés/goûters, soirées raclettes, jeux... ! Je souhaite aussi remercier tous les collègues du L2CB (ou LCMI à mon arrivée) et du service : **Mélanie, Pierre, Véro, Isabelle, Emilie, Dom, Caroline, Florence, Antoine, Fred, Nathalie, Dorothée...** pour leur sympathie et pour les intéressantes discussions autour d'un café/thé ou au détour d'un couloir.

Pour en arriver là, j'ai aussi pu compter sur le soutien de formidables amis. Je commence par mes copines de toujours, mes Léons : **Manon** avec qui je partage de merveilleux souvenirs depuis la maternelle, **Caro** partie beaucoup trop vite de Grenoble mais que je retrouve régulièrement avec grand bonheur pour de nouvelles aventures (les lacs de montagne nous attendent !) et **Marion** sans qui la bande ne serait définitivement pas la même. On repart à Lacanau quand vous voulez (en faisant attention aux « hommes méchants » bien sûr et, promis, moins de Francis dans la playlist cette fois) ! Viens ensuite ceux et celles avec qui j'ai eu la chance de partager mes années prépa et/ou d'école d'ingé : **Pauline**, ma « semi-coloc » avec qui j'ai tant partagé et sans qui l'expérience montréalaise, n'aurait définitivement pas été la même, **Clothilde** et **Marion** mes lilloises débarquées dans le sud et avec qui j'ai vécu tant de beaux moments, **Rasmey** et **Leslie** qui ont eux aussi choisis la vie grenobloise

et que je revoie toujours avec joie. J'ai aussi une grosse pensée pour tous les autres dont j'ai un peu moins de nouvelles mais qui comptent toujours beaucoup pour moi : **Amandine, Aurélien, Edwin, Guillaume, Mika, Pierre, Loïc** et **Thibault**. Enfin, j'ai eu la chance de me faire adopter par tout un tas de copains grenoblois que j'étais ravie de retrouver à mon retour à Grenoble. **Flo** et **Romain** vous faites partis de mes premières rencontres à mon arrivée et je vous dis un gros merci de m'avoir fait découvrir (avec Julie et Gaëtan) la vie grenobloise (j'ai aussi une pensée pour **Alison** qui nous a rejoint depuis quelque temps). Un gros merci au groupe du blindtest (et des « gars du foot » en général) **Hélène, Mike, Max, Yann, Doudou, Greg...** à la bonne humeur communicative et qui ont animé mes mercredis soirs à coup de Larusso et autres séries de la honte ! J'ai aussi une très grosse pensée pour les « Gre », **Marion** (aussi grande copine de yoga !), **Max, Arnaud, Erwan** (je te souhaite tout le meilleur pour ce nouveau départ en Chine), **PE, Mickaël, Yohan, Estelle** et bientôt une petite troisième ! A très vite pour un nouveau paquito, lavage de pierre (même si je n'ai pas encore vraiment participé !) ou pique-nique à la grange !

Enfin, je n'en serais pas là sans le soutien de toute ma famille et je mesure au fur et à mesure des années la chance que j'ai d'avoir une famille aussi proche, avec qui j'ai passé de magnifiques moments et que je suis toujours très heureuse de revoir. Un très très gros merci à **mes parents** qui m'ont toujours soutenus et encouragés dans mes études (et tous mes autres projets) tout en me laissant une grande liberté. Sans votre présence au quotidien et en particulier dans les moments les plus difficiles je ne pense pas que j'aurais pu aller au bout de cette thèse. Une très grosse pensée à mes **grand-parents** avec qui j'ai eu la chance de grandir et que je revoie toujours avec une grande joie. Je remercie aussi mes cousins/cousines **Agathe, Romane, Violette, Prune, Mathis, Gabin, Sébastien** et **Sandrine**, ainsi que mes oncles et tantes **Béa, Christophe, Pascal, Gégé, Cristelle, Isabelle** et **Jean-Guy** pour ces beaux moments familiaux.

Et pour finir, un grand merci à **Ludo** qui a partagé ces dernières années à mes côtés (malgré la distance des débuts), qui m'a toujours soutenu dans les moments un peu plus compliqués et qui sait comme personne me remonter le moral dans les périodes difficiles !

Je m'arrête là avant de devenir trop sentimentale, en espérant n'avoir oublié personne. Ces quelques lignes et mots de remerciement me semblent pourtant bien peu pour vous partager tout le bonheur que vous m'avez apporté ces dernières années, je n'aurais pas pu être mieux entourée !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	13
ABREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION GENERALE	25
CHAPITRE 1 - BIBLIOGRAPHIE	31
1 FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES À PARTIR DE POLYSACCHARIDES	33
1.1 <i>Qu'est-ce qu'un polysaccharide ?</i>	33
1.2 <i>La formation de fibres de polysaccharides par electrospinning</i>	35
1.3 <i>Cas particulier de l'electrospinning de polysaccharides dans l'eau</i>	39
2 MEMBRANES NANOFIBREUSES EN POLYSACCHARIDE POUR DES APPLICATIONS PANSEMENTS	56
2.1 <i>Avantage de la nanostructuration des membranes pour des applications pansements</i>	56
2.2 <i>Avantages de l'HA pour des applications biomédicales</i>	63
CHAPITRE 2 - LA FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES INSOLUBLES A PARTIR DE MELANGES HA-PVA-HPBCD.....	69
1 FORMATION DE FIBRES HA-PVA-HPBCD PAR ELECTROSPINNING.....	71
1.1 <i>Formation de pansements par electrospinning de l'HA dans l'eau – Notre stratégie</i>	71
1.2 <i>Vers une stratégie d'élaboration de nanofibres d'HA en voie aqueuse</i>	79
1.3 <i>Etude de l'influence de paramètres ambiants</i>	86
2 MEMBRANES INSOLUBLES : RÉTICULATION ET CARACTÉRISATIONS.....	93
2.1 <i>Réticulation des membranes HA-PVA- HPBCD</i>	93
2.2 <i>Caractérisation du matériau final</i>	103
3 EVALUATION BIOLOGIQUE DES MEMBRANES DE HA-PVA-HPBCD FINALES.....	107
3.1 <i>Etude de la biocompatibilité des membranes</i>	107
3.2 <i>Etude de la biodégradation des membranes en présence de hyaluronidase</i>	108

CHAPITRE 3 - FONCTIONNALISATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES PAR UNE MOLECULE MODELE : LE NAPROXENE115

1	ETUDE DES VOIES DE FONCTIONNALISATION	117
1.1	<i>Le naproxene</i>	121
1.2	<i>Formation des complexes d'inclusion entre le naproxène et la HPβCD.....</i>	125
2	IMPRÉGNATION DES FIBRES	135
2.1	<i>L'utilisation du CO₂ supercritique pour l'imprégnation d'un principe actif</i>	135
2.2	<i>L'imprégnation du naproxène dans les membranes HA-PVA-HPβCD.....</i>	137
3	SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXÈNE EN SOLUTION AQUEUSE.....	139
4	SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXÈNE EN PRÉSENCE DE HYALURONIDASE	144

CHAPITRE 4 - FORMATION DE FIBRES COMPOSITES POLYMERES/NANOPARTICULES

LIPIDIQUES149

1	LA MISE EN FORME DES FIBRES COMPOSITES.....	151
1.1	<i>Les nanoparticules lipidiques (LNP)</i>	151
1.2	<i>Mises en forme des membranes composites HA-PVA-HPβCD/nanoparticules lipidiques</i>	154
2	EFFET DES CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE DES MEMBRANES SUR LA STABILITÉ DES NANOPARTICULES.....	162
2.1	<i>Etude de l'influence de l'électrospinning sur les nanoparticules lipidiques</i>	162
2.2	<i>Etude de l'influence du recuit sur l'intensité de la fluorescence FRET et de la structure des membranes.....</i>	164
3	SUIVI DU RELARGAGE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES	170
3.1	<i>Relargage des LNP FRET dans le PBS.....</i>	170
3.2	<i>Relargage des LNP en présence de hyaluronidase</i>	172

CHAPITRE 5 – MATERIELS ET METHODES177

1	MATÉRIAUX	180
2	ANALYSES	182
2.1	<i>Microscopie Electronique a Balayage (MEB).....</i>	182
2.2	<i>Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEBE)</i>	182
2.3	<i>Scanner en fluorescence</i>	182
2.4	<i>Microscopie en fluorescence</i>	183
2.5	<i>Spectroscopie infrarouge (IR)</i>	183
2.6	<i>Analyses thermogravimétrique (ATG)</i>	183

2.7	<i>Tension de surface</i>	184
2.8	<i>Conductivité</i>	184
2.9	<i>Diffusion de la lumière (DLS)</i>	184
2.10	<i>Spectrophotométrie UV-Vis</i>	184
2.11	<i>Fluorimétrie</i>	185
2.12	<i>Rhéologie</i>	185
2.13	<i>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	186
2.14	<i>Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)</i>	186
2.15	<i>Spectrométrie de masse MALDI-TOF</i>	187
2.16	<i>Essais de traction</i>	187
3	CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS	189
3.1	<i>L'acide hyaluronique</i>	189
3.2	<i>L'hydroxypropyl-β-cyclodextrine</i>	190
4	FORMATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES HA-PVA-HPBCD	194
4.1	<i>Préparation des solutions</i>	194
4.2	<i>la formation des membranes par electrospinning</i>	194
4.3	<i>La réticulation</i>	198
4.4	<i>Le lavage et le séchage des fibres</i>	198
5	ETUDE DE LA BIOCOMPATIBILITÉ	200
6	ETUDE DE LA BIODÉGRADATION DES MEMBRANES EN PRÉSENCE DE HYALURONIDASE	202
6.1	<i>Suivi de la biodégradation - Imagerie des membranes au cours du temps</i>	202
6.2	<i>Suivi de la biodégradation - Evaluation de la perte de masse des membranes</i>	202
7	IMPRÉGNATION ET RELARGAGE DU NAPROXÈNE	203
7.1	<i>Formation de complexes HPBCD-NAP</i>	203
7.2	<i>Imprégnation</i>	203
7.3	<i>Relargage</i>	204
8	SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUE (LNP)	205
9	ETUDE DE LA STABILITÉ DES LNP	208
9.1	<i>Stabilité des LNP FRET à 4 °C</i>	208
9.2	<i>Stabilité des LNP à 33 °C</i>	208
10	FORMATION PAR ELECTROSPINNING DE FIBRES COMPOSITES LNP/HA-PVA-HPBCD ET SUIVI DU RELARGAGE DES LNP	209
10.1	<i>Préparation des membranes composites</i>	209
10.2	<i>Détermination de la perte en fluorescence après l'electrospinning et après le recuit</i>	209
10.3	<i>Suivi du relargage des LNP FRET dans le PBS</i>	210
10.4	<i>Suivi du relargage dans la Hyal</i>	210

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	213
RÉFÉRENCES	221
COMMUNICATIONS LIEES AUX TRAVAUX DE THESE.....	245

ABREVIATIONS

ACN	Absorbance du contrôle négatif
ACP	Absorbance du contrôle positif
AE	Absorbance de l'échantillon
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ATG	Analyse thermogravimétrique
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> – Réflectance totale atténuée
C*	Concentration de recouvrement
CD	Cyclodextrine
C _e	Concentration d'enchevêtrement
CMC	Carboxyméthylcellulose
D	Distance donneur/accepteur
D ₂ O	Oxyde de deutérium
Ø _{moy}	Diamètre moyen
DIC	Diclofenac
DiD	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> - Diffusion dynamique de la lumière
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Milieu minimum essentiel de Eagle
DMF	Diméthylformamide
DS	Degré de substitution
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimétrie différentielle à balayage
E	Champ électrique
ε ₀	Permittivité diélectrique du vide
E _{FRET}	Efficacité du transfert d'énergie par FRET
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i> - Transfert d'énergie entre fluorophores
FTIR	<i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i> - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
γ	Tension de surface

G'	Module élastique
G''	Module de perte
GAG	Glycosaminoglycane
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA	<i>Hyaluronic Acid</i> - Acide hyaluronique
HCl	Acide chlorhydrique
HPβCD	2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Chromatographie en phase liquide à haute performance
HR	Humidité Relative
Hyal	Hyaluronidase
IR	Infrarouge
LNP	<i>Lipid NanoParticles</i> – Nanoparticules lipidiques
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine
MEB	Microscope électronique à balayage
MEBE	Microscope électronique à balayage environnemental
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscope électronique à transmission
mol %	Pourcentage molaire
M _w	Masse molaire en poids
NAP	Naproxen
NHS	N-hydroxysuccinimide
P _E	Pression électrostatique
P _v	Pression dérivée de la tension de surface
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – Tampon phosphate salin
PDI	<i>PolyDispersity Index</i> – Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	<i>Poly(ethylene oxide)</i> - Poly(oxyde d'éthylène)
PS	Pénicilline-Streptomycine
PVA	<i>Poly(vinyl alcohol)</i> - Alcool polyvinylique
R	Rayon

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
scCO ₂	<i>Supercritical CO₂</i> – CO ₂ supercritique
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> – Chromatographie d'exclusion stérique
SVF	Sérum de Veau Fœtal
UV	Ultraviolet
vol %	Pourcentage volumique
w/w _{H₂O} %	Pourcentage massique par rapport à la masse d'eau
wt %	Pourcentage massique

INTRODUCTION GENERALE

Le soin apporté aux plaies est une préoccupation qui remonte au début de l'humanité. En effet, bien que les blessures puissent guérir d'elles-mêmes, les hommes ont vite remarqué que plusieurs facteurs et différents remèdes, à base de plantes notamment, permettent d'accélérer ou d'aider le processus de cicatrisation. L'un des plus anciens écrits médicaux connus portant sur la cicatrisation de plaies est une tablette d'argile datant de 2200 av. J.-C. Elle décrit « trois gestes de guérison » à apporter à une blessure : laver la plaie, fabriquer les pansements et panser la plaie. Les pansements alors utilisés sont des emplâtres composés d'argile, de boue, de plantes ou d'huile et étaient appliqués sur les plaies pour assurer leur protection et absorber les exsudats, le tout maintenu par des bandes de lin ¹. Ces techniques ont ensuite évoluées durant l'antiquité et le moyen âge, introduisant de nouveaux matériaux permettant le pansage des plaies, comme la laine ou encore les gazes en coton, qui sont encore largement utilisées de nos jours ². Puis, en 1860, Louis Pasteur découvre l'existence de micro-organismes responsables des infections, et montre qu'il est possible de les détruire par la chaleur ou de les éliminer en les « filtrant » avec des substances telles que le coton. L'utilisation du pansement permettant de prévenir l'infection, en faisant barrière entre la plaie et le milieu extérieur, prend alors tout son sens ³. Mais, depuis plusieurs décennies, les matériaux constitutifs des pansements se diversifient afin d'accompagner au mieux toutes les étapes de la cicatrisation. Parmi ces nouveaux matériaux, des pansements à base de polysaccharides ont été mis au point afin de profiter des propriétés de biocompatibilité et de bioactivité de ces macromolécules ⁴. De plus, la structuration même des pansements évolue, passant de simples emplâtres ou tissus, à des architectures plus propices à la cicatrisation des plaies. Parmi ces dernières évolutions, les pansements mis en forme par électrospinning, technologie permettant l'obtention de nanofibres à partir de solutions de polymères, sont capables de reproduire les caractéristiques morphologiques de la matrice extracellulaire de la peau et semblent donc les plus à même de mimer une peau lésée à la surface d'une plaie ⁵. D'autre part, cette technique d'électrospinning permet l'obtention de pansements nanostructurés à partir de multiples polymères, synthétiques ou naturels et, dans cette dernière catégorie, les polysaccharides n'ont pas échappés à la tendance. Cependant, la nature parfois ionique de ces derniers ou le choix restreint de solvants possibles peut complexifier leur mise en forme par électrospinning. Afin de pouvoir mettre en forme ces différents polysaccharides, il faut donc trouver un solvant ou un mélange de solvants adaptés à la solubilisation du polymère et au procédé de formation des nanofibres. Malheureusement, de nombreux solvants utilisés (solvants organiques, acides) soulèvent des problèmes de toxicité que ce soit pendant le procédé d'électrospinning ou dans le matériau final, où ils pourraient être présents sous forme de traces ⁶.

Dans ce travail de thèse, qui s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le CEA-LETI et l'ICPEES, des stratégies d'élaboration de pansements nanofibreux à base d'acide hyaluronique (HA), un polysaccharide d'intérêt, ont été développées par electrospinning en utilisant l'eau pure comme unique solvant afin d'éviter tout problème de toxicité. Pour ouvrir les champs d'application vers un usage thérapeutique, différentes voies de fonctionnalisation de ces matériaux ont été envisagées. La première, a consisté en l'imprégnation directe de naproxène, une molécule modèle aux propriétés anti-inflammatoires. La seconde, repose sur l'incorporation de nanoparticules lipidiques au sein des nanofibres. La stratégie d'élaboration envisagées et les différentes propriétés attendues dans le matériau final sont résumées en Figure 1.

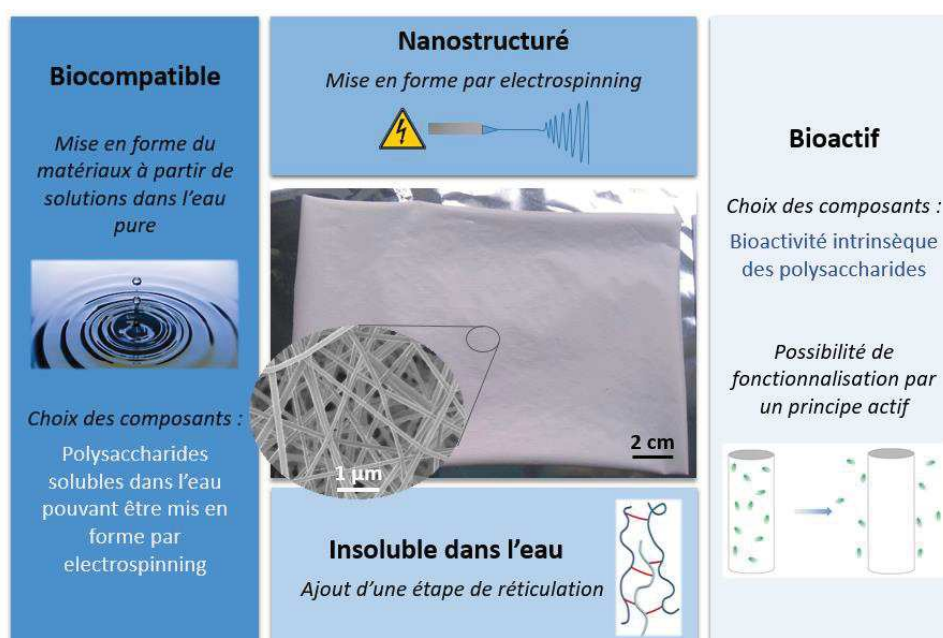


Figure 1 : Stratégie d'élaboration envisagée et propriétés attendues du matériau final

Ce manuscrit est organisé en plusieurs chapitres détaillant les différentes étapes du travail réalisé. Dans le **chapitre 1**, après avoir rapidement introduit la notion de polysaccharide et évoqué leur mise en forme par electrospinning, il est dressé un état de l'art des différents polysaccharides electrospinnés avec l'eau pure pour seul solvant et les stratégies mises en œuvre pour parvenir à ce résultat. Puis, les avantages apportés par la nanostructuration des pansements sont développés et, parmi les différents polysaccharides disponibles, il a été choisi de se focaliser sur l'HA, dont les propriétés de biocompatibilité et de bioactivité sont détaillées. Le **chapitre 2** aborde ensuite la mise en forme des nanofibres à base d'acide hyaluronique grâce à l'ajout d'un polymère porteur, l'alcool polyvinylique

(PVA), et d'un oligosaccharide cyclique la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD). Puis, la réticulation du matériau a été envisagée à l'aide du couple 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) afin d'assurer la tenue de la structure fibreuse lors de l'utilisation du pansement. Enfin, la biocompatibilité du matériau et la biodégradation des membranes au contact de hyaluronidase (enzyme dégradant l'HA) sont étudiées. Le **chapitre 3** porte sur la fonctionnalisation des membranes nanofibreuses par une molécule anti-inflammatoire le naproxène (NAP). Pour cela, deux méthodes d'imprégnation du principe actif au sein des fibres sont expérimentées : par immersion dans une solution aqueuse ou par CO₂ supercritique. Puis, la cinétique de relargage du NAP ainsi imprégné dans les membranes est ensuite mesurée dans une solution de PBS ou en présence de hyaluronidase. Le **chapitre 4** présente, quant à lui, un autre mode de fonctionnalisation à l'aide de nanoparticules lipidiques (LNP) pouvant elles-mêmes encapsuler des principes actifs. L'influence du procédé de mise en forme des membranes sur la stabilité des LNP au sein des fibres est étudiée afin de s'assurer que celles-ci n'ont pas été détériorées par les différentes étapes de mise en œuvre puis, comme précédemment, la cinétique de relargage des LNP dans une solution de PBS ou en présence de hyaluronidase, est mesurée. Enfin, le **chapitre 5** apporte toutes les informations complémentaires à la bonne compréhension de ce travail de thèse que sont les différents matériaux utilisés, les descriptions des méthodes d'analyses et les protocoles détaillés de la formation des membranes par electrospinning, de leur fonctionnalisation par le NAP ou les LNP et de leur relargage.

CHAPITRE 1 - BIBLIOGRAPHIE

Introduction

L'industrie des **pansements** se tourne aujourd'hui de plus en plus vers l'utilisation de **matériaux bioactifs**, permettant la mise en forme de systèmes plus évolués que les traditionnelles compresses. Cette nouvelle génération de pansements est basée sur la création d'un milieu optimal conduisant à une cicatrisation la plus efficace possible. Pour cela, les **polysaccharides** se présentent comme des matériaux de choix alliant, pour certains, une bonne biocompatibilité avec d'intéressantes propriétés de bioactivité.

Après une rapide introduction sur les polysaccharides, la formation de **nanofibres** par electrospinning de ces macromolécules sera présentée. Le cas particulier de **l'electrospinning de polysaccharides dans l'eau** sera ensuite détaillé, en présentant dans un premier temps les différentes propriétés de ces solutions aqueuses et leurs influences sur le procédé d'electrospinning, puis dans un second temps, l'état de l'art concernant la mise en forme de fibres de polysaccharides à partir de solution dans de l'eau pure.

L'élaboration de membranes nanofibreuses par electrospinning pour des applications pansements sera ensuite développée dans une seconde partie. Les différents avantages apportés par la **nanostucturation** des pansements seront détaillés et parmi les différents polysaccharides disponibles pour des applications biomédicales, il sera choisi de s'attarder sur **l'acide hyaluronique**, dont les propriétés de **biocompatibilité** et de **bioactivité** seront développées dans ce chapitre.

CHAPITRE 1 - BIBLIOGRAPHIE	31
1 FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES À PARTIR DE POLYSACCHARIDES	33
1.1 <i>Qu'est-ce qu'un polysaccharide ?.....</i>	33
1.2 <i>La formation de fibres de polysaccharides par electrospinning</i>	35
1.3 <i>Cas particulier de l'electrospinning de polysaccharides dans l'eau.....</i>	39
1.3.1 L'eau, un solvant pouvant complexifier l'electrospinning	39
1.3.2 L'electrospinning de polysaccharides dans l'eau pure – Etat de l'art.....	41
2 MEMBRANES NANOFIBREUSES EN POLYSACCHARIDE POUR DES APPLICATIONS PANSEMENTS	56
2.1 <i>Avantage de la nanostructuration des membranes pour des applications pansements</i>	56
2.1.1 Processus de cicatrisation et apports du pansement	56
2.1.2 Pansements mis en forme par electrospinning	61
2.2 <i>Avantages de l'HA pour des applications biomédicales</i>	63
RÉFÉRENCES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1 FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES A PARTIR DE POLYSACCHARIDES

1.1 QU'EST-CE QU'UN POLYSACCHARIDE ?

Les polysaccharides sont des polymères d'origine naturelle. Ce sont les macromolécules les plus abondantes sur Terre, elles sont extraites de ressources végétales, animales, bactériennes ou encore fongiques. Les polysaccharides sont constitués d'unités monosaccharides appelées oses ou sucres, reliées entre elles par des liaisons osidiques ⁷. Des exemples de structures d'un monosaccharide (le glucose) et d'un polysaccharide (l'amylose, composant de l'amidon) sont présentés en Figure 1-1.

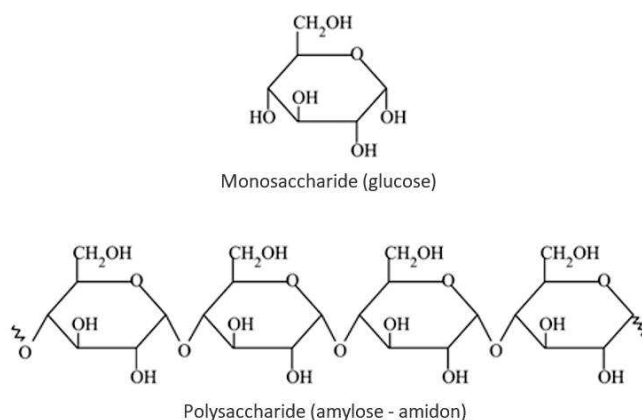


Figure 1-1 : Exemples de structures chimiques d'un monosaccharide (le glucose) et d'un polysaccharide (l'amylose, composant de l'amidon)

En fonction de leur structure chimique, on peut répartir les polysaccharides en deux types : les homopolysaccharides formés d'un seul type de monosaccharide et les hétéropolysaccharides constitués de plusieurs unités d'oses. Ces macromolécules peuvent être soit linéaires tels que le chitosane et l'acide hyaluronique, soit ramifiées comme le dextrane ou le xanthane. La plupart de ces polymères portent un grand nombre de fonctions hydroxyle. En dépit de cette composition chimique, certains polysaccharides sont peu, voir pas, solubles dans l'eau en raison soit d'une forte cristallinité (c'est le cas de la cellulose, malgré le caractère hydrophile des monomères qui la composent), soit de fonctions chimiques particulières (groupements acétylamine de la chitine) ⁸ ou encore, dans le cas de

la chitine, de liaisons hydrogènes intramoléculaires responsables de la raideur des chaînes du polymère⁹. Si certains polysaccharides sont neutres, comme le pullulane ou le dextrane, d'autres présentent des charges réparties le long de leur(s) chaîne(s). La majorité de ces polymères chargés, dit polyélectrolytes, sont anioniques puisqu'ils portent sur leur squelette carboné des fonctions acide carboxylique, c'est par exemple le cas de l'alginate ou l'acide hyaluronique, mais aussi parfois des fonctions sulfates, comme le carraghénane. Enfin, il existe aussi des polysaccharides cationiques, comme le chitosane qui possèdent des fonctions amine facilement protonables, mais ceux-ci sont plus rares^{8,10,11}.

Dans la nature, ces macromolécules ont des rôles majeurs. En effet, certains polymères, appelés polysaccharides de réserve, sont présents chez tous les êtres vivants et mais aussi dans les végétaux. Ce sont des sources d'énergie pour ces derniers, puisqu'ils peuvent être stockées en plus grande quantité que leurs monosaccharides constitutifs seul (comme le glucose, le fructose...). Par exemple, l'amidon est produit par les plantes, qui s'en servent comme d'une réserve d'énergie pour leur croissance mais il peut aussi être digéré par l'amylase (par rupture des liaisons osidiques), une enzyme digestive présente chez les animaux. Le glycogène est l'équivalent de l'amidon chez les animaux. Il est présent dans toutes leurs cellules où il joue un rôle de réserve fournissant de l'énergie aux cellules et régulant le taux de glucose dans le sang^{12,13}. Les polysaccharides peuvent aussi avoir une fonction structurelle, comme la cellulose qui participe au maintien des parois végétales puisque sa forte cristallinité lui assure une grande rigidité¹³. De façon similaire dans le monde animal, la chitine qui possède une structure rigide due aux liaisons entre ses groupes hydroxyle, en font un constituant majeur des carapaces de certains insectes ou crustacés¹⁴. Enfin, plusieurs polysaccharides tels que l'acide hyaluronique (HA) ou l'héparine assurent la constitution de la matrice extracellulaire (MEC) des tissus conjonctifs. Ces macromolécules glucidiques, aussi appelées glycosaminoglycanes (GAGs), sont chargées négativement, en raison de la présence de groupes acide le long de leur squelette. Ces polysaccharides assurent l'hydratation des tissus, permettent le maintien des structures des cellules, fournissent un passage permettant la migration cellulaire et de manière générale, ils apportent adhérence et résistance mécanique à la MEC^{11,12}.

De par leur abondance et leur polyvalence, les polysaccharides ont très tôt soulevé l'intérêt de la recherche et trouvé de nombreuses applications industrielles dans la mise en œuvre de gels, de films ou encore de fibres.

1.2 LA FORMATION DE FIBRES DE POLYSACCHARIDES PAR ELECTROSPINNING

Il existe un grand nombre de polysaccharides sous la forme de fibres à l'état naturel dans les graines, les fruits, les fleurs ou les plantes ^{15,16}. Parmi les plus connues, on peut par exemple citer la fibre de coton, issus de la fleur du cotonnier, constituée principalement de cellulose (illustration en Figure 1-2) ¹⁷.



Figure 1-2 : A gauche – Fleur de cotonnier, A droite – Image MEB de fibres de coton ¹⁸

Ces fibres, sont utilisées dans un large éventail d'applications comprenant l'ameublement, le textile, les matériaux composites, les matériaux biocompatibles, les dispositifs biomédicaux et le stockage d'énergie. Par rapport aux matériaux obtenus à partir de polymères dérivés du pétrole, les fibres polysaccharidiques ont l'avantage d'être issues de ressources renouvelables et d'être biodégradables ¹⁵.

Afin d'obtenir un plus large choix dans les constituants des fibres, celles-ci ont aussi pu être obtenues par manufacture de différents polysaccharides à l'état fondu ou solubilisés dans un solvant. Dans ce cas, la préparation du ou des polymères constituant la matière première, la technique de filage, mais aussi les éventuels post-traitements permettent de former des fibres aux propriétés diverses ¹⁵. Différentes techniques de filages de polymères ont été utilisées par le passé et les descriptions de chaque procédé, ainsi que des exemples de fibres produites, sont décrites dans le Tableau 1-1.

Tableau 1-1 : Procédé de formation de fibres (15)

Procédés de fabrication des fibres	Description du procédé	Exemples de polysaccharides mis en forme par le procédé
Filage par voie fondue (Melt Spinning)	Un polymère fondu est extrudé, puis la fibre formée est refroidi par de l'air.	Acétate butyrate de cellulose seule ou avec ajout de nanocristaux de cellulose ¹⁹
Filage par voie sèche (Dry Spinning)	Un polymère est solubilisé dans un solvant puis extrudé. Lorsque les fibres émergent à travers la filière, le solvant est évaporé à l'air chaud et dans la plupart des cas, il est ensuite recueilli et réutilisé.	Acétate de cellulose ²⁰
Filage par voie humide (Wet Spinning)	Le polymère est solubilisé dans un solvant, puis extrudé directement dans un bain liquide qui va permettre d'extraire le solvant, ne laissant que le polymère.	κ-Carraghénane ²¹ , Chitosan ²²
Filage de gel (Gel Spinning)	Un polymère sous forme de gel (en solution très concentrée ou de solution d'un polymère de très haute masse molaire) est extrudé. La fibre ainsi formée est refroidie à l'air ou dans un bain de solvant.	Cellulose ²³ , nanocristaux de cellulose dans du polyacrylonitrile ²⁴
Electrospinning	Une solution de polymère ou un polymère fondu est étiré par un champ électrique intense, formant un jet de polymère. L'évaporation du solvant ou la solidification du polymère fondu va ensuite permettre la formation d'une fibre.	Chitosan ²⁵ , acide hyaluronique ²⁶ , amidon ²⁷
Dispersion Spinning	Un polymère (la plupart du temps infusible ou insoluble) est dispersé sous forme de particules fines dans un second polymère en solution. Le tout est ensuite extrudé pour former des fibres. L'évaporation du solvant ou la coagulation des particules crée une fibre. Après filage, une étape de traitement thermique est appliquée pour détruire le polymère formant des fibres et fusionner les particules de polymère réelles en fibres	
Extrusion réactive (Reaction Spinning)	Deux prépolymères sont mis en solution avec quelques additifs et sont extrudés à travers une filière. En sortie de filière, les fibres sont chauffées et les deux prépolymères réagissent pour former des fibres solidifiées	

Contrairement aux autres méthodes de filage décrites qui permettent la formation de fibres de diamètre supérieur au micron, l'électrospinning permet d'obtenir des fibres de diamètre bien inférieur, allant jusqu'à quelques dizaines de nanomètres, formant ainsi un matériau nanostructuré, au rapport surface/volume élevé ²⁸. Ces caractéristiques en ont fait des matériaux recherchés dans des

domaines d'applications tels que la filtration, les pansements, la catalyse, le textile, l'ingénierie tissulaire, l'environnement, la défense et sécurité, la pharmaceutique ou encore l'optique ²⁹.

Afin d'obtenir des fibres par l'électrospinning, une pompe alimente une solution de polymère (ou un polymère fondu) vers une aiguille métallique et la goutte formée au bout de cette dernière est soumise à un champ électrique intense (de l'ordre de 1 kV.cm^{-1}). La différence de potentiel entre la surface de la goutte et une contre électrode, appelée collecteur, provoque la déformation de celle-ci en un cône, appelé cône de Taylor ³⁰. Lorsque la force électrique surpasse la tension de surface du liquide, un jet de solution est émis de l'extrémité de ce cône. L'accumulation de charges électriques à la surface du jet, induit des mouvements de fouet lors de son trajet entre l'aiguille et le collecteur ³¹ (voir schémas en Figure 1-3).

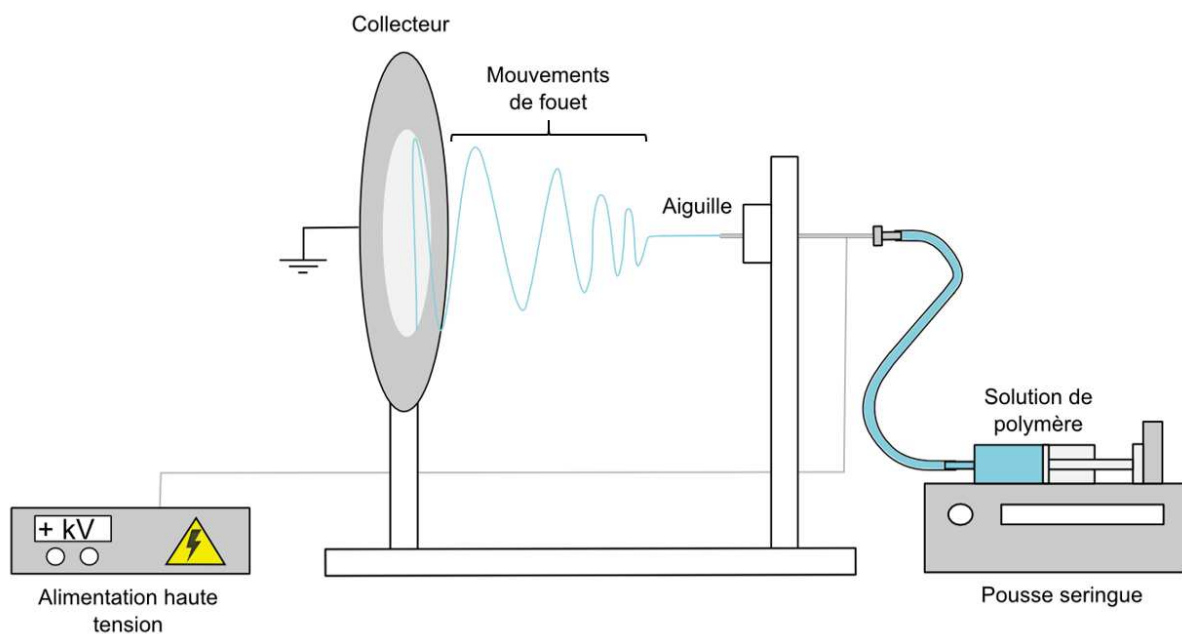


Figure 1-3 : Représentation schématique d'un dispositif d'électrospinning classique

Ces mouvements de fouet sont responsables de l'évaporation efficace du solvant, de la réduction du diamètre et finalement d'un dépôt aléatoire d'une nanofibre sèche sous la forme d'un non tissé, appelé membrane, scaffold ou encore mat. Cette technique a permis le filage de multiples polymères, qu'ils soient synthétiques ou naturels et, dans cette dernière catégorie, les polysaccharides n'ont pas échappés à la tendance. Différentes fibres formées par électrospinning de polysaccharide sont visibles en Figure 1-4.

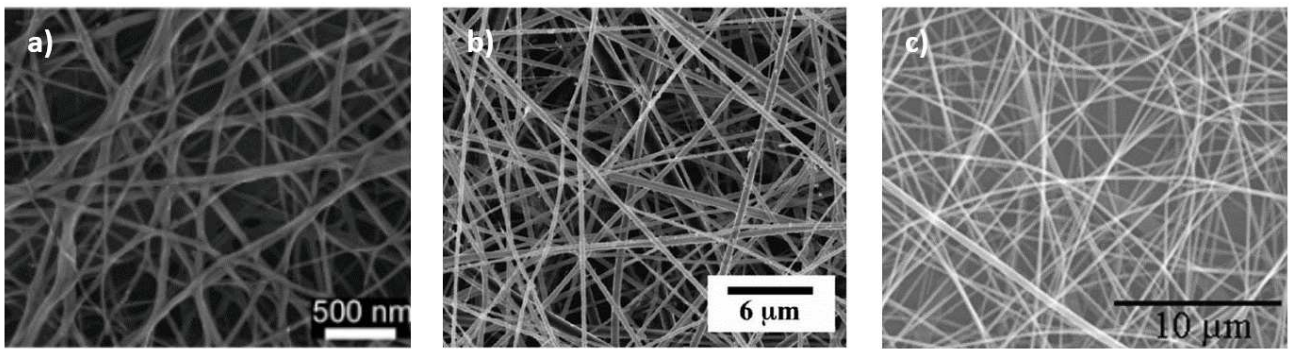


Figure 1-4 : Images MEB de nanofibres obtenues par electrospinning de a) HA ²⁶, b) Chitosane ³², c) Pullulane ³³

Malheureusement, la nature parfois ionique de ces derniers ou le choix restreint de solvants possibles peut complexifier grandement leur mise en forme par electrospinning. En effet, à l'inverse des polymères neutres, de nombreux polysaccharides présentent des interactions électrostatiques entre leur chaînes ainsi que des contre ions qui vont influencer sur le procédé d'electrospinning ³⁴. Dans le cas du chitosane, Min et al. ont émis l'hypothèse qu'en raison de la force électrique élevée appliquée pendant l'electrospinning, des forces répulsives entre les groupes ioniques présents sur les chaînes de polymère se produisent et empêchent la formation de fibres continues ³⁵. De plus, de fortes liaisons hydrogène inter-chaînes peuvent aussi empêcher leur déplacement quand celles-ci sont exposées au champ électrique, ce qui peut entraîner la rupture du jet au cours du processus ³⁶. Le HA, malgré le fait qu'il soit facilement soluble dans l'eau, est difficilement mis en forme par electrospinning. A cause des charges réparties sur ses chaînes, il présente une structure hélicoïdale rigide en solution aqueuse ce qui limite fortement le nombre d'enchevêtrement ³⁷. De plus, c'est un composé fortement hygroscopique, il peut fixer jusqu'à 10 000 fois son propre volume d'eau, les solutions de HA sont donc très visqueuses même à faible concentration (par exemple des solutions aqueuses réalisées avec un HA de $M_w = 3\,500\,000$ et des concentrations comprises entre 1,3 à 1,5 w/v %, présentent une gamme de viscosité comprise entre 3 et 30 Pa.s, à 25 °C ³⁸), il est donc difficile de jouer sur ce paramètre pour améliorer le taux d'enchevêtrement ³⁹. L'alginate, quant à lui, est difficilement electrospinnable car, de manière similaire au HA, les charges présentes sur son squelette causent une rigidification des chaînes qui mène à un taux d'enchevêtrement insuffisant ⁴⁰.

Afin de pouvoir electrospinner ces différents polysaccharides, une des premières solutions est de trouver un solvant ou un mélange de solvants adaptés qui vont permettre de limiter les interactions ioniques entre les chaînes mais aussi d'abaisser la tension de surface de la solution finale. Malheureusement, de nombreux solvants utilisés comme le diméthylformamide (DMF), l'acétone, le

chloroforme...³⁴ soulèvent des problèmes de toxicité que ce soit pendant le procédé d'électrospinning, lors de l'étape d'évaporation du solvant ou dans le matériau final, où ils pourraient être retrouvés sous forme de traces⁶.

1.3 CAS PARTICULIER DE L'ELECTROSPINNING DE POLYSACCHARIDES DANS L'EAU

1.3.1 L'eau, un solvant pouvant complexifier l'électrospinning

Afin de s'affranchir des problèmes de toxicité posés par les solvants organiques ou acides, une alternative est d'utiliser l'eau comme solvant dans le procédé d'électrospinning. Mais cela n'est pas forcément aisé pour diverses raisons.

Tout d'abord, l'eau présente une tension de surface élevée contrairement à d'autres solvants couramment utilisés pour la mise en forme de fibres par électrospinning (voir Tableau 1-2). En effet, les forces principales qui agissent sur une goutte de solution de polymère soumis à un champ électrique sont la tension de surface et la force électrostatique (si la gravité est négligée). La force électrostatique déforme et étire le liquide alors que la tension superficielle agit de façon opposée en le rétractant pour minimiser sa surface⁴¹. Dans le cas du modèle simplifié d'une sphère, la pression dérivée de la tension de surface, P_γ , s'exprime de la façon suivante :

$$P_\gamma = \frac{2\gamma}{R}$$

avec γ la tension de surface de la solution de polymère et R le rayon de la goutte.

La pression électrostatique, P_E , est détaillée par l'équation suivante :

$$P_E = \frac{1}{2} \varepsilon_0 E^2$$

avec ε_0 la permittivité diélectrique du vide et E le champs électrique à la surface de la goutte.

Pour que le cône de Taylor s'établisse et qu'un jet de solution soit émis de ce dernier, il faut donc que la force électrostatique surpasse la tension de surface, c'est-à-dire que :

$$E > \sqrt{\frac{4\gamma}{\varepsilon_0 R}}$$

Donc, plus la tension de surface du solvant utilisé va être importante, plus il faudra appliquer un champ électrique élevé pour simplement former le jet de solution ⁴¹. De plus, ce jet de solution reste stable uniquement quand le taux d'enchevêtrement entre les chaînes de polymère est assez élevé pour maintenir sa structure et éviter qu'il ne se rompe en de multiples gouttelettes.

Quand la tension de surface d'une solution aqueuse est trop élevée, des instabilités du jet peuvent se former, créant ainsi des irrégularités dans le dépôt de fibres comme des gouttelettes ou des inhomogénéités en forme de fuseau voir sphériques le long des fibres, appelées « beads » ⁴². On peut voir ces irrégularités illustrées en Figure 1-5, ou des solutions de 3 wt % de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) ont été électrospinnées dans des mélanges eau-éthanol avec différents ratios massiques. On remarque que lorsque le PEO est en solution dans l'eau pure, des beads se forment sur les fibres (Figure 1-5.a) mais elles diminuent lors d'ajout d'éthanol, réduisant ainsi la tension de surface (qui diminue de $77,6 \text{ mN.m}^{-1}$, pour une solution de PEO dans l'eau, à $59,3 \text{ mN.m}^{-1}$, pour un ratio massique eau-éthanol de 0,26) (Figure 1-5.b), jusqu'à leur disparition une fois la tension de surface suffisamment basse (de $54,7 \text{ mN.m}^{-1}$ pour une solution de PEO dans un mélange eau-éthanol de ratio massique 0,448) (Figure 1-5.c) ⁴³.

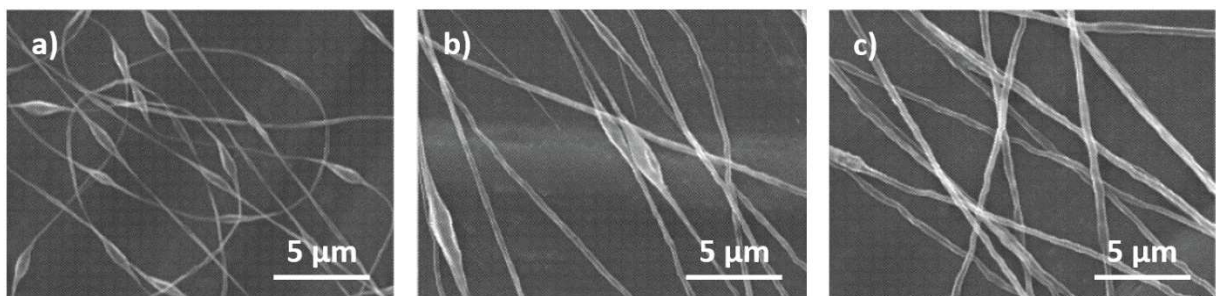


Figure 1-5 : Images MEB de fibres de PEO en solution dans des mélanges eau-éthanol de ratio massique a) 0 (de l'eau seule), b) 0,26 et c) 0,448 ⁴³

Outre une tension de surface élevée, l'eau présente une pression de vapeur saturante assez faible en comparaison avec d'autres solvants organiques (voir Tableau 1-2) ce qui en fait un liquide assez peu volatil. Lors du transport du jet entre l'aiguille et son dépôt sur le collecteur, il est important que tout le solvant soit évaporé afin d'éviter que les fibres ne fusionnent entre-elles pour ne former qu'un film continu, ce qui ferait perdre tout le bénéfice du procédé. Ainsi pour assurer l'évaporation complète de l'eau, on peut jouer sur les paramètres de mise en œuvre du filage, comme par exemple en augmentant la distance aiguille/collecteur.

Tableau 1-2 : Tensions de surface et pressions de vapeur saturante de solvants couramment utilisés en electrospinning ⁴⁴

Solvant	Tension de surface à 20 °C (mN.m ⁻¹)	Pression de vapeur saturante à 21 °C (mmHg)
Eau	72,8	19
Ethanol	22,3	45,7
Acide acétique	27,4	13
Acétone	23,3	194
DMF	35	3,8
Chloroforme	27,2	169
Tétrahydrofurane	28	133
Méthanol	22,6	103

Enfin, l'utilisation de l'eau comme solvant limite le choix des matériaux à electrospinner car tous les polymères ne sont pas hydrosolubles. Par exemple, dans le cas des polysaccharides, la cellulose ou encore la chitine non modifiées ne peuvent être solubilisées que dans un nombre restreint de solvants excluant l'eau ^{34,45}. Par ailleurs, les fibres formées à partir de ces polymères hydrosolubles seront elles-mêmes solubles imposant l'ajout d'une étape de réticulation afin d'obtenir un matériau final insoluble, stable au contact de solutions aqueuses ou de milieux humides lors de son utilisation. Comme pour le choix du solvant, il est important de tenir compte de la toxicité des agents de réticulation qui peuvent être utilisés lors cette étape. Par exemple, le glutaraldéhyde en solution aqueuse ou sous forme de vapeur, est un réactif fréquemment utilisé pour la réticulation de polysaccharides puisqu'il permet de former des ponts entre les groupements amine ou hydroxyle présents sur les chaînes des polymères ⁴⁶. Mais ce composé est aujourd'hui décrié pour ses effets nocifs sur la santé (toxique par ingestion ou inhalation, corrosif pour les voies respiratoires) et sur l'environnement ⁴⁷ en particulier sur les organismes aquatiques ⁴⁸, il est donc important de trouver des alternatives plus adaptées.

1.3.2 L'electrospinning de polysaccharides dans l'eau pure – Etat de l'art

Afin de permettre la mise en forme des fibres de polysaccharides par electrospinning de solutions aqueuses, plusieurs stratégies ont été envisagées et seront présentées par la suite pour chaque polymère.

1.3.2.1 L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire anionique composé de dimères d'acide D-glucuronique et de N-acetyl-D-glucosamine liés alternativement en β -(1 \rightarrow 4) et en β -(1 \rightarrow 3) (sa structure est illustrée en Figure 1-6).

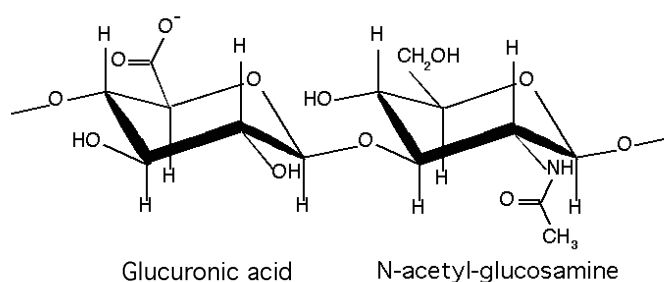


Figure 1-6 : Structure chimique de l'acide hyaluronique

En raison de la conformation de cette liaison β -(1 \rightarrow 3), les molécules d'acide hyaluronique, qui peuvent contenir quelques milliers de résidus monosaccharides, sont enroulées en hélice. Il fut d'abord extrait de sources animales mais il est aujourd'hui majoritairement produit par fermentation microbienne ⁴⁹.

À notre connaissance, la seule méthode de formation de nanofibres à partir d'une solution pure de HA dans l'eau a été réalisée à l'aide d'un procédé d'electroblowing qui combine le procédé classique d'electrospinning à un flux d'air chaud, de débit compris entre 1 et 4,2 m³.h⁻¹, pour des températures allant de 55 à 61 °C ^{38,50}. Une image MEB des fibres de HA formées est visible en Figure 1-7.

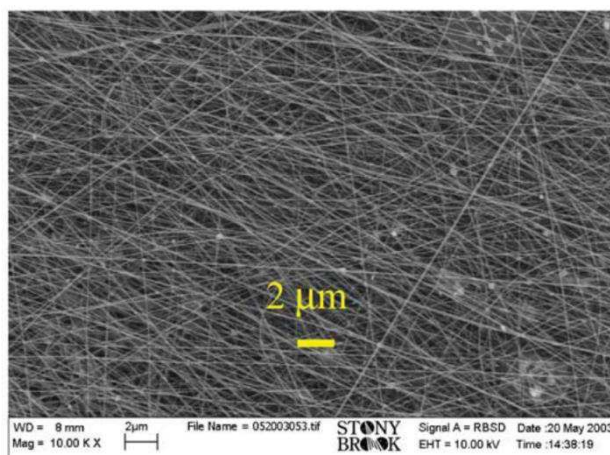


Figure 1-7 : Image MEB de fibres obtenues à partir d'une solution aqueuse de HA (2,5 (w/v) %, $M_w = 3500000 \text{ g.mol}^{-1}$) avec un flux d'air de $4,2 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ à $56 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁵⁰

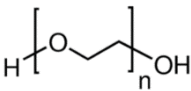
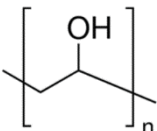
Les fibres obtenues par electroblowing ont des diamètres moyens assez faibles et dépendants de la concentration initiale, puisqu'ils varient de 57 nm pour 2 % (w/v) de HA à 83 nm pour 3 % (w/v) de HA ($M_w = 3\,500\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ et flux d'air $1,96 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ à $57 \text{ }^\circ\text{C}$) [39]. Il a été montré que l'ajout d'un jet d'air à température ambiante ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) ne permettait pas la formation de fibres à partir de HA. C'est seulement à partir de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ qu'une production stable de fibres d'HA est obtenue. En effet, la réussite de ce procédé tient à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, le flux d'air, parallèle au champ électrique, aide à étirer le jet de solution. Ensuite, la température élevée, par rapport au milieu ambiant, permet une diminution de la viscosité de la solution de HA et enfin, l'évaporation du solvant est accélérée par la température et le flux d'air.

Afin de rendre ces fibres d'HA pur insolubles dans l'eau, deux procédés utilisant l'acide chlorhydrique (HCl) ont été mis au point. Le premier consiste à mettre en contact le matériau avec des vapeurs de HCl et le second à le plonger directement dans un mélange éthanol/HCl/eau. Dans ce cas, il s'agirait d'une réticulation physique et non chimique. Des résultats de spectroscopies IR indiquent l'augmentation de concentration des liaisons hydrogène, qui pourraient être responsable de la réticulation du HA dans la membrane. Après avoir adapté les quantités d'éthanol, d'eau et d'HCl et déterminer la durée adéquate d'exposition à la vapeur et à la solution, des fibres stables sur sept jours minimum dans de l'eau à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ont été obtenues⁵⁰.

La deuxième stratégie visant à stabiliser le procédé d'electrospinning et à obtenir des fibres régulières, est de mélanger le HA avec des polymères porteurs synthétiques, bien connus pour leur facilité de mise en forme par d'electrospinning seul dans l'eau⁵¹⁻⁵⁴. Ainsi, du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) a été ajouté à la solution d'HA avec un ratio massique maximum HA:PEO de 2:1⁵⁵⁻⁶⁰ mais aussi de l'alcool

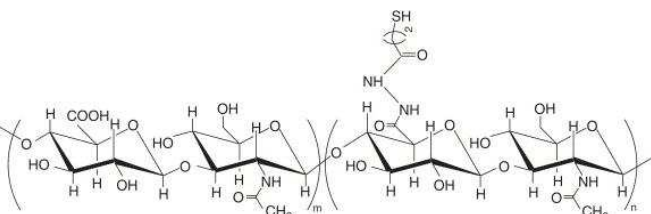
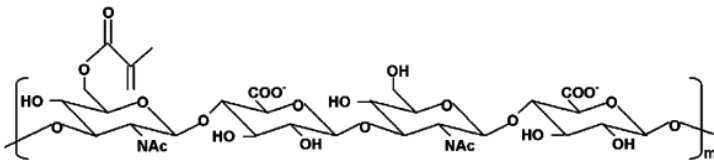
polyvinylique (PVA) mais avec un ratio massique HA:PVA n'excédant pas 1:4⁶¹⁻⁶³ (les structures chimiques de ces deux composés sont illustrés en Tableau 1-3). En effet, les chaînes de PVA étant plus courtes que celles du PEO utilisé pour electrospinning (M_w (PVA) < 125000 g.mol⁻¹ contre 200000 < M_w (PEO) < 900000 g.mol⁻¹), il faut une plus forte concentration en polymère pour atteindre le niveau d'enchevêtrement adéquat.

Tableau 1-3 : Structures chimiques du PEO et du PVA

PEO	PVA
	

Toujours dans le but de rendre ces membranes, obtenues à partir de mélanges HA-polymère synthétique, insolubles dans l'eau, différentes stratégies ont été élaborées. Une des plus directes est la réticulation chimique du matériau final à l'aide de glutaraldéhyde (par formation de ponts entre les groupements hydroxyle présents sur les chaînes des polymères)^{60,62,64}. Une autre, est de modifier les HA par greffage avant l'electrospinning (leurs structures sont visibles en Tableau 1-4). Puis, le simple ajout d'un réactif à la solution avant la mise en forme des nanofibres permet la réticulation du matériau final.

Tableau 1-4 : Structures chimiques des dérivés du HA

HA thiolé ⁵⁷	HA méthacrylate ⁶⁵
	

Par exemple Ji *et al.* ont utilisé un dérivé d'HA thiolé, l'HA modifié par 3,3'-dithiobis(propanoic dihydrazide), et l'ajout de polyéthylène glycol-diacrylate au moment de l'electrospinning (à l'aide de

deux seringues parallèles, l'une contenant le HA et l'autre l'agent réticulant, voir Figure 1-8) permet l'obtention de fibres insolubles dans l'eau ⁵⁷.

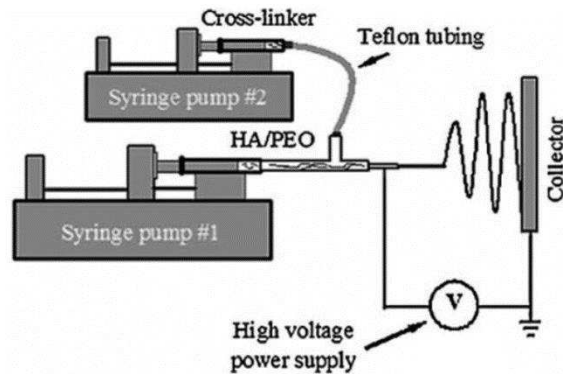


Figure 1-8 : Schéma du dispositif d'électrospinning à double seringue [46]

Kim et al. ont eux préféré ajouter des groupements méthacrylate sur les chaînes de HA qui, en présence d'un photoinitiateur dans les fibres, assurent la photoréticulation du matériau final sous lumière UV ⁵⁹.

1.3.2.2 Le chitosane et ses dérivés

Le chitosane est un polymère cationique linéaire issu de la désacétylation de la chitine, elle-même extraite d'exosquelettes d'arthropodes ou encore de champignons ou de levures. Sa structure consiste en un enchaînement d'unités de N-acétyl- β -D-glucosamine ou de β -D-glucosamine liées en β -(1 \rightarrow 4) ⁶⁶.

Le chitosane n'étant soluble qu'en milieu acide, il n'a pu être électrospinné dans l'eau pure. Sa solubilité varie en fonction de sa masse molaire et de son degré d'acétylation mais la plupart des chitosane sont solubles pour des pH < 6 ^{67,68}. Dans la littérature, le chitosane a été solubilisé dans des solutions aqueuses d'acide acétique de concentration comprises entre 1 et 2 wt % ⁶⁹⁻⁸², ce qui correspond à un pH de 2,88 à 2,62, et qui permet donc une solubilisation rapide du polymère. De plus, la présence d'un polymère porteur, PVA ou PEO, s'avère nécessaire pour former des nanofibres de chitosane. Différents mélanges chitosane:PVA ont été mis en forme par électrospinning avec un ratio massique maximal de 2:3 ⁶⁹⁻⁷⁵. Il en va de même pour les mélanges chitosane:PEO avec, cette fois, un

ratio massique maximal de 9:1 ⁷⁶⁻⁸². La force de répulsion entre les groupes ioniques présents sur le squelette du chitosane limite la formation d'enchevêtrements des chaînes, ce qui empêche la mise en place d'un jet stable lors de l'électrospinning de ce polymère ³⁵. Il a cependant été montré que l'ajout de PEO ou de PVA au chitosane permet la formation de liaisons hydrogène entre les groupes éther du PEO ou hydroxyle du PVA et les groupes hydroxyle et amine du chitosane, ^{36,70}. Les chaînes de polymères synthétiques permettent donc, via ces interactions, de créer des «liens» entre les chaînes de chitosane et ainsi maintenir la cohésion du jet jusqu'au collecteur en palliant au manque d'enchevêtrement du chitosane seul. Dans le cas du PEO, il a été aussi montré que la diminution du ratio massique chitosane/PEO permettait de réduire la conductivité de la solution à électrospinner. En effet, les solutions de chitosane sont plus conductrices que le PEO en raison de leur nature polycationique et des charges positives sur les chaînes polymères, induisant plus d'étirement lors des mouvements de fouet du jet de solution soumis au champ électrique. Mais, ces charges provoquent aussi des interactions répulsives entre les chaînes de chitosane, qui déstabilisent le jet chargé lors de son d'étirement, ce qui entraîne la rupture de ce dernier, ne produisant que des gouttelettes sur le collecteur. Cet ajout de PEO permet de diminuer la conductivité du mélange en remplaçant une macromolécule chargée positivement par une macromolécule neutre, mais aussi en réduisant la protonation du chitosane grâce aux liaisons hydrogène [24].

Afin de rendre ce polymère hydrosoluble sans ajout d'acide, des dérivés du chitosane ont été synthétisés par des modifications chimiques des groupes amine et/ou hydroxyle et ont pu ainsi être électrospinnés dans l'eau pure. Les structures chimiques de ces dérivés sont rapportées dans le Tableau 1-5.

Tableau 1-5 : Structures chimiques des différents chitosanes modifiés

Chitosane non modifié	Chitosane quaternisé ⁸³	Carboxyéthyl chitosane ⁸⁴
Carboxyméthyl chitosane ⁸⁵	Chitosane PEGylé ⁸⁶	Methacrylate glycol chitosane ⁸⁷

Tout d'abord, un chitosane quaternisé, le *N*-[(2-hydroxy-3-triméthylammonium)propyl] chitosane chlorure, a été mélangé à du PVA et ainsi, des fibres composées de 50 wt % de chitosane quaternisé ont pu être facilement formées. Afin de rendre ces fibres résistantes à l'eau, elles ont été réticulées à l'aide de vapeurs de glutaraldéhyde⁸³.

Le carboxyéthyl et le carboxyméthyl chitosane sont deux dérivés du chitosane solubles dans l'eau. Le premier a été électrospinné en présence de PVA et des nanofibres ont pu être produites avec un ratio massique carboxyéthyl chitosane:PVA de 1:1^{84,88,89}. La réticulation des fibres carboxyéthyl chitosane-PVA a été réalisée soit grâce au glutaraldéhyde, soit à l'aide d'un simple recuit. En effet, Mincheva et al. rapportent un procédé de réticulation sans ajout d'agent réticulant, mais seulement par réaction intrinsèque entre le PVA et le carboxyéthyl chitosane, réaction activée par un recuit de 10 h à 100 °C. En l'absence de la bande des C=O à 1720 cm⁻¹ sur les spectres IR (qui est caractéristique des esters), les auteurs supposent que ce sont majoritairement les groupements amines et hydroxyles du carboxyéthyl chitosane qui réagissent lors de la réticulation du matériau formant des liaisons amides entre les chaînes de polymères.

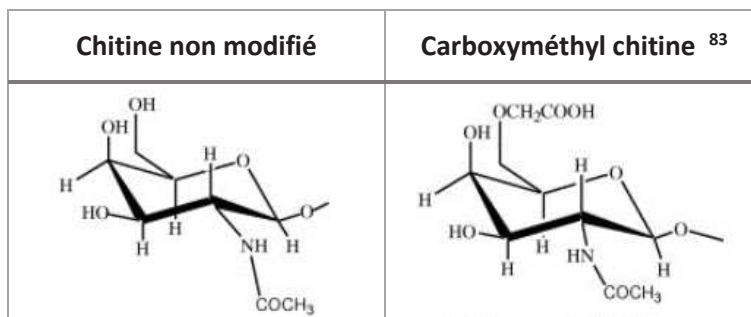
Pour le carboxyméthyl chitosane, deux types de mélange ont été testés, un premier avec le PEO et un second avec le PVA. La formation de fibres la plus efficace a été observée avec le PVA, pour laquelle la quantité de chitosane dans les fibres formées a pu atteindre 80 wt %^{85,90}. Comme pour le carboxyéthyl

chitosane, deux méthodes de réticulation ont été utilisées : soit à l'aide du glutaraldéhyde, soit par un recuit de 30 minutes à 140 °C. Cependant, dans le cas de la réticulation par activation thermique, une immersion supérieure à 3 h des fibres dans l'eau détruit la structure fibreuse du matériau qui prend alors la forme d'un film continu.

Des recherches ont aussi été menées sur le greffage de polyéthylène glycol (PEG), soluble dans l'eau, sur le chitosane. Grâce à ces modifications, des fibres ont pu être formées par electrospinning d'un mélange de chitosane PEGylé et de PEO de ratio massique 4:1 ^{86,91}. Enfin, un chitosane modifié par l'ajout de groupements glycol puis méthacrylate, rendant le polymère à la fois soluble dans l'eau et photoréticulable, a été electrospinné en présence de PEO avec un ratio massique de chitosane modifié:PEO de 7:3. Une fois les fibres formées, il a donc été possible de les réticuler sous lumière UV, formant ainsi un matériau résistant à l'eau ⁹².

Comme pour le chitosane, la chitine a elle aussi été modifiée pour former un dérivé soluble dans l'eau la carboxyméthyl chitine (voir structure en Tableau 1-6)..

Tableau 1-6 : Structures chimiques de la chitine modifiée



Ce composé a été electrospinné dans l'eau en présence de PVA et des fibres sans défauts ont pu être obtenues pour un ratio massique chitine:PVA allant jusqu'à 2:3. Par la suite, ses fibres ont pu être réticulées par des vapeurs de glutaraldéhyde ^{93,94}

1.3.2.3 L'alginate

L'alginate est un polymère linéaire anionique composé de blocs formés d'unités d'acide β -D-mannuronique (M) lié en β -(1 \rightarrow 4) et d'acide α -L-guluronique (G). Les blocs sont composés d'unités G consécutives (GGGGGG), d'unités M consécutifs (MMMMMM) ou d'une alternance d'unités M et G (GMGMGM) (sa structure est illustrée en Figure 0-9). L'alginate disponible dans le commerce est généralement extrait d'algues brunes (aussi nommées Phaeophyceae)⁹⁵.

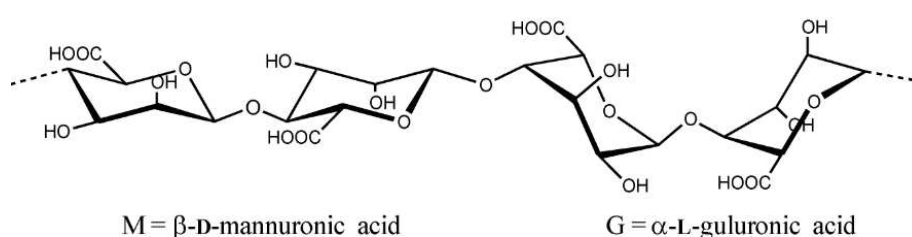


Figure 0-9 : Structure chimique de l'alginate

Encore une fois, les fibres de ce polysaccharide ont pu être obtenues par ajout des polymères porteurs habituels, le PVA et le PEO. Comme pour le chitosane, il a été montré que les molécules de PEO et de PVA forment des liaisons hydrogènes avec l'alginate, réduisant les forces répulsives inter chaînes de l'alginate et permettant l'electrospinning du mélange de polymères⁹⁶. Ainsi des mélanges alginate:PEO⁹⁶⁻¹⁰¹ et alginate:PVA¹⁰²⁻¹⁰⁷ de ratio massique maximum 4:1 pour le premier et 1:1 pour le second ont permis la formation de fibres.

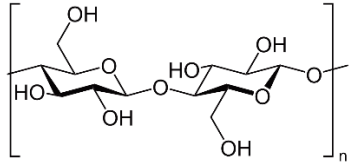
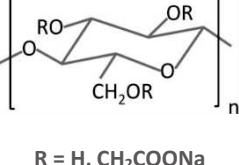
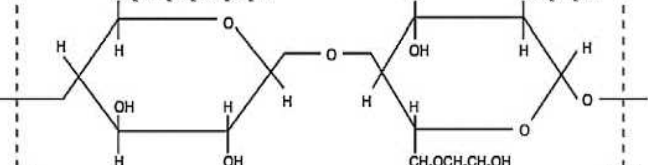
Il a été montré qu'un troisième polymère, naturel cette fois, mélangé à l'alginate pouvait permettre la formation de fibres. Il s'agit de la gélatine, une protéine dérivée du collagène qui peut être extrait de diverses sources animales. En effet ce polymère peut être mis en œuvre seul dans l'eau si le procédé classique d'electrospinning est modifié par l'ajout d'un système de chauffage. A température ambiante, les solutions de gélatine sont à l'état gélifié mais l'augmentation de la température de la solution et/ou de l'enceinte d'electrospinning entre 35 et 55 °C permet de diminuer sa viscosité et de repasser ainsi dans un état liquide autorisant la formation de fibres¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Ainsi, des mélanges alginate/gélatine en solution dans l'eau maintenue à 45 °C ont permis la formation de fibres avec cependant une quantité limitée d'alginate, puisqu'il représente au maximum un peu moins de 12 wt % de la composition finale du matériau¹¹¹.

Les membranes à base d'alginate ainsi obtenues par électrospinning peuvent ensuite être simplement réticulées par immersion dans du dichlorure de calcium en solution dans l'éthanol^{104,107}.

1.3.2.4 Les dérivés de la cellulose

La cellulose est un polysaccharide linéaire composé de motifs D-glucose liés en β -(1 \rightarrow 4). Ce polymère extrait du bois est le plus abondant sur Terre mais, n'étant pas soluble dans l'eau, différents dérivés hydrosolubles ont été synthétisés à partir de ce composé. Les structures chimiques de ces celluloses modifiées sont présentées dans le Tableau 1-7.

Tableau 1-7 : Structures chimiques de différents dérivés de la cellulose

Cellulose	Carboxyméthyl cellulose ¹¹²	Hydroxyéthyl cellulose ¹¹³
	 <p>R = H, CH₂COONa</p>	

La carboxyméthyl cellulose (CMC), couramment utilisée sous forme de sel de sodium, est l'un de ses dérivés les plus largement utilisés¹¹². Elle a été électrospinnée dans l'eau en présence de PEO pour un ratio massique CMC:PEO de 1:1^{114,115} et de PVA mais un ratio CMC:PVA bien moindre (au maximum de 7/93)¹¹⁶.

L'hydroxyéthyl cellulose a elle aussi été utilisée pour la formation de fibres par électrospinning grâce à l'ajout de PVA avec un ratio massique hydroxyéthyl cellulose:PVA maximal de 9:16. Différentes stratégies de réticulation ont été testées sur les fibres issues de ce mélange : soit par ajout de glutaraldéhyde sous forme vapeur¹¹⁷ ou en solution dans l'acétone^{113,118,119} mais aussi par photoréticulation UV grâce à l'incorporation d'un photoinitiateur, le benzoate de sodium, dans le mélange initial¹¹⁷.

Enfin, un moyen original de mise œuvre par électrospinning de la cellulose non modifiée a été proposé par Peresin et al.¹²⁰. Des nanocristaux de cellulose ont été dispersés dans une solution aqueuse de

PVA puis electrospinnés pour former des fibres composites constituées de 15 wt % de cellulose en vue d'améliorer les propriétés mécaniques des fibres de PVA. La membrane finale a ensuite été réticulée par estérification en phase vapeur à l'aide l'anhydride maléique qui permet la formation de ponts ester entre les chaînes de PVA ¹²¹. Comme illustré en Figure 1-10, les fibres ainsi obtenues par electrospinning de PVA et de nanocristaux de cellulose sont homogènes et présentent une surface lisse.

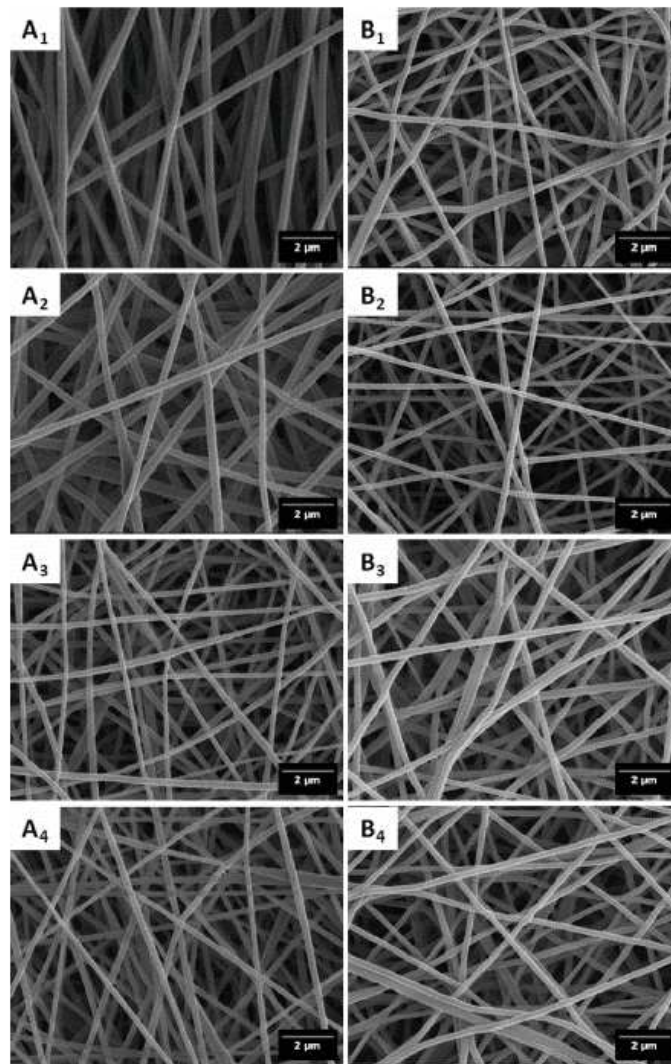


Figure 1-10 : Images MEB de fibres composées de PVA hydrolysé à 98 mol % (A₁₋₄) et de PVA hydrolysé à 88 mol % (B₁₋₄) avec 0 wt % (1), 5 wt % (2), 10 wt % (3) et 15 wt % (4) de nanocristaux de cellulose ¹²⁰

Les propriétés mécaniques de ces fibres composites non réticulées ont été étudiée et lorsque 15 wt % de nanocristaux de cellulose sont ajoutés au PVA entièrement hydrolysé (98 mol %), le module de

conservation E' est multiplié par trois par rapport aux fibres de PVA seul. Cela démontre un transfert de contrainte efficace entre les nanocristaux et le polymère dans les fibres. Dans le cas du PVA partiellement hydrolysé (88 mol %), ce phénomène n'est pas observé. Peresin et al. démontrent par spectroscopie IR la présence de liaisons hydrogène plus fortes entre la cellulose et le PVA lorsqu'il est entièrement hydrolysé générant de meilleures interactions entre le polymère et les nanocristaux ¹²⁰. Dans le cas des fibres de PVA hydrolysé à 98 % réticulé par l'anhydride maléique, il a été montré que l'ajout de nanocristaux de cellulose permet d'améliorer la résistance à la traction ainsi que leur allongement à la rupture ¹²¹.

1.3.2.5 L'amidon et ses dérivés

L'amidon est un mélange de deux homopolymères, l'amylose et l'amylopectine composés de D-anhydroglucopyranose liés en α -(1 \rightarrow 4) qui peut être ramifié via des liaisons α -(1 \rightarrow 6) (illustration des structures chimiques en Figure 1-11).

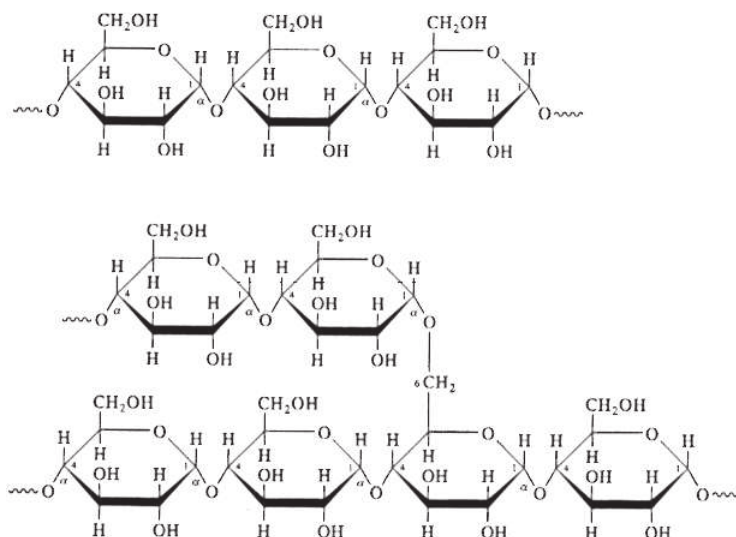


Figure 1-11 : Structure chimique de l'amylose (haut) et de l'amylopectine (bas)

L'amylose présente peu de ramifications alors que l'amylopectine est hautement ramifié (avec un niveau de branchement de l'ordre de 5-6 %). Le ratio entre l'amylose et l'amylopectine varie en fonction de la source botanique de l'amidon (graines, tubercules, rhizomes etc..) ¹²².

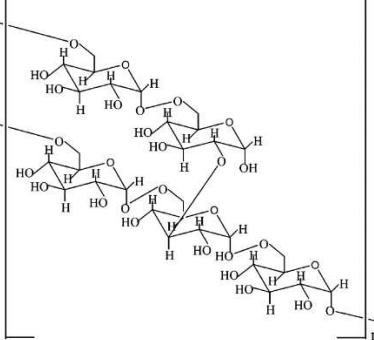
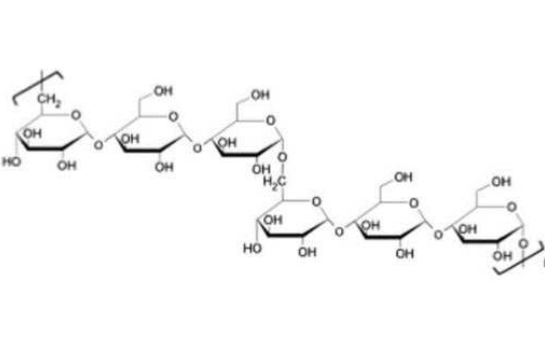
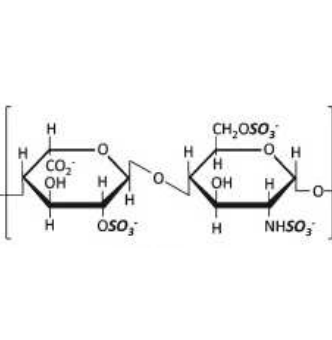
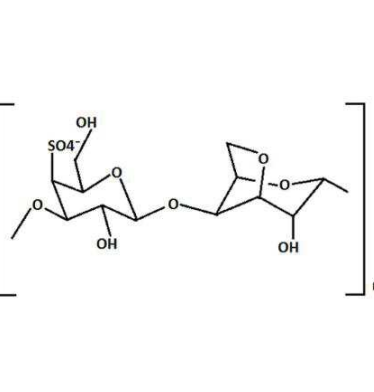
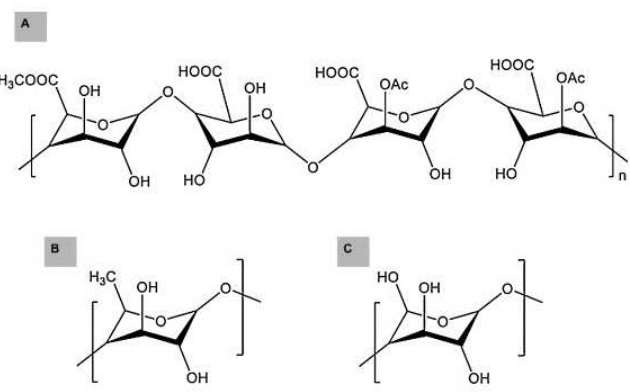
Sutjarittangtham et al. ont montré qu'il était possible de former des fibres par l'électrospinning d'amidon issu de tapioca pur en solution dans l'eau ²⁷. Pour d'autres formes de l'amidon, l'ajout de PVA avec un ratio massique maximum de 1:1 a été nécessaire pour l'obtention de fibres ^{123,124}. Ces différences peuvent s'expliquer par la quantité d'amylose présente dans l'amidon, puisqu'il a été rapporté que cette macromolécule joue un rôle essentiel dans la formation des fibres d'amidon par electrospinning. En effet, l'amylopectine a une structure de chaîne rigide, ne permettant qu'un faible taux d'enchevêtrement alors que l'amylose présente à l'inverse une structure hautement enchevêtrée en solution aqueuse. Ainsi, il a été possible de former des fibres à partir d'amidon à haute teneur en amylose, ce qui a été impossible dans le cas contraire ¹²⁵.

Enfin, un amidon modifié, l'hydroxypropyl amidon, a lui aussi été electrospinné en présence de PEO avec un ratio massique amidon:PEO de 4:1. Afin de rendre les fibres ainsi formées insolubles dans l'eau, celles-ci ont été recouvertes de poly(méthacrylate de méthyle (PMMA). Pour cela, les membranes ont été immergées dans une solution de chloroforme contenant 1 wt % de PMMA puis laissées sécher pour assurer la réticulation ¹²⁶.

1.3.2.6 *Autres polysaccharides*

D'autres polysaccharides, un peu moins courants, ont été mis en forme par electrospinning, leur structure chimique est illustrée dans le Tableau 1-8.

Tableau 1-8 : Structures chimiques de divers polysaccharides

Dextrane	Pullulane	Héparine
		
k-carraghénane	Pectine	
	 <p style="text-align: right;"> <i>A- Acide galacturonique</i> <i>B- Rhamnose</i> <i>C- Xylose</i> </p>	

C'est le cas du dextrane, un polymère d'origine bactérienne, composé de D-glucopyranose liés en α -(1 \rightarrow 6) avec des chaînes ramifiées liées en α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) ou α -(1 \rightarrow 4). Il est un des rares polysaccharides à partir duquel il est possible de former des nanofibres par simple electrospinning de solution aqueuse, sans ajout de polymère. Ce résultat a été rapporté par Jiang H. et al.¹²⁷ où le dextrane electrospinné a été modifié par l'ajout de groupements méthacrylates, afin de permettre une photoréticulation post electrospinning.

Le pullulane est un polymère linéaire issu de champignons souvent utilisé comme additif alimentaire. Il est composé de trois unités de maltotriose liées entre elles par des liaisons osidiques du type α -(1 \rightarrow 4) à nouveau liées à un groupement de trois unités par une liaison osidique α -(1 \rightarrow 6). Comme le dextrane, il a été rapporté que le pullulane pouvait être electrospinné seul en solution dans l'eau^{33,128}. Stijnman et al. expliquent que l'absence de charge sur les chaînes du dextrane et du pullulane ainsi qu'un taux d'enchevêtrement élevé permettent la formation de fibres par electrospinning de ces polymères en solutions aqueuses¹²⁹.

Un troisième polymère, l'héparine, un polysaccharide trisulfaté composé de dimères 2-O-sulfo- α -L-iduronic acid et 6-O-sulfo-N-sulfo- α -D-glucosamine, a été électrospinné en présence de PEO avec un ratio massique héparine:PEO de 1:4¹³⁰. Des nanofibres ont aussi été formées à partir d'héparine modifiée par l'ajout de groupements thiol en présence de PEG fonctionnalisés par des groupements maléimide et de PEO (avec pour concentrations respectives 1 wt %, 1 wt % et 2 wt %). La fonctionnalisation de l'héparine et du PEG permet une réticulation des fibres *in situ* et puis, après dissolution du PEO, un matériau nanoporeux est obtenu¹³¹.

Le carraghénane est un polymère extrait d'algues rouges composé d'un squelette linéaire de D-galactose et 3,6-anhydro- D-galactose partiellement sulfaté liés en β -(1 \rightarrow 4) ou α -(1 \rightarrow 3). Sa forme Kappa, avec un groupe sulfate, est l'une des plus utilisées dans l'industrie alimentaire en tant qu'agent épaississant. Des fibres composées de k-carraghénane ont pu être obtenues par électrospinning grâce à un mélange avec du PEO mais avec une concentration finale en k-carraghénane très limitée car 14 fois plus faible que celle du PEO¹³².

Enfin, les pectines sont des polysaccharides retrouvés dans différents fruits et sont composées en majorité d'unités acide α -D-galacturonique liées en α -(1 \rightarrow 4) partiellement méthylées ou acétylées qui forment la partie linéaire du squelette et de faibles quantités d'unités α -L-ramnose et de xylogalacturonane plus ou moins ramifiés. Différents essais d'électrospinning de pectines en présence de PEO en solution dans l'eau pure ont permis l'obtention de nanofibres avec une teneur en pectine maximum de 50 wt % dans les fibres finales^{133,134}.

La combinaison des propriétés propres à chaque polysaccharide ainsi que de la nanostructuration apportée par le procédé d'électrospinning font des membranes nanofibreuses des matériaux recherchés dans de nombreux domaines. Ces dernières décennies, c'est dans le domaine biomédical que ces matériaux ont trouvé de nombreuses applications. Le développement de telles membranes pour des applications pansements sera discuté dans la partie suivante.

2 MEMBRANES NANOFIBREUSES EN POLYSACCHARIDE POUR DES APPLICATIONS PANSEMENTS

2.1 AVANTAGE DE LA NANOSTRUCTURATION DES MEMBRANES POUR DES APPLICATIONS PANSEMENTS

2.1.1 Processus de cicatrisation et apports du pansement

La peau, le plus grand organe du corps humain, se comporte comme une barrière présentant des fonctions protectrices, immunologiques, thermorégulatrices et sensorielles. Elle est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme qui sont illustrées en Figure 1-12. L'épiderme est constitué de couches de kératinocytes (cellules synthétisant la kératine, une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau) servant de barrière contre les agents infectieux et la déshydratation. Le derme, sous l'épiderme, est un tissu conjonctif formé de matrice extracellulaire (MEC). Cette MEC est constituée de protéines (collagène, élastine, fibronectine et laminine), de glycosaminoglycanes (GAG) comme l'HA et de protéoglycanes (combinaison d'une protéine et d'un GAG). Cette couche apporte à la peau son élasticité et sa résistance mécanique et est parcourue par les systèmes vasculaire et lymphatique ainsi que des faisceaux de nerfs. Enfin, l'hypoderme, composé majoritairement de tissus adipeux et de collagène, fait le lien entre le derme et le muscle ou l'os¹³⁵⁻¹³⁷.

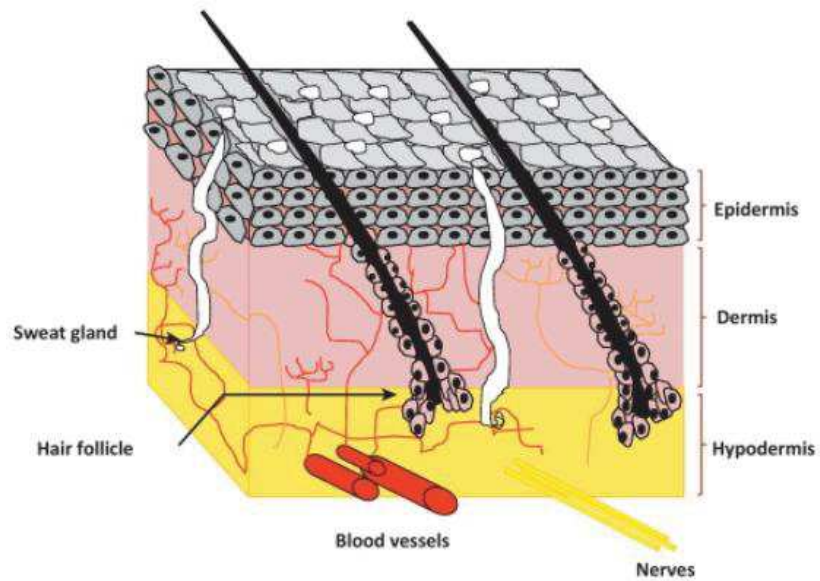


Figure 1-12 : Représentation de peau humaine illustrant les trois couches constitutives ¹³⁶

Une rupture dans la continuité de la structure de la peau, résultant généralement d'un traumatisme physique, chimique, thermique ou d'un dysfonctionnement de l'organisme, est désignée comme une plaie. La peau ne peut donc plus jouer son rôle protecteur et le risque d'infection est alors élevé. Bien que la peau ait des capacités d'autoréparation, l'application d'un pansement qui va protéger et recouvrir la plaie peut être nécessaire. Il va ainsi aider à une meilleure cicatrisation en isolant la blessure du milieu extérieur et, dans certains cas, pouvoir même activer le recouvrement de la plaie

138,139

Le microenvironnement d'une plaie en cours de guérison est complexe, le développement de pansements appropriés nécessite donc quelques connaissances concernant les mécanismes mis en œuvre lors de la cicatrisation. Comme illustré en Figure 1-13, le processus de cicatrisation se divise en quatre étapes complémentaires se mettant en place les unes après les autres : l'homéostasie, l'inflammation, la prolifération et le remodelage.

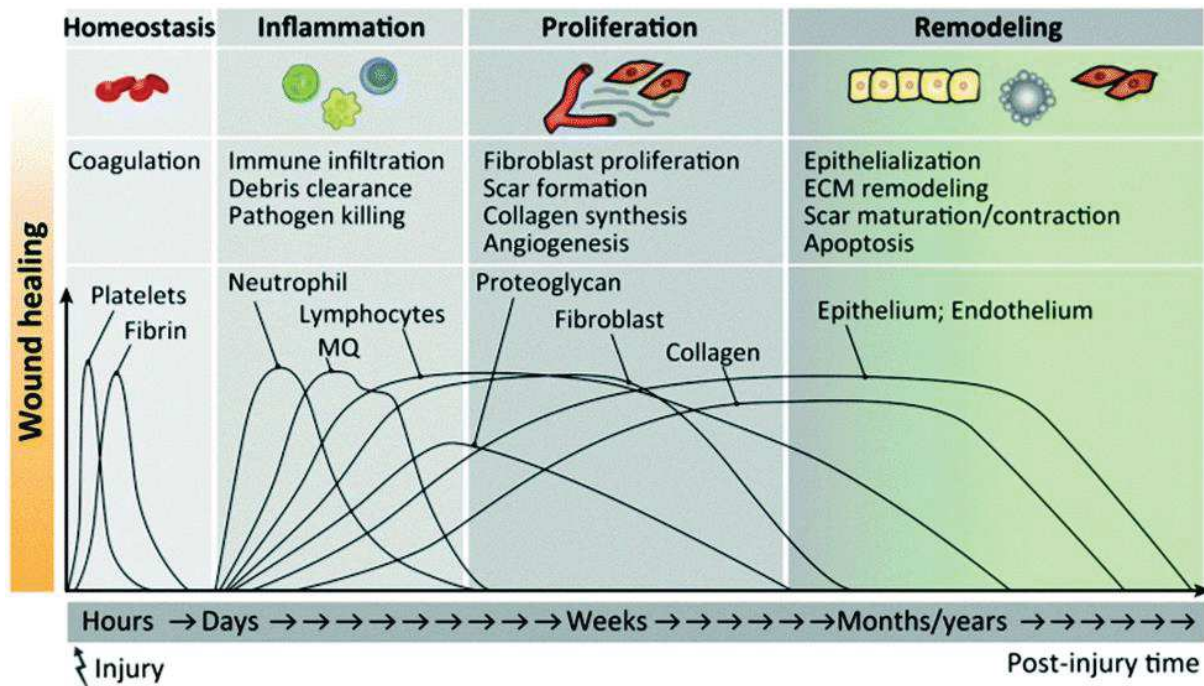


Figure 1-13 : Chronologie des phases du modèle classique de cicatrisation (MQ : macrophages)¹⁴⁰

L'homéostasie est la réponse immédiate de l'organisme à la blessure (quelques secondes ou minutes après celle-ci) afin d'arrêter la perte de sang au niveau de la plaie par la constriction des vaisseaux sanguins et par la formation d'un bouchon plaquettaire, suivi d'un caillot de fibrine. S'ensuit alors une **phase d'inflammation** au cours de laquelle les cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les monocytes, sont attirées au niveau de la blessure par les cytokines libérés par les plaquettes. Les neutrophiles éliminent les bactéries, les corps étrangers et les cellules mortes de la plaie et sont suivis par les monocytes, qui se différencient ensuite en macrophages. Tandis que les macrophages phagocytent les organismes étrangers ainsi que les neutrophiles morts, ils stimulent aussi le mouvement des fibroblastes et des cellules épithéliales dans la plaie. Ces cellules, associées aux kératinocytes, sont essentielles dans la **phase de prolifération** qui va s'étendre sur quelques jours à semaines. Elle est caractérisée par une réépithélialisation (production de collagène, de GAGs et de protéoglycanes, composants de la MEC), une angiogenèse (développement de nouveaux vaisseaux sanguins) et la formation d'un tissu, dit de granulation, qui remplace le caillot de fibrine. Les fibroblastes ont alors tendance à se différencier en myofibroblastes, des cellules capables de favoriser la fermeture et le remodelage de la plaie. Lors de la régression du tissu de granulation, c'est-à-dire la fermeture de la plaie, vient la **phase de remodelage** qui peut durer plus d'un an. L'apoptose de la

plupart des cellules vasculaires, macrophages et myofibroblastes, entraînent alors la formation de tissu cicatriciel et le réarrangement et l'orientation des fibres de collagène permettent de renforcer la peau ^{39,140-142}.

En 2021, le marché mondial des pansements devrait dépasser 8,4 milliards de dollars, une augmentation de près de 6 % par rapport à 2016. D'un secteur à l'autre, les augmentations devraient être variables, les plus faibles correspondant aux pansements de gazes traditionnels et les plus élevées à des systèmes plus évolués, comme des matériaux bioactifs ¹². Cette nouvelle génération de pansements est basée sur la création d'un milieu optimal conduisant à une cicatrisation la plus efficace possible. Pour cela, différents paramètres sont à prendre en compte. Tout d'abord, le maintien de la plaie dans un environnement humide permet d'éviter la déshydratation et la mort des cellules, et favorise l'angiogenèse et la synthèse du tissu conjonctif ¹⁴³. En revanche, un excès d'exsudat au niveau de la blessure peut aussi bloquer la prolifération et l'activité des cellules et causer la dégradation de la MEC et des facteurs de croissance, ce qui peut retarder la cicatrisation. Par conséquent, l'élimination de l'excès d'exsudat est d'une grande importance pour une guérison efficace. De plus, un échange gazeux permet l'oxygénation tissulaire et, ainsi, la stimulation de l'épithélialisation et la formation de fibroblastes. Un pansement doit donc être suffisamment perméable pour permettre l'échange d'air et l'évacuation de l'excès d'exsudat, tout en maintenant la plaie dans un environnement humide. Bien sûr, l'un des rôles clés du pansement est d'empêcher l'accès de la plaie aux bactéries et ainsi de prévenir toute contamination qui pourrait prolonger la phase inflammatoire, inhiber la migration épidermique, induire des lésions tissulaires supplémentaires et même, dans les cas les plus graves, s'étendre hors de la plaie provoquant une septicémie ^{12,139}. Enfin, les pansements doivent aussi apporter une protection mécanique (afin d'éviter tout contact physique qui pourrait conduire à la réouverture de la plaie), être faciles à enlever et à changer, ne pas provoquer de réactions allergiques, être non toxiques et biocompatibles et si possible permettre de réduire la douleur liée à la plaie ¹⁴⁴.

Depuis l'antiquité, différents matériaux ont été utilisés pour recouvrir et protéger des plaies. De l'argile, du miel mais aussi des tissus à bases de lin ou de laine étaient couramment utilisées comme pansements ¹. On trouve aujourd'hui plus de 3000 pansements différents sur le marché, qui sont adaptés à différents types de plaies et qui se répartissent en trois catégories ¹⁴⁵.

Les plus répandus sont les matériaux passifs qui sont des pansements secs, tels que la gaze, les bandages, le tulle..., et qui ne servent qu'à recouvrir la plaie pour éviter les frottement ou autres traumatisme physiques et limiter la contamination ¹³⁹. Ces pansements sont généralement peu onéreux mais nécessitent de fréquents changements pour éviter la macération de la plaie. Ce type de

matériaux peut aussi adhérer à la plaie, ce qui rend leur retrait douloureux et peut endommager le tissu cicatriciel. Ces pansements sont indiqués pour les plaies sèches et propres avec peu d'exsudats¹⁴⁵.

Les deuxièmes types de pansements sont des matériaux interactifs contenant des films polymères et/ou des mousses perméables à la vapeur d'eau et à l'oxygène. Ils ont été développés pour faciliter la cicatrisation de la plaie en plus de la protéger de la contamination. On retrouve dans cette catégorie les films semi-perméables qui sont généralement composés de polyuréthane et qui permettent la transmission de la vapeur d'eau, de l'oxygène et du CO₂. Étant transparents, l'inspection de la plaie est possible sans retrait du pansement¹⁴⁶. Des mousses polymères semi-perméables sont aussi disponibles pour les plaies avec une grande quantité d'exsudat¹⁴⁷. Toujours dans la famille des matériaux interactifs, on trouve les hydrogels fabriqués à partir de polymères synthétiques (comme le polyvinylpyrrolidone ou les polyméthacrylates) ou naturels (comme la cellulose) et qui présentent une teneur élevée en eau (supérieure à 70 %) ¹⁴⁵. Ils peuvent être utilisés pour des plaies nécrosées afin de réhydrater et éliminer les tissus morts¹³⁹. On trouve aussi des pansements hydrocolloïdes qui sont composés d'une couche interne composée d'un polymère gélifié (carboxyméthylcellulose, gélatine et pectine) et d'une couche externe, constituée d'un élastomère et d'adhésif¹⁴⁶. Ils fournissent de l'humidité aux plaies sèches, peuvent absorber une petite quantité d'exsudat, et faciliter l'élimination des tissus nécrosés¹².

Le dernier type de pansement est le matériau bioactif, fabriqué à partir de biomatériaux jouant un rôle important dans le processus de guérison. Dans cette catégorie on retrouve les pansements à base d'alginate qui peuvent absorber 15 à 20 fois leur poids en liquide, ce qui les rend appropriés pour les plaies très exsudatives¹⁴⁶. Au contact des liquides de la plaie l'alginate se solubilise partiellement pour former un gel à la surface des tissus lésés. Les ions de calcium sont alors libérés et amplifient le phénomène de coagulation, conférant au pansement d'importantes propriétés hémostatiques¹⁴⁷. D'autres pansements bioactifs sont composés de collagène qui initie la formation de fibroblastes et accélère la migration des cellules lors du contact avec la plaie, d'HA dont les propriétés seront développées dans la suite du manuscrit mais aussi de chitosane qui favorise la formation de tissu de granulation au cours du stade de prolifération de la cicatrisation de la plaie¹⁴⁵.

Un peu à l'écart de ces trois familles, on retrouve les pansements médicamenteux qui sont composés d'un matériau support (pansement passif, interactif ou bioactif) dans lequel est incorporé un principe actif jouant, directement ou indirectement, un rôle dans le processus de guérison de la plaie. Les composés couramment incorporés dans ce type de pansement incluent des agents antimicrobiens

(particules d'argent, molécules antibiotiques...), des facteurs de croissance ou encore des enzymes (la papaïne et la collagénase sont par exemple utilisés pour digérer les tissus nécrosés) ¹⁴⁵.

Comme décrit dans ce paragraphe, des pansements ont été développés à partir de différents matériaux et/ou avec des structurations spécifiques afin d'accompagner au mieux toutes les étapes de guérison de la plaie. Parmi les différentes structurations possibles, une nouvelle forme de pansement est en train d'émerger, ce sont les membranes nanostructurées produites par electrospinning.

2.1.2 Pansements mis en forme par electrospinning

Depuis une vingtaine d'année, les recherches concernant la fabrication de pansements sous forme de matériaux nanofibreux se sont fortement accélérées. Le rapport surface/volume élevé, la porosité et l'organisation tridimensionnelle des matériaux obtenus par electrospinning sont des caractéristiques recherchées dans divers domaines d'applications comme la filtration, la catalyse, le textile... Mais c'est pour la mise en forme de pansement et l'ingénierie tissulaire que ces caractéristiques deviennent cruciales. En effet, ces matériaux nanofibreux obtenus à partir de solutions polymères sont capables d'imiter la structure de la MEC, puisque les GAGs et protéines qui la composent forment un réseau fibrillaire tridimensionnel ^{39,148-151}. Des exemples de ces réseaux nanofibreux présents chez les animaux et dans le corps humain sont présentés en Figure 1-14.

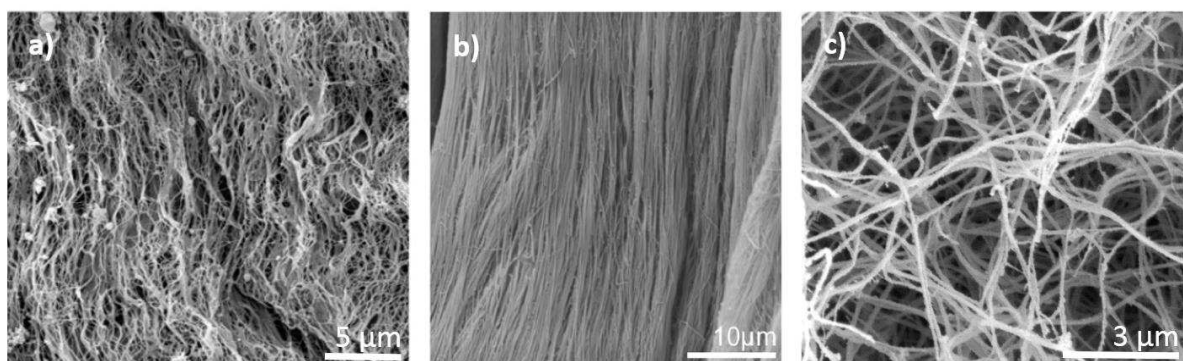


Figure 1-14 : Exemples de structures nanofibreuses retrouvées dans des a) valves aortiques décellularisées ¹⁴⁸, b) tendons décellularisés ¹⁴⁹, c) caillot de fibrine (formé sur une plaie durant la phase l'homéostasie) ¹⁵⁰

Ainsi, les matériaux élaborés par electrospinning sont par leur structure, les plus à même de mimer une peau laissée à la surface d'une plaie. Cette structure biomimétique permet aux matériaux produits par electrospinning d'offrir de multiples avantages en comparaison de pansements « traditionnels ». Ces propriétés sont résumées dans la Figure 1-15.

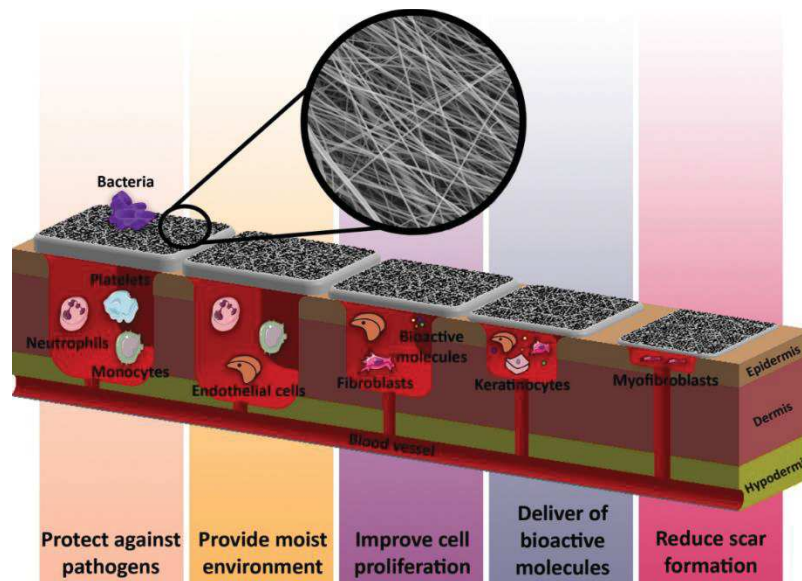


Figure 1-15 : Représentation des propriétés proposées par les pansements nanostructurés ⁵

Tout d'abord, en raison du rapport surface/volume élevé des nanofibres, ils présentent une forte capacité à absorber l'eau, de 17,9 à 213 %, là où les pansements classiques sous forme de films ne présentent qu'une absorption d'eau de prêt de 2 % ^{139,152}. De plus, si des polymères hydrophiles sont utilisés dans la confection de ces pansements nanostructurés, l'absorption des exsudats pourra être encore plus efficace. Cette structure poreuse confère aussi au matériau une semi-perméabilité, qui permet les échanges de gaz nécessaires aux cellules sans toutefois assécher la plaie, la maintenant dans un milieu humide approprié à la cicatrisation. En outre, la taille réduite des pores (allant de la dizaine de nanomètres à quelques micromètres ¹⁵³) empêche le passage des bactéries, protégeant ainsi la plaie de toute infection ^{5,138,139,152}. Ces membranes peuvent être facilement fonctionnalisées par l'incorporation dans les fibres d'agents thérapeutiques lors de l'electrospinning ou par une post fonctionnalisation. Les surfaces spécifiques souvent très élevées des membranes nanofibreuses (de quelques dizaines de $m^2.g^{-1}$ jusqu'à plus de $500 m^2.g^{-1}$ ¹⁵⁴) favorise la libération de ces principes actifs. En fonction du stade du traitement et de la fonctionnalité souhaitée, différents actifs ont été incorporés comme des antiseptiques, des antifongiques, des anti-inflammatoires, des vasodilatateurs,

mais aussi des facteurs de croissance (substances nécessaires à la croissance d'organismes tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales...) ou même des cellules (kératinocytes par exemple)¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Enfin, il a été montré que l'utilisation de nanofibres biodégradables pouvait permettre de d'améliorer l'aspect esthétique d'une cicatrice. La structure tridimensionnelle du pansement favorise en effet sa colonisation par les cellules, ainsi la cicatrisation en est facilitée, induisant la formation d'une peau saine^{139,152}. D'un point de vue mise en œuvre, l'électrospinning s'effectue, dans la plupart des cas, à température ambiante contrairement à de nombreux procédés nécessitant le chauffage du polymère avant mise en forme des fibres (comme le filage en voie fondu par exemple). Ce procédé sans chauffage évite la dénaturation des polymères mis en jeu ainsi que la dégradation de principes actifs thermosensibles incorporés dans les fibres. En contrepartie, le rendement de fabrication de fibres par électrospinning est assez faible ; les débits de solution pour un dispositif à une seule aiguille étant de l'ordre de 1 mL.h⁻¹¹⁵⁸. Ce procédé est donc plutôt réservé à des applications spécifiques, à hautes valeurs ajoutées.

Comme expliqué précédemment, le procédé d'électrospinning permet de mettre en œuvre une multitude de polymères dont les polysaccharides. Ainsi, en combinant les propriétés intrinsèques de ces macromolécules et celles structurelles des membranes produites par électrospinning, il est possible de produire des pansements bioactifs, répondant aux besoins des patients et adaptés aux attentes du marché.

2.2 AVANTAGES DE L'HA POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES

En raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité, faible immunogénicité et bioactivité unique, les polysaccharides sont de plus en plus utilisés dans l'élaboration de dispositifs médicaux.

Le HA est naturellement présent dans le corps humain, ce polymère est donc entièrement biocompatible mais aussi biodégradable, puisque la présence d'enzymes, les hyaluronidases, permettent de rompre les chaînes de HA en clivant la liaison glycosidique β -(1 → 4)¹⁵⁹. Un individu de 70 kg a environ 15 g de HA, dont un tiers est dégradé et se renouvelle quotidiennement¹⁶⁰.


La masse molaire de l'HA peut atteindre 10⁷ g.mol⁻¹ ce qui lui confère des propriétés rhéologiques uniques qui en font un composé indispensable à de nombreux être vivants. On le retrouve notamment dans différentes parties du corps : le liquide synovial où il permet la lubrification des articulations et l'absorption de chocs ; l'humeur vitrée, corps transparents qui remplit l'espace situé entre le cristallin

et la rétine ; et le cartilage où il assure le maintien de sa structure. Comme expliqué précédemment, chez l'être humain on peut aussi retrouver le HA dans la peau, localisé majoritairement dans l'espace intercellulaire avec une concentration pouvant atteindre 2,5 g.L⁻¹. Son rôle principal est alors d'immobiliser les molécules d'eau dans le tissu et permet de changer le volume dermique, maintenant la peau à un taux d'hydratation adéquat. Il joue aussi un rôle défensif puisqu'il permet de piéger les radicaux libres générés par les rayons UV, qui peuvent endommager le matériel génétique des cellules et ainsi causer leur mort ^{161,162}. Enfin, au-delà de ses propriétés structurales, il joue aussi un rôle prépondérant lors de la cicatrisation d'une plaie. En effet, durant le processus de cicatrisation, la quantité de HA va rapidement augmenter au niveau de la plaie pour atteindre un maximum après trois jours pour ensuite diminuer. Dès les premiers instant de la blessure, le HA vient s'accumuler dans la plaie formant une matrice support pour la construction du caillot de fibrine ¹⁶⁰. Le HA, de par sa nature hygroscopique, crée un environnement favorable à la migration des cellules vers de nouveaux sites tissulaires et permet ainsi l'afflux de fibroblastes et de cellules endothéliales vers le site de la plaie, qui seront par la suite nécessaires à la formation du tissu de granulation ^{163,164}. Le HA joue également un rôle modulateur dans la phase d'inflammation, grâce à son action sur les radicaux libres, son effet antioxydant, par l'exclusion des enzymes responsables de la dégradation des tissus ou par son action sur certains facteurs de croissance responsables de l'inflammation ¹⁶⁵. Il intervient aussi lors de la formation de nouveau vaisseau sanguin (phase d'angiogenèse) et dans la modulation de la réponse immunitaire. Ces trois propriétés vont varier suivant la taille de chaînes polymère impliquées : les HA de hautes masses molaires étant connus pour être anti-inflammatoires, inhibiteurs d'angiogenèse et immunosuppresseurs (ils empêchent le corps de rejeter un tissu étranger par exemple) alors que ses oligomères (variant de 3 à 50 unités de disaccarides) sont plutôt inflammatoires, promeuvent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et stimulent les défenses immunitaires ^{166,167}. Même le plus petit fragment de HA, le tétrasaccharide, a des fonctions spécifiques, puisqu'il est capable de supprimer l'apoptose des cellules ¹⁶⁰.

Ainsi, le rôle de l'HA tant au niveau structurel que fonctionnel lors de la cicatrisation en font un matériau de choix pour le développement de pansements. De par sa nature hygroscopique, un matériau formé d'HA est en effet capable d'absorber un excès d'exsudat tout en maintenant le site de la plaie hydraté. Il a été montré que l'HA (sous forme de film, de gel, de membrane fibreuse ou encore de mousse) permet une cicatrisation plus rapide de simples escarres dans la peau, de brûlures de premier et deuxième degrés, mais aussi de plaies chroniques, comme un ulcère de la jambe tout en diminuant la douleur du patient ^{165,168}. Il a aussi été rapporté que la présence de ce polysaccharide améliore l'aspect final d'une cicatrice car un environnement riche en HA peut inhiber certaines cellules

responsables de la formation du tissu cicatriciel et ainsi améliorer son apparence ^{165,169}. Dans le commerce, les pansements à base d'HA se retrouvent sous différentes formes : des compresses stériles imprégnées d'HA (IALUSET®) ¹⁷⁰, des membranes composées d'une couche en contact avec la blessure formée à partir d'un dérivée d'HA sous forme fibreuse et d'une couche externe constituée d'une membrane de silicone semi-perméable (Hyalomatrix®) ¹⁶⁵, sous forme de gel (Vulnamine®) ¹⁷¹... Ces matériaux sont présentés en Tableau 1-9.

Tableau 1-9 : Illustration de pansements à base d'HA

Comresse Ialuset ¹⁷²	Membrane Hyalomatrix ¹⁶⁵	Gel Vultamine ¹⁷¹
		

Ces dispositifs médicaux, bien qu'intégrant l'HA à leur composition, restent relativement simples et leur structuration assez rudimentaire. La formation de matériaux nanostructurés base d'HA par electrospinning pourrait donc permettre d'allier les différents atouts liés à la nanostructuration du matériau mais aussi à sa composition propre. Les différentes méthodes permettant la mise en forme de nanofibres par electrospinning du HA ont été présentées précédemment (paragraphe 1.3.2.1) mais celles-ci restent aujourd'hui à l'état de recherche.

Conclusion

Les différents dispositifs médicaux utilisés pour protéger les plaies et aider la cicatrisation ont connu de nombreuses avancées ces dernières décennies, permettant la création de pansements adaptés à différents types de plaie. Parmi les divers matériaux disponibles aujourd'hui, on retrouve des membranes nanostructurées élaborées par electrospinning.

Notre étude visant à utiliser des polysaccharides mis sous forme de nanofibres pour obtenir des propriétés particulières, la mise en forme de matériaux nanofibreux par electrospinning de polysaccharides a été présentée. Il a été montré que l'utilisation de l'eau pour mettre les polymères en solution permettait de s'affranchir de l'emploi de solvants organiques ou d'acides pouvant poser des problèmes de toxicité. L'eau présentant une tension de surface élevée et une tension de vapeur saturante assez faible, ce solvant rend plus compliqué la mise en forme de fibres. Toutefois, différentes stratégies ont été développées afin de pouvoir electrospinner les polysaccharides à partir de solutions aqueuses comme l'ajout d'un polymère porteur, la modification chimique de la macromolécule ou encore l'ajout d'un flux d'air chaud.

Par la suite, Il a été montré que les membranes formées par electrospinning, en mimant la structure de la MEC, pouvaient permettre la formation d'une nouvelle génération de pansements, basée sur la création d'un milieu de cicatrisation optimal afin d'obtenir la guérison la plus efficace possible.

Parmi tous les polysaccharides existants, l'HA est connu pour son rôle prépondérant dans le corps humain et en particulier lors du processus de cicatrisation. La combinaison des propriétés intrinsèques de l'HA et de la nanostructuration apportée par la mise en forme par electrospinning pourrait donc permettre la formation d'une nouvelle génération de pansements permettant à la fois de protéger la plaie et d'aider au processus de cicatrisation.

CHAPITRE 2 - LA FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES INSOLUBLES A PARTIR DE MELANGES HA-PVA-HPBCD

Introduction

L'objectif de ce chapitre est de former une membrane **nanofibreuse biocompatible et insoluble dans l'eau** par **electrospinning d'HA, de PVA et d'HP β CD en solution aqueuse**.

Dans un premier temps, l'influence de la **concentration des composants** ainsi que des **paramètres ambiants** (humidité relative et température) sur la mise en forme de fibres par electrospinning sera étudiée, afin d'obtenir un **procédé stable** permettant la mise en forme de membrane nanofibreuse.

Dans un second temps, nous nous pencherons sur la mise en place de la **réticulation** du matériau par l'**EDC** et le **NHS**. L'influence de la concentration des deux réactifs sur l'electrospinning et la réticulation sera étudiée et nous verrons l'importance de l'ajout d'une **étape de recuit** sur la réticulation de la membrane. Puis le matériau final sera caractérisé par spectroscopie IR et MEB environnemental.

Enfin, la **biocompatibilité** du matériau sera évaluée par des tests de cytotoxicité et la **biodégradation** des membranes au contact de hyaluronidase sera étudiée.

**CHAPITRE 2 - LA FORMATION DE MEMBRANES NANOFIBREUSES INSOLUBLES A PARTIR DE
MELANGES HA-PVA-HPβCD..... 69**

1	FORMATION DE FIBRES HA-PVA-HPβCD PAR ELECTROSPINNING.....	71
1.1	<i>Formation de pansements par electrospinning de l'HA dans l'eau – Notre stratégie.....</i>	71
1.1.1	Ajout de PVA	72
1.1.2	Ajout de la HPβCD	73
1.2	<i>Vers une stratégie d'élaboration de nanofibres d'HA en voie aqueuse.....</i>	79
1.3	<i>Etude de l'influence de paramètres ambiants.....</i>	86
1.3.1	L'influence de l'humidité relative	86
1.3.2	L'influence de la température	91
2	MEMBRANES INSOLUBLES : RÉTICULATION ET CARACTÉRISATIONS.....	93
2.1	<i>réticulation des membranes HA-PVA- HPβCD</i>	93
2.1.1	Le choix des agents réticulants.....	93
2.1.2	Etude de l'influence de la concentration en EDC et NHS sur la réticulation et l'electrospinning du mélange HA-PVA-HPβCD	95
2.1.3	Etude de l'influence du post-traitement sur la morphologie des fibres.....	98
2.2	<i>Caractérisation du matériau final</i>	103
2.2.1	Spectroscopie IR	103
2.2.2	MEB environnemental.....	104
2.2.3	Détermination des propriétés mécaniques	106
3	EVALUATION BIOLOGIQUE DES MEMBRANES DE HA-PVA-HPβCD FINALES.....	107
3.1	<i>Etude de la biocompatibilité des membranes</i>	107
3.2	<i>Etude de la biodégradation des membranes en présence de hyaluronidase</i>	108
	RÉFÉRENCES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1 FORMATION DE FIBRES HA-PVA-HPBCD PAR ELECTROSPINNING

1.1 FORMATION DE PANSEMENTS PAR ELECTROSPINNING DE L'HA DANS L'EAU – NOTRE STRATEGIE

Le but de ce travail de thèse est de former un matériau nanostructuré à base d'HA afin de créer une nouvelle génération de pansements profitant à la fois des bénéfices apporté par la nanostructuration, mais aussi des propriétés de bioactivité du polysaccharide. Dans le but de s'affranchir de l'utilisation de solvants pouvant altérer les propriétés de biocompatibilité du matériau final, il a été choisi de réaliser l'électrospinning uniquement à partir de solutions aqueuses, c'est-à-dire sans ajout de co-solvant, même en faible quantité. Comme il a été détaillé dans le chapitre précédent, la formation de fibres par electrospinning de HA dans l'eau pure requiert, soit une adaptation du procédé d'électrospinning permettant un flux d'air chaud en sortie d'aiguille, soit l'ajout d'un second polymère, qui va permettre la structuration de la fibre. De plus, afin d'obtenir un matériau stable au contact de milieu humide, une étape de réticulation des différents composés doit être prévue. En outre, comme expliqué dans le chapitre 1 paragraphe 2.1.2, il peut être intéressant de fonctionnaliser les nanofibres de polymères par des agents pharmaceutiques conférant de nouvelles propriétés au matériau (antibactériennes, anti-inflammatoires...). Il faut donc prendre en compte dans la stratégie de mise en forme des fibres de HA l'éventuel ajout d'un principe actif soit dans la solution de départ soit par fonctionnalisation de la membrane nanofibreuse formée par electrospinning.

Les différentes propriétés attendues du matériau final sont illustrées en Figure 2-1. Notre stratégie visant à mettre en forme un tel matériau est développée dans les paragraphes suivants.

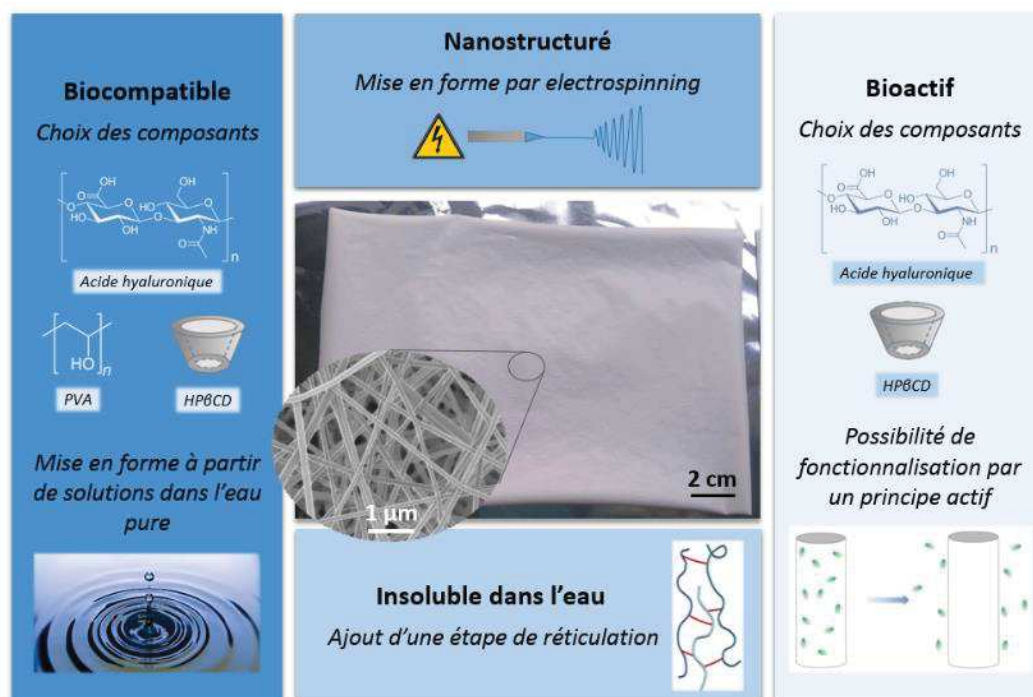


Figure 2-1 : Stratégie d'élaboration envisagée et propriétés attendues du matériau final

1.1.1 Ajout de PVA

Afin de pouvoir former des fibres à partir de solution aqueuse d'HA, il a été choisi d'ajouter un polymère porteur, le PVA. Ce choix a été fait afin de conserver un dispositif d'electrospinning simple d'utilisation et d'éviter l'apport de chaleur au niveau de la solution électrospinnée tel que proposé par l'electroblowing^{38,50}.

Avec le PEO, le PVA est un des polymères les plus utilisés pour faciliter la mise en forme de fibres à partir de solutions aqueuses et dans le cas de l'electrospinning de HA, il a déjà été démontré qu'il est possible de former des fibres à partir d'un mélange HA et PVA dans l'eau (chapitre 1, paragraphe 1.3.2.1). Pour la mise en forme de fibres à partir de solution aqueuse de HA, il a été choisi d'utiliser le PVA plutôt que le PEO car il présente une température de fusion très élevée, comprise entre 180 et 190 °C, s'il est partiellement hydrolysé, et allant jusqu'à 230 °C s'il est entièrement hydrolysé¹⁷³. Au contraire, le PEO a une température de fusion basse, comprise entre 40 et 80 °C suivant sa masse molaire, ce qui limite son potentiel d'application en particulier lorsqu'un traitement thermique s'avère nécessaire à l'élaboration du matériau final (réticulation, stérilisation...) ¹⁷⁴.

Le PVA est un polymère synthétique issu de l'hydrolyse alcaline de l'acétate de polyvinyle (illustration de la réaction en Figure 2-2), lui-même formé par polymérisation de l'acétate de vinyle.

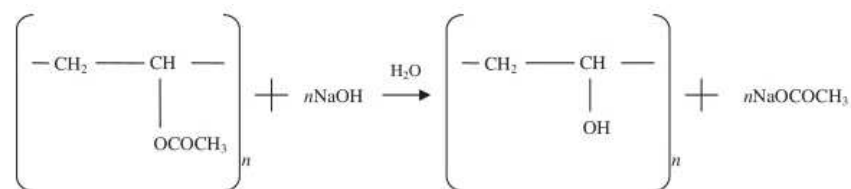


Figure 2-2 : Schéma réactionnel de la formation du PVA à partir de l'acétate de polyvinyle ¹⁷⁵

Un certain nombre de grades de PVA sont disponibles dans le commerce et peuvent être divisés en deux types : les PVA entièrement hydrolysés et les PVA partiellement hydrolysés en fonction de la quantité de groupes acétate restant sur le squelette. La présence de nombreux groupements hydroxyle sur le squelette du PVA fait de ce polymère un composé soluble dans l'eau, mais dont la valeur de la solubilité va dépendre de son degré d'hydrolyse et de sa masse molaire ¹⁷⁶.

De plus, le PVA est un polymère biocompatible déjà utilisé dans les domaines de l'alimentaire (emballage, additif) et du biomédical pour l'ingénierie tissulaire ou comme composant de pansements ¹⁷⁷. Des hydrogels de PVA ont déjà été utilisés pour la mise en forme de lentilles de contact, d'organes artificiels ou encore comme systèmes d'administration de médicaments innovants ⁵².

1.1.2 Ajout de la HPβCD

1.1.2.1 Présentation de la cyclodextrine, de ses dérivés et des complexes d'inclusion

La cyclodextrine (CD) est un oligosaccharide cyclique composé d'unités de α-D-glucopyranose liées en α-(1 → 4). Elle est produite à partir de l'amidon par réaction de cyclisation de chaînes linéaires de glucopyranose par une enzyme : la cyclodextrine glucosyl transférase ¹⁷⁸. Comme illustré en Figure 2-3, il existe trois types de CDs natives constituées de 6, 7 ou 8 monosaccharides appelées respectivement α-CD, β-CD et γ-CD.

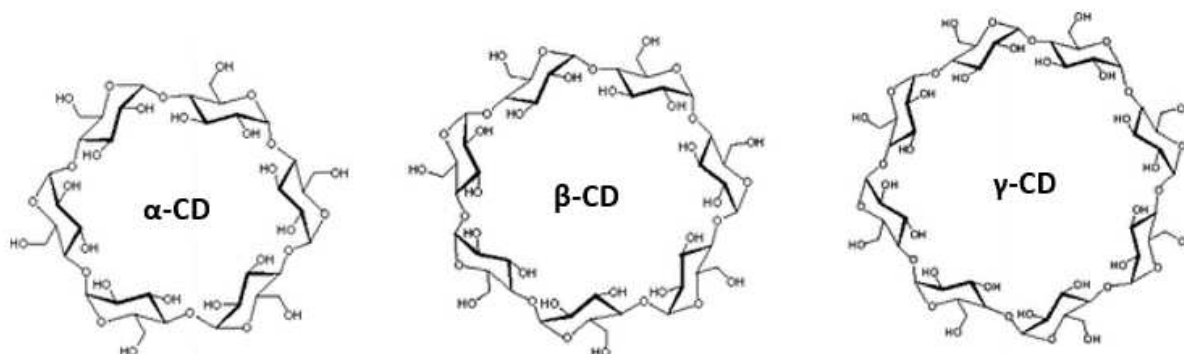


Figure 2-3 : Structures chimiques de la α -, β - et γ -CD

En raison de la configuration des monosaccharides qui les composent, les molécules de CD prennent une forme de cône tronqué avec des fonctions hydroxyles orientées vers l'extérieur du cône. Les groupes hydroxyle primaires sont localisés sur le bord étroit du cône et les groupes hydroxyle secondaires sur le bord plus large (voir illustration en Figure 2-4). La cavité centrale est, elle, bordée par le squelette carboné. Ainsi, la CD présente une structure atypique, avec une surface extérieure hydrophile et une cavité centrale hydrophobe ¹⁷⁹.

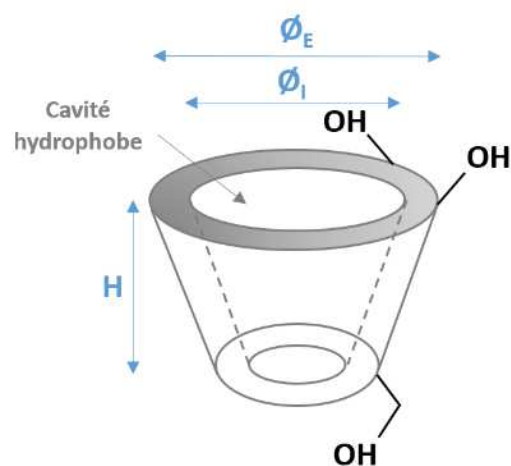


Figure 2-4 : Représentation schématique de la CD

Les limites de solubilité dans l'eau de la α , β et γ -CD sont inférieures à celles des dextrines linéaires comparables, car des liaisons hydrogène intermoléculaires maintiennent ces oligosaccharides dans un état cristallin. Si la α et la γ -CD restent relativement bien solubles dans l'eau, avec des solubilités

respectives de 145 et 232 mg.mL⁻¹ (à 25 °C), la β -CD présente une solubilité plus limitée (de 18,5 mg.mL⁻¹ à 25 °C) car la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires diminuent sa capacité à former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes¹⁸⁰. Afin d'améliorer ce paramètre, des groupements hydroxyle de CD natives ont pu être substitués par d'autres fonctions ce qui permet d'accroître grandement leur solubilité. De cette façon, des dérivés de β -CD ont pu être obtenus comme la 2-hydroxypropyl- β -CD (HP β CD), dont la structure est illustrée en Figure 2-5, qui présente une solubilité à 25 °C supérieure à 600 mg.mL⁻¹, la méthyl- β -CD (M β CD) qui a une solubilité > 500 mg.mL⁻¹, la sulfobutyléther- β -CD de solubilité > 500 mg.mL⁻¹ et bien d'autres¹⁸⁰.

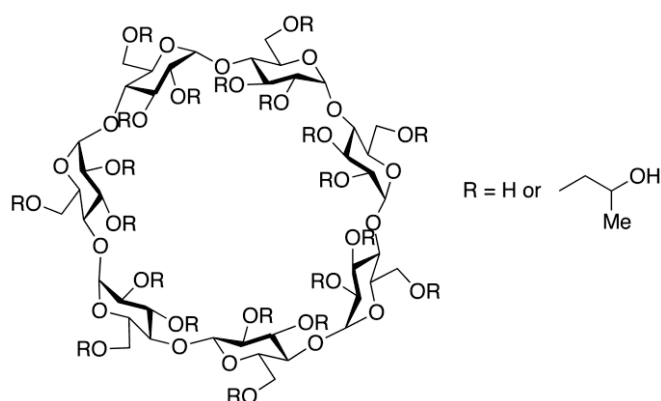


Figure 2-5 : Structure chimique de la HP β CD

De plus, il a été démontré que certains dérivés de la β -CD comme l'HP β CD étaient plus favorables à la formation de complexes que les CD natives¹⁸¹. Grâce à leur structure particulière, comme illustré en Figure 2-6, les CDs sont capables de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules hydrophobes, parmi lesquelles de multiples molécules bioactives. La capacité des CDs à encapsuler une molécule dépend de sa taille, puisque si leur hauteur (H) reste constante à 0,78 nm, le diamètre de la cavité (\varnothing) va varier de 0,57 nm pour la α -CD à 0,78 nm pour la β -CD et 0,95 nm pour la γ -CD. Suivant la structure de la molécule encapsulée, le complexe sera formé d'une (complexe 1:1) ou deux (complexe 1:2) molécules de CD par molécule^{179,182}.

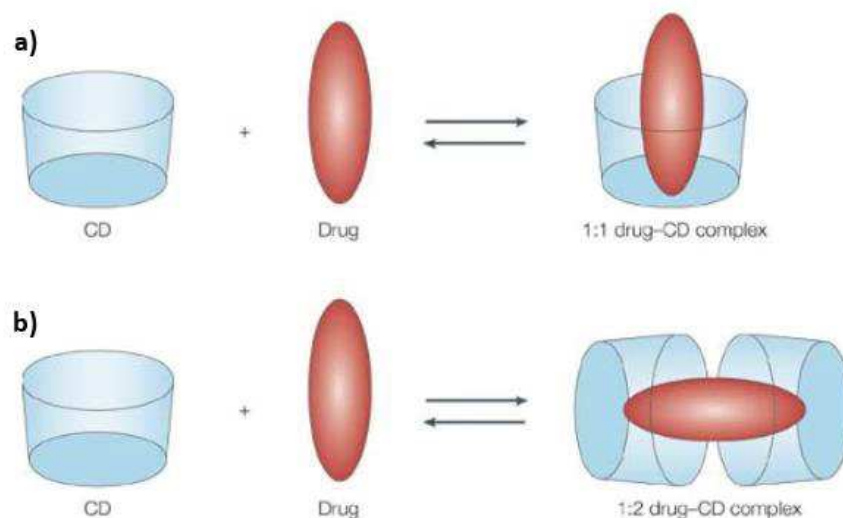


Figure 2-6 : Illustration de la formation de complexes d'inclusion avec a) une ou b) deux molécules de CD ¹⁸²

Lors de la formation de ces complexes d'inclusion, aucune liaison covalente n'est formée ou rompue, l'inclusion doit sa stabilité aux interactions électrostatiques, van der Waals ou hydrophobes, à des transferts de charges ou encore aux liaisons hydrogène en fonction de la nature de la molécule hôte mais aussi du type de CD ^{183,184}. Les complexes ainsi formés sont très stables mais sont aussi réversibles. Quand le complexe est dissout dans un solvant, et dans l'eau en particulier, la molécule hôte et la CD vont voir leurs interactions diminuer et ainsi le complexe va pouvoir se dissocier ¹⁸⁵.

Les différentes propriétés d'encapsulation de la CD en font un composé largement utilisé dans le domaine pharmaceutique. De plus, Il a été rapporté que l'inclusion de principes actifs hydrophobes dans les cavités de la CD permet d'augmenter leur solubilité et leur stabilité. De tels complexes diffusent ainsi plus facilement dans l'organisme que le médicament libre, ce qui peut améliorer sa biodisponibilité dans le cas où la solubilité est l'étape limitante ¹⁸⁶. Il a aussi été montré que l'utilisation de la CD permet de réduire les effets secondaires indésirables associés à certains médicaments, comme par exemple pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) où la formation de complexes réduit les phénomènes d'irritation gastro-intestinale ^{181,187,188}. Le complexe CD-AINS formé se redissout plus vite et assure une meilleure absorption de l'AINS par rapport à l'actif seul, évitant ainsi le contact entre les agrégats cristallins d'AINS irritants et les muqueuses ¹⁸⁹.

Les CDs natives sont biocompatibles et donc sans danger pour l'être humain (comme pour le PVA, ce composé est approuvé par la FDA). Si certains dérivés de la CD peuvent soulever des problèmes de toxicité (comme le M β CD), il a été démontré que la HP β CD est, quant à elle, biocompatible ¹⁹⁰ ce qui

en fait un composé largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique dans des formulations médicamenteuses pour administration orale, parentérale (par injection) ou topique (application sur une surface du corps, telle que la peau ou les muqueuses)¹⁷⁹. De plus, l'inclusion de CD modifiée ou non dans des pansements, a permis d'obtenir des matériaux actifs capables de protéger et de moduler la libération de molécules bioactives^{191–194} mais aussi de diminuer les odeurs issues de plaies en piégeant certains composés volatils malodorants¹⁹⁵.

1.1.2.2 CD et electrospinning

Si la formation de nanofibres contenant de la CD par electrospinning a pu être réalisée en présence d'un ou plusieurs polymères¹⁹⁶, il a aussi été montré qu'il était possible de former des fibres à partir de solutions de CD pure. En effet, Celebioglu et Uyar¹⁹⁷ furent les premiers à rapporter qu'il était possible d'electrospinner la M β CD en solution dans l'eau ou le DMF. Ils attribuent le succès de l'electrospinning aux nombreuses liaisons hydrogène entre les oligosaccharides, qui agissent comme les enchevêtrements des chaînes de polymères en maintenant un jet continu de solution¹⁹⁷. Dans des études postérieures, ces mêmes auteurs ont démontré qu'il était possible d'electrospinner deux autres dérivés de la CD, la HP β CD et la HP γ CD, en solution dans l'eau, le DMF et le diméthylacétamide. L'ajout d'urée aux différentes solutions de CD entraînant une diminution des liaisons hydrogène empêche la mise en forme de fibres par electrospinning, confirmant ainsi la théorie proposée précédemment^{198,199}. Par la suite, les CD natives ont été electrospinnées en solutions aqueuses contenant 10 % (w/v) de NaOH pour la α - et β -CD²⁰⁰ et à l'aide d'un mélange eau-diméthylsulfoxyde pour la γ -CD²⁰¹.

De plus, il a aussi été rapporté que la CD pouvait permettre d'accroître la stabilité du processus d'electrospinning de certains polymères comme observé pour les mélanges PVA/ β -CD en solution dans l'eau²⁰², zéine/ α - β - γ -CD en solution dans le DMF²⁰³ et PMMA/ α - β - γ -CD aussi en solution dans le DMF²⁰⁴. Comme illustré en Figure 2-7, pour le mélange PVA/ β -CD, l'ajout de CD permet l'obtention de fibres uniformes sans défaut.

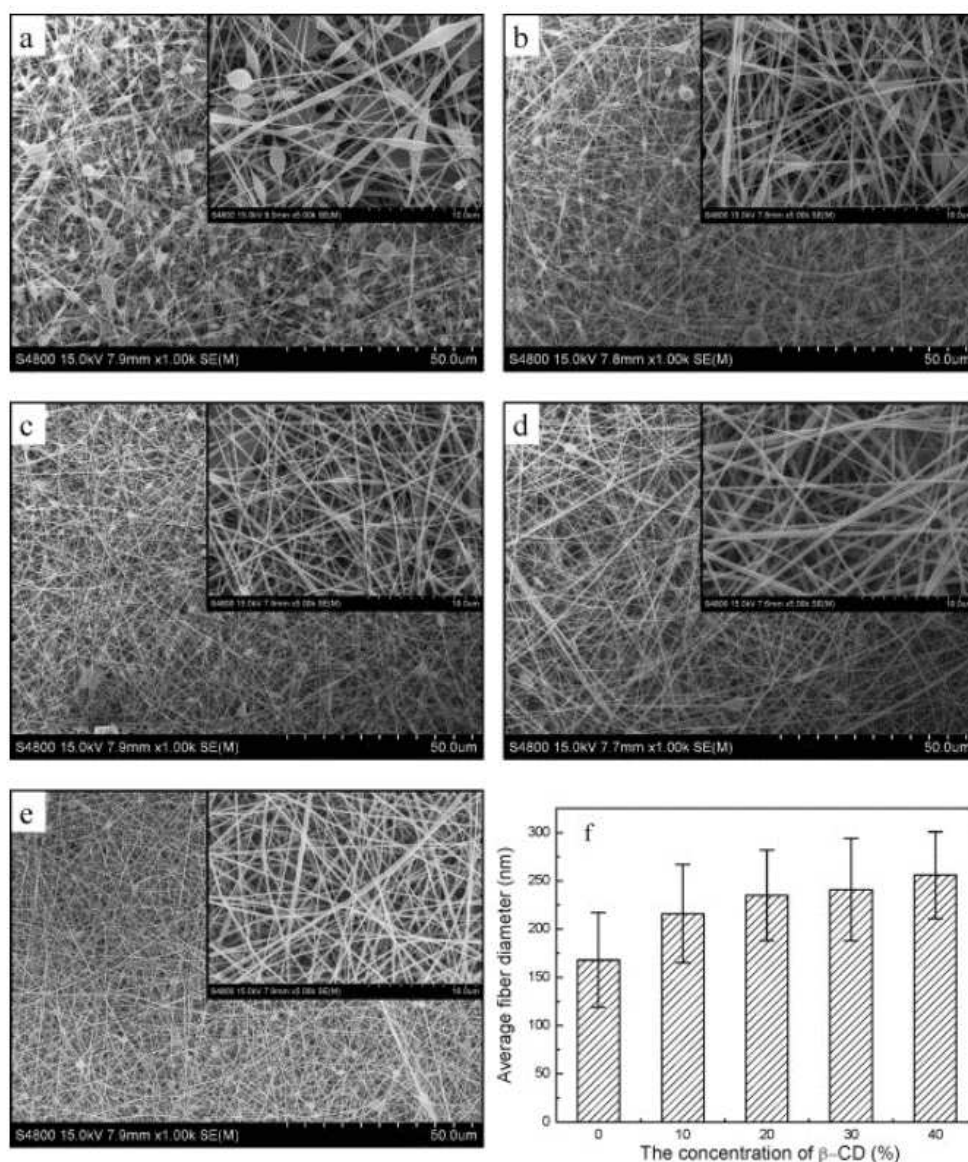


Figure 2-7 : Images MEB de nanofibres électrospinnées à partir de 8 wt % de PVA à différentes concentration de β -CD par rapport au PVA : a) 0 wt %, b) 10 wt %, c) 20 wt %, d) 30 wt %, e) 40 wt % et diamètre moyen des fibres obtenues en fonction de la concentration en β -CD ²⁰²

Dans les trois cas, il a été noté que l'ajout de CD provoque l'augmentation de la viscosité des solutions qui pourrait être attribuée à la formation d'interactions intermoléculaires entre les chaînes de polymère et la CD. Dans le cas du mélange PVA/ β -CD, ces interactions ont été mises en évidence par RMN du proton, où les déplacements des pics de la β -CD en présence du PVA, par rapport aux pics obtenus pour la β -CD seule, peuvent être interprétés comme la conséquence de la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes de PVA et la β -CD ²⁰². Dans le cas des mélanges de zéine/ α - β - γ -CD et de PMMA/ α - β - γ -CD, il a aussi été montré que l'ajout de CD entraîne un changement de la

conductivité des solutions (pour la zéine la conductivité diminue avec l'augmentation de la concentration en CD et il se produit le phénomène inverse pour le PMMA). La conductivité de la solution est l'un des principaux paramètres de contrôle du procédé d'electrospinning puisque la solution de polymère est étirée en raison de la répulsion des charges présentes à la surface, la variation de la conductivité des solutions peut donc entraîner des modifications significatives de la morphologie des fibres^{203,204}.

Ainsi, afin de tirer avantage des diverses propriétés de complexation des CD, il a donc été choisi d'ajouter ce troisième constituant au système HA-PVA. Pour des raisons de solubilité et de biocompatibilité le choix s'est porté sur la HP β CD, le travail de mise en forme de fibres par electrospinning va donc porter sur le système HA-PVA-HP β CD.

La HP β CD est obtenue à partir de la β CD par substitution de certains groupements hydroxyle par des groupements hydroxypropyle. Le degré de substitution (DS) de la HP β CD, qui correspond au nombre moyen de groupements substitués par molécule de CD, va affecter l'agrégation des molécules de HP β CD entre elles, leur toxicité, mais aussi leur capacité à solubiliser certaines molécules hydrophobes. Pour des applications pharmaceutiques, la gamme de DS recommandé se situe entre 2,8 et 10,5, ce qui correspond à 0,4-1,5 substituants par unité de glucose²⁰⁵. Il est donc important de connaître avec précision le DS de la HP β CD qui sera par la suite utilisée pour mettre en forme les membranes electrospinnées. Par RMN du proton (voir détails en chapitre 5 paragraphe 3.2.1) nous avons mesuré en moyenne 5,1 substituants par molécule de HP β CD, ce qui correspond à 0,7 substituants par unité de glucose et qui confirme son utilisation potentielle pour des applications biomédicales ou pharmaceutiques.

1.2 VERS UNE STRATEGIE D'ELABORATION DE NANOFIBRES D'HA EN VOIE AQUEUSE

L'objectif du travail de thèse est de former des membranes nanofibreuses par electrospinning de solutions de HA dans l'eau pure. Les propriétés attendues du matériau à cette étape de la mise en forme sont résumées en Figure 2-8.

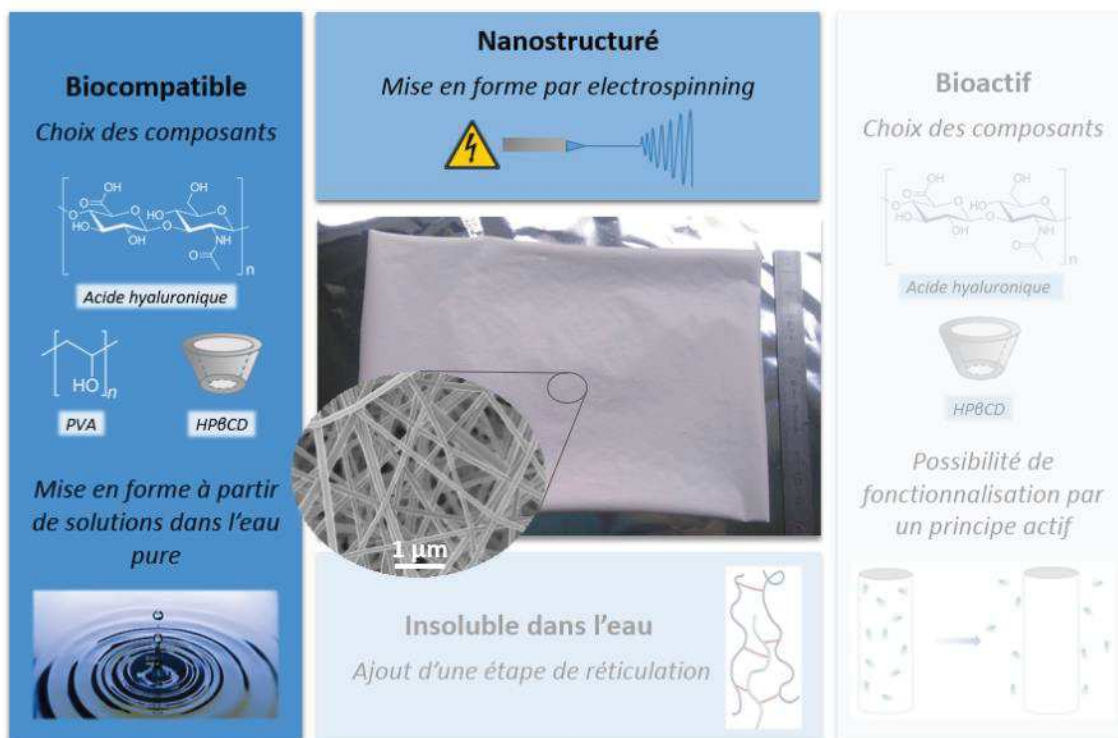


Figure 2-8 : Représentation des propriétés attendues à cette étape de la mise en forme des membranes : on souhaite dans un premier temps obtenir des nanofibres par electrospinning d'une solution composée de HA, de PVA et de HPβCD dans l'eau pure

Comme nous l'avons vu précédemment, l'electrospinning du HA dans l'eau peut être rendu possible par l'ajout d'un polymère porteur, qui favorise la formation des fibres. Notre choix s'étant porté vers l'utilisation du PVA, des mélanges HA-PVA de différentes concentrations ont été électrospinnés. Le protocole détaillé des essais d'electrospinning est disponible dans le chapitre 5 (paragraphe 4.2). Le rapport HA:PVA le plus élevé permettant la formation de nanofibres par electrospinning est de 1:1 et a été obtenu pour des concentrations de 6 % w/w_{H2O} de chaque polymère dans l'eau. Cependant, pour cette composition, le jet émis n'est pas stable et le dépôt présente de nombreux défauts tels que des structures perlées le long des fibres et des gouttelettes (Figure 2-9). Nous avons vu précédemment que l'ajout de CD ou ses dérivés, avait permis de stabiliser le processus d'electrospinning de certains polymères (chapitre 2, paragraphe 1.1.2.2). L'influence de l'ajout d'HPβCD sur la formation de fibres HA-PVA a donc été étudiée. Pour cela des solutions composées de 6 % w/w_{H2O} de HA, de 6 % w/w_{H2O} de PVA et de 0 à 40 % w/w_{H2O} de HPβCD ont été électrospinnées et les fibres obtenues ont été imagées par MEB (Figure 2-9).

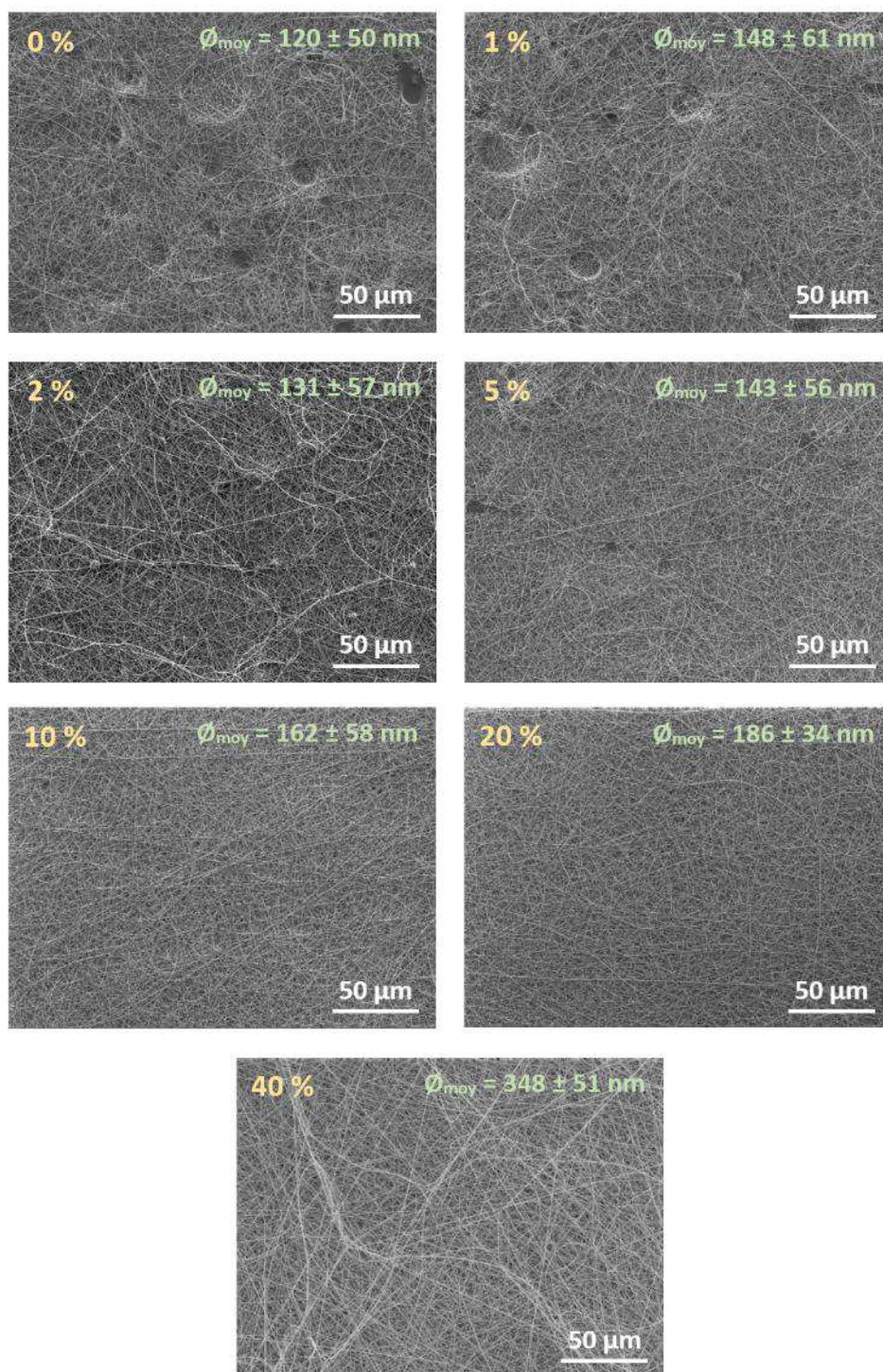


Figure 2-9 : Images MEB et diamètres moyens des fibres HA-PVA-HP β CD obtenues pour différentes concentrations en HP β CD (% w/w H_2O) avec des concentrations en HA et PVA fixes de 6 % w/w H_2O chaque

On remarque que le diamètre moyen des fibres s'accroît avec l'augmentation de la concentration en HP β CD, passant de 120 ± 50 nm pour 0 % w/w H_2O de HP β CD à 350 ± 50 nm pour 40 % w/w H_2O de

HPβCD. On voit aussi que l'ajout de HPβCD permet, dans un premier temps, de diminuer le nombre de défauts visibles sur la membrane et à partir de 10 % w/w_{H2O} de HPβCD le dépôt devient entièrement uniforme. L'addition de HPβCD au mélange HA-PVA empêche donc la formation de gouttelettes et permet une production stable de nanofibres pendant plusieurs heures. Par la suite, l'augmentation du ratio HA:PVA en présence de HPβCD a été testé, néanmoins, l'ajout de HPβCD n'a pas permis de réduire la quantité de PVA, qui apparaît comme un composant clé dans la formation des nanofibres à base d'HA.

Le rôle bénéfique de la HPβCD dans le procédé d'électrospinning a donc été étudié. Il a été rapporté que la CD ou ses dérivés pourrait agir comme un surfactant en solution aqueuse, diminuant ainsi la tension de surface du milieu aqueux²⁰⁶. Etant donné que la tension de surface est un paramètre clé dans la formation de fibres par électrospinning (chapitre 1, paragraphe 1.3.1) nous avons choisi d'investiguer en premier ce paramètre. Comme on peut voir en Figure 2-10a, lorsque la HPβCD est ajoutée dans l'eau, la tension superficielle diminue de 70,1 mN.m⁻¹ pour l'eau milli-Q pure à 57 mN.m⁻¹ pour une solution aqueuse contenant 10 % w/w_{H2O} de HPβCD et atteint 49,5 mN.m⁻¹ avec 40 % w/w_{H2O} de HPβCD. Cependant, pour les solutions de HA-PVA-HPβCD, la tension de surface reste constante à 47 mN.m⁻¹, valeur imposée par les polymères et plus spécifiquement par le PVA. Ainsi, la HPβCD ne joue pas un rôle prépondérant sur la tension de surface des solutions HA-PVA-HPβCD, ce n'est donc pas ce paramètre qui influe la mise en forme des nanofibres.

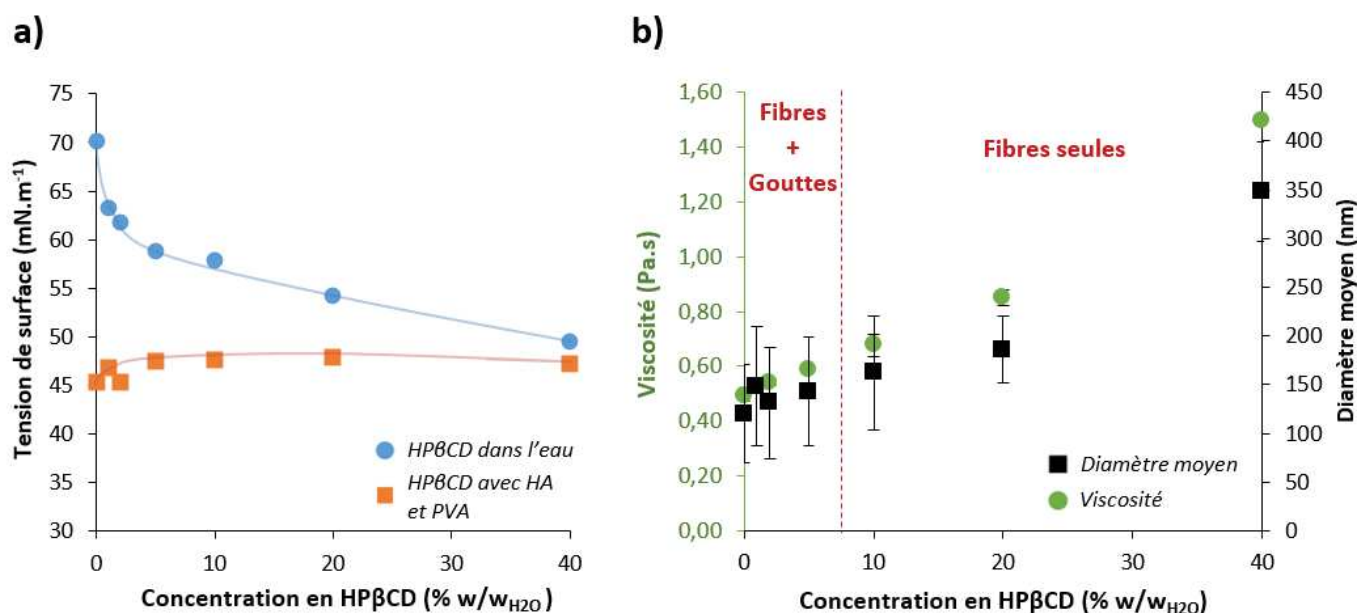


Figure 2-10 : a) Evolution de la tension de surface de solution de HPβCD dans l'eau ou en présence de HA et de PVA (6 % $\text{w/w}_{\text{H}_2\text{O}}$ chaque) en fonction de la concentration en HPβCD et b) Influence de la concentration en HPβCD sur la viscosité de solutions HA-PVA-HPβCD (avec HA et PVA fixes à 6 % $\text{w/w}_{\text{H}_2\text{O}}$) et sur le diamètre moyen des fibres obtenues

L'effet de la HPβCD sur la viscosité de la solution a ensuite été étudié (Figure 2-10b). On note en effet une augmentation de la viscosité des solutions de HA-PVA-HPβCD avec la concentration de HPβCD, qui triple entre 0 et 40 % $\text{w/w}_{\text{H}_2\text{O}}$ de HPβCD. Comme rapporté par Zhang et al.²⁰² dans le cas de mélanges β-CD/PVA, le changement de structure des fibres pourrait être attribué à la présence de liaisons hydrogène. En effet, l'augmentation de la viscosité à une quantité donnée de HA et de PVA avec la concentration de HPβCD pourrait être attribuée à des interactions intermoléculaires entre la HPβCD et, l'HA et le PVA. En effet, le HA et le PVA présentent tous deux des structures chimiques favorables à la formation de liaisons hydrogène avec la HPβCD, ces interactions seraient alors responsables de l'augmentation de la viscosité qui est, elle, propice à l'obtention de nanofibres uniformes.

L'augmentation du diamètre moyen des fibres avec la concentration en HPβCD peut être expliquée par l'augmentation de la viscosité. En effet, les forces d'origine visqueuses s'opposent à la répulsion électrostatique responsable de l'étirement et de l'amincissement du jet de solution²⁰⁷. L'augmentation de viscosité d'une solution va donc mener à l'obtention de fibres de diamètres plus élevés. Mais ce phénomène peut aussi s'expliquer par un changement dans la conductivité des mélanges. En effet, Uyar et al.^{203,204} ont mis en avant un changement de conductivité de solutions de polymères avec l'ajout de α, β et γ-CD. En mesurant la conductivité des mélanges HA-PVA-HPβCD avec des

concentrations fixes en HA et PVA de 6 % w/w_{H2O}, nous avons remarqué une diminution de la conductivité avec l'augmentation de la concentration en HPβCD. Celle-ci varie de $4,1 \pm 0,3 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour une solution sans HPβCD à $3,3 \pm 0,3 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour une solution contenant 10 % w/w_{H2O} de HPβCD et atteint $1,6 \pm 0,2 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour 40 % w/w_{H2O} de HPβCD. Or, on sait qu'une solution moins conductrice limitera l'étirement du jet de solution formé lors du processus d'électrospinning en raison de la diminution du nombre de charge et les fibres formées auront donc des diamètres plus élevés²⁰⁸.

La solution composée de 6 % w/w_{H2O} de HA, 6 % w/w_{H2O} de PVA et 10 % w/w_{H2O} de HPβCD est un mélange avec les concentrations les plus faibles de PVA et de HPβCD qui permet l'obtention de nanofibres uniformes. Dans le reste du manuscrit, ce mélange sera annoté comme la solution 6-6-10.

Comme on peut le voir en Figure 2-11, la viscosité spécifique de la solution 6-6-10, correspondant donc à une concentration totale de 22 % w/w_{H2O}, est bien supérieure à la concentration d'enchevêtrement (C_e) mesurée pour le système HA-PVA-HPβCD. La C_e délimite le régime semi-dilué non enchevêtré et le régime semi-dilué enchevêtré, régime nécessaire à la formation de fibres par électrospinning^{209,210}. Dans le cas de polymères neutres comme le PVA, il a été montré que la formation de fibres sans défaut était possible pour des concentrations en polymère supérieures à $2-2,5 C_e$ ^{211,212}. Dans le cas des polyélectrolytes, cette valeur peut alors augmenter jusqu'à $8-10 C_e$ ^{36,213}. Pour le système HA-PVA-HPβCD de ratio massique 6-6-10, la concentration totale en solide de 22 % w/w_{H2O}, déterminée comme la plus faible concentration permettant la formation de fibres sans défaut (pour une concentration fixe en HA de 6 % w/w_{H2O}), correspond à $2,4 C_e$. Malgré la présence de HA, le mélange HA-PVA-HPβCD présente donc le comportement d'une solution de polymère neutre.

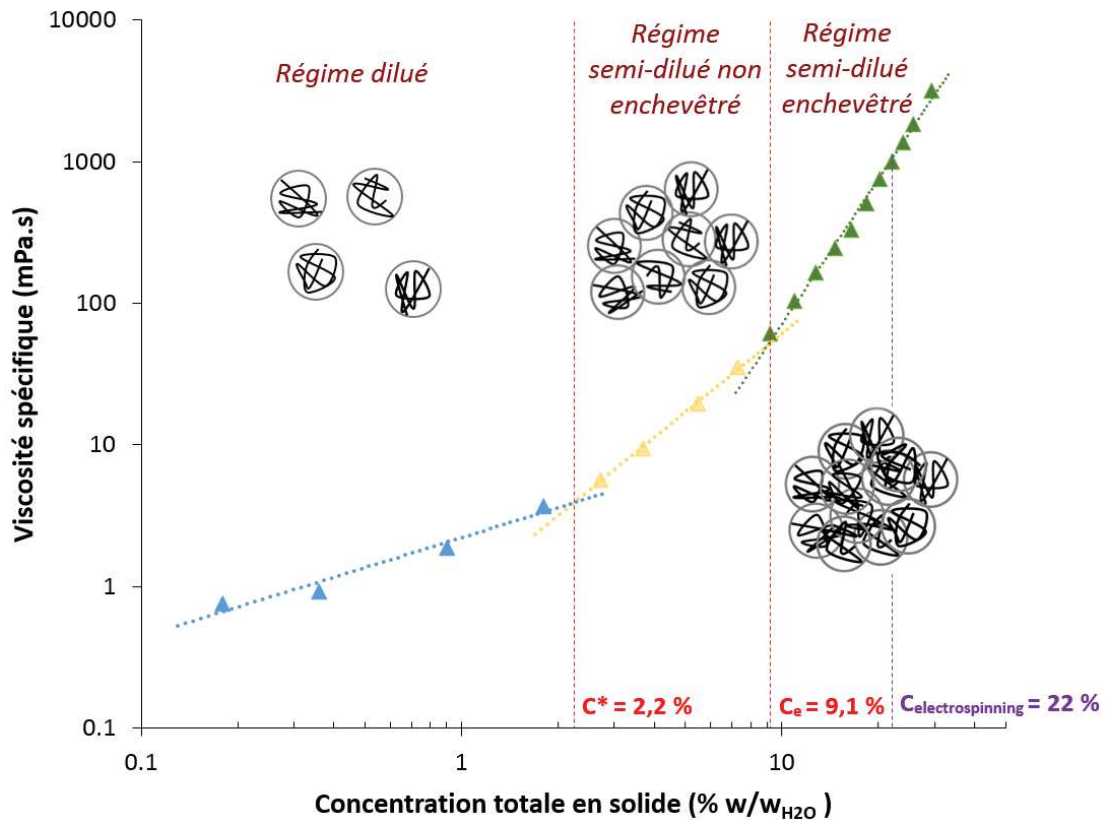


Figure 2-11 : Viscosité spécifique de solutions HA-PVA-HPβCD (avec un ratio massique fixe de 6:6:10) avec C_e la concentration d'enchevêtrement et C^* la concentration de recouvrement

Afin d'obtenir un rendement de production des fibres le plus élevé possible, des solutions de ratio massique identique (6-6-10) mais de concentration totale supérieure à 22 % ont été électrospinnées. Malheureusement ces solutions, plus concentrées que le mélange 6-6-10, étant très visqueuses (viscosités supérieures à 1000 mPa.s), elles circulent difficilement à travers l'aiguille et, de plus, celles-ci ont tendance à sécher très rapidement en bout d'aiguille ce qui rend le procédé très instable. Il est donc impossible d'augmenter le rendement en utilisant des solutions plus concentrées que le mélange 6-6-10.

Le reste de l'étude va donc se concentrer sur la mise en forme de fibres HA-PVA-HPβCD à partir de la solution 6-6-10, composées de 6 % w/w_{H2O} de HA, 6 % w/w_{H2O} de PVA et 10 % w/w_{H2O} de HPβCD.

1.3 ETUDE DE L'INFLUENCE DE PARAMETRES AMBIANTS

1.3.1 L'influence de l'humidité relative

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la formation de nanofibres par electrospinning est fortement influencée par les paramètres de la solution electrospinnée (viscosité, tension de surface...). Les paramètres liés au procédé (tension, débit, distance aiguille/collecteur...) jouent eux aussi un rôle primordial sur la morphologie des fibres obtenues^{53,214}. Mais le rôle des paramètres dits « ambiants » tels que la température et l'humidité relative (HR) sont parfois moins pris en compte. Pourtant, il a été démontré que l'HR pouvait fortement influencer la forme et le diamètre des fibres produites par electrospinning²¹⁵⁻²¹⁸. Pour réaliser l'étude portant sur l'influence de la concentration des composants sur la mise en forme des fibres, nous nous sommes placés à une humidité relative inférieure à 40 % car des travaux réalisés par Pelipenko et al.⁶³ ont rapporté qu'au-delà de 40 % d'HR (à 24 ± 1 °C), les fibres formées à partir d'un mélange HA-PVA (de ratio massique 20:80) n'avaient plus une morphologie uniforme mais présentaient une structure perlée. Cependant, pour la suite des travaux, il a été décidé d'étudier l'influence de l'humidité relative sur notre mélange HA-PVA-HP β CD, afin de déterminer les conditions optimales de formation des membranes.

Pour cela, dans un premier temps, il a été décidé de réguler l'humidité dans toute la cabine d'electrospinning et d'imager les fibres de HA-PVA-HP β CD (de ratio massique 6-6-10) pour des HR variant de 20 à 60 % (Figure 2-12). Tous les détails du protocole sont indiqués dans le chapitre 5 (paragraphe 4.2). A partir de 40 % d'HR (à 21 ± 3 °C), on peut voir que le dépôt de fibres n'est plus homogène, des gouttelettes encore humides se sont déposées sur le collecteur et par endroit on peut voir des structures perlées le long des nanofibres. On remarque que ces phénomènes s'accroissent avec l'augmentation de l'humidité. En mesurant le diamètre moyen des fibres en fonction de l'humidité, on constate aussi que celles-ci s'affinent avec l'accroissement de l'HR, leur diamètre moyen diminuant de 170 nm à 20 % d'HR à 110 nm à 60 % d'HR (Figure 2-12f).

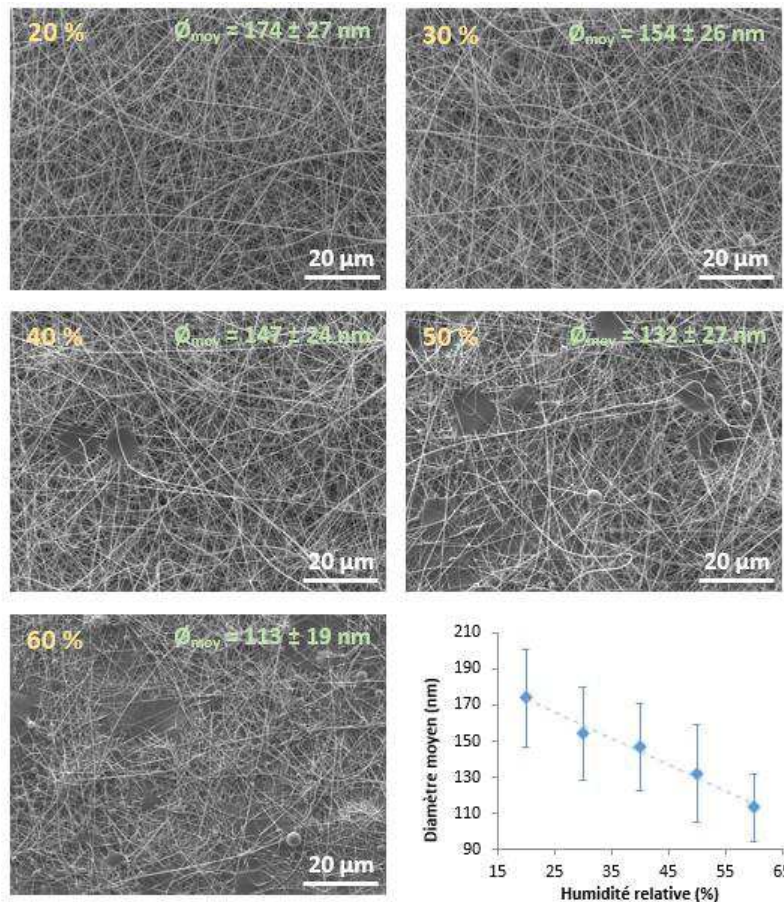


Figure 2-12 : Images MEB de fibres HA-PVA-HPβCD (6-6-10) obtenues pour différentes HR dans la cabine entière de et évolution du diamètre moyen des fibres en fonction de l'HR (en bas à droite)

Ce phénomène de diminution du diamètre des fibres avec l'augmentation d'HR peut être expliqué de deux façons : la première hypothèse, soutenue par Pelipenko et al. ⁶³, porte sur la vitesse d'évaporation du solvant (de l'eau dans notre cas). La différence entre la pression de vapeur du solvant et sa pression partielle dans la cabine d'électrospinning est le paramètre clef du phénomène d'évaporation. Or, dans le cas de solutions aqueuses, ce gradient augmente avec une diminution de l'HR. Lorsque celle-ci est très faible, le taux d'évaporation du solvant est élevé, ce qui provoque une solidification rapide du jet de polymère. Il est alors moins longtemps soumis à l'effet d'étirement provoqué par le champ électrique et les mouvements de fouet, par conséquent les fibres obtenues ont un diamètre moyen plus élevé. A l'inverse, quand l'HR est plus élevée, la solidification du jet se produit plus lentement, il est donc étiré plus longtemps, ce qui entraîne la formation de fibres plus fines. La seconde hypothèse, concernant le lien entre le diamètre des fibres et l'HR, est proposée par Medeiros et al. ²¹⁹. Ils expliquent que la diminution du diamètre des fibres pourrait être une conséquence de la formation de

jets secondaires en raison de l'augmentation de la conductivité de l'air chargée de molécules d'eau, la polarisation de cet air due au champ électrique entraînant la formation d'un « chemin » conducteur provoqué par les dipôles d'eau présents dans l'atmosphère. Or, les jets secondaires sont en général de diamètres plus faibles que le jet principal, ce qui provoque la formation de différentes populations de fibres avec des diamètres moyens différents au sein d'un même dépôt. Cependant, comme on peut le voir en Figure 2-13 pour les fibres obtenues avec une HR de 30 %, les diamètres de fibres obtenues ne forment qu'une seule population, ce qui invalide cette seconde hypothèse. C'est donc la différence dans la vitesse d'évaporation de l'eau contenu à l'intérieur de la solution qui est à l'origine de la diminution des diamètres des fibres avec l'augmentation de l'HR.

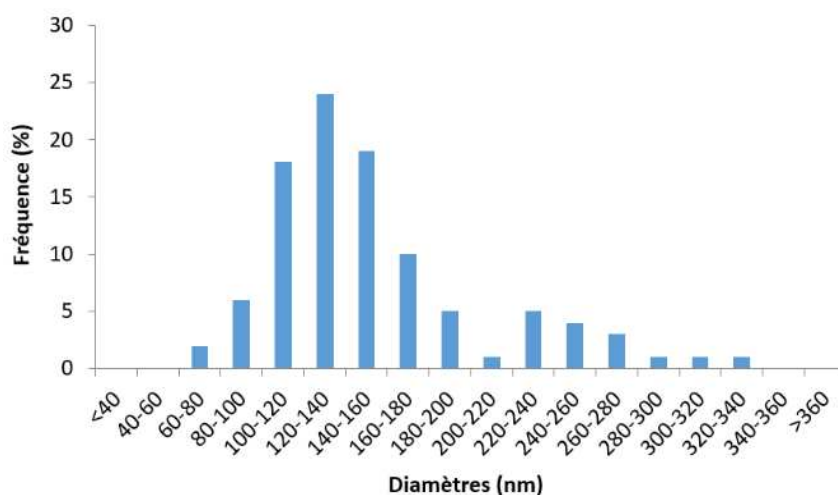


Figure 2-13 : Distribution des fibres HA-PVA-HPBCD (6-6-10) obtenue à une HR = 30 % de diamètre moyen de 150 ± 30 nm

Les expérimentations présentées précédemment ont aussi mis en avant un autre phénomène lié à l'augmentation de l'HR : l'apparition de structures perlées le long des fibres accompagnées d'un dépôt de gouttelettes. En effet, si la formation de structures perlées sur les fibres peut être due aux propriétés intrinsèques à la solution électrospinnée (faible concentration en polymère/viscosité, tension de surface élevée...²²⁰) différents travaux ont montrés qu'elles pouvaient aussi être le fait d'une augmentation de l'HR : par exemple pour l'électrospinning du PEO^{217,221}, de mélanges alginate/PEO²²² ou encore de PVP²²³. Une hypothèse concernant la formation de ces structures perlées sur les fibres avec l'augmentation de l'HR est proposée par Pelipenko et al.⁶³, et illustrée en

Figure 2-14. Selon eux, ce sont les propriétés viscoélastiques de la solution de polymère qui seraient responsables de la formation de perles sur les fibres.

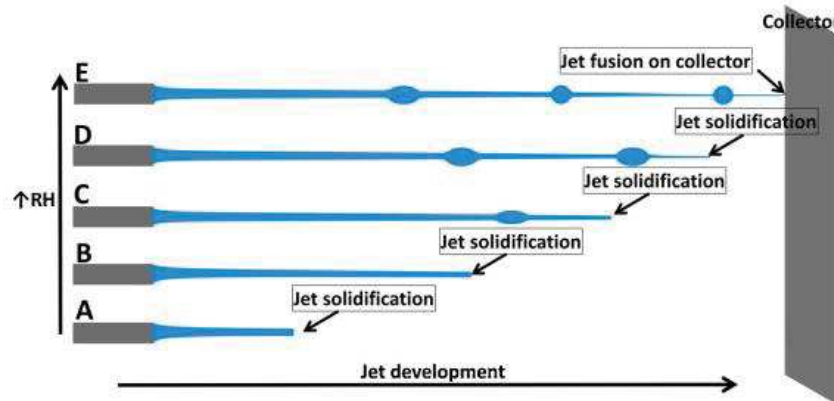


Figure 2-14 : Représentation schématique du développement du jet pour différentes HR ⁶³

En effet, la stabilité du jet va dépendre des propriétés élastiques (dépendantes du module élastique, G') et visqueuses (dépendante du module de perte, G'') de la solution. La force élastique augmente la tendance du jet à se contracter, ce qui crée des structures perlées voir provoque la rupture du jet, entraînant la formation de gouttelettes. L'évaporation du solvant lors de l'étirement du jet sous l'effet du champ électrique provoque l'augmentation de la concentration globale en polymère ce qui entraîne une augmentation des valeurs de G' et G'' . Le ratio entre G' et G'' est lui aussi impacté, plus la concentration en polymère est élevée, plus le ratio G''/G' est faible. Selon cette hypothèse, à une HR élevée, l'évaporation du solvant est plus lente, la solution est alors plus concentrée pour un temps plus long. Ainsi, les forces élastiques vont graduellement surpasser les forces plastiques, ce qui va progressivement provoquer l'apparition de perles sur les fibres et des gouttelettes.

Ces différentes explications concernant l'effet de l'HR sur le diamètre moyen et la morphologie des fibres obtenues par electrospinning ne sont valables que lorsque les nanofibres sont préparées à partir de solutions aqueuses. Dans le cas de matériaux nanofibreux produits à partir de polymères solubilisés dans des solvants organiques, l'eau (contenue dans l'atmosphère) agit comme un non-solvant et c'est alors la formation de nanofibres poreuses qui a été rapportée dans ce cas ^{224,225}.

La régulation de l'humidité dans la cabine prenant du temps (entre 2 et 10 minutes suivant l'HR voulue et l'HR de la pièce), il a été choisi dans un second temps, d'étudier l'influence de l'HR en sortie d'aiguille, qui pourrait permettre une régulation immédiate de l'atmosphère proche du jet de solution. Pour cela, un flux d'air régulé en température à 20 °C, pour des HR variables entre 10 et 50 %, est injecté à 10 L.min⁻¹ en sortie d'aiguille parallèlement au jet. Le protocole détaillé ainsi que les schémas des montage sont disponibles dans le chapitre 5 (paragraphe 4.2, Figure 5-8 et Figure 5-9). Les images des fibres de HA-PVA-HP β CD (de ratio massique 6-6-10) obtenues, ainsi que leur diamètre moyen sont présentés en Figure 2-15.

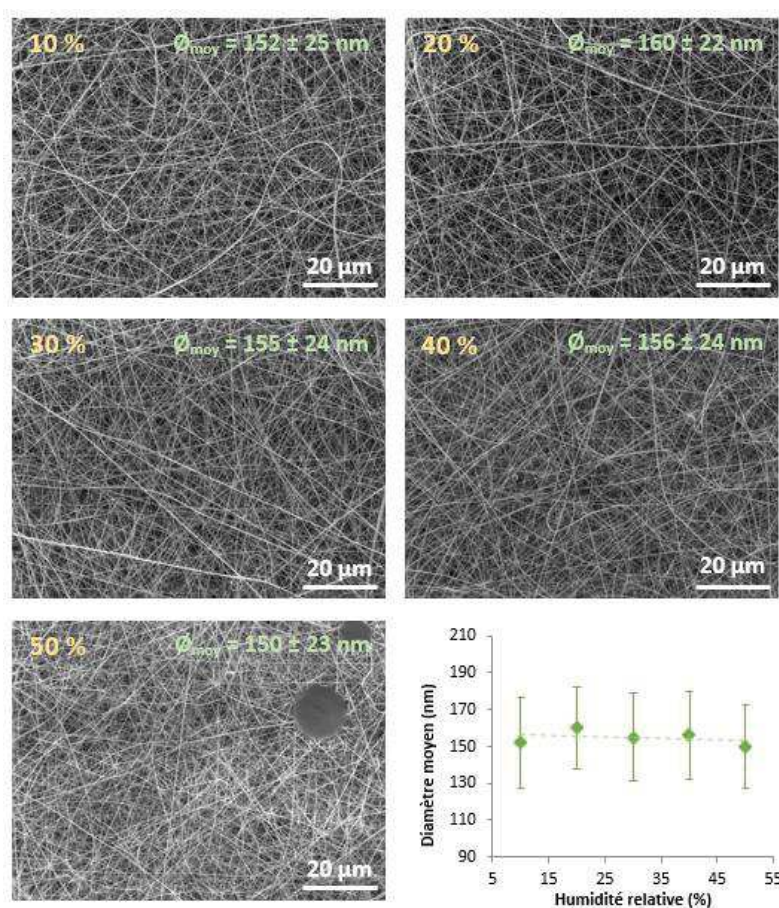


Figure 2-15 : Images MEB de fibres HA-PVA-HP β CD (6-6-10) obtenues pour différentes HR en sortie d'aiguille et évolution du diamètre moyen des fibres en fonction de l'HR (en bas à droite)

On remarque que l'HR de l'air ajouté en sortie d'aiguille a moins d'influence sur la morphologie des fibres que lorsque l'HR est régulée dans la cabine entière. En effet, il faut attendre 50 % d'humidité

pour voir l'apparition de gouttelettes qui restent encore très rares. Pour ce qui est du diamètre moyen des fibres, il reste cette fois stable avec le changement d'HR, autour d'une valeur moyenne de 150 ± 20 nm. Lors de la régulation de l'HR dans la cabine entière, un diamètre moyen de 150 nm correspondait à une HR de 32 %. Lors des essais de régulation de l'HR à l'aiguille, l'HR de la cabine (loin du jet) est égale à 28 % ce qui très proche de la valeur de 32 % correspondant au diamètre des fibres formées. On en déduit donc que la régulation en sortie d'aiguille est insuffisante, l'humidité de la cabine joue toujours un rôle primordial dans la morphologie des fibres formées. Des tests de régulations de l'humidité en sortie d'aiguille avec une humidité dans la cabine plus élevée ($HR > 40$ %) auraient permis de mettre plus en avant la dépendance de la morphologie des fibres à l'HR de la cabine cependant, la régulation en sortie d'aiguille n'étant pas assez efficace, il a été décidé de s'en tenir là.

Afin d'obtenir des fibres de morphologie uniforme, dans la suite du travail, la mise en forme des membranes sera réalisée à une HR contrôlée dans toute la cabine de 30 ± 5 %.

1.3.2 L'influence de la température

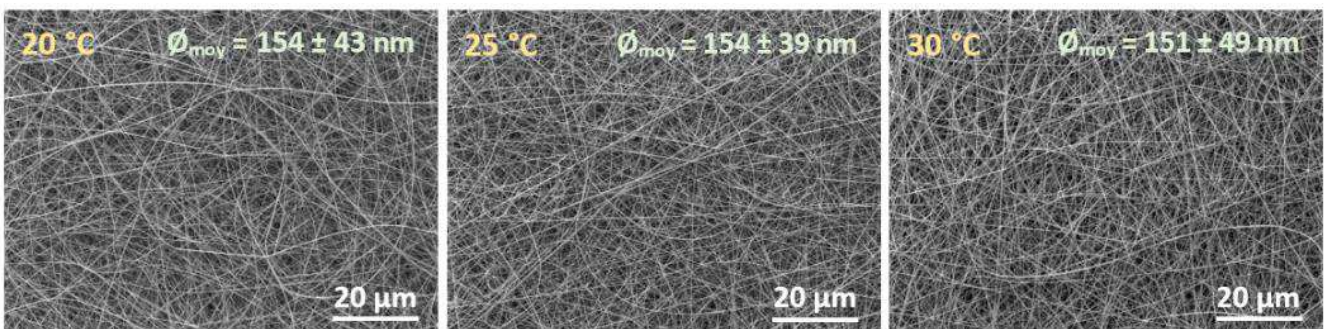


Figure 2-16 : Images MEB et diamètres moyens de fibres HA-PVA-HPβCD (6-6-10) obtenues pour différentes températures régulées dans l'ensemble de la cabine

La régulation de l'air injecté seulement en sortie d'aiguille ayant montré des résultats peu probants, l'influence de la température sur la morphologie des fibres HA-PVA-HPβCD (6-6-10) obtenues par electrospinning, a été étudiée en variant la température entre 20 et 30 °C dans l'enceinte de la cabine (celle-ci n'étant pas isolée thermiquement, il est compliqué d'atteindre des températures supérieures à 30 °C).

L'HR dépendant de la température, une même HR à des températures différentes ne reflétera pas la même quantité de molécules d'eau au sein de l'atmosphère de la cabine. Il a donc été choisi de se placer à température de rosée (Dew point, T_d) constante. La température de rosée est la température à partir de laquelle la vapeur d'eau contenue dans l'air commence à se condenser quand l'atmosphère se refroidit et pour une même teneur en eau de l'air, la température de rosée est fixe et ne dépend pas de la température de l'air. Pour cette étude, il a été choisi de maintenir l'atmosphère de la cabine à une $T_d = 1,9$ °C (qui correspond à une HR = 30 % et une température de 20 °C) et seule la température va varier entre 20 et 30 °C.

Les images MEB des fibres obtenues, ainsi que leur diamètre moyen, sont présentés en Figure 2-16. On voit, que dans cette gamme de températures, ce paramètre n'a aucune influence sur la morphologie des fibres obtenues, que ce soit au niveau de leur diamètre moyen qui restent très proches ou de la régularité du dépôt, qui reste sans défaut.

Une légère variation de la température de la pièce d'electrospinning n'aura donc pas d'impact sur la qualité du dépôt de fibres. Pour la poursuite de ce travail, la mise en forme des membranes sera donc réalisée à température ambiante (21 ± 3 °C) avec une HR contrôlée dans toute la cabine de 30 ± 5 %.

Cette première partie du travail a permis de choisir les matières premières adéquates et leurs proportions respectives, et d'établir les paramètres critiques de leur mise en forme menant à la formation d'une membrane nanostructurée par electrospinning d'HA en solution dans l'eau pure par ajout de PVA et de HP β CD. Cependant, à l'issue de cette étape, le matériau formé reste soluble dans l'eau, empêchant son utilisation en tant que pansement.

2 MEMBRANES INSOLUBLES : RETICULATION ET CARACTERISATIONS

2.1 RETICULATION DES MEMBRANES HA-PVA- HPβCD

2.1.1 Le choix des agents réticulants

Les trois composés de notre système, le HA, le PVA et la HPβCD, étant solubles dans l'eau, il est indispensable de prévoir une étape de réticulation afin d'obtenir un matériau final insoluble et pouvant donc être appliqué comme pansement sans risque de dissolution immédiat au contact de fluides corporels (Figure 2-17).

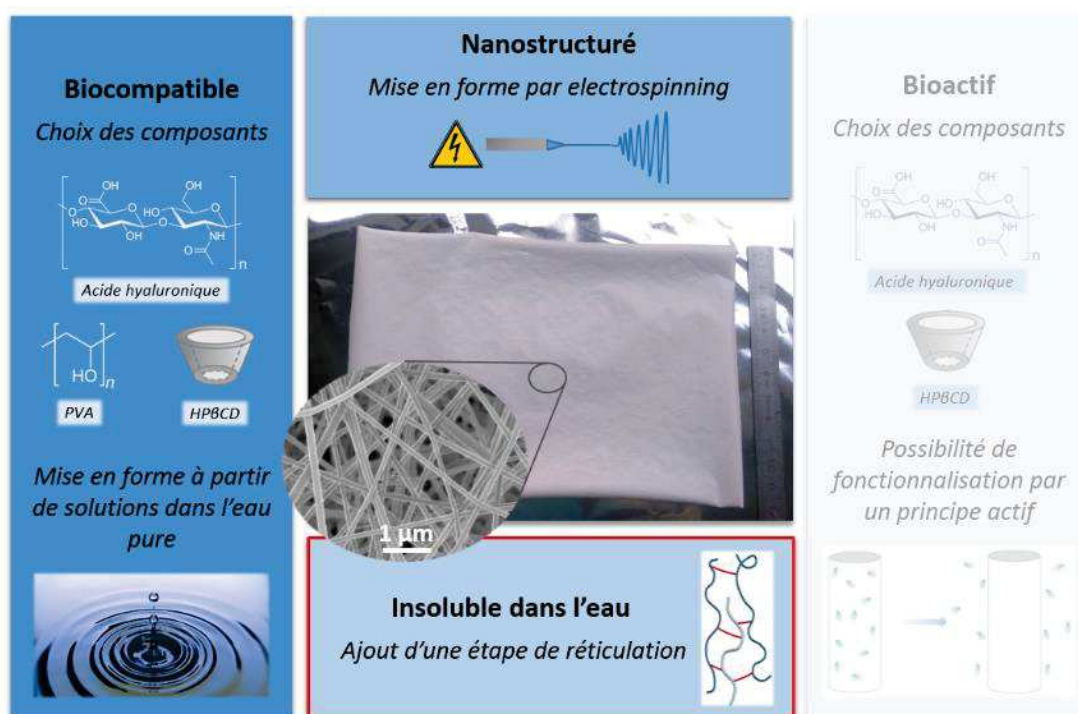


Figure 2-17 : Représentation des propriétés attendues à cette étape de la mise en forme des membranes : En plus de l'obtention de membranes nanostructurées biocompatibles nous souhaitons maintenant que celles-ci soient rendues insolubles dans l'eau

Les groupes fonctionnels, qui sont principalement utilisés pour la réticulation des molécules HA, sont les groupes hydroxyle et carboxyle. Les groupes hydroxyle peuvent être réticulés via une liaison éther et des groupes carboxyle via une liaison ester. Comme présenté dans le chapitre 1 (paragraphe

1.3.2.1), il est possible de modifier chimiquement l'HA avant sa mise en forme puis de le réticuler *in situ* grâce à l'ajout d'un réactif pendant l'électrospinning⁵⁷ ou par activation de la réticulation une fois les fibres formées (par lumière UV par exemple)⁵⁹. Afin d'éviter une modification chimique du HA, différents réactifs permettant une réticulation directe ont été utilisés pour la formation d'un matériau insoluble à base de HA. Les plus courants étant le divinylsulfone, les composés époxydés (comme le butanediol diglycidyl éther-BDDE ou le poly(éthylène glycol) diglycidyl éther) et le glutaraldéhyde^{162,226,227}. Dans le cas de matériaux formés par électrospinning, la plupart du temps, les réticulations utilisant ces composés sont réalisées sur la membrane finale, car leur réactivité très élevée peut empêcher la mise en œuvre de réticulation *in situ* (la solution risque de gélifier dès l'ajout de l'agent réticulant et avant même la formation des fibres)^{60,62}. Malheureusement, ces composés sont identifiés comme toxiques que ce soit lors de la mise en œuvre du dispositif final mais aussi en tant que résidus présents à l'état de traces dans le matériau^{47,228,229}.

Afin de s'affranchir de tels problèmes de toxicité, il a été choisi d'utiliser un carbodiimide hydrosoluble, le 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC) couplé au N-hydroxysuccinimide (NHS), composés présentant une toxicité bien moindre^{230,231}. Le couple EDC/NHS est surtout utilisé dans la réticulation de protéines par réaction entre un acide carboxylique et une amine^{232,233}, dans le cas du HA, il peut également être à l'origine de la formation de liaisons ester entre les groupes hydroxyle et carboxyle présents sur les chaînes du polysaccharide²³⁴. Les structures chimiques de l'EDC et du NHS et la réaction mise en jeu lors de la réticulation entre ces deux groupements sont présentées en Figure 2-18.

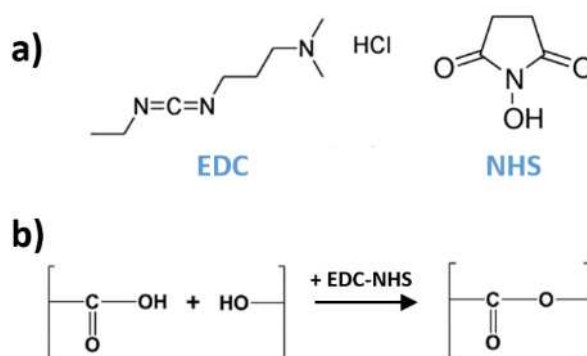


Figure 2-18 : a) Structures chimiques de l'EDC et du NHS et b) schéma réactionnel de la réticulation

Il est donc envisageable de réticuler notre système HA-PVA-HPβCD tout en limitant grandement les risques de toxicité par l'ajout du couple EDC-NHS. Ainsi les liaisons ester pouvant se former entre les groupes acides carboxyliques de l'HA et les groupes hydroxyles présents à la fois sur l'HA, le PVA et la HPβCD devraient rendre notre matériau insoluble.

2.1.2 Etude de l'influence de la concentration en EDC et NHS sur la réticulation et l'électrospinning du mélange HA-PVA-HPβCD

Dans un premier temps, la réticulation post-electrospinning des fibres a été explorée. Pour cela, des membranes HA-PVA-HPβCD (6-6-10) déjà formées ont été immergées dans une solution eau:éthanol (de ratio volumique 5:95) avec un mélange EDC-NHS de concentrations en EDC variant de 3 à 9 % w/w_{H2O} et en NHS allant de 0 à 2 % w/w_{H2O} (protocole inspiré du travail de Park et al. pour la réticulation d'un aérogel HA-collagène²³⁵). Cependant, la HPβCD étant soluble dans l'éthanol, le matériau se solubilise rapidement et ceci bien avant que la réticulation par le couple EDC/NHS n'ait eu lieu. Il est donc impossible d'envisager une telle réticulation post-electrospinning des fibres, du moins avec ces réactifs.

La réticulation *in-situ* des fibres, a été envisagée en ajoutant l'EDC et le NHS directement dans la solution initiale avant electrospinning. Pour cela, différentes concentrations d'EDC et de NHS ont été rajoutées à des solutions de HA-PVA-HPβCD (6-6-10) puis ces dernières ont été electrospinnées (le protocole détaillé est disponible dans le chapitre 5, paragraphe 4.3). Une observation visuelle des solutions de polymères, 1 h et 24 h après l'ajout de l'EDC, a été réalisée afin d'évaluer si la réticulation des mélanges a lieu. Ces états macroscopiques des solutions, associés à la stabilité du jet formé lors de l'étape d'électrospinning sont rapportés dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Aspect des solutions HA-PVA-HPβCD (6-6-10) 1 h et 24 h après l'ajout d'EDC et de NHS et stabilité de l'électrospinning de ces solutions

Concentration en EDC et NHS (% w/w _{H2O}) dans la solution 6-6-10	Aspect de la solution 1 h après l'ajout d'EDC	Aspect de la solution 24 h après l'ajout d'EDC	Stabilité de l'électrospinning
1 % EDC 1 % NHS	Liquide visqueux	Liquide visqueux	Jet stable + de 30 min
2 % EDC 1 % NHS	Liquide visqueux	Gel déformable	Jet stable + de 30 min
2 % EDC 0,75 % NHS	Liquide visqueux	Gel indéformable	Jet stable 20 min puis instable
2 % EDC 0,5 % NHS	Liquide visqueux	Gel indéformable	Jet stable 10 min puis instable
2 % EDC 0,25 % NHS	Gel déformable	Gel indéformable	Jet stable 1-2 min puis brusquement instable
2 % EDC 0 % NHS	Liquide visqueux	Liquide visqueux	Jet stable + de 30 min
3 % EDC 1 % NHS	Gel indéformable	Gel indéformable	Electrospinning impossible

Avec 1 % w/w_{H2O} d'EDC, la réticulation n'est pas efficace puisque, 24 h après l'ajout d'EDC et de NHS, la solution de HA-PVA-HPβCD reste liquide. A l'inverse, avec 3 % w/w_{H2O} d'EDC, la réaction de réticulation est très rapide ce qui empêche la mise en forme des fibres par électrospinning. La réticulation des membranes HA-PVA-HPβCD avec 2 % w/w_{H2O} d'EDC, qui est une concentration intermédiaire permettant une réaction de réticulation efficace mais suffisamment lente pour permettre la mise en forme des fibres, a donc été testée en détail. Pour cette concentration, il a par la suite été choisi d'étudier l'influence de la quantité de NHS sur la réticulation du mélange HA-PVA-HPβCD et sur la stabilité de l'électrospinning. Comme on peut le voir dans le Tableau 2-1, la réticulation des solutions est plus rapide quand le ratio NHS:EDC diminue, mais quand la concentration en NHS est nulle, la réticulation n'est plus visible, ce qui confirme l'importance du NHS dans la réaction de réticulation. La mesure de la viscosité des solutions HA-PVA-HPβCD au cours du temps après ajout d'EDC et de NHS (Figure 2-19) confirme les observations précédentes.

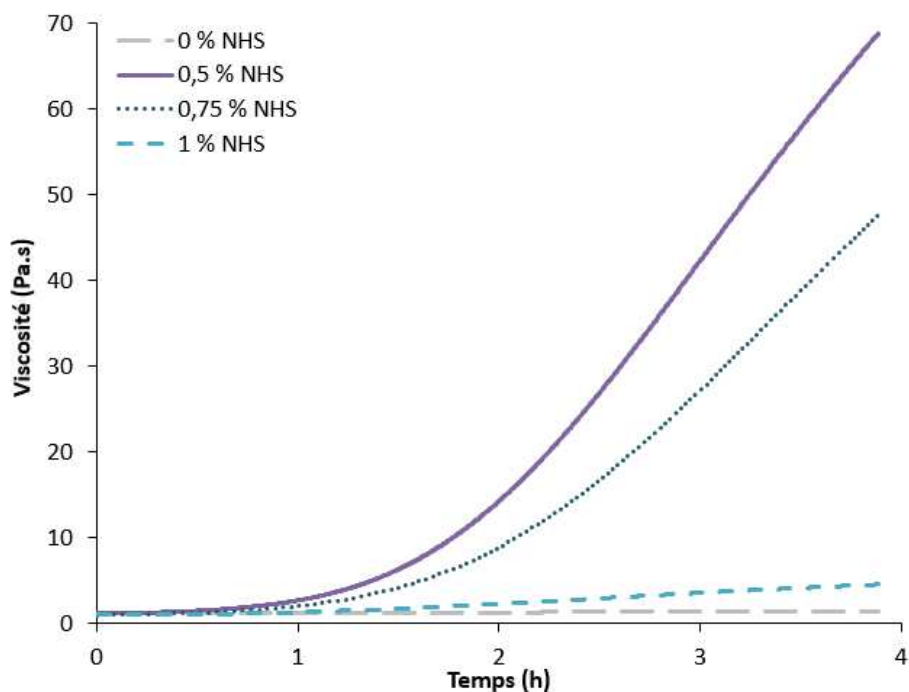


Figure 2-19 : Evolution de la viscosité des solutions HA-PVA-HPβCD (6-6-10) au cours du temps après ajout de 2 % w/w_{H2O} d'EDC et des concentrations en NHS comprises entre 0 et 1 % w/w_{H2O}

On remarque qu'en l'absence de NHS, la viscosité de la solution 6-6-10 n'évolue pas sur 4 h ce qui est en accord avec les résultats précédents. Cependant, plus la concentration en NHS est élevée (entre 0 et 1 % w/w_{H2O}), plus la réticulation est lente ; la viscosité de la solution contenant 1 % w/w_{H2O} de NHS est multipliée par 5 en 200 minutes, alors que celle avec 0,5 % w/w_{H2O} de NHS est multiplié par 69 sur la même durée.

On peut voir en Figure 2-20 les images MEB des fibres HA-PVA-HPβCD obtenues précédemment avec 2 % w/w_{H2O} d'EDC et des concentrations en NHS de 0,5, 0,75 et 1 % w/w_{H2O} (ces dépôts de fibres correspondent au 5 premières minutes d'électrospinning quand le jet de solution est stable pour les trois mélanges). On remarque que, dans les trois cas, le dépôt de fibres est uniforme et les diamètres moyens des fibres sont proches de ceux mesurés pour des membranes sans EDC et NHS (égal à 150 ± 40 nm pour des fibres obtenues à partir de la solution 6-6-10 à 20 °C et 30 ± 5 % d'HR, voir paragraphe 1.3.2 de ce chapitre). L'ajout d'EDC et de NHS à la solution de HA-PVA-HPβCD n'influence donc pas la taille et la géométrie des nanofibres formées.

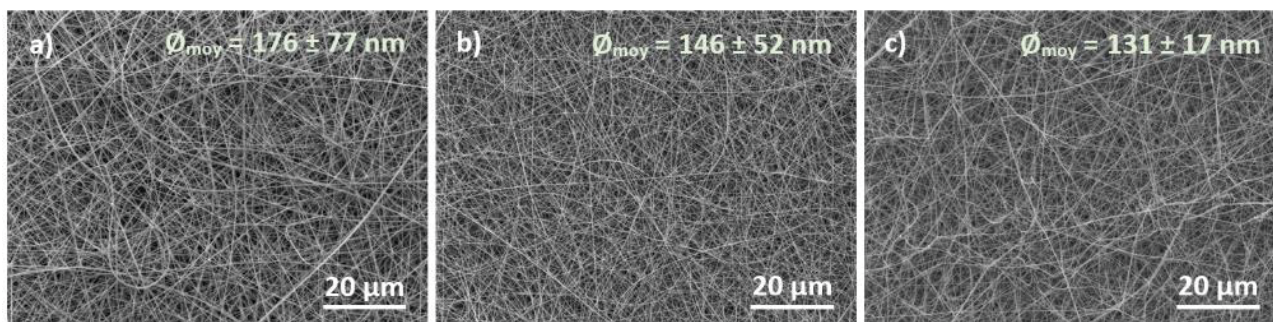


Figure 2-20 : Fibres HA-PVA-HPβCD (6-6-10) avec 2 % w/w_{H2O} d'EDC et a) 0,5 % w/w_{H2O} de NHS, b) 0,75 % w/w_{H2O} de NHS, c) 1 % w/w_{H2O} de NHS

Afin de pouvoir former des nanofibres HA-PVA-HPβCD insolubles, il faut que la réaction de réticulation soit efficace mais suffisamment lente pour permettre l'obtention du matériau par électrospinning (procédé qui nécessite une solution suffisamment liquide pour traverser une aiguille de diamètre interne réduit, de 0,84 mm dans ce travail). Au vu des résultats obtenus précédemment, il a donc été choisi de continuer les essais de réticulation par l'ajout de 2 % w/w_{H2O} d'EDC et de de 1 % w/w_{H2O} de NHS puisque ces concentrations remplissent les conditions attendues.

2.1.3 Etude de l'influence du post-traitement sur la morphologie des fibres

Les fibres formées à partir des solutions HA-PVA-HPβCD + EDC-NHS ont par la suite été immergées dans l'eau mais celles-ci, malgré l'ajout des agents réticulants, se sont immédiatement solubilisées. Le simple ajout d'EDC et de NHS au mélange HA-PVA-HPβCD ne permet donc pas, à ce stade, l'obtention de fibres insolubles dans l'eau. Il faut en effet prévoir une étape de recuit pour activer la réaction de réticulation au sein des fibres. Dans un premier temps, un recuit des fibres à 100 °C a été réalisé pendant 24 h.

La Figure 2-21 montre des images MEB de nanofibres HA-PVA-HPβCD, avant et après recuit, après immersion dans l'eau pendant 48 h et séchage dans les conditions ambiantes et après immersion dans l'eau et lyophilisation.

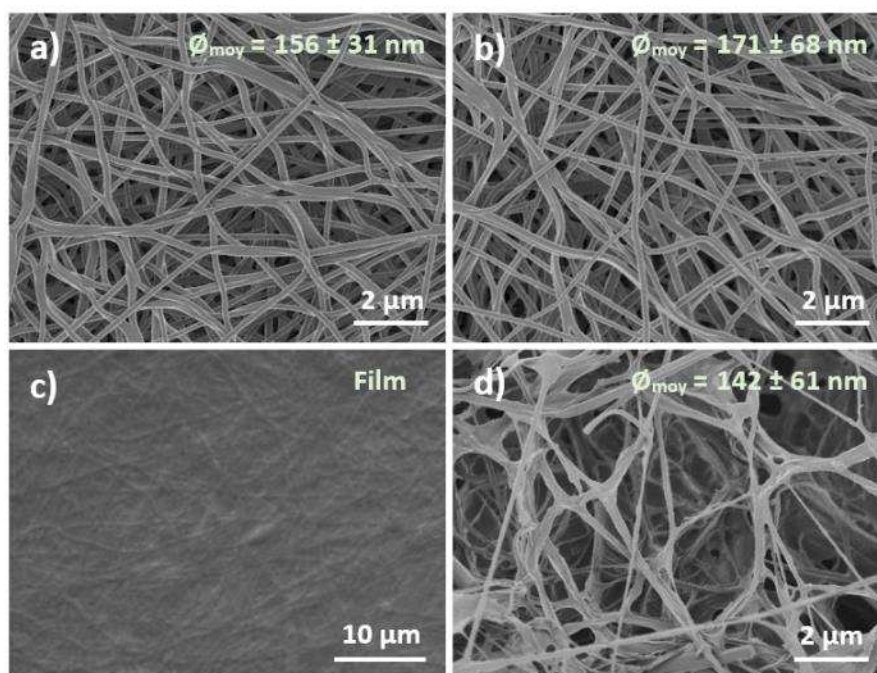


Figure 2-21 : Images MEB de fibres HA-PVA-HPβCD réticulées par EDC-NHS a) avant recuit (100 °C, 24 h), b) après recuit (100 °C, 24 h), c) après immersion dans de l'eau pendant 48 h et séchage à température et pression ambiante pendant 48 h et d) après immersion dans l'eau pendant 48 h et lyophilisation

Comme en témoignent ces images, les fibres avant (Figure 2-21a) et après (Figure 2-21b) recuit sont lisses et uniformes, et le chauffage n'a pas d'effet significatif sur le diamètre des fibres (160 ± 30 nm avant et 170 ± 70 nm après le traitement thermique). La réaction de réticulation fonctionne puisque le matériau ne se solubilise pas lors de son immersion dans l'eau mais, en raison de la tendance des HA réticulés à gonfler dans l'eau^{236,237}, les nanofibres ont absorbé de l'eau et gonflé sans s'autoassembler. C'est à l'étape critique du séchage que les fibres fusionnent entre elles et forment un film si celui-ci a lieu dans des conditions ambiantes (Figure 2-21c). Mais, comme cela a déjà été observé dans des études antérieures^{57,58}, l'ajout d'une étape de lyophilisation après immersion dans l'eau permet de conserver la morphologie nanofibreuse des membranes (Figure 2-21d).

Pour vérifier que la structure nanoporeuse n'est pas due uniquement à l'étape de lyophilisation, un film continu HA-PVA-HPβCD réticulé par EDC-NHS de la même composition que les fibres a été immergé dans l'eau puis lyophilisé dans les mêmes conditions. Les images MEB du film lyophilisé ont montré que le matériau présentait une interface de très faible porosité (Figure 2-22). La

nanostucturation de la membrane finale est donc bien due à la combinaison des étapes d'electrospinning et de lyophilisation.

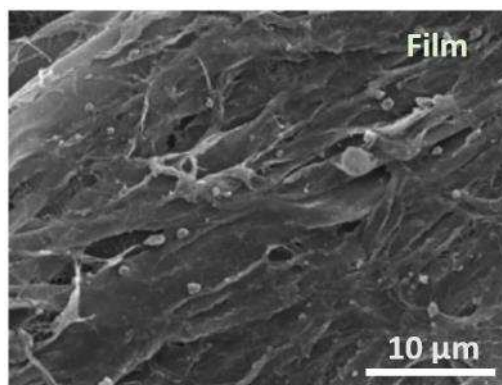


Figure 2-22 : Image MEB d'un film HA-PVA-HP β CD réticulé par EDC-NHS après immersion dans l'eau pour 48 h et lyophilisation

Afin d'éliminer l'EDC et le NHS en excès, ainsi que les sous-produits de la réaction de réticulation ou les composants (HA, PVA et HP β CD) n'ayant pas été réticulés, une étape de lavage des membranes est envisagée. Pour cela, elles sont immergées dans l'eau pendant 48 h, puisqu'il a été déterminé qu'il s'agissait du temps d'immersion minimum pour ne plus détecter de relargage des agents réticulants résiduels du matériau (voir détails en Chapitre 5, paragraphe 4.4). La perte de masse des membranes avant et après l'étape de lavage a été mesurée et est égale à $21 \pm 1,4$ %. Un spectre IR des membranes avant et après immersion dans l'eau a donc été réalisé. De plus, afin d'étudier les solides pouvant être relargués dans l'eau de lavage, celle-ci a été récupérée puis lyophilisée et le résidu solide a lui aussi été étudié par IR. Les spectres IR sont présentés en Figure 2-23.

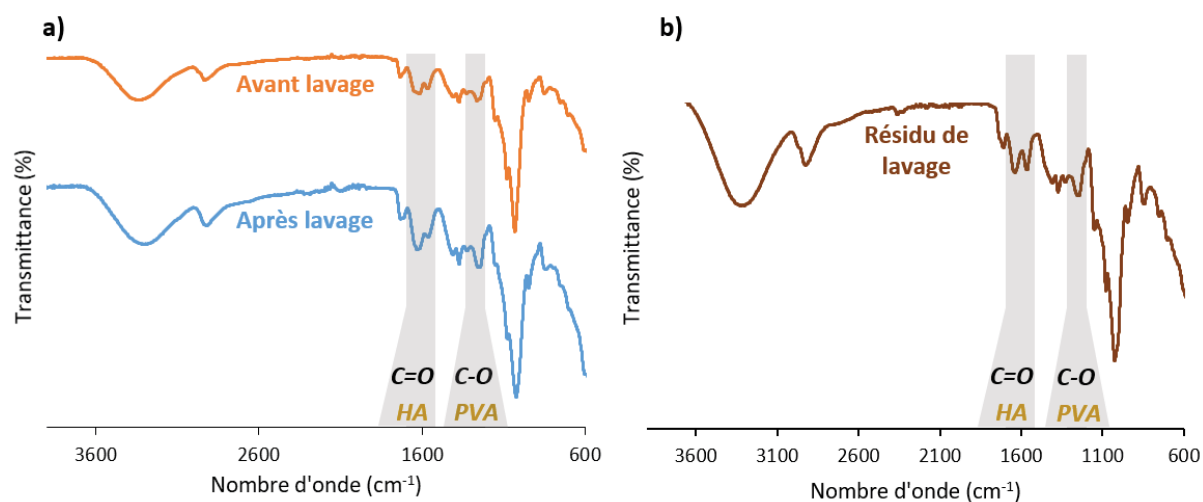


Figure 2-23 : a) Spectres IR des fibres HA-PVA-HPβCD réticulées par EDC-NHS avant et après 48 h d’immersion dans l’eau pour lavage et b) Spectre IR du résidu de lavage

On peut voir sur le spectre du résidu de lavage les bandes caractéristiques des liaisons $C=O_{amide}$ du HA à 1620 cm^{-1} et $C-O_{ester}$ du PVA à 1256 cm^{-1} (liaisons issues des groupes acétate de vinyle qui n’ont pas été hydrolysés) qui montrent qu’une partie de ces composés n’a pas dû être réticulée et a été éliminée lors de l’immersion de la membrane dans l’eau. Pour la HPβCD, il n’y a pas de bande caractéristique visible qui permet d’identifier ce composé en présence de HA et de PVA, il n’est pas possible de confirmer sa présence avec un simple spectre IR. On remarque sur les spectres des membranes HA-PVA-HPβCD qu’il n’y a pas de différence significative entre le spectre des fibres avant et après lavage, les bandes caractéristiques du HA et du PVA sont toujours présentes, prouvant la présence de ces deux composés après l’étape de lavage. Pour la HPβCD, il est encore une fois impossible de statuer à partir du spectre IR.

Afin d’élargir les applications possibles de ce matériau, nous verrons plus tard que l’incorporation de principes actifs dans les fibres a été envisagée. La bioactivité de ces composés pouvant être détériorée par une augmentation de température, les conditions les plus douces possibles à mettre en œuvre lors du recuit de réticulation ont été cherchées dès la mise en forme des nanofibres. Pour cela, des membranes HA-PVA-HPβCD + EDC-NHS ont subi des recuits de 4 à 24 h pour des températures comprises entre 40 et 100 °C . On peut voir en Figure 2-24 les images MEB de certaines de ces membranes après recuit, immersion dans l’eau pour 48 h suivie de la lyophilisation.

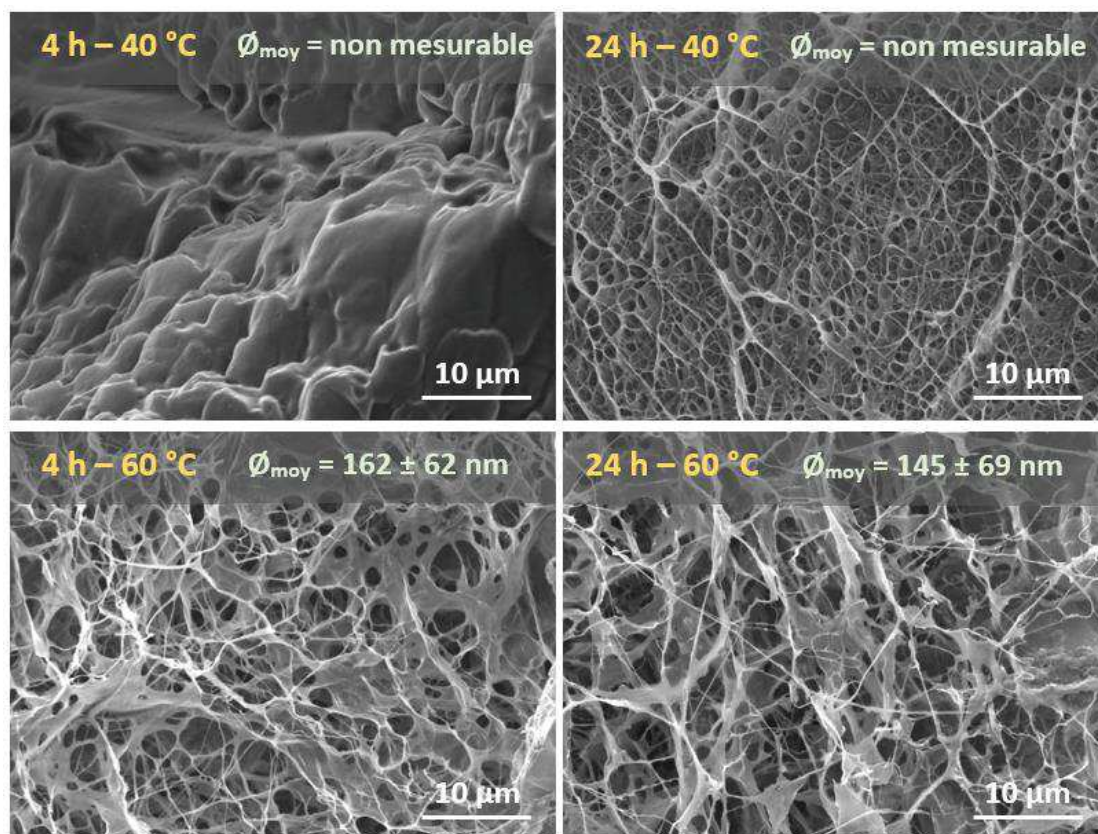


Figure 2-24 : Images MEB de fibres HA-PVA-HP β CD réticulées par EDC-NHS après différentes conditions de recuit, 48 h d'immersion dans de l'eau et lyophilisation

Comme en témoignent ces images, les membranes, dont le recuit a été effectué à 40 °C, ont perdu leur structure nanoporeuse après immersion dans l'eau. De plus, elles sont très fragiles et s'effritent facilement lors de leur manipulation. A partir de 60 °C, on observe que la structure fibreuse est à nouveau présente, mais les recuits inférieurs à 24 h produisent des membranes qui restent fragiles. Il faut donc un recuit minimum de 60 °C pendant 24 h pour obtenir une membrane aisément manipulable et qui conserve sa nanostructuration après immersion dans l'eau et lyophilisation. La perte de masse des membranes dans ces conditions de recuit est mesurée à $22,1 \pm 0,8$ %, ce qui est très proche de celle mesurée pour un recuit de 24 h à 100 °C (égale $21 \pm 1,4$ %). On en déduit que la baisse de température à 60°C n'affecte pas la réaction de réticulation et sera appliquée lors du recuit nécessaire à la formation des nanofibres insolubles.

La Figure 2-25 récapitule toutes les étapes et les conditions de formation de nanofibres insolubles par électrospinning en voie aqueuse du mélange HA-PVA-HP β CD réticulé par EDC-NHS.

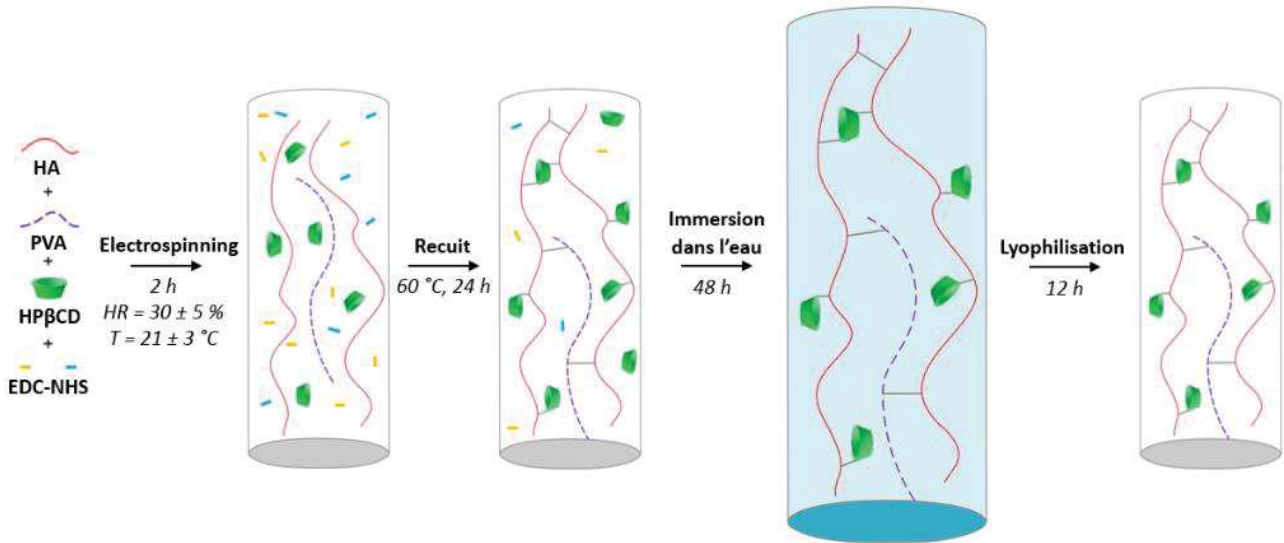


Figure 2-25 : Schéma récapitulatif du protocole de mise en forme des membranes HA-PVA-HPβCD insolubles

2.2 CARACTERISATION DU MATERIAU FINAL

Une fois le procédé de mise en œuvre du matériau nanofibreux établi, il a été décidé d'en analyser les propriétés en réalisant diverses caractérisations de ces membranes formées par electrospinning. Dans un premier temps, il a été choisi de mettre en évidence la réaction de réticulation par spectroscopie IR, puis d'étudier l'influence de cette réticulation sur le gonflement des fibres en fonction de l'humidité relative et enfin de s'intéresser aux propriétés mécaniques du matériau.

2.2.1 Spectroscopie IR

Dans un premier temps, le succès de la réticulation des membranes a été démontré indirectement par la non solubilisation des nanofibres au contact de l'eau. Cette réticulation peut également être mise en évidence lors de la caractérisation du matériau en identifiant par exemple les liaisons chimiques spécifiquement formées au cours de cette étape. Ainsi, des spectres IR des membranes HA-PVA-HPβCD (ratio 6-6-10) réticulées ou non ainsi que les spectres du HA, du PVA et de la HPβCD ont été réalisés et sont visibles en Figure 2-26.

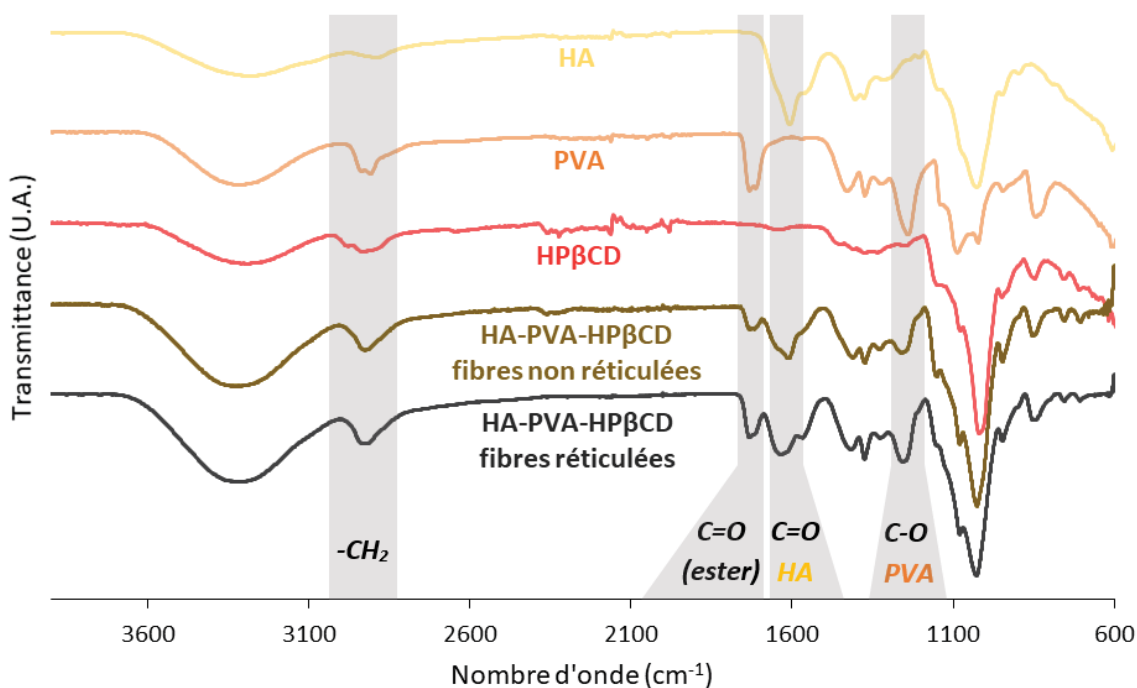


Figure 2-26 : Spectres IR des membranes HA-PVA-HPβCD réticulées ou non, du HA, du PVA et de l' HPβCD seuls

Sur les cinq spectres, les bandes observées à 3340, 2930 et 1027 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'étirement de groupements -OH, $-\text{CH}_2$ et $\text{C}-\text{O}_{(\text{alcool})}$ respectivement. Concernant les spectres des fibres de HA-PVA-HPβCD, les bandes à 1256 cm^{-1} et à 1620 cm^{-1} , caractéristiques des liaisons C-O du PVA et C=O du HA respectivement, sont clairement identifiables, ce qui met en évidence la présence des deux composés dans le matériau final. La bande à 1730 cm^{-1} , relative aux liaisons carbonyle des groupes acétate de vinyle résiduels dans le PVA, apparaît dans les spectres de fibres de HA-PVA-HPβCD non réticulés et réticulés. Cette bande est également attribuée aux groupes ester formés lors de l'étape de réticulation. L'absorbance à 1730 cm^{-1} a donc été mesurée en prenant pour référence l'intensité de la bande $-\text{CH}_2$ à 2930 cm^{-1} qui reste inchangée pendant la réaction de réticulation. Une augmentation de $73 \pm 17 \%$ du rapport A_{1730}/A_{2930} a ainsi été mesurée, prouvant la formation de liaisons ester et donc la bonne réticulation du matériau.

2.2.2 MEB environnemental

Afin de prédire le comportement de la membrane lorsqu'elle sera en contact avec un environnement humide tel qu'une plaie, le gonflement des fibres a été étudié par MEB environnemental (MEBE) en fonction de l'HR. Les images de nanofibres non réticulées et réticulées et la variation de leur diamètre moyen en fonction de l'HR sont données en Figure 2-27.

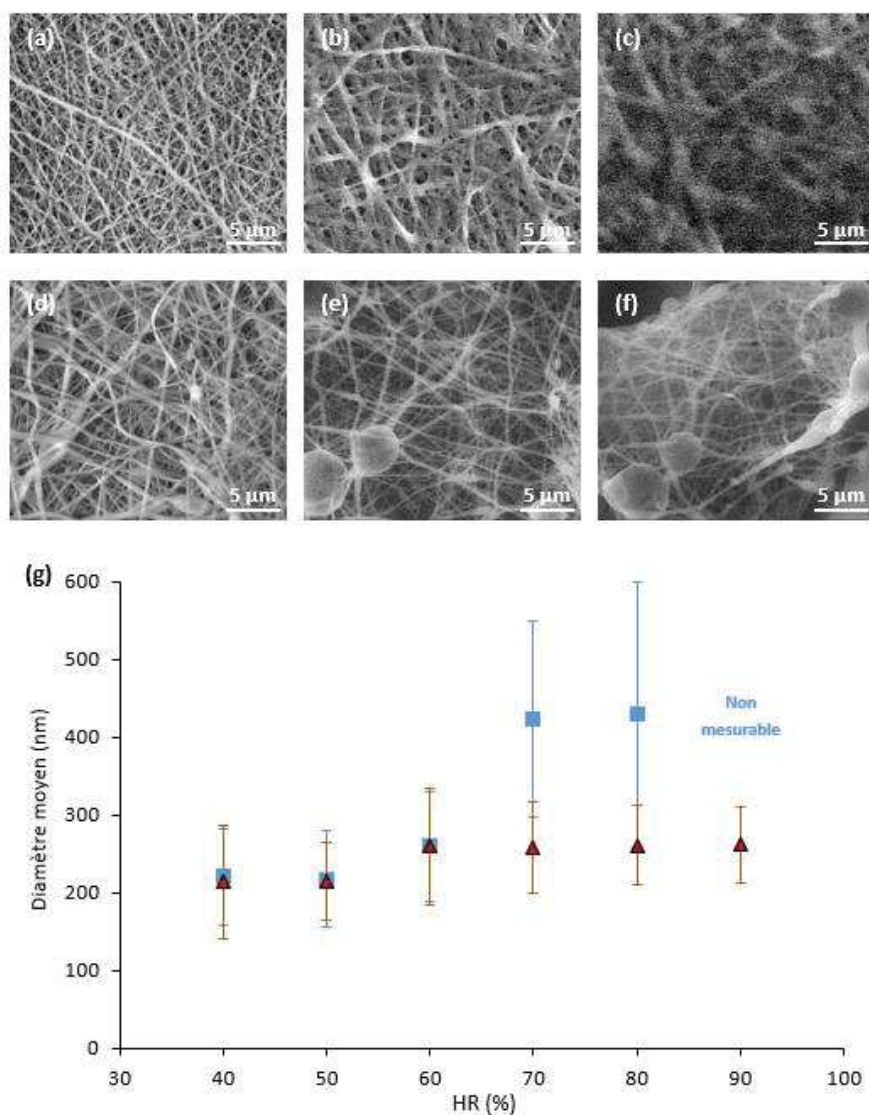


Figure 2-27 : Images MEB de fibres HA-PVA-HP β CD non réticulées à a) HR = 40 %, b) HR = 70 %, c) HR = 90 %, de fibres réticulées à d) HR = 40 %, e) HR = 70 %, f) HR = 90 % et g) diamètre moyen des fibres en fonction de l'HR, fibres non réticulées (■) et fibres réticulées (▲)

Les fibres non réticulées présentent un fort gonflement entre 60 % et 70 % de l'HR, caractérisé par une augmentation du diamètre moyen de 260 ± 70 nm à 420 ± 130 nm respectivement. Lorsque l'HR atteint 90 %, les fibres ont complètement fusionné pour former un film continu. Au contraire, le

diamètre moyen des fibres réticulées reste constant quel que soit l'HR. À une humidité de 90 %, les fibres peuvent encore être distinguées les unes des autres même si elles ont commencé à fusionner en certains points. Cette observation suggère que l'étape de réticulation est cruciale pour éviter toute dissolution et fusion des fibres entre elles tout en limitant le gonflement du matériau final.

2.2.3 Détermination des propriétés mécaniques

Afin d'évaluer les propriétés mécaniques des matériaux réticulés, des essais de traction ont été effectués sur les membranes sèches ainsi que les membranes hydratées par de l'eau. La contrainte en fonction de la déformation a été mesurée pour chaque matériau (pour un protocole détaillé de ces essais se rapporter au chapitre 5, paragraphe 2.16) et les propriétés mécaniques calculées à partir de ces mesures sont résumées dans le Tableau 2-2.

Tableau 2-2 : Propriétés mécaniques des membranes sèches ou humides

	Module d'Young (MPa)	Déformation à la rupture (%)	Contrainte à la rupture (MPa)
Membrane sèche	609 ± 360	22 ± 10	21 ± 10
Membrane humide	0,9 ± 360	127 ± 11	0,6 ± 0,1

Les propriétés mécaniques observées après la réticulation montrent que les membranes sont rigides. Les valeurs élevées mesurées pour le module de Young et la contrainte à la rupture pourraient être dues à la réticulation se produisant dans et entre les fibres, ce qui entraîne également une contrainte à la rupture assez faible. Cependant, après hydratation de la membrane, le module de Young et la contrainte à la rupture diminuent de plusieurs ordres de grandeur tandis que la déformation à la rupture augmente de manière significative, montrant un comportement ductile. Pour les applications pansement, un tel comportement mécanique revêt une grande importance car il permet au matériau de s'adapter à la forme de la plaie.

3 EVALUATION BIOLOGIQUE DES MEMBRANES DE HA-PVA-HP β CD FINALES

3.1 ÉTUDE DE LA BIOCOMPATIBILITÉ DES MEMBRANES

L'objectif de cette étude est de s'assurer de l'absence de toxicité des membranes formées mises au contact d'un milieu mimant des conditions biologiques (peau, tissu biologique...). Pour cela, des fibroblastes NIH/3T3 ont été utilisés comme cellules modèles et la viabilité de ces cellules par contact direct avec les membranes (test de contact) ou par contact indirect (test de relargage) a été étudiée. Ces deux tests ont été réalisés à partir des membranes HA-PVA-HP β CD (6-6-10) réticulées par EDC-NHS et sont illustrés en Figure 2-28.

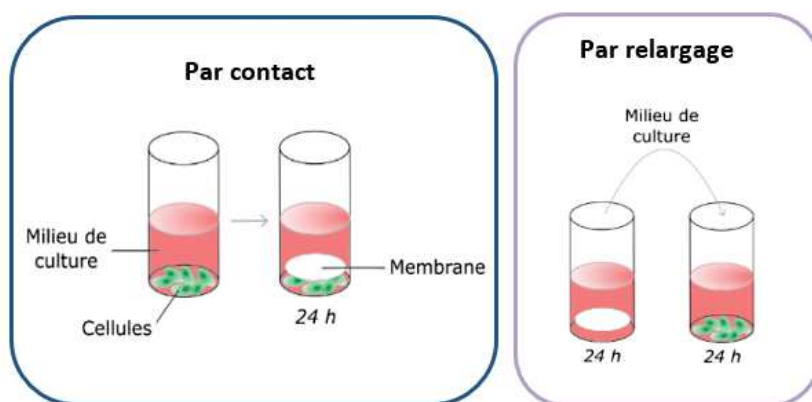


Figure 2-28 : Représentation des tests de toxicité par contact (immersion de la membrane dans le milieu de culture en présence de cellules) et par relargage (membrane préalablement immergée dans milieu de culture, puis milieu de culture, sans membrane, mis en contact avec les cellules)

Pour le test de contact, les membranes sont incubées avec les cellules dans un milieu de culture pendant 24h. Pour le test de relargage, les membranes sont dans un premier temps immergées dans un milieu de culture pendant 24h, puis ce milieu de culture exempt de la membrane est ensuite incubé avec les cellules pendant 24h. Dans ce cas, on évalue la toxicité d'éventuels sous-produits relargués de la membrane après sa mise en condition en milieu humide.

Pour un protocole plus détaillé se reporter au chapitre 5 (paragraphe 5).

Comme on peut le voir en Figure 2-29, les densités de cellules vivantes incubées dans les milieux de culture en contact direct ou indirect avec les membranes HA-PVA-HP β CD sont comparables au contrôle positif et au milieu en contact avec le support seul.

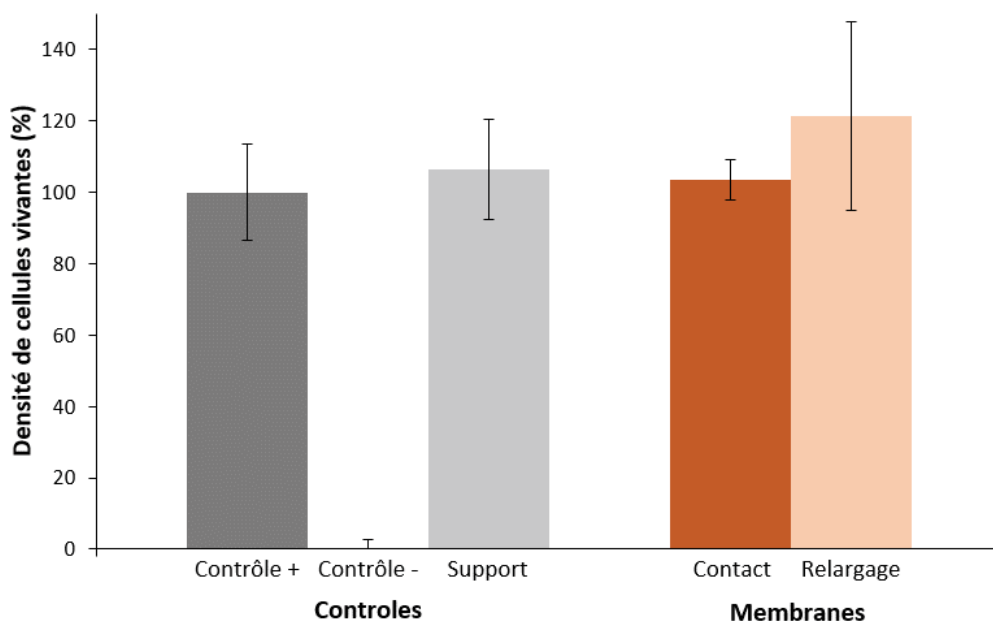


Figure 2-29 : Densité des cellules vivantes après 24 h d'incubation en contact direct (contact) ou indirect (relargage) avec les membranes HA-PVA-HP β CD. Contrôle + : cellules incubées dans le milieu de culture, Contrôle - : cellules incubées dans le en présence de H₂O₂ et Support : cellules incubées en présence de supports CellCrown vide.

Ces tests mettent en évidence l'absence de mortalité des fibroblastes en contact direct ou indirect avec le matériau développé, confirmant ainsi que les membranes HA-PVA-HP β CD ne représentent pas de risque de cytotoxicité.

3.2 ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES MEMBRANES EN PRESENCE DE HYALURONIDASE

Les membranes HA-PVA-HP β CD en contact avec des liquides physiologiques peuvent être dégradées par les enzymes de hyaluronidase (Hyal) qu'ils contiennent. Dans le corps humain, il existe six types de Hyal différentes : Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, PH-20, HyalP1, qui dégradent le HA par hydrolyse de la liaison glycosidique β -(1 \rightarrow 4)^{238,239}, comme illustrée en Figure 2-30.

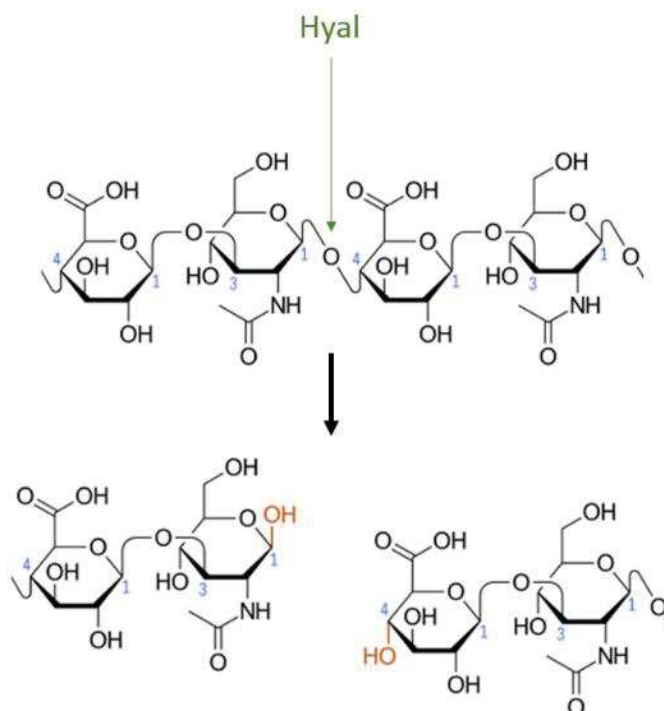


Figure 2-30 : Schéma illustratif de la dégradation de l'HA par la Hyal

La concentration de chaque enzyme peut varier suivant les différents endroits du corps (par exemple dans le serum humain la concentration en Hyal-1 est de 60 ng.mL^{-1} ²⁴⁰), mais la Hyal-1 et la Hyal-2 sont les deux hyaluronidases les plus présentes dans les tissus humains. La Hyal-2 dégrade le HA de masse molaire élevée en un produit approximativement de 50 unités de disaccharide, tandis que Hyal-1 peut dégrader le HA de haute masse molaire en petits oligomères, principalement en tétrasaccharides ¹⁵⁹.

Afin d'étudier l'influence de la Hyal sur les membranes HA-PVA-HPβCD, celles-ci ont été immergées dans une solution contenant $50\text{-}125 \text{ U.mL}^{-1}$ de Hyal-1 à 33 °C . La perte de masse des membranes a été mesurée et l'évolution de la structure nanofibreuse a été imagée par MEB (pour les protocoles détaillés se référer au chapitre 5, paragraphe 6). La Figure 2-31 illustre la perte de masse des membranes immergées dans la Hyal ou le PBS au cours du temps.

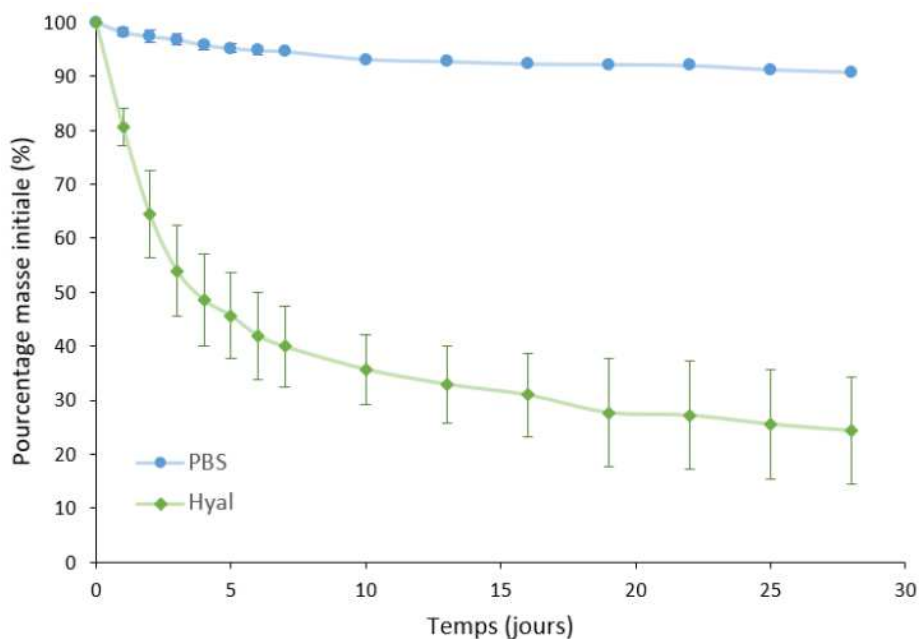


Figure 2-31 : Suivi de la perte de masse de membranes HA-PVA-HPβCD (6-6-10) immergées dans du PBS ou une solution de Hyal

On remarque que la masse de la membrane immergée dans le PBS est relativement stable : après 7 jours, $94,6 \pm 0,7$ % de la masse est conservée et après 28 jours celle-ci est toujours de $90,8 \pm 0,5$ %. On note par contre une forte perte de masse des membranes immergées dans la solution de Hyal : après 24 h d’immersion, $19,4 \pm 3,4$ % ont été solubilisés, après 7 jours, la perte de masse atteint $60,1 \pm 7,5$ % et après 28 jours celle-ci est de $75,7 \pm 9,9$ %.

En parallèle, l’évolution de la structure au cours du temps des membranes immergées dans du PBS ou de la Hyal a été imagée par MEB (Figure 2-32).

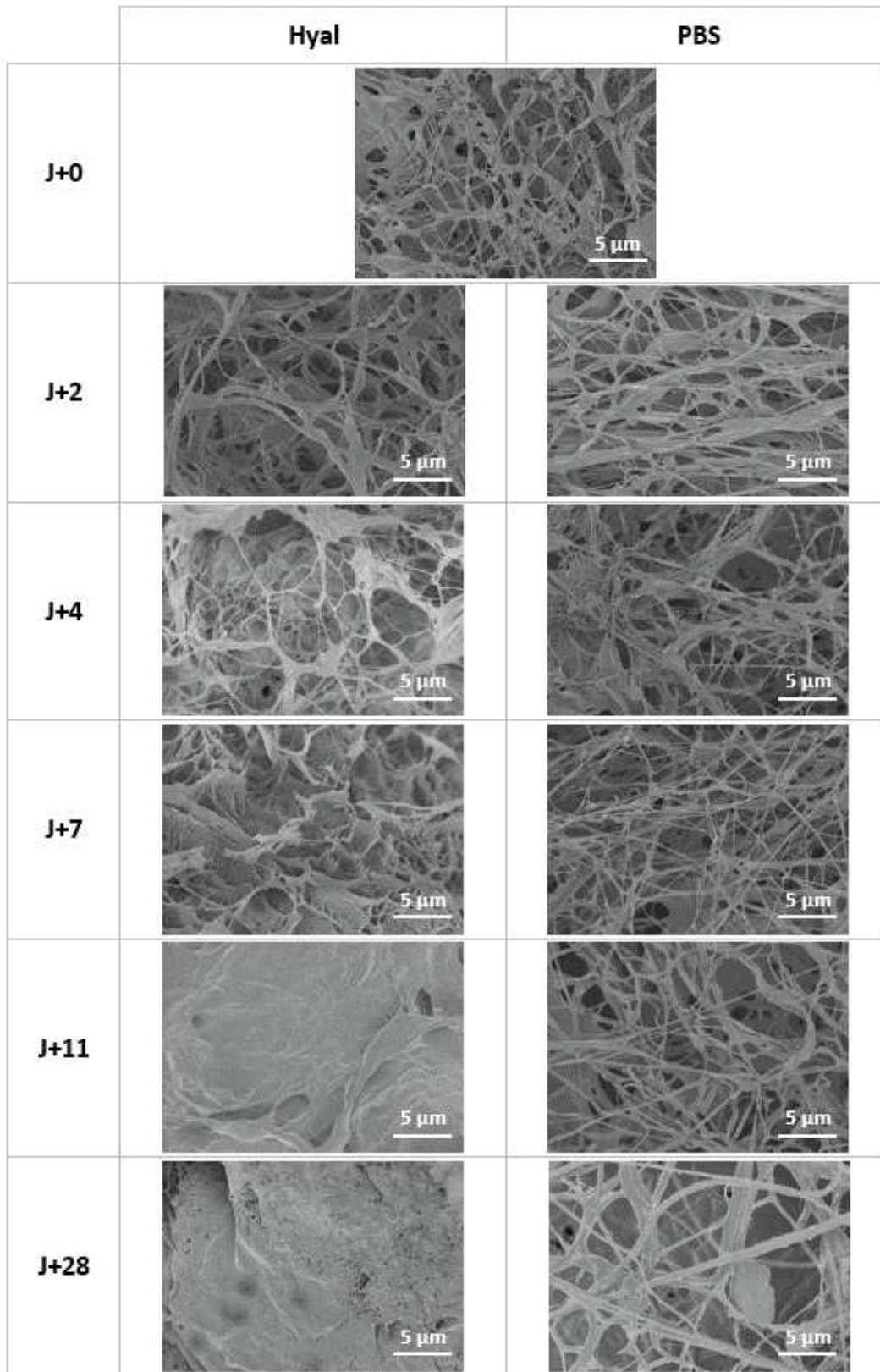


Figure 2-32 : Images MEB de fibres HA-PVA-HP β CD après immersion dans une solution de Hyal ou du PBS

Pour les membranes immergées dans le PBS, on remarque que la géométrie des fibres n'évolue pas, la nanostructuration est conservée pendant les 28 jours d'immersion. Par contre, au contact de la Hyal, on peut constater que la structure nanofibreuse à tendance à disparaître au cours du temps pour ne former plus qu'un film compact. Si ces résultats prouvent la bonne dégradation des fibres au contact de milieux physiologiques, la dégradation du matériau n'est cependant pas immédiate, jusqu'à 7 jours on peut considérer que la membrane est encore nanostructurée et c'est seulement à partir de 11 jours que cette structuration a entièrement disparue. Cette dégradation est donc suffisamment lente pour permettre au matériau de jouer son rôle de protection de la plaie durant les premiers jours suivant la blessure. En effet, la phase de prolifération de la cicatrisation, qui débute environ 12 h après la formation de la plaie, va permettre la formation du tissu de granulation qui va isoler la plaie de l'extérieur. Après une à deux semaines, ce tissu sera presque entièrement formé et pourra alors servir de support au développement de vaisseaux sanguins et à la formation d'une peau saine, lors de la phase de remodelage²⁴¹. C'est donc lors de la première, voir deuxième semaine suivant les individus et le type de blessure, qu'il est important de protéger la plaie par un pansement, puisque celui-ci permettra de l'isoler des pathogènes extérieurs et évitera des traumatismes mécaniques qui pourraient retarder la formation du tissu de granulation et donc la cicatrisation de la plaie. De plus, l'apport de l'HA dans la modulation de la phase inflammatoire est important la première semaine suivant la blessure, puisque, dans le cas d'une plaie saine, l'inflammation atteint son maximum après 24 h pour ensuite rapidement diminuer au bout d'une semaine²⁴¹.

Il faut cependant noter que l'évolution dans la morphologie des nanofibres en présence de Hyal ne donnent qu'une idée relative du comportement de dégradation des membranes et que le temps de dégradation *in vivo* de ces dernières va dépendre de leur localisation, puisque les concentrations en enzymes vont varier d'une zone à l'autre⁶⁵.

Conclusion

Dans ce chapitre, un matériau nanofibreux insoluble à base d'HA a été obtenu avec succès par electrospinning en voie aqueuse. Deux polymères additionnels, le PVA et l'HPβCD ont été incorporés pour assurer l'homogénéité du dépôt formé et faciliter la mise en forme des fibres. Le mélange idéal de ces 3 polymères avec la plus faible concentration de PVA et HPβCD est composé de 6 % w/w_{H2O} de HA, 6 % w/w_{H2O} de PVA et 10 % w/w_{H2O} de HPβCD (6-6-10). Parmi les paramètres ambiants influençant la mise en forme par electrospinning, l'humidité relative joue un rôle crucial que ce soit sur l'homogénéité du dépôt ou sur le diamètre moyen des fibres, en revanche la température (dans la gamme étudiée) ne semble pas affecter la morphologie du dépôt de fibres. Une régulation de l'humidité relative dans la cabine à 30 ± 5 % est donc nécessaire à la formation de fibres sans défauts qui présentent dans ce cas un diamètre moyen de 150 ± 30 nm.

Dans un second temps, des membranes HA-PVA-HPβCD insolubles ont été formées en réticulant les fibres *in situ* par l'ajout de 2 % w/w_{H2O} d'EDC et de 1 % w/w_{H2O} de NHS à la solution initiale de HA-PVA-HPβCD ainsi qu'en réalisant une étape de recuit à 60 °C pendant 24 h minimum des fibres formées par electrospinning. L'ajout d'une étape de lyophilisation du matériau final après lavage des fibres a permis la conservation de la nanostructuration de la membrane. La réticulation des fibres a été par la suite démontrée par spectroscopie IR et par MEBE.

Enfin, des études de cytotoxicité ont permis de prouver l'innocuité des membranes HA-PVA-HPβCD réticulées par EDC-NHS. De plus, une forte perte de masse des membranes au contact de hyaluronisases a été observée, ce qui prouve la bonne dégradabilité du matériau.

Une fois la mise en forme des membranes maîtrisée, il a par la suite été choisi de les fonctionnaliser à l'aide d'un principe actif. Cette étude fera l'objet du chapitre 3.

CHAPITRE 3 - FONCTIONNALISATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES PAR UNE MOLECULE MODELE : LE NAPROXENE

Introduction

Après avoir formé des membranes nanofibreuses, biocompatibles et insolubles dans l'eau par electrospinning d'une solution aqueuse de HA-PVA-HP β CD, il a été choisi de **fonctionnaliser** ce matériau par un principe actif afin d'ouvrir les champs d'application vers un usage thérapeutique.

Dans un premier temps, le choix d'une molécule modèle, le **naproxène (NAP)**, aux propriétés **anti-inflammatoires**, sera justifié, puis la fonctionnalisation des nanofibres via la formation d'un **complexe** d'inclusion entre le NAP et la HP β CD sera étudiée et caractérisée par spectroscopie IR, ATG ou encore $^1\text{H-RMN}$.

Dans un second temps, deux méthodes d'**imprégnation** du NAP dans les membranes HA-PVA-HP β CD seront testées : par **immersion dans une solution aqueuse** de NAP ou par **CO₂ supercritique**. La **cinétique de relargage** du NAP ainsi imprégné dans les membranes sera ensuite mesurée dans une solution de PBS ou en présence de hyaluronidase, qui induit une dégradation du matériau. Les cinétiques de relargage des membranes seront comparées à celles obtenues pour des **films** HA-PVA-HP β CD afin d'évaluer l'apport de la nanostructuration du matériau.

CHAPITRE 3 - FONCTIONNALISATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES PAR UNE MOLECULE MODELE : LE NAPROXENE	115
1 ETUDE DES VOIES DE FONCTIONNALISATION	117
1.1 <i>Le naproxene</i>	121
1.2 <i>Formation des complexes d'inclusion entre le naproxène et la HPβCD.....</i>	125
1.2.1 <i>Les complexes d'inclusions NAP-CD dans la littérature.....</i>	126
1.2.2 <i>Formation et caractérisation des complexes NAP/HPβCD dans le cadre de notre travail</i>	127
2 IMPRÉGNATION DES FIBRES	135
2.1 <i>L'utilisation du CO₂ supercritique pour l'imprégnation d'un principe actif</i>	135
2.2 <i>L'imprégnation du naproxène dans les membranes HA-PVA-HPβCD.....</i>	137
3 SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXÈNE EN SOLUTION AQUEUSE.....	139
4 SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXÈNE EN PRÉSENCE DE HYALURONIDASE	144
RÉFÉRENCES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1 ETUDE DES VOIES DE FONCTIONNALISATION

Comme récapitulé en Figure 3-1, les différentes stratégies mises en place jusque-là ont permis de mettre en forme une membrane à partir d'HA en solution dans l'eau pure grâce à l'ajout d'HPβCD et de PVA.

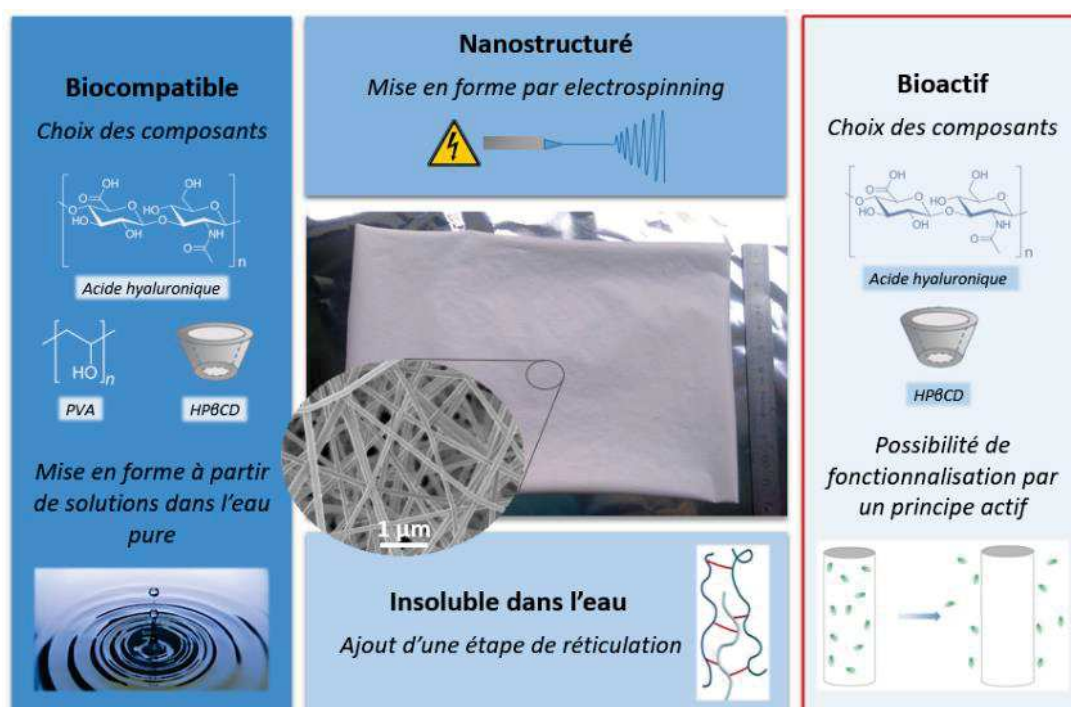


Figure 3-1 : Représentation des propriétés attendues à cette étape de la mise en forme des membranes : Après avoir formé un matériau nanostructuré biocompatible et insoluble, une bioactivité du pansement par sa fonctionnalisation est maintenant souhaitée

De par leur nanostructuration et leur surface spécifique élevée, les matériaux obtenus par électrospinning peuvent être facilement fonctionnalisés par l'incorporation dans les fibres d'agents thérapeutiques. Cela permet de viser des applications spécifiques ou d'apporter des fonctions supplémentaires au matériau. Des matériaux biodégradables ou non dégradables peuvent être utilisés comme support au principe actif. La libération peut avoir lieu par diffusion uniquement ou par diffusion et dégradation simultanées de la membrane nanofibreuse.

Afin d'imprégner le principe actif dans le matériau, différentes stratégies sont possibles. L'une des plus simples et des plus largement utilisées consiste en un simple **mélange** du principe actif à la solution de polymère électrospinnée^{157,242-244}. Pour cela, il faut que le médicament soit soluble dans un solvant commun au polymère électrospinné et qu'il ne perturbe pas la mise en forme des fibres ou leur réticulation si celle-ci est envisagée. Cette méthode, simple à mettre en œuvre, permet la formation de fibres en une seule étape mais ne permet pas de contrôler la répartition de la molécule active au sein des fibres. Pour cela, il est possible d'utiliser l'**electrospinning coaxial** qui a pour objectif principal de former des fibres de structure cœur-coquille, en adaptant la géométrie de l'émetteur (illustration en Figure 3-2).

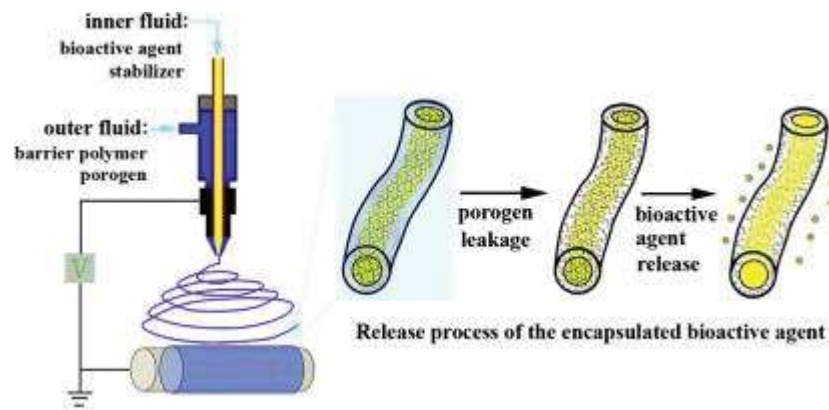


Figure 3-2 : Schéma illustratif de l'électrospinning coaxial, de la structure des fibres formées et du mode de libération du principe actif²⁴⁵

Des nanofibres contenant le principe actif en cœur et enveloppé dans une gaine de polymère sont ainsi formées. De la sorte, le médicament est protégé par l'enveloppe polymère et une libération prolongée et contrôlée de la molécule active est alors possible²⁴⁵⁻²⁴⁷. Il est aussi possible d'obtenir des fibres similaires en utilisant une simple aiguille par **electrospinning d'une émulsion** tel qu'illustré en Figure 3-3.

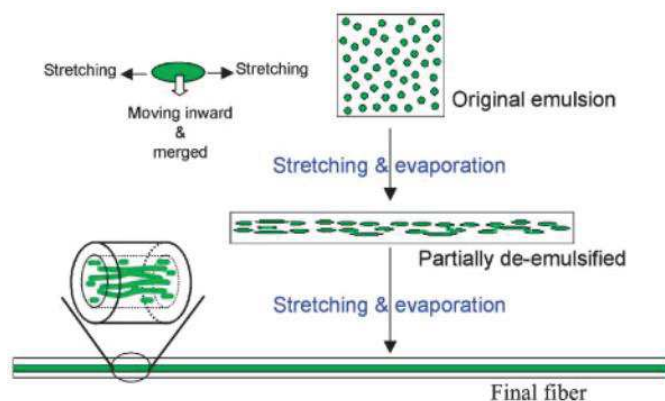


Figure 3-3 : Représentation schématique de la formation de fibres cœur-coquille par électrospinning d'une émulsion ²⁴⁸

L'émulsion est alors composée de deux phases, une première dans laquelle on retrouve le principe actif et une seconde contenant le polymère en solution. Dans ce cas, la structure de la fibre est obtenue par étirement et fusion coalescence de l'émulsion ^{248,249}. Il est aussi possible de réaliser des **fibres composites contenant des nanoparticules** en incorporant celles-ci directement dans la solution électrospinnée. Les nanoparticules peuvent présenter elles-mêmes un intérêt biomédical de par leur composition (nanoparticules d'hydroxyapatite ²⁵⁰, d'argent ²⁵¹...) ou être fonctionnalisées par un principe actif ²⁵².

Dans tous les procédés présentés ci-dessus, le principe actif est inclus dans la solution électrospinnée, mais il est aussi possible d'incorporer les molécules d'intérêt une fois les membranes nanofibreuses formées par une post-fonctionnalisation. Pour cela, plusieurs voies de fonctionnalisation sont envisageables:

- (i) par **immersion de la membrane** dans une solution contenant la molécule d'intérêt. La fonctionnalisation a alors lieu par simple adsorption physique du principe actif sur le matériau nanofibreux. Une **modification de surface** des fibres (par traitement plasma, par chimie en voie aqueuse...) peut avoir été effectuée au préalable assurant le greffage ou la simple absorption du principe actif à la surface des nanofibres ¹⁵⁶.
- (ii) par un **assemblage couche-par-couche (layer-by-layer)** de polyélectrolytes contenant le principe actif ²⁵³ sur les fibres déjà formées.
- (iii) par **adsorption directe de nanoparticules à la surface des fibres** ²⁵⁴⁻²⁵⁶ (toutes ces techniques sont illustrées en Figure 3-4).

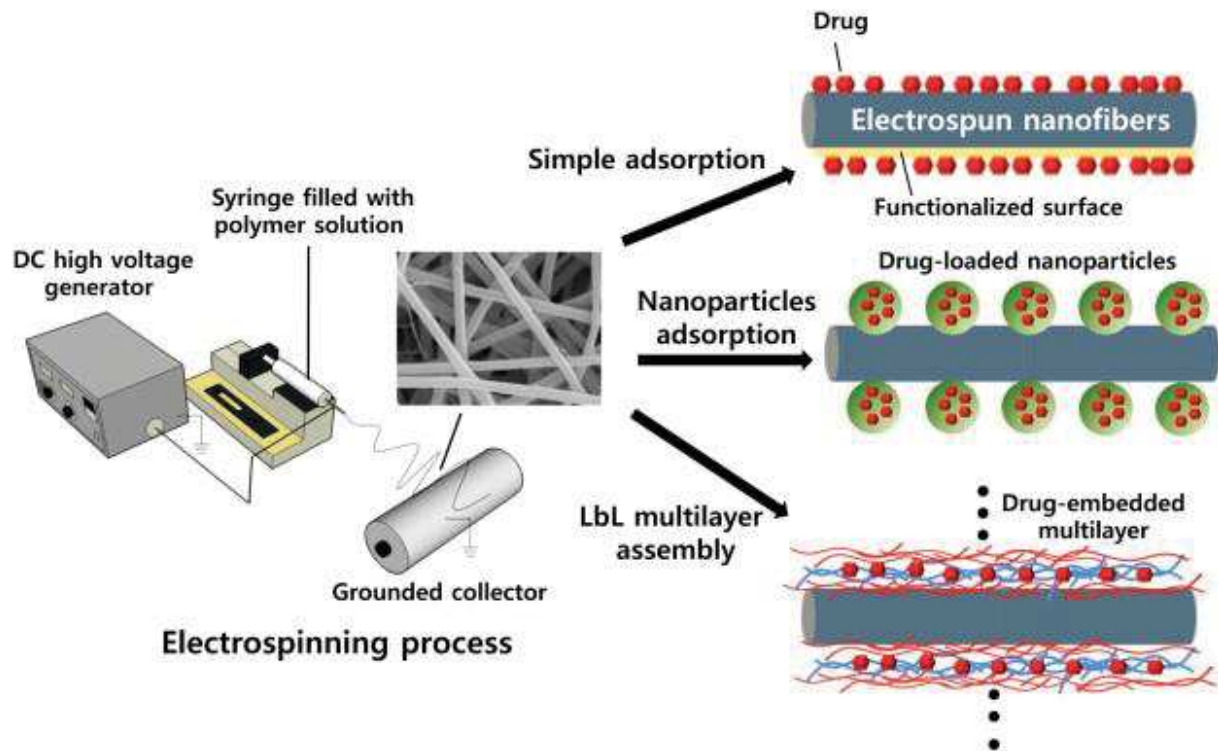


Figure 3-4 : Illustration des modes de post-fonctionnalisation de fibres obtenues par electrospinning (avec LbL : layer-by-layer) ¹⁵⁶

Selon la fonctionnalité souhaitée, il a été montré que, grâce à ces différentes méthodes de fonctionnalisation, toutes sortes d'actifs peuvent être incorporés dans les matériaux nanofibreux obtenus à l'aide de divers polymères. Parmi ces molécules, quelques exemples sont cités ci-dessous :

- des **antibiotiques** (tétracycline dans fibres d'acide polylactique et de poly(éthylène-co-vinyl acétate) ²⁴², acide fusidique et rifampicine dans fibres acide poly(lactique-co-glycolique) ²⁴³, tétracycline dans fibres acide polylactique/polycaprolactone ²⁵⁷, céfoxitine dans fibres acide poly(lactique-co-glycolique) ²⁵⁸)
- des **antifongiques** (eugénol dans fibres de polyacrylonitrile ²⁵⁹, chlorure de cétylpéridinium dans fibres polyvinylpyrrolidone/poly(méthacrylate de méthyle) ²⁶⁰)
- des **anti-inflammatoires** (Kétoprofène dans fibres éthyl cellulose/polyvinylpyrrolidone ²⁴⁴, ibuprofène dans fibres acide poly(lactique-co-glycolique)/poly(éthylène glycol)-g-chitosan ²⁶¹, kétoprofène dans fibres polyvinylpyrrolidone/zéine ²⁶², fenbufène dans fibres acide poly(lactique-co-glycolique)/gélatine ²⁶³)

- des **anticancéreux** (doxorubicine dans fibres poly(éthylène glycol)/acide polylactique ²⁶⁴, doxorubicine dans fibres acide polylactique ²⁶⁵, cisplatine dans fibres acide polylactique/ acide poly(lactique-co-glycolique) ²⁶⁶, paclitaxel dans fibres acide poly(lactique-co-glycolique)
- ...

1.1 LE NAPROXENE

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle et la découverte de l'aspirine (acide acétylsalicylique), une multitude de médicaments anti-inflammatoires ont été développés et commercialisés ²⁶⁷. Les molécules anti-inflammatoires se divisent en deux familles : les corticoïdes ou anti-inflammatoires stéroïdiens (comme la cortisone) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dont fait partie l'aspirine. Ces deux familles se distinguent par leur mécanisme d'action. Le corticoïde se fixe directement sur la cellule par le biais d'un récepteur spécifique et peut ainsi réguler son activité, en augmentant la production de protéines anti-inflammatoires et en diminuant celle de molécules favorisant l'inflammation ²⁶⁸. Les AINS, quant à eux, sont des inhibiteurs d'une enzyme, la cyclooxygénase, qui catalyse la formation de prostaglandines, médiateurs chimiques responsables de l'inflammation ²⁶⁹. Ces deux mécanismes sont illustrés en Figure 3-5.

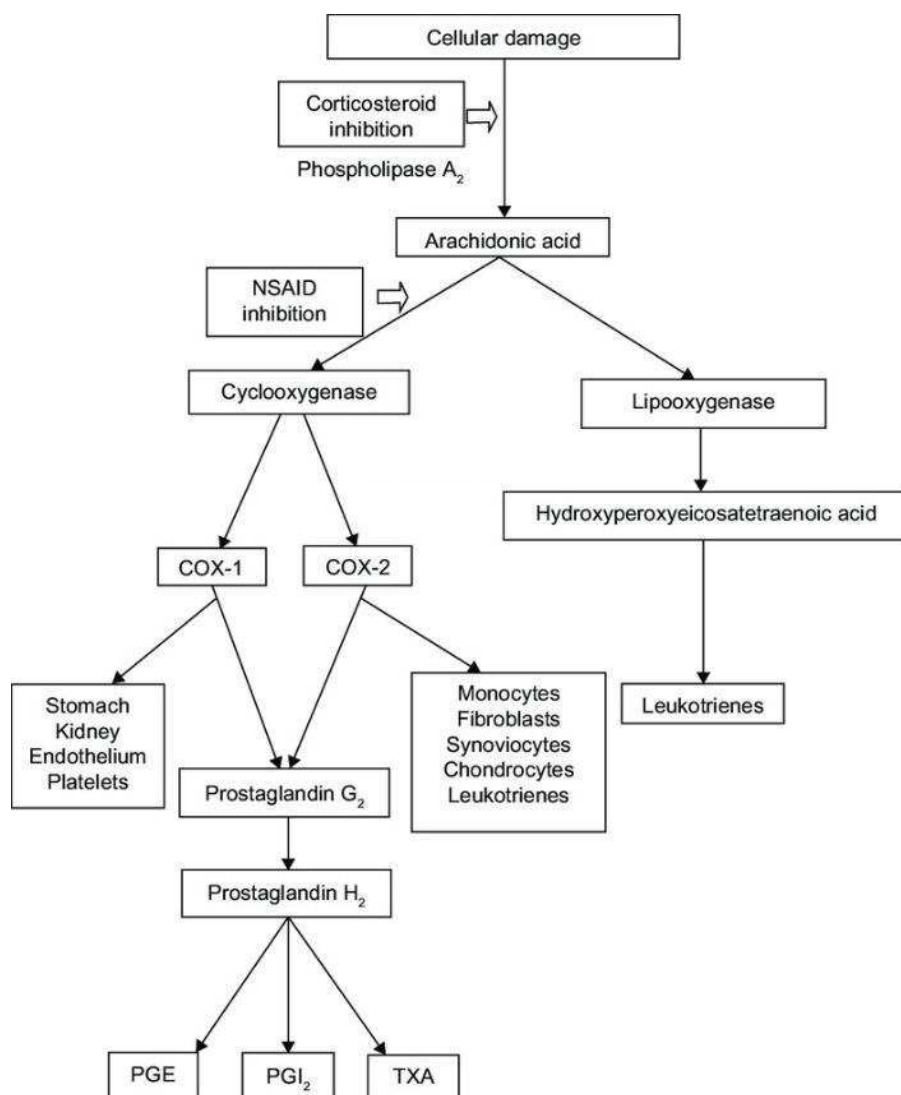


Figure 3-5 : Représentation de l'inhibition de la cascade inflammatoire par les corticoïdes et par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ici NSAID). Avec COX, cyclooxygenase; PG, prostaglandin; TXA, Thromboxane A₂ ²⁷⁰

Le (S)-naproxène (NAP), dont la structure est illustrée en Figure 3-6, fait partie de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ce composé est utilisé pour ses propriétés analgésiques (anti douleur), antipyrétiques (qui lutte contre la fièvre) et anti-inflammatoires ²⁷¹.

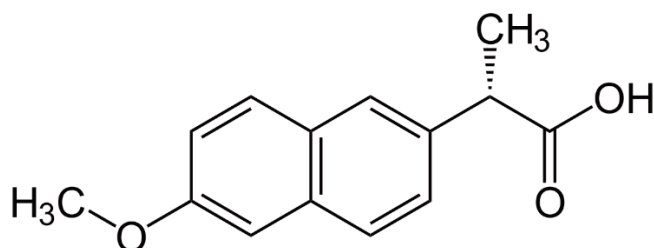


Figure 3-6 : Structure chimique du naproxène

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'inflammation est la réponse naturelle du corps à la formation d'une plaie. Comme illustré en Figure 3-5, cette réaction physiologique met en œuvre un mécanisme complexe dans lequel intervient les cellules immunitaires (mastocytes, macrophages...) mais aussi de nombreux médiateurs chimiques (cyclooxygénases, prostaglandines...) ²⁷². Cette réaction physiologique est essentielle dans l'élaboration des défenses immunitaires. En effet, elle permet d'activer les mécanismes conduisant au contrôle des agents pathogènes et de soigner les dommages de la blessure initiale ou ceux créés par des pathogènes extérieurs qui auraient pu pénétrer la plaie ²⁷³. Cependant, dans certains cas, l'inflammation peut se développer de manière exagérée et devenir délétère. La réaction inflammatoire est accompagnée de douleurs qui, suivant l'intensité, peuvent être difficilement supportables par la personne atteinte. Il a, par exemple, été montré que la diminution de l'inflammation et de la douleur apportée par les AINS dans le cas de chirurgie orthopédique, permet aux patients de commencer une rééducation plus tôt, ce qui facilite la récupération du mouvement et de la fonction motrice des membres opérés ²⁷⁴. De plus, Lisboa et al. ont rapporté que le traitement par AINS des plaies postopératoires diminuait les concentrations de cytokines inflammatoires ce qui peut contribuer à une réponse inflammatoire plus favorable permettant une meilleure cicatrisation de la plaie (étude réalisée avec différents AINS : le célécoxib, le kétorolac, l'ibuprofène, l'indométacine et l'acide acétylsalicylique pour une durée de traitement de 4 jours en moyenne et posologie variant en fonction de l'état et du niveau de douleur de chaque patient) ²⁷⁵. Il a aussi été démontré que l'intensité de la phase inflammatoire pouvait influencer la formation de tissu cicatriciel. En effet, plus l'inflammation au sein d'une plaie est intense, plus le risque de formation d'une cicatrice rémanente est élevé, alors qu'au contraire une inflammation moins forte va permettre une formation de cicatrice minimale ²⁴¹.

Tous ces résultats démontrent le potentiel favorable que peut avoir l'administration d'un anti-inflammatoire comme le NAP sur la cicatrisation saine d'une plaie tout en apportant un confort non négligeable au patient.

Les AINS sont administrés par voie orale, rectal ou injectable, mais peuvent aussi faire l'objet d'une administration topique (administration d'un médicament sur un point externe du corps comme la peau) le plus souvent sous forme de crème ou de gel, afin de lutter localement contre l'inflammation. Leur posologie varie grandement en fonction de la molécule utilisée, de l'état et du niveau de douleur du patient. Dans le cas particulier du NAP, il n'est disponible en France que par administration orale (avec une dose maximale de 1100 mg par jour) ²⁷⁶⁻²⁷⁸.

Cependant, l'administration de NAP, comme autres AINS, peut présenter des effets secondaires indésirables et en particulier la formation de lésions gastro-intestinales dans le cas d'une administration orale du principe actif. Celles-ci, sont la conséquence de deux phénomènes. Tout d'abord, le NAP inhibe l'enzyme cyclooxygénase responsable de la production de prostaglandine responsable de l'inflammation mais aussi de la sécrétion de mucus protecteur des parois du système digestif ²⁶⁹. Par ailleurs, le NAP peut aussi provoquer l'irritation directe des tissus à son contact. En effet, étant peu soluble dans l'eau (15,9 mg.L⁻¹ à 25°C ²⁷⁹) sa dissolution lente provoque une concentration locale élevée sous forme d'agrégats au contact de la muqueuse gastrique entraînant alors une irritation de cette dernière jusqu'à l'ulcération gastrique.

L'administration topique peut minimiser le contact avec les muqueuses gastriques en amenant le principe actif au plus proche du point d'action à traiter. Cependant, le contact avec la peau lésée pourrait également engendrer un problème d'irritation. Incorporé dans un pansement, comme proposé au travers de ces travaux de thèse, le NAP pourrait être libéré au niveau de la plaie de manière plus diffuse, en limitant ses effets indésirables de concentrations.

Ces problèmes de lésions gastro-intestinales peuvent être grandement minimisés par une administration topique du principe actif qui peut ainsi permettre de profiter des avantages du produit directement à l'endroit concerné en minimisant les effets secondaires liée à une ingestion du composé. Par ailleurs, dans les membranes HA-PVA-HPβCD formées précédemment, le NAP pourrait compléter, voire même créer une synergie dans l'action de modulation de l'inflammation apporté par le HA constitutif du matériau.

De plus, une augmentation du taux de dissolution et d'absorption réduisant le temps de contact entre le médicament et la muqueuse peut donc entraîner une réduction des effets de concentrations indésirables induits par le médicament. Ce phénomène peut être évité par la formation de complexes entre un composé hydrophobe et de la CD qui permet alors une dissolution plus rapide de la molécule. En effet, comme présenté précédemment dans le chapitre 2 (paragraphe 1.1.2.1), la cavité

hydrophobe et la surface extérieure hydrophile de la CD permet, par sa complexation avec un composé hydrophobe, d'accroître sa solubilité. Ainsi les molécules de HPβCD présentes dans la membrane pourraient-elles aussi jouer un rôle dans la réduction des effets secondaires délétères du NAP.

1.2 FORMATION DES COMPLEXES D'INCLUSION ENTRE LE NAPROXENE ET LA HPβCD

Dans la littérature, les exemples de complexes de NAP avec différentes formes de la CD sont nombreux (NAP/β-CD ²⁸⁰⁻²⁸⁶ et NAP/HPβCD ²⁸⁷⁻²⁹⁰). En effet, la structure particulière des molécules de CD (avec une cavité hydrophobe et une couronne hydrophile) permet la formation de complexes d'inclusion avec le NAP, fortement hydrophobe. Des études ont montrés que les complexes NAP/CD présentent une stœchiométrie de 1:1 quel que soit le type de CD utilisé ^{286,287}.

Dans un premier temps, il a été choisi d'étudier les interactions du NAP et des molécules de HPβCD afin de comprendre l'influence de ces dernières sur le principe actif.

Comme c'est le cas pour de nombreux composés hydrophobes, il a été montré que la complexation du NAP avec la β-CD a l'avantage d'accroître sa vitesse de dissolution : à un pH de 1,2 (pH des sucs gastriques) celle-ci est multipliée par 3 en 60 minutes (voir Figure 3-7), phénomène que l'on associe à l'accroissement de la solubilité du NAP complexé et à la diminution de sa cristallinité ²⁸⁰.

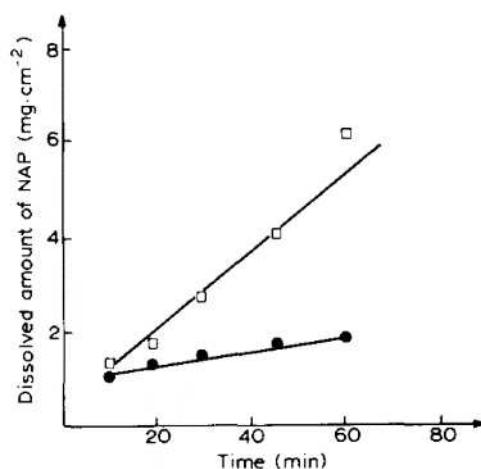


Figure 3-7 : Profil de dissolution du NAP à partir de disques de poudres compressées (sous une pression de 3500 kg.cm²) de NAP seul (●) et complexe NAP/βCD (□) ²⁸⁰

Des solutions de 20 mg.mL⁻¹ de NAP ou de NAP complexé avec la βCD ont été administrées oralement à des rats pendant 4 jours (avec un total de 200 mg par kilo corporel) et au 5^{ème} jour, l'état des parois gastriques des animaux a été examiné et comparé à celui d'animaux n'ayant subi aucun traitement (contrôle). Une diminution significative des irritations gastriques est alors observée chez les rats traités par le complexe (l'état des tissus ne diffère pas de celui des contrôles) en comparaison de ceux traités par l'AINS seul. De plus, chez ces derniers, la présence de sang dans l'estomac, causée par la formation d'ulcère a été relevée. Les auteurs de cette étude attribuent la diminution de la toxicité locale du NAP au niveau gastro-intestinal à l'augmentation de la solubilité et de la stabilité du complexe dans le milieu gastrique, de sorte que des agrégats de NAP n'entrent pas en contact avec les parois gastriques. Cette augmentation du taux de dissolution de l'AINS par sa complexation avec la β-CD permet donc bien de réduire les effets indésirables du NAP sur les tissus à son contact^{291,292}. Des résultats similaires sont obtenus pour les complexes NAP/HPβCD²⁸⁷.

Il a donc été choisi de réaliser des complexes NAP/HPβCD au préalable de l'étape d'électrospinning dans le but de les incorporer ensuite dans les membranes HA-PVA-HPβCD.

1.2.1 Les complexes d'inclusions NAP-CD dans la littérature

Il existe différentes méthodes de mise en œuvre couramment utilisées pour générer les complexes NAP-CD. Parmi celles-ci, on peut citer :

- le pétrissage pour lequel un mélange NAP-CD est placé dans un mortier et mouillé par un mélange eau-éthanol, puis mélangé jusqu'à la formation d'une pâte dense, qui est ensuite séchée dans un four)^{283,293}.
- l'évaporation d'une solution aqueuse : le NAP et la CD sont solubilisés dans l'eau qui est ensuite évaporée sous pression réduite²⁸⁷.
- la lyophilisation : une solution aqueuse de NAP et de CD est congelée puis lyophilisée^{280,284,293}.
- L'atomisation (*spray drying*) : une solution aqueuse de NAP et de CD est pulvérisée dans une chambre de séchage²⁹³.

Plus récemment, Junco et al. ont montré que la complexation du NAP avec de la β-CD pouvait être réalisée à l'aide de CO₂ supercritique (scCO₂). Le NAP et la CD sous forme solide sont placés dans le

réacteur puis le CO₂ est injecté dans l'enceinte mise en condition de pression et température adéquates pour atteindre l'état supercritique du CO₂ (40-65 °C et 270 bar)^{293,294}. Dans ces conditions toutes les CD testées (α-CD, β-CD, γ-CD, HPβCD et diméthyle-βCD) sont insolubles dans le scCO₂ tandis que le NAP (115 mg) se trouve solubilisé dans son intégralité. Le phénomène de complexation du NAP avec la CD, réalisée dans ces conditions, a été mis en évidence par spectroscopie IR et par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)²⁹⁴.

La complexation par scCO₂ du NAP et de la CD a été comparée à d'autres méthodes utilisées habituellement pour former les complexes que sont le pétrissage, la lyophilisation et l'atomisation. La caractérisation de ces poudres par spectroscopie IR et analyses thermogravimétrique (ATG) montre que la complexation du principe actif avec les molécules de CD est totale dans le cas de la lyophilisation, de l'atomisation et du scCO₂ tandis que pour le pétrissage une partie du principe actif reste libre, avec cette dernière méthode le rendement d'encapsulation est le moins bon²⁹³.

1.2.2 Formation et caractérisation des complexes NAP/HPβCD dans le cadre de notre travail

Dans un premier temps, un complexe NAP/HPβCD a été formé par évaporation d'une solution aqueuse de NAP et de HPβCD, introduits initialement dans un ratio molaire de 1:1. Pour comparaison, un mélange physique de HPβCD et de NAP a aussi été réalisé en mélangeant simplement les deux poudres ensemble à l'état solide dans un mortier, avec, toujours, un ratio molaire 1:1. Le protocole détaillé est disponible dans le chapitre 5 (paragraphe 7.1). Afin de s'assurer de la bonne complexation du NAP et de la HPβCD, plusieurs méthodes de caractérisation, couramment employées dans la littérature lors de l'étude de complexes d'inclusion, ont été utilisées.

1.2.2.1 Analyses IR

La formation de complexes d'inclusion entre le NAP et la CD met en jeu différentes interactions entre les deux molécules (voir chapitre 2, paragraphe 1.1.2.1) qui peuvent engendrer des modifications sur les différentes liaisons chimiques de ces composés. La spectroscopie IR a donc été utilisée pour mettre en avant ces changements, caractérisant la formation de complexes. Les spectres IR obtenus à partir

des poudres solides de NAP, de la HPβCD, du mélange physique NAP/HPβCD et du complexe NAP/HPβCD sont illustrés en Figure 3-8.

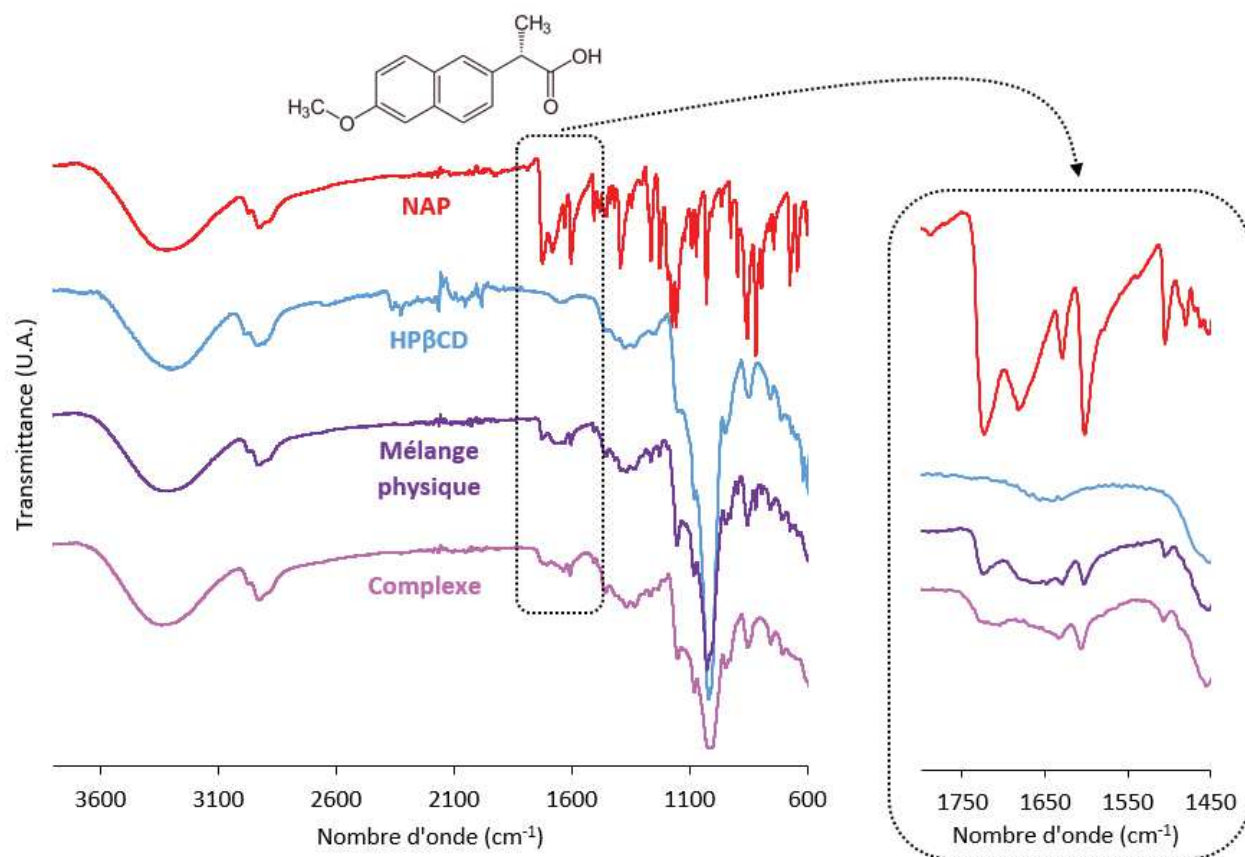


Figure 3-8 : Spectres IR du NAP, de la HPβCD, du mélange physique NAP/HPβCD et du complexe NAP/HPβCD et structure chimique du NAP

Le spectre du NAP, présente de nombreuses bandes dont certaines peuvent être attribuées à la vibration du C=O de l'acide carboxylique, à 1725 cm⁻¹, aux vibrations des C=C des cycles aromatiques à 1601 cm⁻¹ et 1505 cm⁻¹, à la vibration du =C-O de l'éther à 1225 cm⁻¹ ou aux déformations des C-H hors du plan des noyaux benzéniques aux alentours de 700 cm⁻¹. Quant au spectre de la cyclodextrine, il présente notamment une bande forte de vibration de valence des C-O autour de 1000 cm⁻¹ des alcools. Les spectres du mélange physique et du complexe sont très similaires. La principale différence réside dans le fait que certaines bandes du NAP sont un peu mieux définies (à 1725 cm⁻¹ ou vers 700 cm⁻¹), cependant, ces différences ne sont certainement pas suffisamment significatives pour prouver l'inclusion du NAP dans la HPβCD.

1.2.2.2 ATG

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique qui consiste à mesurer la masse d'un échantillon soumis à des variations de température. Elle est souvent utilisée pour déterminer la température de dégradation des composés analysés.

Les résultats des ATG du NAP, de la HP β CD, du mélange physique NAP/HP β CD et du complexe NAP/HP β CD sont illustrés en Figure 3-9.

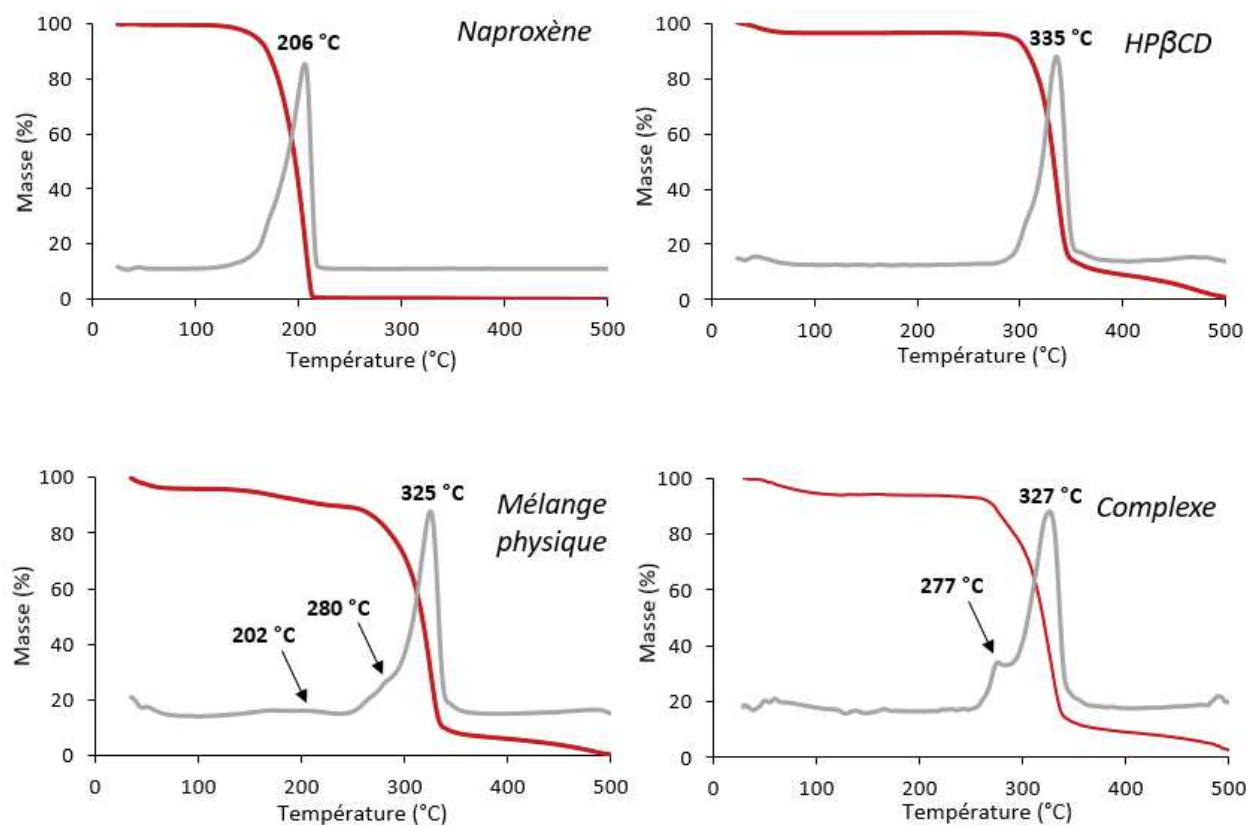


Figure 3-9 : ATG du NAP, de l'HP β CD, du mélange physique NAP/HP β CD et du complexe NAP/HP β CD

Sur les thermogrammes, des pertes de masses à des températures inférieures à 100 °C sont visibles pour la HP β CD, le mélange physique et le complexe et sont attribuées à une perte en eau des solides. La température de dégradation du NAP est observée à 206 °C et pour le HP β CD à 335 °C. Sur le spectre du complexe NAP-HP β CD, on observe un déplacement du pic de dégradation du NAP vers des températures plus élevées, de 206 °C à 277 °C marquant une augmentation de la stabilité thermique

du NAP lorsque celui-ci est complexé dans la cavité de la HPβCD. Ce résultat a déjà été décrit dans la littérature pour différents complexes molécules hôtes/CD. En effet l'encapsulation de composés au sein de la CD « protège » la molécule ce qui augmente sa stabilité thermique décalant ainsi sa température de dégradation vers les hautes températures^{295,296}. Comme pour les observations faites par spectroscopie IR, les caractérisations par ATG confirment la complexation du NAP au sein de la HPβCD²⁸⁴. Dans le cas du mélange physique, un déplacement du pic de dégradation du NAP vers des températures plus élevées est aussi observé. La faible température de fusion du NAP, de 154 °C²⁹⁷, pourrait expliquer ce résultat, la fusion du principe actif lors du chauffage permettant sa complexation avec la HPβCD.

1.2.2.3 RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton est une technique d'analyse reflétant les interactions de proximité des groupements fonctionnels d'une molécule. Elle est donc régulièrement mise en œuvre dans l'étude des complexes d'inclusion.

Les spectres RMN du proton du NAP et du complexe NAP/HPβCD dans D₂O ont été réalisés et sont présentés en Figure 3-10 (les conditions opératoires des analyses RMN sont développées en chapitre 5, paragraphe 2.13).

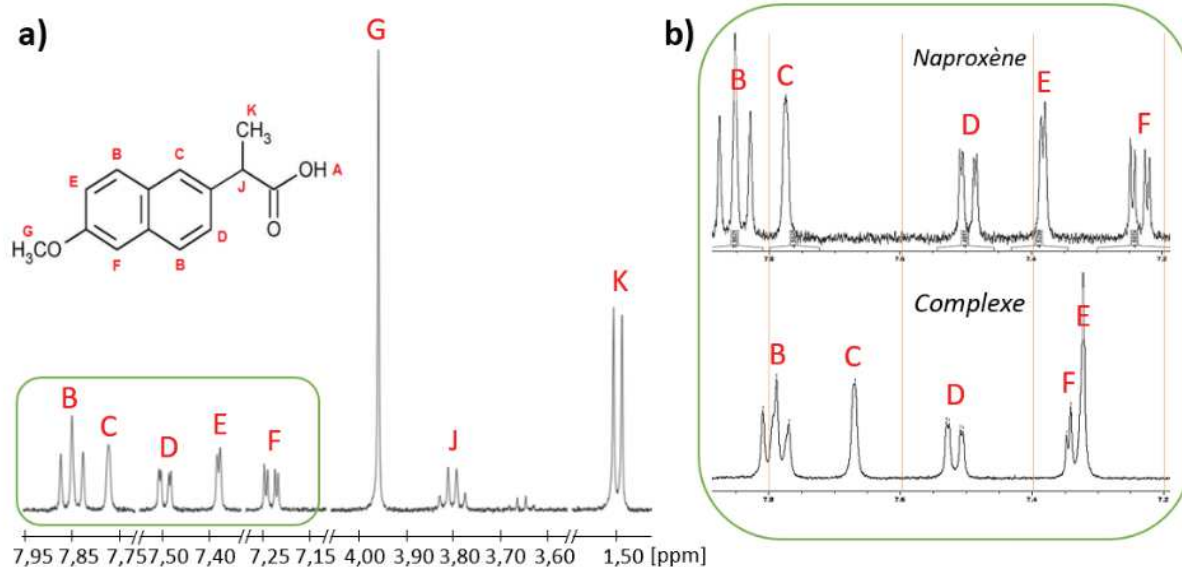
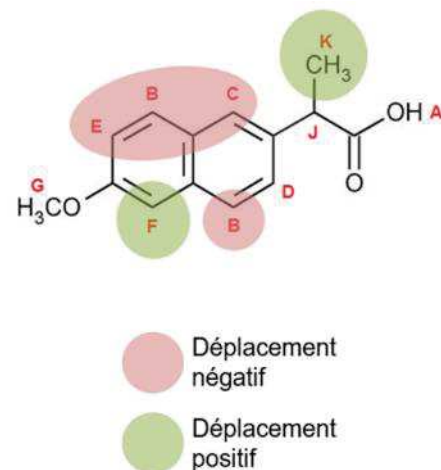


Figure 3-10 : a) Spectre ^1H -RMN et structure chimique du NAP et b) Comparaison des spectres ^1H -RMN du NAP et du complexe NAP/HPβCD

Pour comparaison, le mélange physique NAP/HPβCD a été analysé par RMN. Les valeurs des déplacements chimiques des protons appartenant à chaque échantillon ont ensuite été mesurés (avec comme référence le déplacement chimique de l'eau à 4,79 ppm) et les complexes ou mélanges physiques sont comparés à l'anti-inflammatoire seul (ou à l'HPβCD seul) afin de quantifier les déplacements chimiques de chaque molécule (Tableau 3-1).

Tableau 3-1 : Déplacements chimiques en ppm des protons du NAP en présence de HPβCD

	Naproxène	Intégration	Complexe	$\Delta\delta$	Mélange physique	$\Delta\delta$
B	7,88	1,98	7,81	-0,07	7,81	-0,07
C	7,78	1,00	7,67	-0,11	7,69	-0,09
D	7,51	0,99	7,53	+0,02	7,54	+0,03
E	7,38	1,01	7,32	-0,06	7,31	-0,07
F	7,25	1,00	7,35	+0,10	7,34	+0,09
G	3,96	3,05	3,98	+0,02	3,98	0,02
J	3,81	1,09	-	-	-	-
K	1,51	3,03	1,58	+0,07	1,57	+0,06



Dans un premier temps, on peut déjà voir de nets décalages entre les pics caractéristiques du NAP seul et ceux du NAP complexé dans la HPβCD. Le déplacement chimique du proton J n'a pas pu être mesuré car le pic n'est plus discernable en présence de HPβCD (chevauchement avec les pics propres à la HPβCD). Les autres protons du noyau naphthalène présentent un déplacement chimique supérieur à 0,05 ppm en présence de HPβCD. Ces déplacements sont caractéristiques d'un composé encapsulé dans une CD ou un dérivé, puisque les protons interagissent alors avec l'intérieur de la cavité de la molécule hôte, ce qui provoque alors le décalage du pic sur le spectre RMN ^{282,298}.

Le signe de la variation du déplacement chimique peut aussi donner des renseignements sur la localisation de la molécule de NAP au sein de la cavité de la HPβCD. En effet, le signe positif de la variation indique que le proton est proche d'un atome hôte riche en électrons π, en l'occurrence, dans ce cas, des atomes d'oxygène. Les déplacements chimiques de protons G et K du complexe suggèrent donc qu'ils se situent à proximité des atomes d'oxygène dans la cavité CD. Une variation du déplacement négative indique, quant à elle, des interactions plus faibles avec les atomes d'hydrogène. Les variations négatives du déplacement des protons B, C et E suggèrent qu'ils se situent à une certaine distance des molécules d'oxygène et proche d'un atome d'hydrogène ²⁸⁶.

Comme indiqué en Tableau 3-1, le déplacement chimique est quasiment identique pour le complexe et le mélange physique, ce qui indique que, dans les deux cas, la molécule de NAP est encapsulée dans la HPβCD. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir aux conditions de préparation des échantillons afin de réaliser les spectres RMN en phase liquide. En effet, les différents solides sont au préalable solubilisés dans un solvant, l'eau lourde (D_2O) dans notre cas, pendant 3 h. Pendant ce laps de temps, les molécules de NAP et de HPβCD ont eu la possibilité de former des complexes. Pour démontrer ce phénomène, 2 % w/w_{H₂O} de complexe, de mélange physique et une quantité équivalente en NAP ont été solubilisés dans l'eau distillée et placés sous agitation pendant 3 h pour reproduire les conditions de préparation. L'aspect visuel des solutions obtenues après 3h est présenté en Figure 3-11. On observe que le NAP seul n'est pas soluble dans l'eau à cette concentration et qu'il forme des agrégats donnant un aspect opaque et blanchâtre à la solution. Au contraire, dans le cas du complexe, la solution est limpide indiquant que le NAP est complètement solubilisé grâce à sa complexation avec la HPβCD qui augmente sa solubilité. Dans le cas du mélange physique, la solution est encore une fois totalement limpide ce qui indique que le NAP a aussi complexé avec la HPβCD. La complexation des deux molécules a donc lieu spontanément en phase aqueuse sous agitation et à température ambiante sans mise en œuvre particulière.

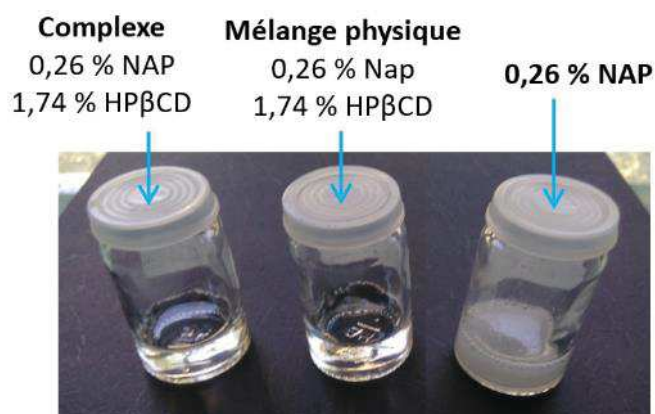


Figure 3-11 : Photographie des solutions aqueuses de complexes NAP/HPβCD, du mélange physique NAP/HPβCD et du NAP seul après 3 h d'agitation (% w/w_{H₂O})

Ainsi, il a été montré que la réaction de complexation entre le NAP et la HPβCD était spontanée en milieu aqueux, facilitant ainsi sa mise en œuvre par simple solubilisation des espèces dans des conditions douces.

Dans le cadre de la fonctionnalisation des membranes nanofibreuses par le NAP, l'incorporation de ce dernier à un mélange HA-PVA (sans HPβCD) ne permet pas d'obtenir la formation de fibres HA-PVA/NAP (Figure 3-12c). Mais l'ajout de HPβCD sous forme de complexe ou de mélange physique avec le NAP permet l'obtention de fibres uniformes de diamètres moyens proches de ceux obtenus pour des fibres sans NAP (voir Figure 3-12a et Figure 3-12b). Cependant, la réticulation des membranes mise en place avec à l'EDC et au NHS n'est pas envisageable après ajout du NAP car ce composé porte un groupement –COOH qui peut réagir et perturber la réaction de réticulation.

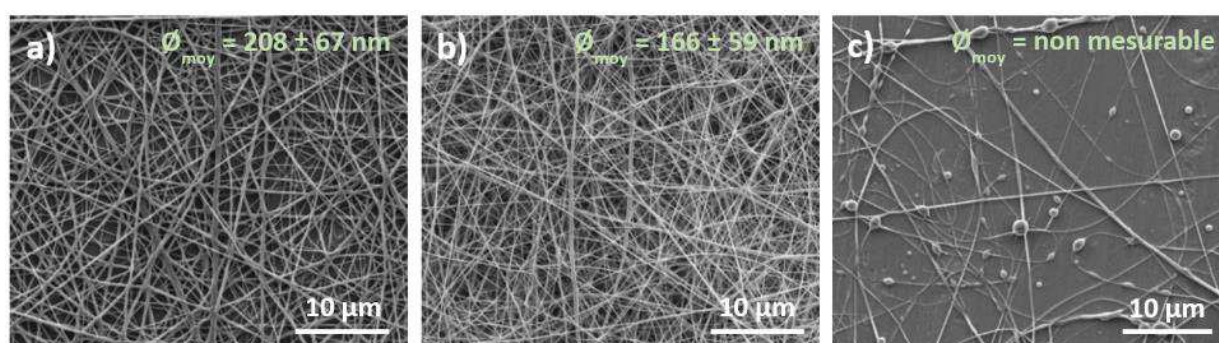


Figure 3-12 : Fibres composées de 6 % w/w_{H2O} de HA, 6 % w/w_{H2O} de PVA, 2 % w/w_{H2O} de EDC, 1 % w/w_{H2O} de NHS et avec a) 8 % w/w_{H2O} de HPβCD + 2 % w/w_{H2O} de complexe (1,74 % de HPβCD et 0,26 % de NAP), b) 8 % w/w_{H2O} de HPβCD + 2 % w/w_{H2O} de mélange physique (1,74 % de HPβCD et 0,26 % de NAP) et c) 0,26 % w/w_{H2O} de NAP seul

Il a donc été envisagé pour la suite de l'étude, de former les membranes HA-PVA-HPβCD dans un premier temps, puis dans un second temps d'imprégner le NAP dans le matériau déjà formé. En effet, la complexation spontanée du NAP avec la HPβCD en phase aqueuse, démontrée par H¹-RMN, permet d'envisager la complexation du principe actif avec les molécules de HPβCD déjà présentes dans les membranes et rend ainsi possible une post fonctionnalisation du matériau.

2 IMPREGNATION DES FIBRES

La capacité d'imprégnation et de libération du principe actif des membranes HA-PVA-HPβCD réticulées a été étudiée. Deux procédures d'imprégnation différentes ont été testées afin de fonctionnaliser les membranes avec le NAP, par simple immersion du matériau dans une solution aqueuse de NAP ou par CO₂ supercritique (scCO₂).

2.1 L'UTILISATION DU CO₂ SUPERCRITIQUE POUR L'IMPREGNATION D'UN PRINCIPE ACTIF

Comme il a été évoqué précédemment, le scCO₂ peut aussi être utilisé pour réaliser des complexes NAP/CD. Le CO₂ est un composé peu coûteux, non toxique, non inflammable et disponible en grande quantité avec une haute pureté. Selon les conditions extérieures de pression et température, le CO₂ existe en phase solide, liquide ou gazeuse (ces différentes phases sont représentées dans un diagramme de phase en Figure 3-13a). Le changement d'état peut se produire en faisant varier la pression et/ou la température mais, au-delà de 31,1 °C et 73,8 bar, le CO₂ entre dans un état supercritique qui possède des propriétés physico-chimiques (diffusivité, densité, viscosité) intermédiaires entre celle d'un gaz et celle d'un liquide²⁹⁹. En effet, à partir du point critique il y a une continuité de ces propriétés entre l'état supercritique, le liquide et le gaz. La densité du scCO₂ est alors semblable à celle d'un liquide (densité comprise entre 0,2 et 1,5 g.cm⁻³ en fonction de la pression et de la température avec pour comparaison l'eau qui présente une densité de 1 g.cm⁻³ à 4 °C et pression atmosphérique) et ses propriétés de transport sont proches de celle d'un gaz³⁰⁰. Le scCO₂ est un excellent solvant apolaire qui se révèle être un bon candidat pour remplacer les solvants organiques conventionnels. Il a largement été utilisé dans l'industrie alimentaire pour extraire des arômes ou des huiles de produits naturels ou encore pour décaféiner des grains de café³⁰¹. Mais le scCO₂ peut aussi être utilisé pour imprégner divers composés au sein d'un matériau, comme le fongicide dans le bois ou pour teindre des textiles. Ainsi les propriétés du scCO₂ s'avèrent aussi très intéressantes dans l'imprégnation de diverses molécules au sein de biomatériaux³⁰⁰. En effet, ce procédé a déjà été utilisé avec succès dans le cas d'imprégnation de principes actifs dans des implants polymères, avec différents composés comme des anti-inflammatoires (naproxène³⁰², ibuprofène³⁰³⁻³⁰⁵...) ou encore des extraits de plantes (menthol³⁰⁶, thymol³⁰⁷...) dans des polymères synthétiques (poly(méthacrylate de méthyle)

³⁰⁸⁻³¹¹, polycaprolactone ³¹²...) ou naturels (dérivé de chitosane ^{307,313}, HA ³¹⁴, agarose ³⁰⁷...). Les principaux avantages de l'utilisation de scCO₂ en tant que solvant reposent sur la possibilité de travailler à basse température et sur l'obtention d'une matrice imprégnée finale exempte de tout résidu de solvant ³⁰⁰.

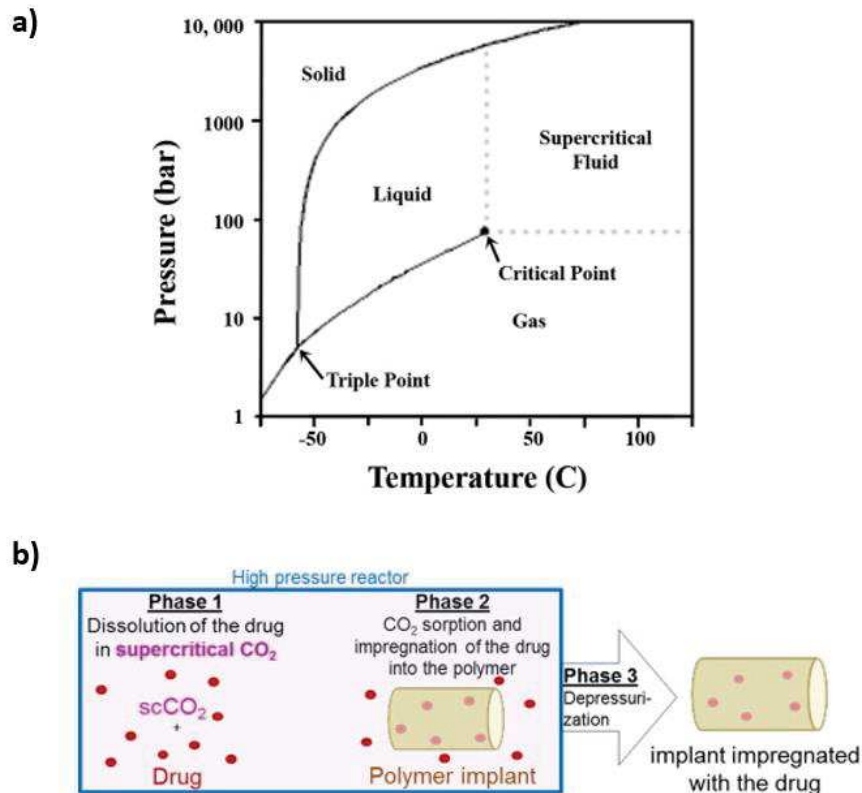


Figure 3-13 : a) Diagramme de phase du CO₂ et b) représentation schématique des étapes du processus d'imprégnation ³⁰⁰

Le processus d'imprégnation se divise en trois étapes qui sont représentées en Figure 3-13b :

- La dissolution du principe actif dans le scCO₂, qui est un bon solvant pour les composés non polaires et de faible masse molaire mais médiocre pour les molécules polaires hydrophiles, polaires ou composés de masse molaire élevée (tels que les polymères) ³¹⁵.
- La solution scCO₂ + principe actif diffuse ensuite dans le matériau polymère, ce qui entraîne l'imprégnation du principe actif dans la masse. La diffusion est facilitée si le CO₂ peut gonfler le polymère, ce qui peut varier avec les conditions de fonctionnement de pression et température.

- Le réacteur est ensuite dépressurisé et le CO₂ devient gazeux lors de la purge. Le principe actif non imprégné solubilisé dans le CO₂ est à la fois entraîné par le CO₂ et précipité au fond du réacteur. Enfin, le polymère imprégné est récupéré, exempt de tout solvant³⁰⁰.

Dans le cas des membranes HA-PVA-HP β CD, l'imprégnation du NAP peut donc suivre deux mécanismes : une simple imprégnation de la molécule dans la matrice polymère des fibres ou, de par son affinité avec la HP β CD, la formation de complexes d'inclusion entre la CD modifiée et le principe actif.

2.2 L'IMPREGNATION DU NAPROXENE DANS LES MEMBRANES HA-PVA-HP β CD

Pour l'imprégnation du NAP par immersion, les membranes HA-PVA-HP β CD ont simplement été immergées dans une solution aqueuse saturée en principe actif (40 mg.mL⁻¹) pendant 4 h, puis congelées et lyophilisées afin de conserver l'aspect fibreux du matériau. Dans le cas de l'imprégnation par scCO₂, la membrane est placée dans la chambre du dispositif de dépôt par CO₂ supercritique en présence du NAP sous forme solide. Puis, le CO₂ est injecté dans la chambre et amené sous forme supercritique par régulation de la température et de la pression. Les différents protocoles d'imprégnation sont disponibles en chapitre 5 (paragraphe 7.2).

Dans le cas de l'imprégnation par solution aqueuse, le processus est facile à réaliser, mais le NAP n'étant que légèrement soluble dans l'eau, la quantité pouvant être imprégnée dans les fibres est limitée. De plus, ce procédé est assez long et demande plusieurs manipulations des membranes: l'étape d'immersion dure 4 h, puis est suivie d'une étape de congélation et de lyophilisation de 12 h, soit 16 h en tout. Pour ce qui est de l'imprégnation par scCO₂, le procédé nécessite un équipement spécifique mais le processus d'imprégnation est beaucoup plus rapide à réaliser puisqu'il ne demande qu'environ 1h20. Ce procédé permet aussi de diminuer la quantité de NAP utilisée initialement pour réaliser l'imprégnation des membranes puisque la fonctionnalisation par immersion consomme 20 mg de NAP par membrane contre 8 mg pour le scCO₂.

Des images au MEB des fibres HA-PVA-HP β CD initiales et imprégnées de NAP soit par immersion en solution aqueuse soit par scCO₂ sont visibles en Figure 3-14. Les images montrent que, quel que soit le type d'imprégnation réalisé, la morphologie nanofibreuse des membranes est préservée par rapport aux membranes non imprégnées et la taille des fibres reste inchangée, macroscopiquement aucune

différence significative n'est observée. Les deux modes d'imprégnation mis en jeu pour fonctionnaliser ces membranes par le NAP n'affectent donc pas la structure des membranes formée par électrospinning.

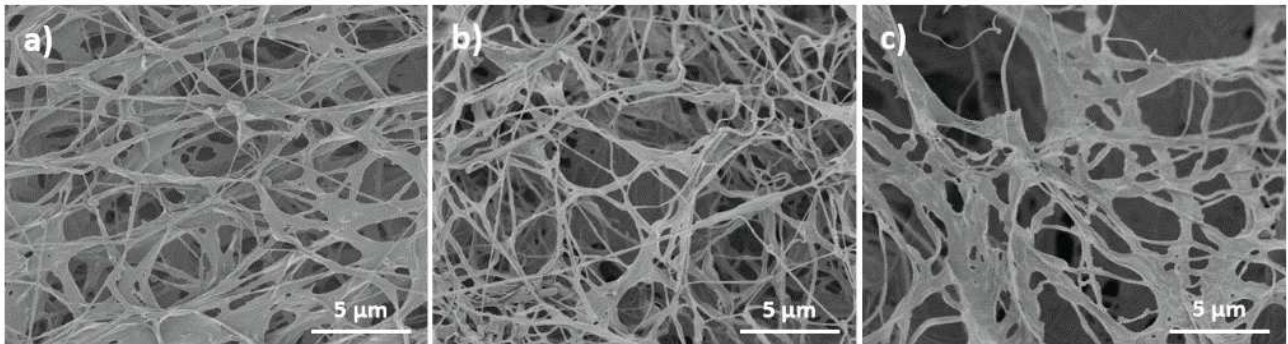


Figure 3-14 : Membranes HA-PVA-HP β CD a) après lyophilisation, b) après imprégnation par $scCO_2$ et c) après imprégnation par solution aqueuse

3 SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXENE EN SOLUTION AQUEUSE

Afin de connaître la cinétique et la quantité de NAP pouvant être relarguée des membranes HA-PVA-HP β CD imprégnées, des essais de relargage du principe actif ont été réalisés dans une solution de PBS. Les conditions opératoires de cette étude sont détaillées au chapitre 5 (paragraphe 7.3). Brièvement, une partie de la solution dans laquelle est immergée la membrane est prélevée puis la quantité de NAP libérée est quantifiée par spectrophotométrie UV. Le comportement des membranes nanofibreuses imprégnées ($30 \pm 0,1$ mg, épaisseur moyenne de $0,1 \pm 0,02$ mm et de 3×3 cm environ) a été comparé à celui de films continus de même composition en HA-PVA-HP β CD, EDC-NHS et ayant été imprégnés dans les mêmes conditions ($100 \pm 0,1$ mg, épaisseur moyenne de $0,15 \pm 0,01$ mm et d'environ $0,8 \times 0,8$ cm). Des membranes HA-PVA-HP β CD sans NAP ont été utilisées comme contrôle.

La cinétique de relargage du NAP des membranes HA-PVA-HP β CD imprégnées par solutions aqueuses ou par scCO₂ est présentée en Figure 3-15.

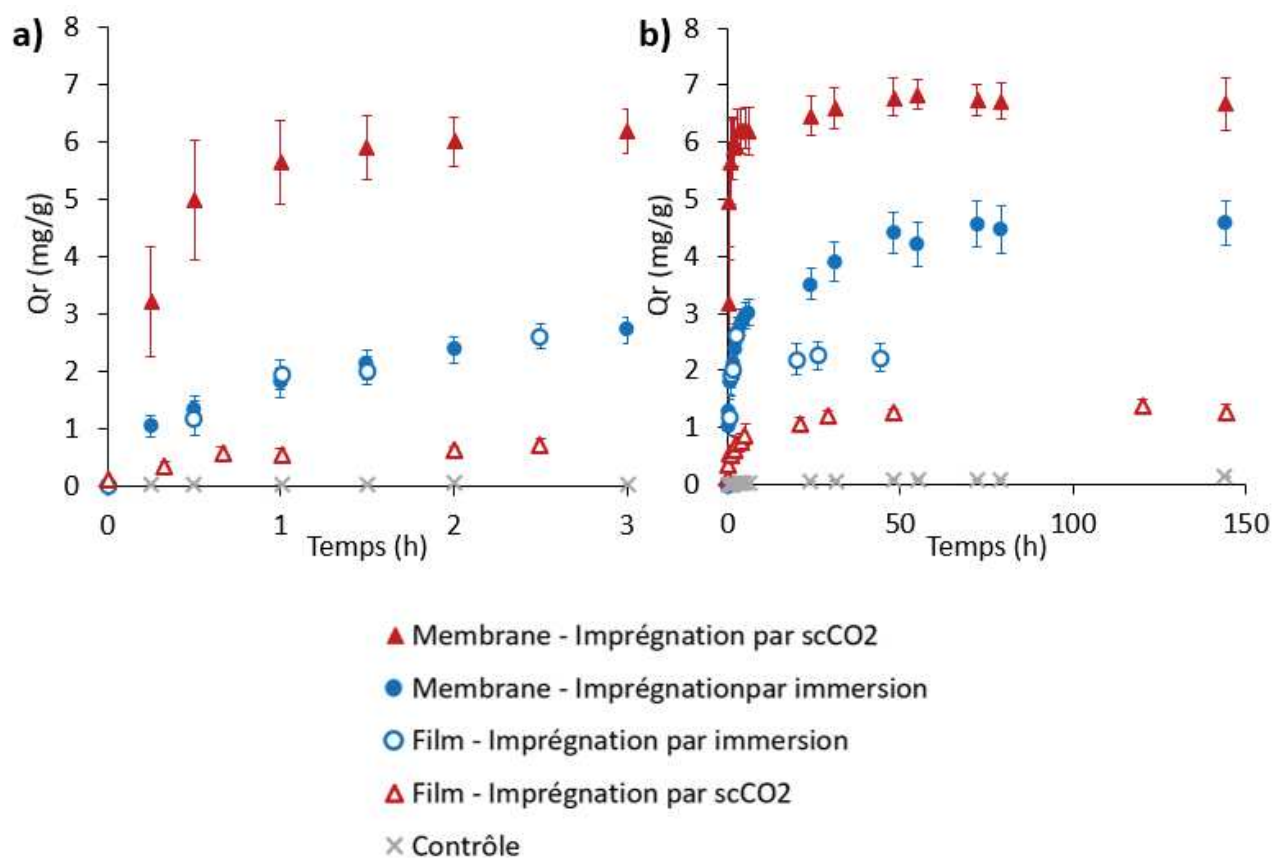


Figure 3-15 : Quantité de NAP relarguée par gramme de matériau (Q_r) dans le PBS à partir de membranes et de films HA-PVA-HPβCD imprégné par $scCO_2$ ou solution aqueuse pour a) les premières 3 h de relargage et pour b) une libération totale de 150 h.

Pour chaque type d'échantillon, le relargage se déroule suivant le même schéma : une libération rapide directement après immersion dans le PBS (phase de « Burst Effect ») puis celle-ci ralentit avant d'atteindre un plateau, plus ou moins rapidement selon les échantillons. Dans le cas des matériaux imprégnés par solution aqueuse, la quantité totale de médicament libéré est de deux fois plus élevée pour les membranes que pour les films. Le même comportement est observé avec les matériaux imprégnés par $scCO_2$, pour lesquels les membranes ont libéré cinq fois plus de NAP que les films.

Les profils de relargage révèlent que, pour les films imprégnés en solutions aqueuses, 95 % de la quantité de médicament est libérée après seulement 2h30. En comparaison, les membranes nanofibreuses ont montré un relargage plus lent, car la libération de 95 % de NAP n'est atteinte qu'après 24 heures dans le cas de l'imprégnation par $scCO_2$ et après 48 h dans le cas de l'imprégnation par solution aqueuse. Ces observations suggèrent que, dans le cas de films de 0,15 mm d'épaisseur, le NAP n'est pas absorbé profondément dans le film, mais seulement en surface, provoquant ainsi une

libération rapide du médicament. Dans le cas des fibres, de diamètre 170 nm, le rapport surface/volume plus élevé permet la pénétration du médicament au cœur de la membrane. On obtient alors une libération prolongée du NAP et en quantité supérieure, ce qui est en accord avec des expérimentations réalisées sur des systèmes similaires et rapportés précédemment dans la littérature³¹⁶.

Afin de s'assurer qu'il n'y a plus de NAP disponible au sein des membranes, celles-ci ont été immergées dans du PBS frais pendant 7 jours puis dans de l'éthanol pendant 7 jours afin de vérifier s'il pouvait rester du NAP dans les membranes qui ne serait pas libéré en solution aqueuse. Dans les deux cas, aucune trace de NAP n'est détectée dans les solutions de relargage, ce qui indique qu'il n'y a plus de principe actif disponible dans le matériau.

Quand on compare les quantités totales de NAP relarguées, on peut voir que dans le cas des membranes, l'imprégnation par scCO₂ permet de libérer $6,7 \pm 0,5$ mg par gramme de matériau contre seulement $4,6 \pm 0,4$ mg pour l'imprégnation par solution aqueuse. Cependant, on observe le phénomène inverse dans le cas des films, puisque $1,3 \pm 0,1$ mg par gramme de matériau sont libérés après l'imprégnation par scCO₂ et $2,2 \pm 0,2$ mg après imprégnation par solution aqueuse. Ce phénomène peut s'expliquer par le gonflement du matériau en solution aqueuse. En effet, le HA étant très hygroscopique, celui-ci va fortement absorber l'eau à son contact. Que ce soit pour les films ou pour les membranes, le matériau absorbe environ 40 fois sa masse en eau. Dans le cas des films, on note aussi un fort gonflement dans l'eau, leur volume étant multiplié par 28 environ. Dans le cas des membranes, on n'observe pas ce phénomène de gonflement au niveau macroscopique, mais comme cela a été mis en avant dans le chapitre précédent par les observations au MEB environnemental, ce sont les fibres qui gonflent, occupant les porosités du matériau. Donc dans le cas des films, leur gonflement au contact de l'eau permet d'avoir une plus grande surface en contact avec la solution de NAP ce qui permet une plus importante imprégnation à la surface du composé. A l'inverse dans le cas des membranes nanofibreuses, le gonflement des fibres en solution aqueuse peut gêner la diffusion du principe actif au sein du matériau ce qui peut expliquer qu'une quantité moins importante de NAP soit imprégnée.

Dans le chapitre 2, la dégradation des membranes HA-PVA-HPβCD dans le PBS a été évaluée (paragraphe 3.2). Il a été montré que, après 7 jours d'immersion dans le PBS, la structure nanofibreuse du matériau est restée intacte et seule une perte de masse de $5,4 \pm 0,7$ % a été mesurée. Dans le cas des membranes imprégnées, l'évolution de la structure des membranes pendant le relargage du principe actif a été étudiée. Pour cela, des images au MEB des nanofibres ont été prises après 6 jours

d'immersion dans le PBS et comparées à celles des matériaux après imprégnation mais avant l'étape de relargage (Figure 3-16). Celles-ci montrent que la morphologie nanofibreuse des membranes n'a pas évolué pendant la phase de libération du NAP, ce qui indique que l'intégrité de la membrane est préservée pendant la durée du relargage. Sur cette période, où la structure de la membrane reste stable, la libération du NAP s'effectue donc par diffusion après gonflement des fibres par l'eau plutôt que par la dégradation de la membrane elle-même.

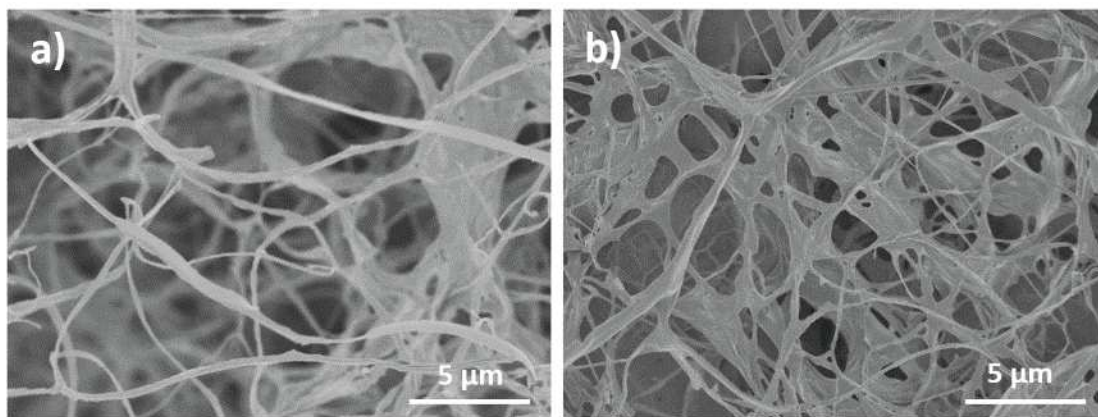


Figure 3-16 : Image MEB des fibres HA-PVA-HPβCD a) imprégnées par $scCO_2$ après 6 jours de relargage du NAP dans le PBS et b) imprégnées par solution aqueuse après 6 jours de relargage du NAP dans le PBS

Comme présenté précédemment (en chapitre 1, paragraphe 2.1.1), le processus de cicatrisation d'une plaie se déroule en différentes étapes, parmi lesquelles on retrouve le phénomène d'inflammation. Celui-ci s'installe après l'homéostasie, réponse immédiate de l'organisme à la blessure et qui se caractérise entre autre par un phénomène de coagulation du sang. Ces différentes étapes et leur chronologie sont illustrées en Figure 3-17. Dans le déroulement chronologique de la cicatrisation, il a été démontré que la phase inflammatoire d'une plaie commençait quelques minutes après la blessure et atteignait son maximum après 24 heures environ ^{241,317}.

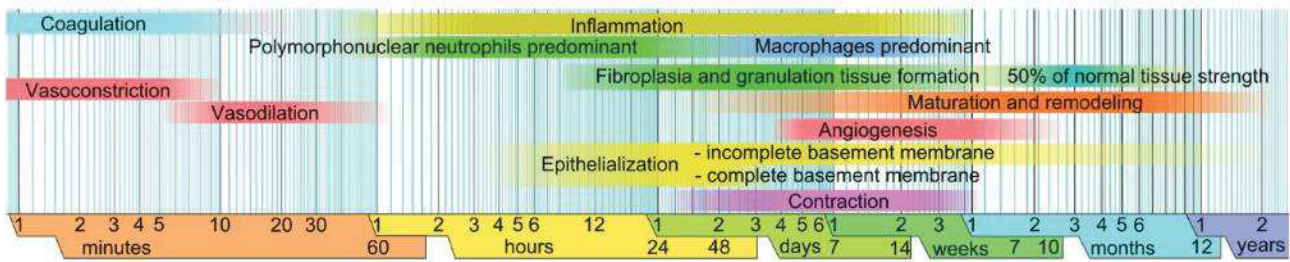


Figure 3-17 : Chronologie de la cicatrisation ²⁴¹

Pour bénéficier de l'effet anti-inflammatoire et antalgique du NAP, il est donc important de le délivrer au bon moment. Grâce à leurs propriétés permettant un maximum de libération au cours des premières 24 h, les membranes HA-PVA-HP β CD respectent donc la cinétique attendue pour la délivrance d'un anti-inflammatoire. Ce type de matériau est donc un candidat idéal pour administrer le NAP directement sur la plaie, tout en évitant ou réduisant ainsi les effets secondaires dus à une prise orale ³¹⁸.

Si, dans le cas du relargage du NAP à partir des membranes HA-PVA-HP β CD dans le PBS, aucune dégradation de la structure nanofibreuse du matériau n'a été mesurée, il a été vu précédemment, qu'en milieu physiologique, la présence d'enzymes pouvait induire une dégradation plus rapide de la membrane ce qui pourrait éventuellement influencer la cinétique de relargage du NAP en accélérant sa libération et/ou augmentant la dose disponible dans la plaie.

4 SUIVI DU RELARGAGE DU NAPROXENE EN PRESENCE DE HYALURONIDASE

Comme il a été montré au chapitre précédent, les membranes HA-PVA-HP β CD en contact avec des liquides physiologiques peuvent être dégradées par les enzymes de hyaluronidase (Hyal) qu'ils contiennent. En effet, si après 4 jours d'immersion dans une solution de Hyal à 50/125 U.mL⁻¹ la structure nanofibreuse était conservée (il faut attendre 7 jours pour que l'on observe les premières dégradations) la membrane perd tout de même 51,4 \pm 8,4 % de sa masse (et 60,1 \pm 7,5 % après 7 jours) (chapitre 2, paragraphe 3.2).

Afin de voir si la dégradation de la membrane par la Hyal peut influencer la libération du NAP, la cinétique de relargage du principe actif a été mesurée en présence de l'enzyme et comparée aux résultats obtenus précédemment dans le PBS. Ces essais ont été réalisés à partir de membranes imprégnées par solution aqueuse car, comme il a été vu précédemment, la libération est légèrement plus lente dans ce cas-là. Les résultats obtenus sont illustrés en Figure 3-18.

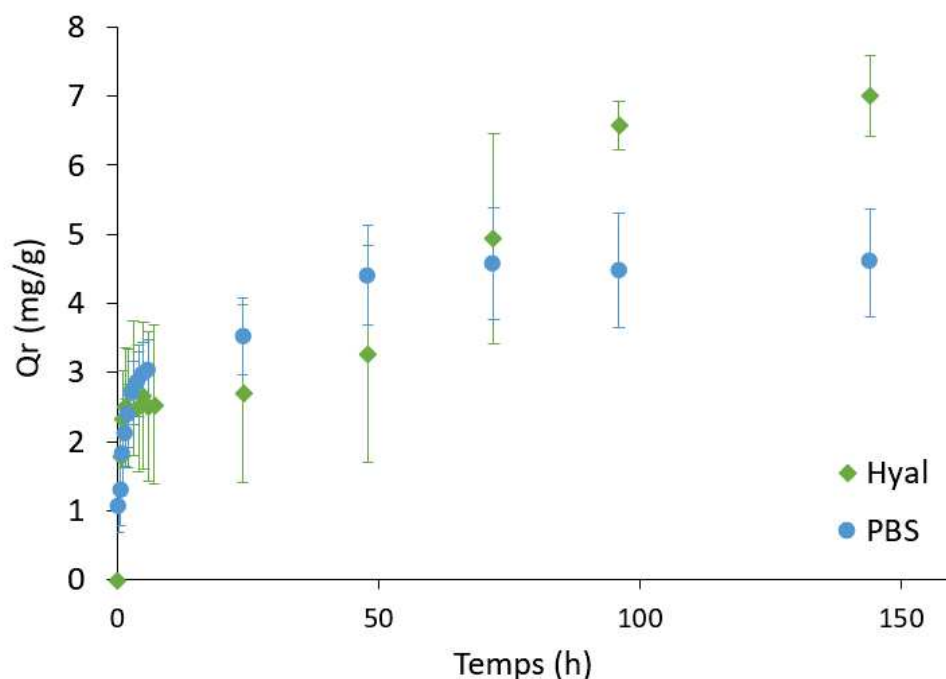


Figure 3-18 : Quantité de NAP relarguée (Qr) dans le PBS ou une solution de Hyal à partir de membranes HA-PVA-HP β CD imprégné par solution aqueuse

Jusqu'à 72 h (3 jours), aucune différence significative n'est relevée dans la cinétique de libération du NAP dans le PBS ou dans une solution de Hyal. C'est seulement à partir de 96 h (4 jours), qu'on remarque que la quantité de NAP relarguée est légèrement supérieure en présence de Hyal ce qui peut être dû à la dégradation de la membrane. En effet, malgré l'arrêt du relargage du NAP dans le PBS après 3 jours (comme décrit dans le paragraphe précédent), il se pourrait qu'une partie du principe actif reste immobilisé dans les fibres, qui ne puisse plus être libéré dans le PBS. Or, en présence de Hyal, la membrane a, après 4 jours d'immersion, perdu près de la moitié de sa masse, ce qui pourrait donc permettre de libérer une partie du NAP qui n'était pas disponible en solution aqueuse car bloqué au sein de la membrane.

Ces essais de relargage en présence de Hyal indiquent donc que celle-ci n'a que peu d'influence sur la cinétique de libération du principe actif, augmentant seulement légèrement la quantité totale de NAP relargué. La libération du NAP est donc toujours principalement causée par diffusion à partir des fibres gonflées par l'eau.

Conclusion

Dans ce chapitre, la fonctionnalisation des membranes HA-PVA-HPβCD par un principe actif a été réalisée avec succès. Le NAP est utilisé comme molécule modèle : il complète l'action de modulation de l'inflammation du HA présent dans la membrane en apportant des propriétés anti-inflammatoires au matériau pouvant accélérer le processus de cicatrisation de la plaie et des propriétés analgésiques permettant une diminution de la douleur.

La spectroscopie IR, l'ATG et la ¹H-RMN ont montré que le procédé de complexation mis en place entre le NAP et la HPβCD était efficace mais non nécessaire puisque la complexation des deux composés peut être assurée de manière spontanée et totale en moins de 3 h en solution aqueuse. Étant donné que la présence de NAP dans les fibres produites par électrospinning nuit à la réaction de réticulation de la membrane, il a été décidé de réaliser une post-fonctionnalisation du NAP sur la membrane préalablement élaborée.

Dans ce but, deux procédés d'imprégnation ont été comparés : par immersion en solution aqueuse et par CO₂ supercritique (scCO₂), le second permettant une imprégnation plus rapide du principe actif (1h20 contre 16 h). Des essais de relargage dans le PBS du NAP imprégné dans les membranes ont montré que le procédé par scCO₂ permet d'imprégner plus de NAP au sein des membranes avec $6,7 \pm 0,5$ mg par gramme de matériau contre $4,6 \pm 0,4$ mg pour une imprégnation par immersion en solution. La comparaison des cinétiques de relargage des membranes avec celles de films de même composition a permis de mettre en avant l'apport de la nanostructuration ; en effet celle-ci permet d'imprégner le NAP en plus grande quantité et de réaliser une libération prolongée du principe actif. Dans le cas des membranes imprégnées par scCO₂, il a été montré que la cinétique de relargage du NAP, permettant un maximum de libération au cours des premières 24 heures, coïncidait avec la propagation de la phase inflammatoire au sein d'une plaie.

L'étude du relargage de NAP en présence de hyaluronidase a permis de démontrer que cette enzyme n'avait que peu d'influence sur la vitesse de relargage de la molécule, en particulier dans les premières 24 h de l'essai.

Les membranes HA-PVA-HPβCD se présentent donc comme candidates idéales pour administrer le principe actif directement sur la plaie, réduisant ainsi les effets secondaires dus à une prise orale de l'anti-inflammatoire.

CHAPITRE 4 - FORMATION DE FIBRES COMPOSITES POLYMERES/NANOPARTICULES LIPIDIQUES

Introduction

Après avoir montré qu'il est possible de fonctionnaliser les membranes HA-PVA-HP β CD par imprégnation d'un principe actif au sein des fibres, il a été choisi d'expérimenter un autre mode de fonctionnalisation via des **nanoparticules lipidiques (LNP) chargées d'un principes actif**.

Des nanoparticules encapsulant deux fluorophores, le 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) et le 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate (DiD), utilisés comme agents d'imagerie de fluorescence, ont été synthétisées et incorporées dans la solution d'electrospinning, dans le but de former des **membranes composites** HA-PVA-HP β CD/LNP.

Par la suite, l'influence du procédé de mise en forme des membranes sur la stabilité des LNP au sein des fibres sera étudiée afin de s'assurer que celles-ci n'ont pas été détériorées par les différentes étapes de mise en œuvre. Pour cela, la **technologie Förster Resonance Energy Transfer (FRET)**, reposant sur le transfert d'énergie entre le DiI et le DiD, a été utilisée.

Enfin, les **cinétiques de relargage des LNP** dans une solution de PBS ou en présence de hyaluronidase, favorisant la dégradation du matériau, ont ensuite été étudiées par fluorimétrie.

CHAPITRE 4 - FORMATION DE FIBRES COMPOSITES POLYMERES/NANOPARTICULES

LIPIDIQUES149

1 LA MISE EN FORME DES FIBRES COMPOSITES..... 151

1.1 Les nanoparticules lipidiques (LNP) 151

1.2 Mises en forme des membranes composites HA-PVA-HP β CD/nanoparticules lipidiques 154

1.2.1 Le choix des nanoparticules lipidiques à incorporer dans les fibres..... 154

1.2.2 Formulation et caractérisation des LNP FRET..... 157

1.2.3 L'électrospinning du mélange HA-PVA-HP β CD/nanoparticules lipidiques 160

2 EFFET DES CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE DES MEMBRANES SUR LA STABILITÉ DES NANOPARTICULES..... 162

2.1 Etude de l'influence de l'électrospinning sur les nanoparticules lipidiques 162

2.2 Etude de l'influence du recuit sur l'intensité de la fluorescence FRET et de la structure des membranes..... 164

3 SUIVI DU RELARGAGE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES 170

3.1 Relargage des LNP FRET dans le PBS..... 170

3.1.1 Stabilité des LNP FRET avec la température 170

3.1.2 Suivi du relargage des LNP FRET dans le PBS..... 171

3.2 Relargage des LNP en présence de hyaluronidase 172

3.2.1 Stabilité des LNP FRET en présence de hyaluronidase 172

3.2.2 Suivi du relargage des LNP Dil dans une solution de hyaluronidase 173

RÉFÉRENCES ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1 LA MISE EN FORME DES FIBRES COMPOSITES

Comme évoqué dans le chapitre précédent, il est aussi possible de fonctionnaliser les nanofibres mises en forme par électrospinning par des nanoparticules organiques ou inorganiques. Afin de libérer directement les nanoparticules au niveau du site d'action souhaité, celles-ci peuvent être incorporées dans un matériau support et les nanofibres polymères se présentent comme un matériau de choix pour ce rôle. La présence de ces particules à l'intérieur ou sur les fibres est particulièrement intéressante car le matériau final bénéficie des avantages apportés par les nanofibres (décrits dans le chapitre 1, paragraphe 2.1) mais aussi par les nanoparticules^{319,320}. En effet, les nanoparticules sont aujourd'hui intégrées dans les dispositifs biomédicaux car la plupart des systèmes biologiques sont également nanométriques. Les organismes vivants sont ainsi constitués de cellules d'un ordre de grandeur de 10 µm de diamètre. Cependant, les différentes parties constituantes de la cellule sont, elles, beaucoup plus petites et se situent dans le domaine de la taille submicronique. Les protéines sont, quant à elles, encore plus petites, inférieures à 10 nm³²¹. Les nanoparticules peuvent ainsi être utilisées dans le cadre de la détection de protéines³²² ou encore de pathogènes³²³, de l'imagerie médicale (nanoparticules luminescentes ou magnétiques)^{324,325}, ou pour la délivrance de principes actifs³²⁶. En effet, il a été montré qu'en raison de leur petite taille et de leur grande surface, les nanoparticules médicamenteuses peuvent protéger le principe actif (d'une éventuelle dégradation), réduire ses effets secondaires (comme la toxicité vis-à-vis de certaines cellules ou organes) et/ou accroître sa solubilité, modifiant alors sa biodisponibilité le rendant plus efficace à l'endroit ciblé souhaité. De plus, ses systèmes nanométriques peuvent pénétrer dans le système pulmonaire, être absorbées par les jonctions des cellules endothéliales de la peau et être fonctionnalisées par des ligands de ciblage afin de cibler des organes spécifiques^{327,328}.

1.1 LES NANOPARTICULES LIPIDIQUES (LNP)

Depuis plusieurs années, le CEA LETI développe des nanoparticules lipidiques (LNP), aussi appelées Lipidots®, pour la vectorisation de diverses molécules. Comme illustrées en Figure 4-1, ces nanoparticules sont constituées d'un cœur lipidique semi-cristallin ainsi que d'une couronne de tensioactifs qui stabilise le système.

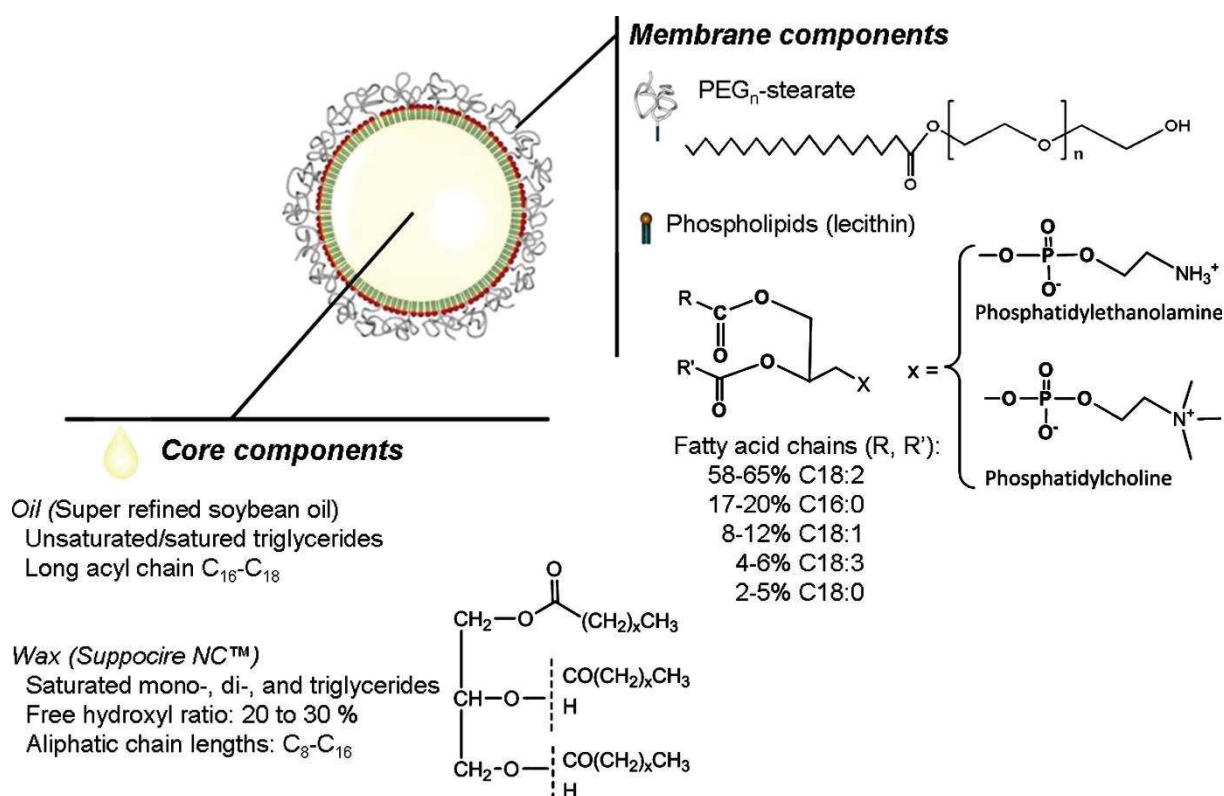


Figure 4-1 : Représentation schématique d'une LNP et structures chimiques de ses composants ³²⁹

Les LNP sont obtenues par émulsification d'un mélange de lipides (cire, huile et phospholipides) et d'une solution aqueuse de tensioactifs PEGylés. En modifiant le ratio lipides/tensioactifs, il est possible de formuler des particules de diamètre compris entre 30 et 120 nm, stables à température ambiante pour plus d'un an (le protocole ainsi que les quantités des différents ingrédients utilisés dans cette étude sont développés en détail dans le chapitre 5, paragraphe 8) ³²⁹.

Les différents produits entrant dans la composition des LNP sont de grade pharmaceutique, biorésorbables et approuvés par la FDA pour l'utilisation chez l'homme, ce qui en fait des systèmes entièrement biocompatibles et utilisables pour des applications *in vivo* ³³⁰. Le cœur hydrophobe de la particule permet d'encapsuler des molécules lipophiles et l'enveloppe de PEG qui recouvre sa surface lui confère une furtivité qui prolonge son temps de circulation dans l'organisme ³³¹. De plus, cette enveloppe de tensioactifs permet d'envisager le greffage de ligands de ciblage ou de biomolécules d'intérêts comme des anticorps ou des peptides à la surface de la LNP ³³². Des essais de toxicité sur cellules ont permis de mettre en avant la faible cytotoxicité de ces nanoparticules (IC₅₀ = 1000 µg.mL⁻¹ de lipide sur la lignée de fibroblaste 3T3) et des études de tolérance chez le rat, ont montré une bonne innocuité. En effet après une administration intraveineuse aussi élevée que 150 mg.kg⁻¹ de LNP, les

animaux ont survécu au moins 6 semaines sans changement de consommation alimentaire et avec une prise de poids normale après injection ³³³.

Toutes ces données, ont donc mis en avant la pertinence de l'utilisation des LNP comme vecteurs de molécules d'intérêt au sein de l'organisme vivant. Dans un premier temps, ces particules ont été formulées pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles pour des applications d'imagerie biomédicale *in vivo* ou pour la détection de tumeurs ^{330,332,334}, puis pour la délivrance ciblée de principes actifs comme des photosensibilisateurs pour la chimiothérapie ³³⁵ et plus récemment pour l'élaboration de nouvelles formes vaccinales ³³⁶.

Si les nanoparticules peuvent être administrées directement par injection parentérale, il a été montré qu'il était aussi possible de les intégrer dans des hydrogels de carboxyméthylcellulose (voir illustration en Figure 4-2) servant de support pour une délivrance locale et prolongée d'un actif encapsulé au sein des LNP ³³⁷.

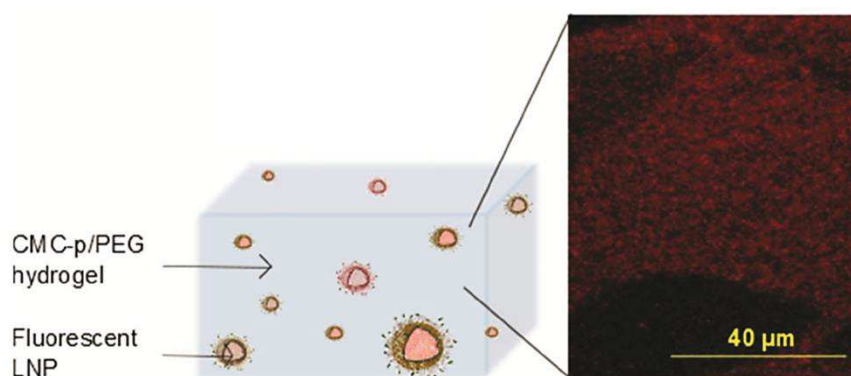


Figure 4-2 : Représentation schématique d'un composite hydrogel/LNP ³³⁷

Ainsi la formation d'un matériau nanofibreux composite HA-PVA-HPbCD fonctionnalisé par des LNP, pourrait permettre d'allier les avantages de la nanostructuration du matériau support avec les capacités d'encapsulation et de vectorisation des LNP. Il serait ainsi possible de profiter d'un double relargage de principes actifs : un premier rapide, dans le cas de la libération directe d'un principe actif incorporé dans le matériau nanofibreux lui-même (comme étudié dans le chapitre précédant par imprégnation du naproxène dans les fibres), puis un second plus durable à partir de nanoparticules chargées au sein du matériau.

1.2 MISES EN FORME DES MEMBRANES COMPOSITES HA-PVA-HP β CD/NANOPARTICULES LIPIDIQUES

1.2.1 Le choix des nanoparticules lipidiques à incorporer dans les fibres

La stratégie retenue pour la fonctionnalisation des fibres HA-PVA-HP β CD par les LNP a été d'incorporer les nanoparticules pré-formulées dans le mélange HA-PVA-HP β CD 6-6-10, utilisé précédemment pour former les membranes nanofibreuses, puis d'electrospinner ensemble ces constituants pour former le matériau nanofibreux composite. Ce procédé, illustré en Figure 4-3, a été choisi pour sa facilité de mise en œuvre.

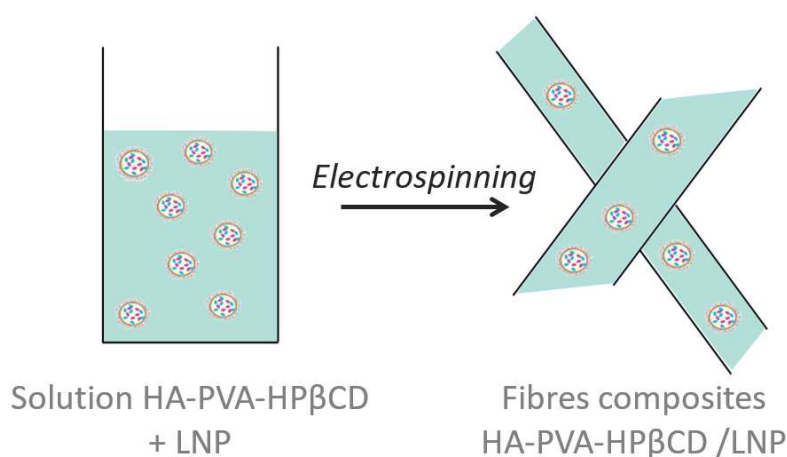


Figure 4-3 : Représentation schématique de la formation des fibres composites HA-PVA-HP β CD/LNP

Dans les travaux réalisés précédemment au sein de l'équipe, les LNP utilisées étaient dispersées en solutions aqueuses ou insérées dans des matériaux hautement hydratés (hydrogel). Et, même s'il a été montré que ces nanoparticules pouvaient être lyophilisées dans des conditions bien précises (utilisation du tréhalose en tant que cryoprotecteur et adaptation du type de congélation en fonction du diamètre des LNP), il n'est pas certain que celles-ci soient conservées après l'étape d'electrospinning. En effet, l'étirement très rapide du jet d'electrospinning, ainsi que le passage d'un milieu liquide (solution aqueuse) à un milieu sec (nanofibres) pourrait facilement détériorer la structure des LNP. Il faut donc développer une stratégie permettant de s'assurer que les LNP soient toujours intactes après les différentes étapes d'élaboration des matériaux (electrospinning et

traitement thermique). Pour cela, il a été choisi d'utiliser la technologie FRET (Förster Resonance Energy Transfer), une technique déjà appliquée pour des nanoparticules en phase liquide³³⁸. La fluorescence FRET repose sur l'utilisation de deux fluorophores, l'un donneur et l'autre accepteur d'énergie. Le spectre d'émission du donneur doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'absorption de l'accepteur et, lorsque les deux fluorophores sont suffisamment proches spatialement, entre 1 et 10 nm, ceux-ci sont capables d'interagir par FRET. L'excitation du donneur est alors transmise à l'accepteur, qui réémettra un signal à sa longueur d'onde d'émission³³⁹. L'efficacité du transfert d'énergie par FRET (E_{FRET}) dépend fortement de la distance entre le donneur et l'accepteur (D). Elle peut être calculée selon la formule suivante :

$$E_{FRET}(D) = \frac{R_0^6}{D^6 + R_0^6}$$

avec R_0 , le rayon de Förster, qui correspond à la distance donneur/accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50 %.

Le 1,1'-Diocetadecyl-3,3',3'-Tetraméthylindodicarbocyanine Perchlorate (DiI) et le 1,1'-Diocetadecyl-3,3',3'-Tetraméthylindodicarbocyanine Perchlorate (DiD) sont deux fluorophores lipophiles pouvant être utilisés pour l'imagerie FRET puisque, comme illustré en Figure 4-4, le spectre d'émission du DiI recouvre le spectre d'excitation du DiD, permettant un transfert d'énergie entre les deux molécules si celles-ci sont suffisamment proches. La valeur de R_0 pour le couple DiI/DiD est de 5,2 nm³⁴⁰.

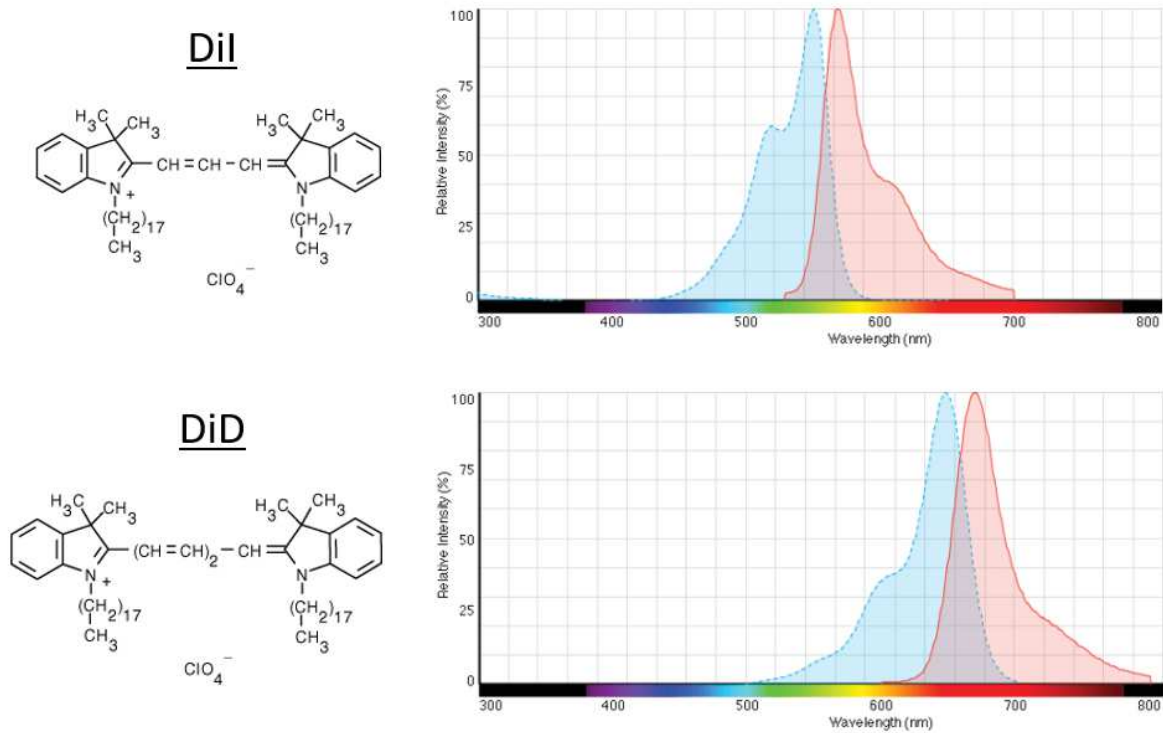


Figure 4-4 : Structures chimiques du DiI et du DiD et leurs spectres respectifs d'excitation (en bleu) et d'émission (en rouge) de fluorescence

De plus, il a été montré dans de précédents travaux que, grâce à leur caractère lipophile, ces deux fluorophores pouvaient être encapsulés aisément dans le cœur des LNP, avec une efficacité supérieure à 95 %^{332,340}. Comme illustré en Figure 4-5, une fois encapsulées dans les LNP, les molécules sont suffisamment proches (moins de 10 nm) pour permettre un transfert d'énergie entre les deux fluorophores et ainsi, par excitation du DiI, un signal sera réémis par le DiD.

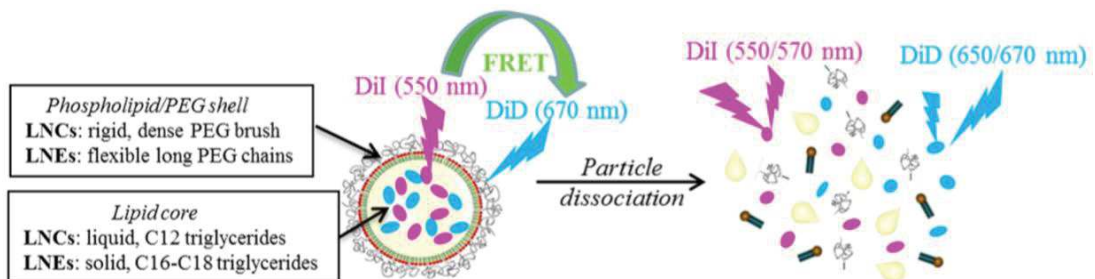


Figure 4-5 : Représentation schématique du procédé de FRET³⁴⁰

Par contre, dans le cas de la déstabilisation des nanoparticules, tous ses composants se retrouvent alors dilués, distants les uns des autres et le transfert d'énergie entre les deux fluorophores ne peut plus avoir lieu. Dans ce cas-là, aucun signal ne sera émis par le DiD après excitation du Dil. Ainsi, le transfert d'énergie par FRET, qui se caractérise par la présence d'un signal émis par le DiD, est un indicateur simple de l'intégrité des nanoparticules ³⁴⁰.

Afin de pouvoir s'assurer de l'intégrité des nanoparticules après electrospinning, il a donc été choisi d'utiliser des LNP FRET (avec un mélange de Dil et DiD en cœur) pour la formation de fibres composites polymères/LNP. La faisabilité du transfert FRET n'ayant été démontré que pour des nanoparticules de diamètres moyens compris entre 50 et 80 nm, il a été choisi de travailler avec des LNP FRET de diamètre 80 nm, par ailleurs celles-ci pourraient, par leur plus grande taille, être plus facilement imagées par MEB.

1.2.2 Formulation et caractérisation des LNP FRET

Des LNP ont été synthétisées suivant le protocole décrit en chapitre 5 (paragraphe 8) par émulsion d'une phase aqueuse et d'une phase huileuse contenant le Dil et le DiD. Les particules obtenues ont ensuite été purifiées puis reconcentrées.

Le diamètre hydrodynamique, c'est-à-dire le diamètre de la particule en tenant compte de sa couche d'hydratation, ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules sont mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le PDI reflète la dispersion de taille des particules, plus il se rapproche de 0, plus la taille des particules est homogène, la population est dite monodisperse (de taille homogène). Le potentiel zêta des LNP (charge électrique à la surface des particules en solution/dispersion) est mesuré par électrophorèse laser Doppler (un champ électrique est appliqué à la dispersion de particules, qui se déplacent ensuite à une vitesse liée à leur potentiel zêta). Les valeurs mesurées pour le diamètre hydrodynamique, le PDI et le potentiel zêta des LNP FRET sont récapitulées en Tableau 4-1.

Tableau 4-1 : Valeurs moyennes et écarts-types du diamètre, du PDI et du potentiel zêta des LNP FRET

	Diamètre (nm)	PDI (nm)	Potentiel zêta (mV)
LNP FRET	71,7 ± 0,7	0,115 ± 0,003	-1,6 ± 0,5

Les LNP FRET ont un diamètre hydrodynamique moyen de $71,7 \pm 0,7$ nm, proche de la taille théorique attendue de 80 nm avec un PDI de $0,115 \pm 0,003$ qui indique que la population de nanoparticules présente des tailles homogènes. Avec une valeur de potentiel zêta proche de zéro ($-1,6 \pm 0,5$ mV), les nanoparticules sont considérées comme neutres.

Afin de s'assurer que le transfert d'énergie par FRET entre le DiI et le DiD a bien lieu dans les nanoparticules, une solution de LNP FRET à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ a été analysée par fluorimétrie en mesurant l'émission de fluorescence de cet échantillon. Pour cela, la solution contenant les LNP est excitée à une longueur d'onde de 532 nm (qui correspond à l'excitation du DiI, voir Figure 4-4) et le spectre d'émission obtenu a été enregistré (Figure 4-6).

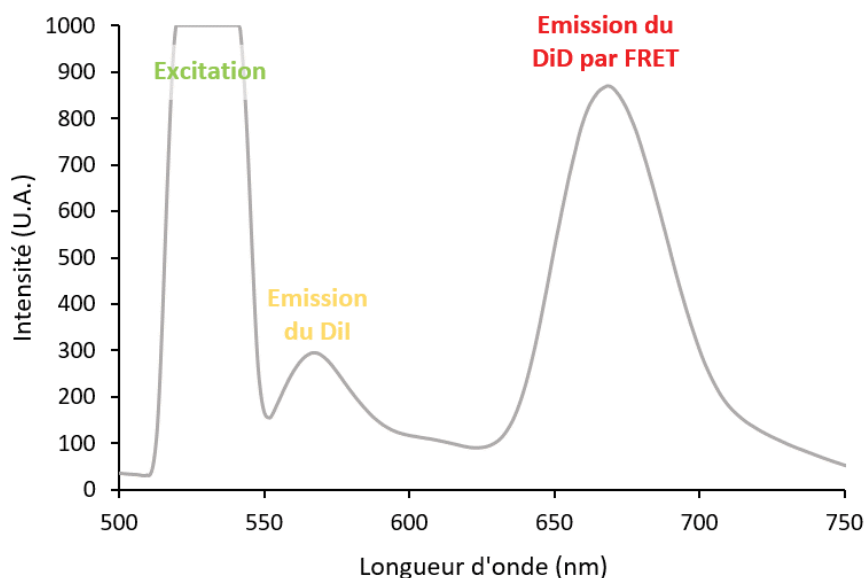


Figure 4-6 : Spectre d'émission des LNP FRET à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans l'eau après excitation à 532 nm

Sur ce spectre, un premier pic d'intensité lumineuse compris entre 510 et 550 nm est enregistré, qui correspond à la diffusion de la lumière incidente par la solution des LNP. Entre 550 et 600 nm (avec un maximum à 567 nm), un second pic dû à la fluorescence du DiI contenu dans les LNP FRET est mesuré.

En effet, malgré la présence du DiD au sein de la nanoparticule, le transfert d'énergie par FRET n'est pas total et une partie de l'énergie d'excitation du Dil est directement réémise par fluorescence de la molécule. Enfin, un signal (3 fois plus intense que celui dû à la fluorescence du Dil) est enregistré entre 630 et 720 nm (avec un maximum à 668 nm), qui correspond cette fois à la fluorescence du DiD après transfert de l'énergie d'excitation du Dil.

Afin de s'assurer que la fluorescence du DiD est bien due au transfert d'énergie du Dil au DiD, et non à l'excitation directe des molécules de DiD, des LNP F80 contenant seulement du DiD ont été synthétisées. Après excitation d'une solution de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de LNP DiD dans l'eau à 532 nm, on ne note aucun signal correspondant à la fluorescence du DiD sur le spectre d'émission des LNP DiD (Figure 4-7).

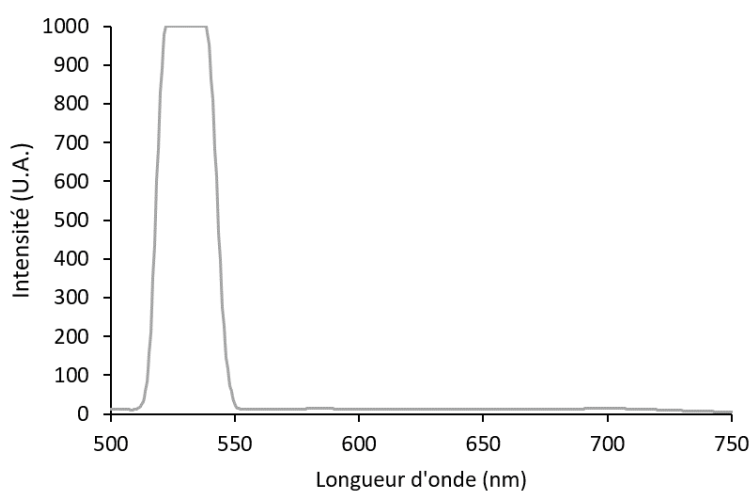


Figure 4-7 : Spectre d'émission des LNP DiD à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans l'eau après excitation à 532 nm

La stabilité des LNP FRET en solution dans de l'eau à 4°C (température de conservation des nanoparticules) a été étudiée par DLS et fluorimétrie pendant 3 mois. Aucun changement dans le diamètre des LNP et dans l'intensité de la fluorescence FRET n'a été relevé, ce qui révèle une bonne stabilité colloïdale des particules FRET en solution pendant 3 mois minimum.

Après avoir mesuré les différentes caractéristiques colloïdales des LNP et s'être assuré de l'efficacité de la fluorescence FRET des particules, il est maintenant possible de se tourner vers la formation des fibres composites HA-PVA-HP β CD/LNP FRET.

1.2.3 L'électrospinning du mélange HA-PVA-HPβCD/nanoparticules lipidiques

Une solution de HA-PVA-HPβCD (6-6-10) a été préparée en ajoutant 1 % w/w_{H2O} de LNP FRET au mélange soit 4,6 % en masse de LNP FRET par rapport à la masse de HA-PVA-HPβCD. La tension de surface de la solution et sa viscosité ont été mesurées et comparées à celles de solutions sans nanoparticules (Tableau 4-2).

Tableau 4-2 : Valeurs et écarts-types de la viscosité et de la tension de surface des solutions HA-PVA-HPβCD avec ou sans LNP FRET

	Viscosité (Pa.s)	Tension de surface (mN.m ⁻¹)
Solution avec LNP FRET	0,73 ± 0,05	47,5 ± 0,4
Solution sans LNP FRET	0,68 ± 0,04	47,7 ± 0,3

L'ajout des LNP à la solution de départ HA-PVA-HPβCD ne semble pas affecter significativement la viscosité et la tension de surface, paramètres clés dans le procédé d'électrospinning. Le mélange HA-PVA-HPβCD/LNP FRET a donc été électrospinné en gardant les mêmes paramètres (tension, débit, distance aiguille collecteur...) que pour la solution HA-PVA-HPβCD sans nanoparticules (voir détails en chapitre 5, paragraphe 10.1). Les fibres obtenues ont ensuite été imagées par MEB (Figure 4-8).

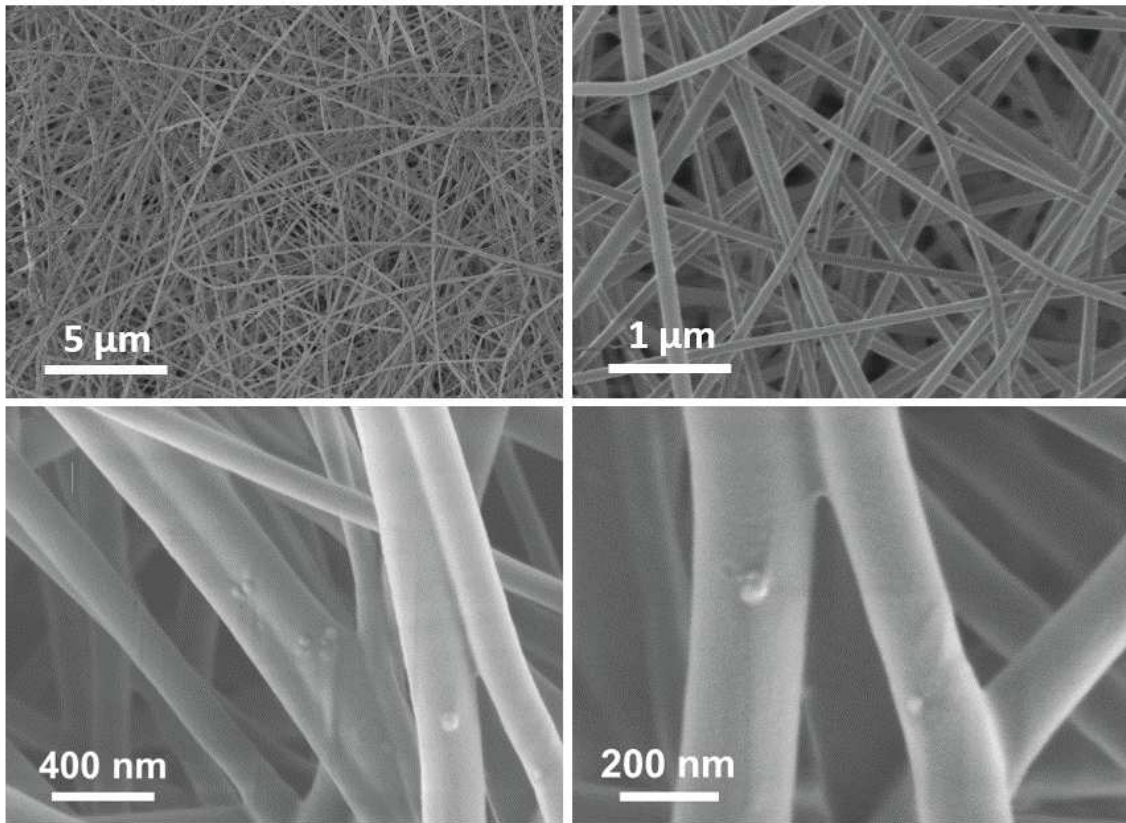


Figure 4-8 : Images MEB de fibres composites HA-PVA-HPβCD/LNP FRET à différents grossissements. Images MEB haute résolution obtenues à basse tension et sans dépôt métallique en surface.

Ces images montrent un dépôt de fibres uniformes d'un diamètre moyen de 109 ± 23 nm, similaires à celles obtenues sans LNP. A de plus forts grossissements, on peut voir à la surface des fibres des aspérités sphériques, qui ne sont visibles que sur les fibres formées à partir de la solution contenant les LNP FRET. Le diamètre moyen de ces aspérités sphériques est de 61 ± 8 nm ce qui est comparable au diamètre hydrodynamique des LNP mesuré par DLS (voir Tableau 4-1). Il s'agit donc probablement de LNP FRET à la surface des nanofibres. Le fait que les LNP apparaissent rarement en surface s'explique par leur faible concentration dans les fibres (moins de 5% en masse de LNP par rapport à l'ensemble HA, PVA et HPβCD) et que très certainement la majeure partie des LNP sont noyées au cœur des fibres.

Cependant, même si ces nanoparticules sont visibles sur les membranes HA-PVA-HPβCD, il faut s'assurer que celles-ci n'ont pas été détériorées par les différentes étapes de mise en œuvre (electrospinning et traitement thermique) et qu'elles conservent leur intégrité colloïdale une fois relarguées en solution.

2 EFFET DES CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE DES MEMBRANES SUR LA STABILITE DES NANOPARTICULES

2.1 ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ELECTROSPINNING SUR LES NANOPARTICULES LIPIDIQUES

Dans un premier temps les membranes composites HA-PVA-HP β CD/LNP FRET ont été imagées par microscopie optique en fluorescence. Pour cela, le dépôt de fibres est illuminé à la longueur d'onde d'excitation du DiI et, grâce à un jeu de filtres optiques, des images de la fluorescence du DiD (fluorescence FRET) sont enregistrés (pour plus de détails, voir chapitre 5, paragraphe 2.4). Les images des fibres sous lumière blanche et sous filtre FRET sont présentées en Figure 4-9.

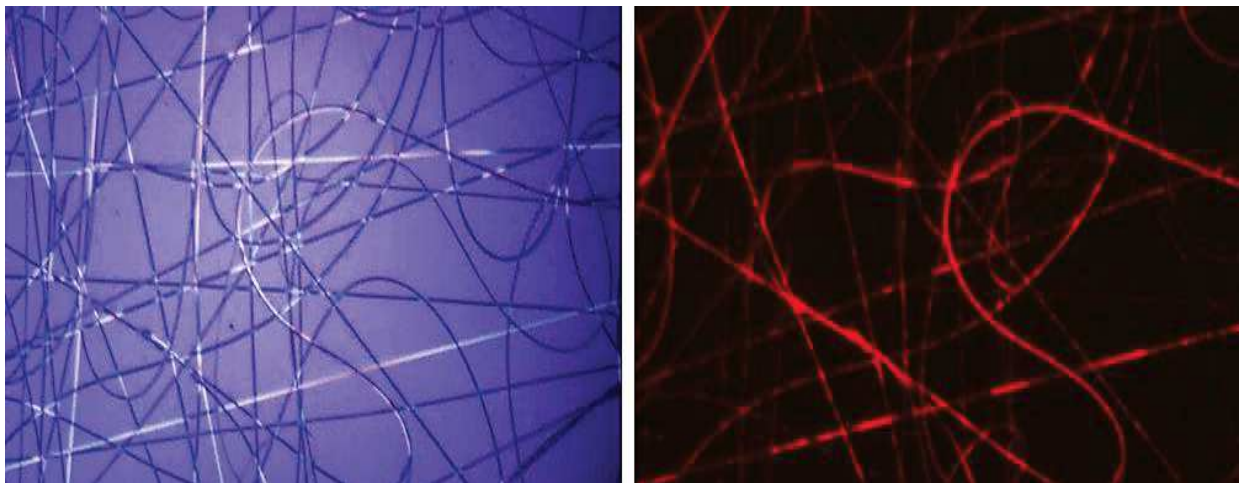


Figure 4-9 : Images microscope des fibres HA-PVA-HP β CD/LNP FRET sous lumière blanche (à gauche) et sous filtre FRET (à droite)

On peut voir sur ces images un signal lumineux tout au long des fibres, qui indique la présence de transfert d'énergie par FRET au sein des nanoparticules. Or si ce transfert a lieu, c'est que les molécules de fluorophores sont suffisamment proches, donc, à priori, encore encapsulées dans la LNP. Afin de s'assurer que la fluorescence provient bien des LNP FRET et non d'une fluorescence intrinsèque des fibres HA-PVA-HP β CD/LNP FRET, des images de membranes sans nanoparticules ont été réalisées suivant les mêmes paramètres. Dans ce cas, aucune fluorescence des fibres n'est détectée. Le signal lumineux imagé à l'aide des filtres FRET est donc bien le fait de la présence des LNP au sein des fibres.

Ces résultats semblent donc indiquer que les nanoparticules n'ont pas été détruites pendant la mise en forme des fibres et que celles-ci sont toujours bien présentes au sein des membranes nanofibreuses. Cependant, la solidification du milieu dans lequel sont contenues les LNP FRET (fibres HA-PVA-HP β CD) pourrait aussi être responsable de la conservation de la fluorescence FRET. En effet, comme illustré en Figure 4-10, lors de la mise en forme de la fibre, la structure cœur/coquille des nanoparticules pourrait être détériorée mais les fluorophores confinés dans l'enveloppe solide de polymères, pourraient être figés. Etant donc maintenus artificiellement proches au sein des fibres solidifiées, le transfert d'énergie par FRET pourrait avoir lieu malgré la dégradation colloïdale des LNP.

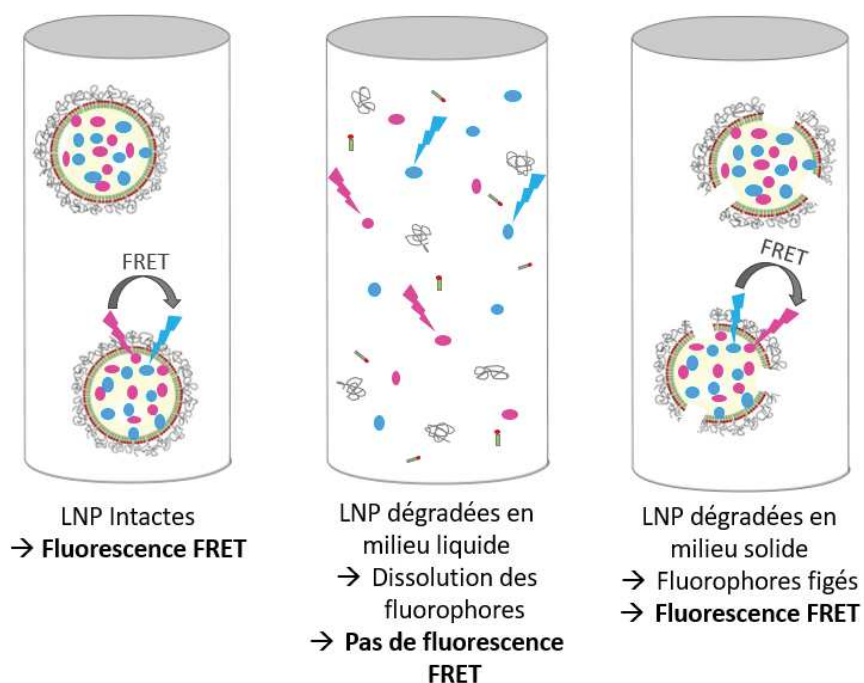


Figure 4-10 : Représentation schématique des LNP FRET (dégradées ou non) au sein des fibres HA-PVA-HP β CD

Afin de s'assurer que les LNP FRET n'ont pas été dégradées pendant la mise en forme des fibres, des échantillons de membrane HA-PVA-HP β CD/LNP FRET non réticulée (sans EDC et NHS dans la solution de départ) ont été solubilisés dans du PBS de façon à obtenir une concentration en LNP de 0,1 mg.mL⁻¹. Pour comparaison, une solution de HA, PVA, HP β CD et LNP est préparée dans du PBS de manière à obtenir les mêmes concentrations que les fibres solubilisées. La fluorescence FRET des différentes solutions est étudiée par fluorimétrie (avec une longueur d'onde d'excitation de 532 nm, correspondant à l'excitation du Dil). Un contrôle est réalisé à l'aide d'une solution de fibres

HA-PVA-HP β CD sans LNP solubilisées dans du PBS (le protocole détaillé est disponible en chapitre 5 paragraphe 10.2). Les spectres d'émission obtenus sont présentés en Figure 4-11.

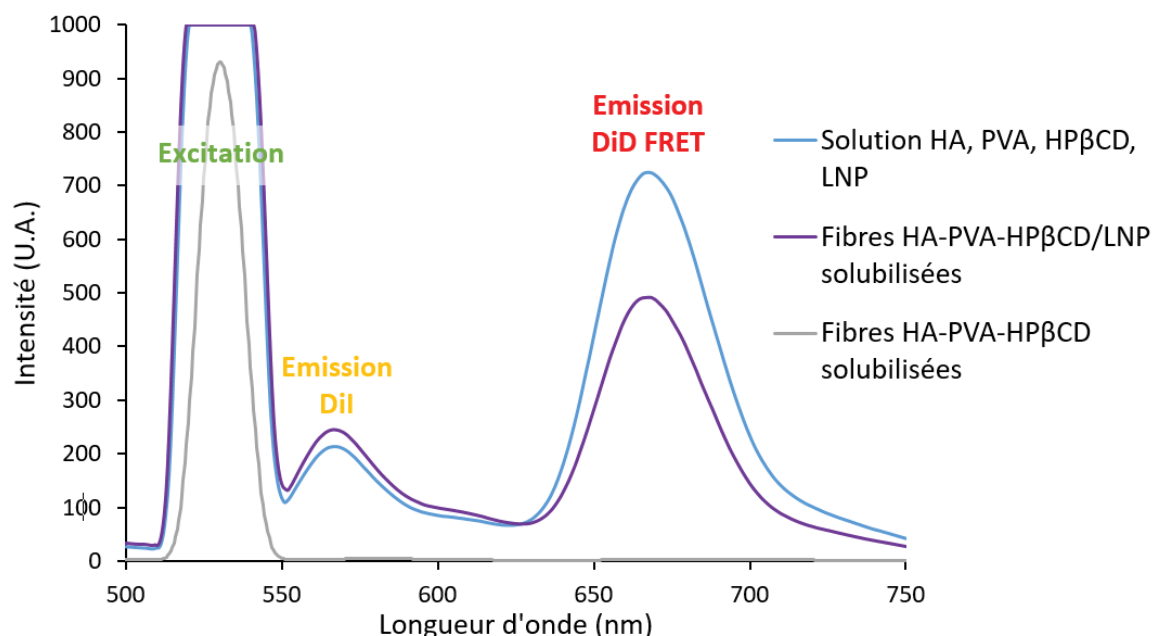


Figure 4-11 : Spectres d'émission des LNP FRET avant et après electrospinning

Le spectre des fibres HA-PVA-HP β CD/LNP FRET présente un fort signal de fluorescence FRET ce qui indique que des nanoparticules intactes sont bien présentes en solution. L'intensité de la fluorescence des fibres solubilisées est cependant légèrement inférieure à celle de la solution de HA, PVA, HP β CD et LNP FRET n'ayant pas subi l'electrospinning. Une diminution de $32 \pm 4 \%$ de la fluorescence FRET est relevée (la perte de fluorescence est calculée à partir de maximum d'émission à 669 nm pour le FRET), traduisant qu'une partie des LNP pourrait être détériorée par l'ES, même si la majorité des particules reste cependant intacte. Le procédé d'electrospinning permet donc la formation de fibres composites tout en préservant l'intégrité colloïdale d'une majorité des nanoparticules.

2.2 ETUDE DE L'INFLUENCE DU RECUIT SUR L'INTENSITE DE LA FLUORESCENCE FRET ET DE LA STRUCTURE DES MEMBRANES

Des essais de relargage des LNP à partir des membranes nanofibreuses composites étant envisagés dans la suite des travaux, il est important que les nanoparticules soient facilement détectables par fluorimétrie. Or, une baisse de fluorescence des LNP FRET après le recuit des membranes pourrait fortement complexifier cette détection. Les conditions de recuit préservant au maximum la fluorescence des nanoparticules ont donc été recherchées.

L'influence du recuit sur la fluorescence des LNP a tout d'abord été étudiée pour un échantillon de fibres HA-PVA-HP β CD/LNP FRET sans EDC et NHS dans les conditions proposées dans le chapitre précédent (échantillon placé en étuve pendant 24 h à 60 °C, conditions de recuit pour la réticulation déterminée dans le chapitre 2, paragraphe 2.1.3). L'échantillon a ensuite été solubilisé dans du PBS et sa fluorescence a été étudiée par fluorimétrie (Figure 4-12).

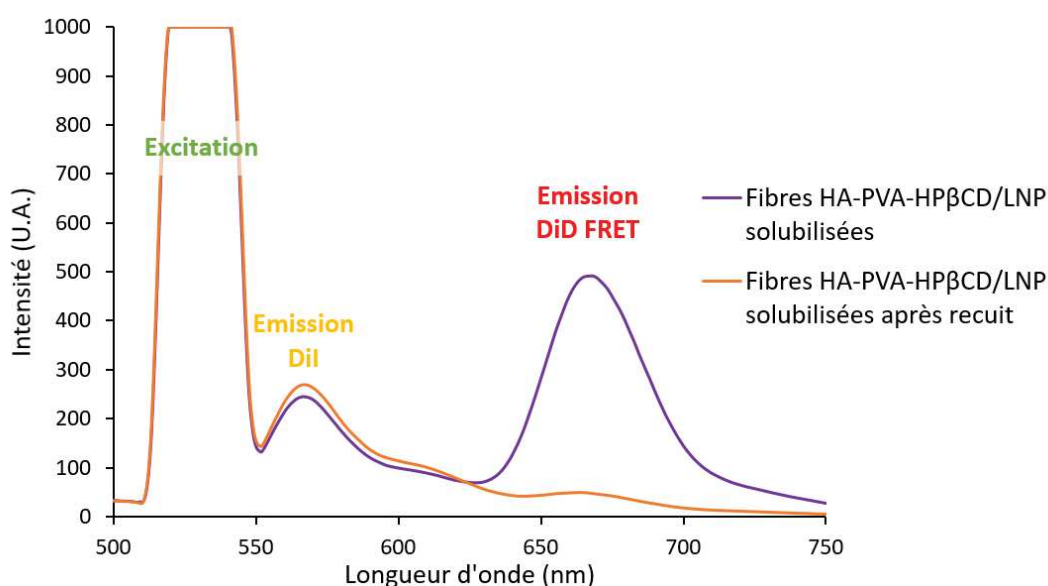


Figure 4-12 : Spectres d'émission des LNP FRET contenues dans les nanofibres avant et après recuit

Le spectre d'émission des fibres ayant subi le recuit présente un signal de fluorescence FRET plus faible avec une diminution de $85 \pm 3 \%$ de l'intensité de la fluorescence en comparaison avec les fibres HA-PVA-HP β CD/LNP FRET qui n'ont pas été chauffées. Cette perte de FRET peut être due, soit à la déstabilisation de la structure nanoparticulaire, ou simplement causé par la dégradation chimique de ces fluorophores, appartenant à la famille des cyanines, connues pour être sensibles à la température³⁴¹. D'ailleurs le protocole d'encapsulation de cette famille d'agents de fluorescence dans les LNP a dû

être adapté. En effet, lors de leur incorporation dans la phase huileuse, il est recommandé de maintenir cette dernière à une température inférieure à 50°C³⁴².

La stabilité thermique des fluorophores étant fortement dépendante du milieu dans lesquels ils se trouvent, il a été choisi de réaliser l'étude de l'influence des conditions de recuit sur l'intensité de la fluorescence des LNP FRET directement sur les membranes HA-PVA-HPβCD/NP FRET et non sur les fluorophores seuls.

Dans un premier temps, des échantillons de membrane HA-PVA-HPβCD/LNP FRET non réticulée ont subi différentes conditions de recuit (durées de 24 ou 48 h pour températures variant entre 40 et 60 °C). Ces fibres ont ensuite été solubilisées dans du PBS et l'intensité de la fluorescence FRET a été mesurée par fluorimétrie. Ces résultats sont présentés en Figure 4-13a.

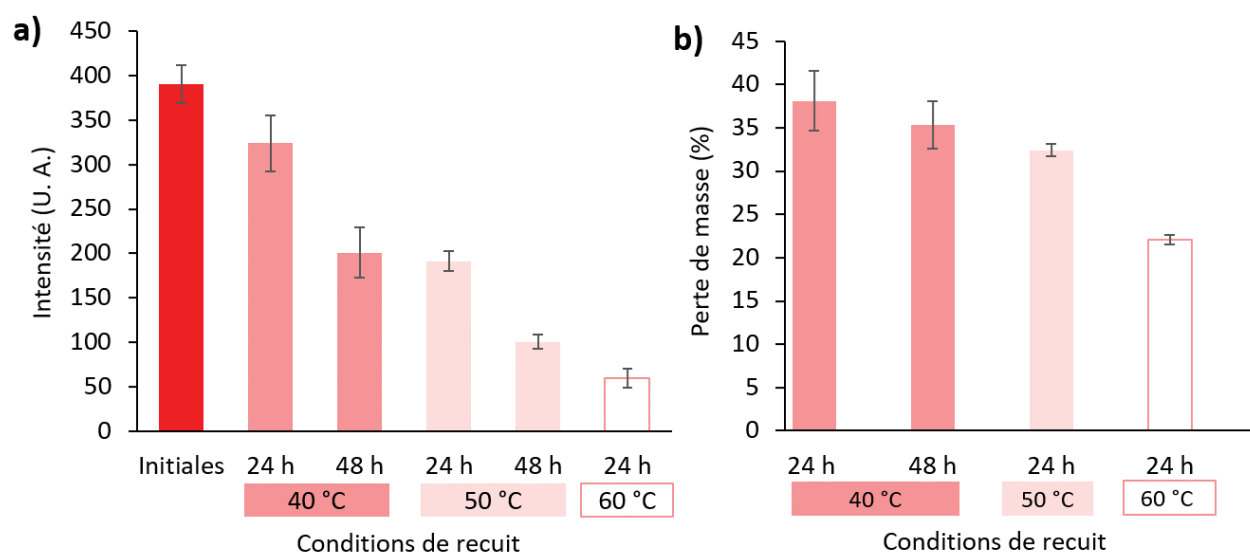


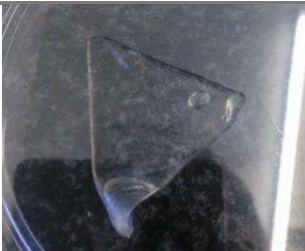



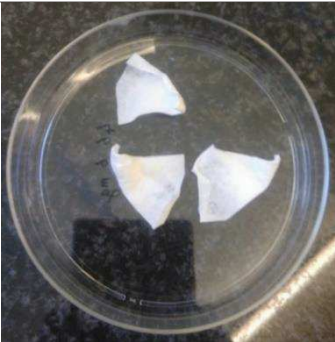
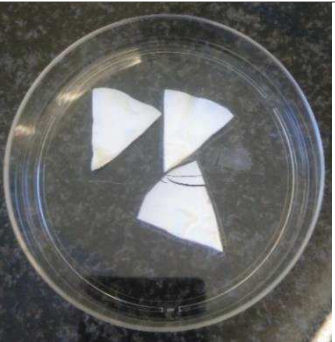
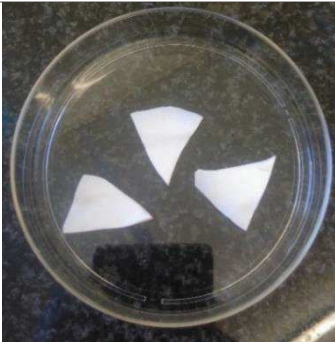
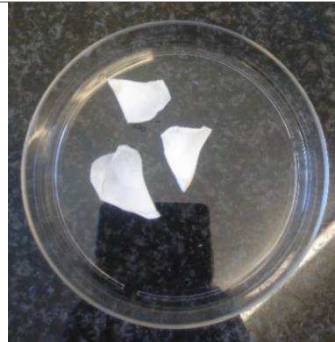
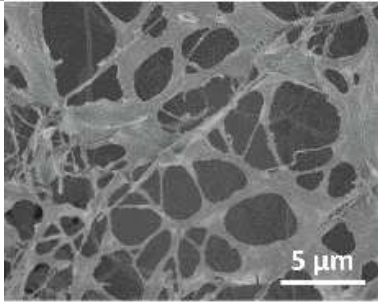
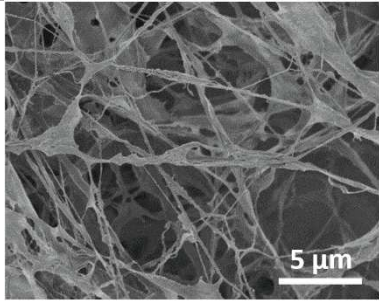
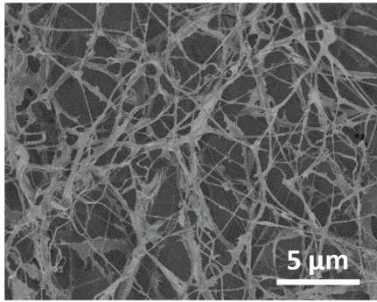
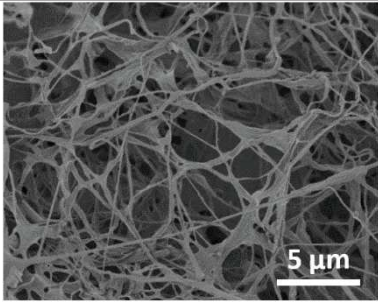
Figure 4-13 : a) Intensité de la fluorescence FRET des LNP après différentes conditions de recuit et b) perte de masse des membranes après lavage pour différentes conditions de recuit

Plus la température est élevée et la durée du recuit est longue, plus l'intensité de la fluorescence FRET diminue. Pour préserver la fluorescence des LNP, il semble donc préférable d'effectuer la réticulation des fibres à la température la plus basse et pour une durée la plus courte possible. Il faut cependant que ces conditions soient compatibles avec une bonne réticulation des membranes, sinon elles seront dégradées durant l'étape de lavage, il sera alors impossible de les manipuler et lors de leur mise en contact en milieu physiologique, elles se désintégreront très rapidement. Pour cela, des membranes HA-PVA-HPβCD/LNP FRET avec EDC-NHS ont été chauffées entre 40 et 60 °C pour des durées de 24 à

48 h et leur perte de masse après lavage a été mesurée. Ces résultats sont présentés en Figure 4-13b. Le recuit de 48 h à 50 °C n'a pas été réalisé car la perte d'intensité de la fluorescence FRET de $74 \pm 2 \%$ a été jugée trop importante pour la poursuite des expérimentations. Le recuit de 60 °C pendant 24 h (conditions habituelles de recuit), bien qu'induisant une forte perte d'intensité de $85 \pm 3 \%$, est étudié pour servir de point de comparaison à de nouvelles conditions de recuit. Ces mesures indiquent que, plus la durée et la température de recuit sont élevées, plus la perte de masse des membranes après lavage est faible et donc plus la réticulation du matériau est efficace, contrairement à l'intensité de la fluorescence FRET qui diminue avec l'augmentation de la température et de la durée du recuit. Il faut donc trouver un compromis dans les conditions de recuit pour conserver la fluorescence FRET des LNP tout en maintenant une réticulation de la membrane suffisamment efficace.

Pour comparer l'état macroscopique des membranes après différentes conditions de recuit, des photographies des matériaux après leur lavage et après la lyophilisation ont été réalisées. Parallèlement, afin d'étudier l'influence des conditions de recuit sur la structure nanofibreuse des membranes, des images MEB de celles-ci ont été effectuées. Toutes ces images sont présentées dans le Tableau 4-3.

Tableau 4-3 : Photographies des membranes ayant subi différentes conditions de recuits après lavage et après lyophilisation, images MEB et aspect général des membranes finales

	40 °C / 24 h	40 °C / 48 h	50 °C / 24 h	60 °C / 24 h
Membrane après lavage				
Membrane après lyophilisation				
Après réticulation (MEB)				
Aspect	Très friables	Très friables	Facilement manipulables	Facilement manipulables

Pour toutes les conditions de recuit testées, la réticulation est suffisamment efficace pour prévenir la dissolution des membranes lors de leur immersion dans l'eau pour l'étape de lavage. Cependant, après la lyophilisation, les membranes ayant été recuites à 40 °C sont fragiles et friables, et se cassent quand elles sont manipulées. De plus, celles n'ayant été chauffées que 24 h à 40 °C ont perdu leur structure nanofibreuse. Les membranes recuites à 50 °C pendant 24 h, ont, elles, conservées leur nanostructuration et, après lyophilisation, celles-ci restent suffisamment solide pour être facilement manipulables.

Bien que conduisant à une perte de masse supérieure au recuit classique, un chauffage de 24 h à 50 °C permet de conserver $49 \pm 3 \%$ de l'intensité de la fluorescence FRET des LNP tout en permettant l'obtention d'une membrane nanofibreuse facilement manipulable. Ces conditions de recuit ont donc été choisies pour la poursuite des travaux.

3 SUIVI DU RELARGAGE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES

Afin de savoir si les nanoparticules incluses dans les membranes composites HA-PVA-HP β CD/LNP FRET peuvent être libérées en solution, des essais de relargage ont été réalisés dans une solution de PBS ainsi qu'en présence de hyaluronidase (Hyal) dans le but d'étudier l'influence de la dégradation de la membrane sur la cinétique de relargage des LNP.

3.1 RELARGAGE DES LNP FRET DANS LE PBS

3.1.1 Stabilité des LNP FRET avec la température

Avant de pouvoir réaliser les essais de relargage des LNP FRET, il faut s'assurer que celles-ci soient stables dans les conditions de l'expérimentation. Lors du relargage, la solution surnageante (solution de PBS dans laquelle sont libérées les nanoparticules) est renouvelée toutes les 24 h, il faut donc s'assurer que les LNP FRET soient au minimum stables dans le milieu pour cette durée (voir protocoles détaillés en chapitre 5, paragraphes 10.3 et 10.4).

Comme pour le relargage du naproxène, le suivi de la libération des LNP FRET est réalisé à 33 °C, température moyenne de la peau. Pour cela, des LNP FRET en solution dans du PBS ont été maintenues sous agitation à 33 °C et le diamètre moyen des nanoparticules est mesuré au cours du temps par DLS. Pendant les trois premiers jours de l'expérimentation, le diamètre moyen des LNP reste stable mais, à partir de quatre jours, on note une augmentation de la taille des particules (de $34 \pm 0,8$ %) et du PDI (de 39 ± 2 %) qui traduit la déstabilisation des LNP. En parallèle, l'intensité de la fluorescence FRET des nanoparticules a été enregistrée, et suit la même évolution : c'est-à-dire qu'elle reste stable pendant trois jours avant de subir une faible variation à partir du 4^{ème} jour, associée à la déstabilisation des particules. Cependant, le renouvellement de la solution surnageante lors de l'étude de relargage est effectué toutes les 24h ; sur cette durée les LNP FRET restent stables ce phénomène de dégradation des particules, observé à plus de 4 jours, ne nuira pas au suivi de leur relargage.

3.1.2 Suivi du relargage des LNP FRET dans le PBS

Des échantillons de membranes composites réticulées de $30 \pm 0,1$ mg ont été immergées dans du PBS maintenu à 33°C et le relargage des LNP FRET a été suivi par fluorimétrie. Des membranes HA-PVA-HP β CD sans LNP ont été utilisées comme contrôle (le protocole détaillé du relargage est disponible en chapitre 5, paragraphe 10.3). Le profil du relargage des LNP dans le PBS est présenté en Figure 4-14.

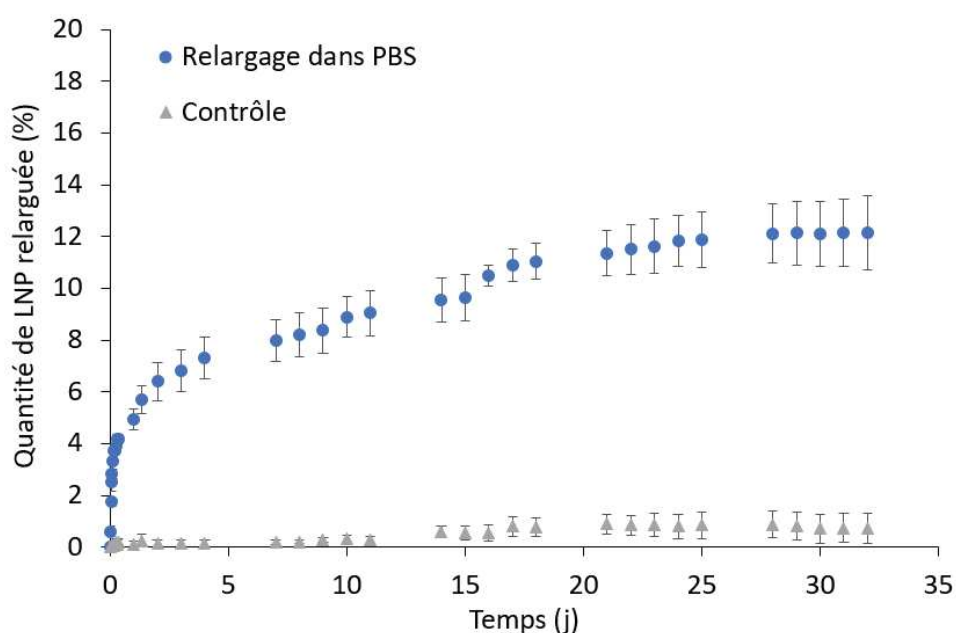


Figure 4-14 : Quantité de LNP relarguée dans le PBS au cours du temps

Dès 30 minutes d'immersion des membranes composites dans le PBS, la présence de LNP FRET dans la solution surnageante est détectée. La libération des nanoparticules se poursuit ensuite régulièrement pendant 25 jours, pour atteindre un plateau lors de la cinquième semaine de suivi du relargage. A ce moment-là, $12,2 \pm 1,4$ % des LNP présentes initialement dans la membrane ont été libérées dans le PBS. En tenant compte que 32 ± 4 % de nanoparticules sont détériorées par l'électrospinning (voir paragraphe 2.1 de ce chapitre), $17,9 \pm 3,1$ % des LNP intactes après la mise en forme des fibres ont donc été relarguées de la membrane. Cette quantité de LNP est encore bien inférieure au nombre total de particules incluses dans la membrane. En effet, il a été montré dans le chapitre 2 (paragraphe 3.2) que les membranes HA-PVA-HP β CD étaient très stables dans le PBS avec $90,8 \pm 0,5$ % de leur masse

conservée après 28 jours d'immersion dans le PBS. Ainsi même si ces résultats démontrent que les membranes composites HA-PVA-HP β CD/LNP FRET permettent de libérer des nanoparticules intactes par simple contact du matériau avec une solution aqueuse, il se pourrait qu'une grande partie soient encore emprisonnées au sein de la matrice polymère des fibres. Afin de rendre compte de la dégradation des membranes au contact de fluides physiologiques, des essais de relargage ont été réalisés en présence de hyaluronidase (Hyal).

3.2 RELARGAGE DES LNP EN PRESENCE DE HYALURONIDASE

3.2.1 Stabilité des LNP FRET en présence de hyaluronidase

Comme pour la stabilité dans le PBS, des LNP FRET dispersées dans une solution de Hyal (50/125 U.mL⁻¹) ont été maintenues sous agitation à 33 °C et le diamètre moyen des nanoparticules ainsi que l'intensité de la fluorescence FRET sont mesurés au cours du temps (les protocoles détaillés des études de stabilité sont disponible en chapitre 5, paragraphe 9). Cependant, une forte augmentation du diamètre des nanoparticules ainsi que de leur PDI est enregistrée après seulement une journée (+ 57 \pm 3 % pour le premier paramètre et + 46 \pm 7 % pour le second). Les LNP FRET ne sont donc pas stables pendant 24 h en présence de Hyal, il faut donc trouver une alternative aux LNP FRET permettant de suivre la libération des nanoparticules dans une solution de Hyal.

Pour cela, des LNP Dil de diamètre moyen de 80 nm (qui ne contiennent qu'un seul fluorophore, le Dil, au sein de leur cœur huileux) ont été synthétisées (la formulation détaillée des LNP Dil est disponible en chapitre 5, paragraphe 8). Contrairement au LNP FRET, les LNP Dil sont, elles, stables pendant 24 h en présence de Hyal (pas de variation de leur diamètre moyen ou du PDI, ni de l'intensité de la fluorescence).

Dans les travaux présentés précédemment, la fluorescence FRET a permis de mettre en évidence l'intégrité colloïdale des nanoparticules libérées à partir de membranes électrospinnées. Ce fait établi, l'utilisation du FRET n'est donc plus indispensable et la fluorescence seule des LNP devrait être suffisante pour la détection et la quantification des particules libérées. Pour des raisons de stabilité en présence de Hyal, les LNP FRET sont donc remplacées par des LNP Dil de même diamètre au sein des fibres.

3.2.2 Suivi du relargage des LNP Dil dans une solution de hyaluronidase

Comme dans le cas du relargage des LNP dans le PBS, des échantillons de membranes de $30 \pm 0,1$ mg ont été immergées dans une solution de Hyal de $50/125$ U.mL⁻¹ à 33 °C et le relargage des LNP Dil a été suivi par fluorimétrie (le protocole détaillé du relargage est disponible en chapitre 5, paragraphe 10.4). Le profil du relargage des LNP dans la solution de Hyal, comparé à celui obtenu dans le PBS, est présenté en Figure 4-15.

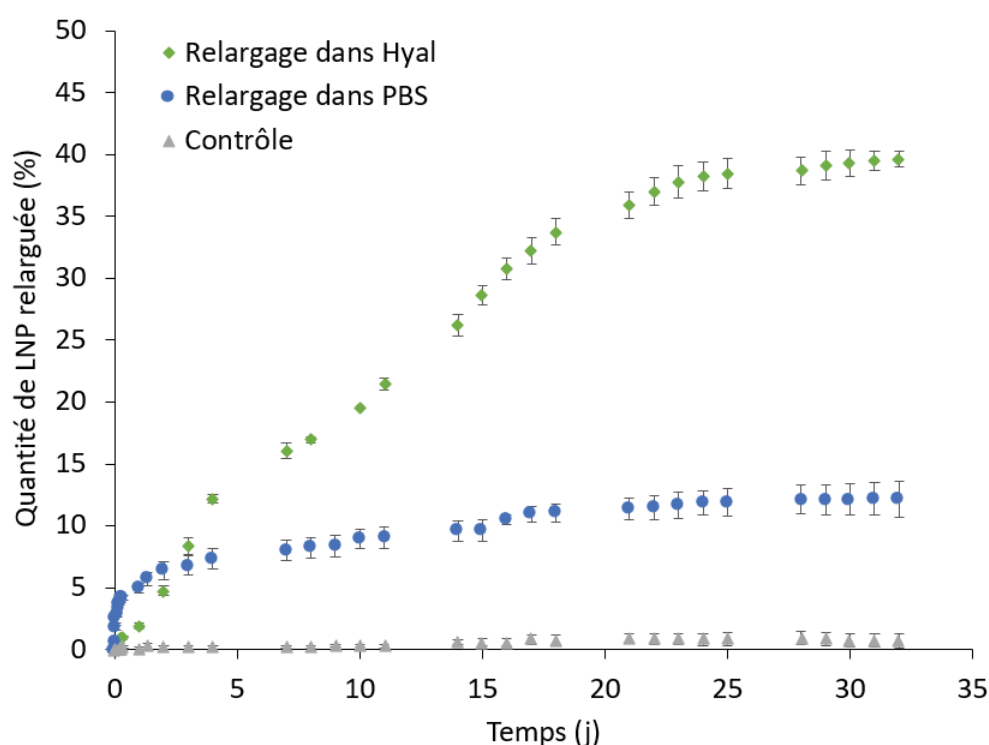


Figure 4-15 : Quantité de LNP relarguée au cours du temps dans une solution de Hyal ou de PBS

En présence de Hyal, la quantité de LNP relarguée est bien supérieure à celle obtenue dans le PBS seul, puisqu'elle atteint $39,6 \pm 0,7$ % des LNP présentes initialement dans la membrane. En tenant compte de la dégradation des nanoparticules lors de l'électrospinning $58,4 \pm 5,5$ % des LNP intactes après la mise en forme des fibres ont été relarguées de la membrane. Il a été montré, qu'après 28 jours, les membranes HA-PVA-HP β CD immergées dans une solution de Hyal avaient perdu $75,7 \pm 9,9$ % de leur masse initiale (chapitre 2, paragraphe 3.2). C'est donc la dégradation de la membrane par l'enzyme

qui permet de libérer une plus grande quantité de LNP (plus de 3 fois plus de particules libérées dans la solution de Hyal par rapport au relargage dans le PBS).

Cependant, lors des 3 premiers jours, les relargages des LNP dans le PBS et dans la Hyal ne suivent pas le même profil de diffusion. En effet, malgré la dégradation de la membrane au cours de ces 3 jours, moins de nanoparticules sont libérées des membranes immergées dans la solution de Hyal. Ce comportement pourrait être dû aux différences entre les LNP utilisées. En effet, comme expliqué précédemment, des LNP Dil ont été employées à la place des LNP FRET pour le relargage dans la Hyal. Les LNP Dil sont plus anioniques avec un potentiel zéta de $-6,1 \pm 0,4$ mV contre $-1,6 \pm 0,5$ mV pour les LNP FRET. Lors de la mise en forme des fibres composites par electrospinning, la solution polymères/LNP est soumise à un fort champ électrique. Or les nanoparticules étant chargées, celles-ci peuvent être amenées à migrer dans le jet de solution sous l'effet de ce champ. Les LNP Dil et LNP FRET ne présentant pas la même charge, cela pourrait donc jouer sur la répartition des particules au sein des fibres après electrospinning et donc modifier leur cinétique de libération.

Dans ces travaux de thèse, les LNP utilisées renferment des fluorophores qui ont permis de s'assurer de la bonne conservation des particules après leur incorporation dans les nanofibres polymères (par fluorescence FRET) et de détecter et quantifier les LNP lors de leur relargage en milieu aqueux. Mais, comme évoqué en début de chapitre (paragraphe 1.1), il a été montré que divers principes actifs pouvaient être encapsulés au sein des LNP. Les nanoparticules incluses dans les membranes HA-PVA-HP β CD peuvent donc être aussi envisagées comme vecteurs de molécules actives.

Contrairement à la fonctionnalisation par imprégnation d'un principe actif dans les fibres HA-PVA-HP β CD (étudié dans le chapitre précédant à l'aide du naproxène comme molécule modèle) qui permet d'obtenir une libération rapide du principe actif, la fonctionnalisation des fibres par les nanoparticules permettrait de réaliser un relargage progressif des composés actifs. En effet, par imprégnation, la majorité du principe actif est libéré au cours des premières 24 h alors que le relargage des LNP peut se poursuivre sur plusieurs semaines. Il pourrait être envisagé de réaliser les deux types de fonctionnalisation sur une même membrane permettant ainsi d'obtenir un relargage combiné de deux principes actifs, avec des cinétiques différentes, adaptées au rôle de chacune des molécules actives dans le déroulement de la cicatrisation d'une plaie. En effet, si le naproxène nécessite d'être libéré rapidement pour lutter contre la réaction d'inflammation, pour d'autres principes actifs il pourrait être préférable de réaliser un relargage plus lent. Par exemple, une libération en faible quantité de manière prolongée d'un agent antimicrobien encapsulé dans les LNP, pourrait palier aux problèmes d'infection de la plaie qui peuvent entraîner un retard de la cicatrisation.

Conclusion

Dans ce chapitre, la fonctionnalisation des nanofibres HA-PVA-HP β CD par des nanoparticules lipidiques (LNP) a été menée avec succès. Pour cela, des LNP FRET contenant deux fluorophores, le Dil et le DiD, ont été synthétisées puis ajoutées au mélange HA-PVA-HP β CD à hauteur de 1 % w/w_{H₂O} (soit 4,6 % en masse par rapport à la masse de fibres) et le tout a été directement électrospinné avec les paramètres établis précédemment. Des images MEB des membranes composites HA-PVA-HP β CD/LNP ont montré que l'ajout de nanoparticules, visibles à la surface des fibres, ne perturbait pas leur mise en forme, puisqu'un dépôt nanofibreux sans défaut est obtenu. De plus, les fibres ainsi formées présentent un diamètre moyen de 109 ± 23 nm, similaire à celui obtenu sans LNP.

Grâce à la fluorescence FRET des nanoparticules, il a été montré que des LNP sont toujours intactes au sein des fibres après leur mise en forme par électrospinning, mais aussi une fois les fibres solubilisés dans du PBS, où, 68 ± 4 % des LNP sont retrouvées intactes. Par contre, si le procédé d'électrospinning permet de conserver les LNP, l'étape de recuit a dû être optimisée par rapport aux conditions du chapitre précédent soit 24h à 60°C. La température de recuit a ainsi été abaissée à 50 °C pendant 24h, ce qui a permis de conserver 49 ± 3 % de l'intensité de la fluorescence FRET des LNP (contre seulement 15 ± 3 % pour un recuit de 24h à 60°C) tout en conservant la structure nanofibreuse de la membrane.

Le suivi du relargage des LNP dans des solutions de PBS ou de hyaluronidase a ensuite permis de montrer que des nanoparticules intactes étaient relarguées dans les deux milieux et que la libération des LNP était prolongée sur plusieurs semaines (28 jours dans le PBS). Cependant, il a été noté que la dégradation de la membrane par l'enzyme permet de libérer une quantité bien plus importante de LNP (après 28 jours, $58,4 \pm 5,5$ % des LNP intactes après la mise en forme des fibres ont été relarguées de la membrane en présence de hyaluronidase, contre $17,9 \pm 3,1$ % dans le PBS).

La fonctionnalisation des fibres par les nanoparticules pourrait donc s'avérer complémentaire à une fonctionnalisation par imprégnation puisque les cinétiques de relargage des principes actifs sont très différentes dans les deux cas. Ces types d'imprégnations pourraient donc s'adresser à différentes familles de molécules actives qui doivent intervenir à des étapes distinctes dans la cicatrisation d'une plaie.

CHAPITRE 5 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

Introduction

L'objectif de ce chapitre est de présenter toutes les **informations complémentaires** à la bonne compréhension de ce travail de thèse.

Tout d'abord, les **matériaux** ainsi que les **méthodes d'analyses** utilisées seront développés puis, les différentes caractérisations réalisées sur les matériaux constitutifs des membranes seront présentés.

Par la suite, les **protocoles détaillés** de la formation des membranes HA-PVA-HP β CD par électrospinning, leur fonctionnalisation par le naproxène ou les nanoparticules lipidiques et, enfin, leur relargage seront développés.

CHAPITRE 5 – MATERIELS ET METHODES	177
1 MATÉRIAUX	180
2 ANALYSES	182
2.1 <i>Microscopie Electronique a Balayage (MEB).....</i>	182
2.2 <i>Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEBE)</i>	182
2.3 <i>Scanner en fluorescence</i>	182
2.4 <i>Microscopie en fluorescence</i>	183
2.5 <i>Spectroscopie infrarouge (IR)</i>	183
2.6 <i>Analyses thermogravimétrique (ATG)</i>	183
2.7 <i>Tension de surface.....</i>	184
2.8 <i>Conductivité.....</i>	184
2.9 <i>Diffusion de la lumière (DLS)</i>	184
2.10 <i>Spectrophotométrie UV-Vis.....</i>	184
2.11 <i>Fluorimétrie</i>	185
2.12 <i>Rhéologie.....</i>	185
2.13 <i>Résonance magnétique nucléaire (RMN)</i>	186
2.14 <i>Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....</i>	186
2.15 <i>Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....</i>	187
2.16 <i>Essais de traction.....</i>	187
3 CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS.....	189
3.1 <i>L'acide hyaluronique</i>	189
3.2 <i>L'hydroxypropyl-β-cyclodextrine</i>	190
4 FORMATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES HA-PVA-HPBCD	194
4.1 <i>Préparation des solutions.....</i>	194
4.2 <i>la formation des membranes par electrospinning</i>	194
4.3 <i>La réticulation.....</i>	198
4.4 <i>Le lavage et le séchage des fibres</i>	198

5	ETUDE DE LA BIOCOMPATIBILITÉ.....	200
6	ETUDE DE LA BIODÉGRADATION DES MEMBRANES EN PRÉSENCE DE HYALURONIDASE	202
6.1	<i>Suivi de la biodégradation - Imagerie des membranes au cours du temps.....</i>	<i>202</i>
6.2	<i>Suivi de la biodégradation - Evaluation de la perte de masse des membranes</i>	<i>202</i>
7	IMPRÉGNATION ET RELARGAGE DU NAPROXÈNE	203
7.1	<i>Formation de complexes HPβCD-NAP</i>	<i>203</i>
7.2	<i>Imprégnation.....</i>	<i>203</i>
7.3	<i>Relargage</i>	<i>204</i>
8	SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUE (LNP)	205
9	ETUDE DE LA STABILITÉ DES LNP	208
9.1	<i>Stabilité des LNP FRET à 4 °C.....</i>	<i>208</i>
9.2	<i>Stabilité des LNP à 33 °C.....</i>	<i>208</i>
10	FORMATION PAR ELECTROSPINNING DE FIBRES COMPOSITES LNP/HA-PVA-HPβCD ET SUIVI DU RELARGAGE DES LNP.....	209
10.1	<i>Préparation des membranes composites</i>	<i>209</i>
10.2	<i>Détermination de la perte en fluorescence après l'electrospinning et après le recuit</i>	<i>209</i>
10.3	<i>Suivi du relargage des LNP FRET dans le PBS</i>	<i>210</i>
10.4	<i>Suivi du relargage dans la Hyal</i>	<i>210</i>
	RÉFÉRENCES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1 MATERIAUX

Les trois principaux composants utilisés pour la formation de nanofibres par électrospinning, la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD, 97 %, degré de substitution compris entre 2 et 6), l'alcool polyvinylique (PVA, Mowiol 18-88, $M_w = 130\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 86,7-88,7 mol % hydrolysé) et l'acide hyaluronique (HA, $M_w = 50\,000\text{--}80\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, grade cosmétique) ont été respectivement obtenus chez Acros organics, Sigma Aldrich et Contipro. Les agents réticulant N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC, purum $\geq 98\%$) et N-Hydroxysuccinimide (NHS, $\geq 98\%$), ont quant à eux été commandés chez Sigma Aldrich pour le premier et Alfa Aesar pour le second.

Le (S)-naproxène (NAP, $\geq 99\%$), utilisé comme molécule modèle pour la complexation avec la HP β CD, a été obtenu chez Bertin pharma.

Toutes les solutions électrospinnées ont été préparées à partir d'eau Milli-Q (18,2 M Ω .cm) purifiée par le système d'eau ultra pure Millipore Milli-Q. Le tampon phosphate salin (PBS) de pH 7,4 utilisé lors des essais de relargage, a été préparé à partir d'une solution commerciale concentrée 10 fois de Sigma-Aldrich (100 mM de phosphate et 1,54 M de chlorure de sodium).

Pour les analyses de RMN du proton, les composés ont été solubilisés dans de l'eau deutérée (D_2O) obtenu chez Sigma-Aldrich.

Pour l'étude de cytotoxicité, les cellules utilisées sont des fibroblastes NIH-3T3 fournies par ATCC. Elles ont été cultivées dans un milieu minimum essentiel de Eagle (DMEM) complété de sérum de veau foetal (SVF) et de Pénicilline-Streptomycine (PS) tous trois obtenus chez Invitrogen et l'activité des cellules a été mesurée à l'aide du réactif WST-1 (Roche). La hyaluronidase (Hyal) utilisée pour l'étude de la biodégradabilité des membranes est de type I, sous forme de poudre lyophilisée, avec 400/1000 U. mg^{-1} et provient de Sigma-Aldrich.

La synthèse des nanoparticules lipidiques (LNP) a été réalisée à partir d'une phase aqueuse composée d'un surfactant PEGylés (Myrjs40TM, CRODA) et de glycérol (Sigma-Aldrich) et d'une phase lipidique qui comprend de la cire (Suppocire[®] NB, Gattefossé), de l'huile de soja (CRODA), de Lipoid-s75 (Lipoid GmbH) et deux fluorophores lipophiles le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate) et le DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine perchlorate) distribués par Invitrogen.

Tous ces produits et leurs caractéristiques sont récapitulés en Tableau 5-1.

Tableau 5-1 : Récapitulatif des matériaux utilisés

Produits	Abréviations	Caractéristiques	Fournisseur
Acide hyaluronique	HA	Mw = 50 000-80 000 g.mol ⁻¹ , grade cosmétique	Contipro
Alcool polyvinylique	PVA	Mw = 130 000 g.mol ⁻¹ , 86,7-88,7 mol % hydrolysé	Sigma Aldrich
Cire	---	---	Gattefossé
1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate	Dil	---	Invitrogen
1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate	DiD	---	Invitrogen
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride	EDC	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Eau Milli-Q	---	18,2 MΩ.cm	Millipore
Fibroblaste NIH-3T3	---	---	ATCC
Glycérol	---	---	Sigma-Aldrich
Huile de soja	---	---	CRODA
Hyaluronidase	Hyal	Type I, 400/1000 U.mg ⁻¹	Sigma-Aldrich
2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrine	HPβCD	97 %, degré de substitution compris entre 2 et 6	Acros organics
N-Hydroxysuccinimide	NHS	≥ 98 %	Alfa Aesar
Lipoid-s75	---	---	Lipoid GmbH
Milieu minimum essentiel de Eagle	DMEM	---	Invitrogen
(S)-Naproxène	NAP	≥ 99 %	Bertin pharma
Oxyde de deutérium	D ₂ O	---	Sigma-Aldrich
Pénicilline-Streptomycine	PS	---	Invitrogen
Sérum de veau foetal	SVF	---	Invitrogen
Surfactant PEGylés	Myrjs40 TM	---	CRODA
Tampon phosphate salin	PBS	pH 7,4	Sigma-Aldrich
WST-1	---	---	Roche

2 ANALYSES

2.1 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

La structure et la taille des fibres ont été imagées par MEB à l'aide de microscopes Tescan Vega 3 ou Hitachi S-5500. Pour le premier, toutes les images ont été obtenues à 5 kV avec un détecteur d'électron secondaire (SE). Pour le second, les images ont été réalisées à 1 kV, avec un détecteur SE.

Avant d'imager les fibres, celles-ci ont été métallisées par dépôt d'or (100 s à 20 mA) avec un métalliseur Quorum Technologies Q150RS ou Edwards S150B. Le logiciel Image J a été utilisé pour déterminer le diamètre des fibres (logiciel disponible au téléchargement sur <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), consulté le 11/02/2019). Pour cela, 100 mesures réparties sur 4 images au minimum ont été réalisées par échantillon et le diamètre moyen ainsi que l'écart type ont été calculés à partir de ces valeurs.

2.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ENVIRONNEMENTAL (MEBE)

Des images des fibres ont été réalisées par MEBE Quanta FEG 250 pour des humidités relatives variant de 20 à 90 % à une température fixe de 3 °C. Suivant les conditions, les images ont été obtenues à 5 ou 10 kV.

2.3 SCANNER EN FLUORESCENCE

Afin de mesurer la fluorescence du DiI, du DiD et l'émission due au FRET, un scanner en fluorescence Tescan LS Reload a été utilisé. Tout d'abord, les fibres ont été déposées sur des lames de verre (Gold Seal, Thermo Scientific) 75x25 mm et 1 mm d'épaisseur.

Les scans ont été réalisés avec une résolution de 4 μm , un gain de 110 et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées ont été résumées dans le tableau suivant :

Tableau 5-2: Longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées pour le scanner en fluorescence

	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
Dil	532 nm	575 nm
DiD	633 nm	692 nm
FRET	532 nm	692 nm

Le traitement des images obtenues a été réalisé avec le logiciel GenePix Pro.

2.4 MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

La fluorescence FRET des fibres composites HA-PVA-HP β CD + LNP a été imagée par microscopie en fluorescence grâce au microscope Sarfus Zeiss et à l'aide d'un lot de filtres n°45 de Zeiss : excitation 560/40 nm, séparateur de faisceau 585 nm, émission 630/75 nm.

Parallèlement, des images en lumière blanche ont été réalisées à l'aide du même microscope.

2.5 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (IR)

Des spectres IR ont été réalisés en utilisant un spectromètre à transformée de Fourier (FTIR) Thermo Nicolet 380 FT-IR équipé d'un module de réflectance totale atténuée (ATR) avec une résolution de 4 cm⁻¹, pour une gamme comprise entre 4000-400 cm⁻¹ et 32 scans.

2.6 ANALYSES THERMOGRAVIMETRIQUE (ATG)

Les ATG ont été effectuées sous air en imposant une rampe de température de 20 °C.min⁻¹ de 30 à 700 °C à l'aide de l'équipement d'analyse thermique TA Instrument Q5000.

2.7 TENSION DE SURFACE

Les mesures de la tension de surface ont été réalisées par la méthode de la goutte pendante sur un tensiomètre Tracker, Teclis Scientific, équipé d'une seringue en verre de 500 μ L (SGE Analytical Science) et d'une aiguille 18 G. Au moins 10 mesures ont été effectuées par solution pour obtenir une valeur de tension de surface.

2.8 CONDUCTIVITE

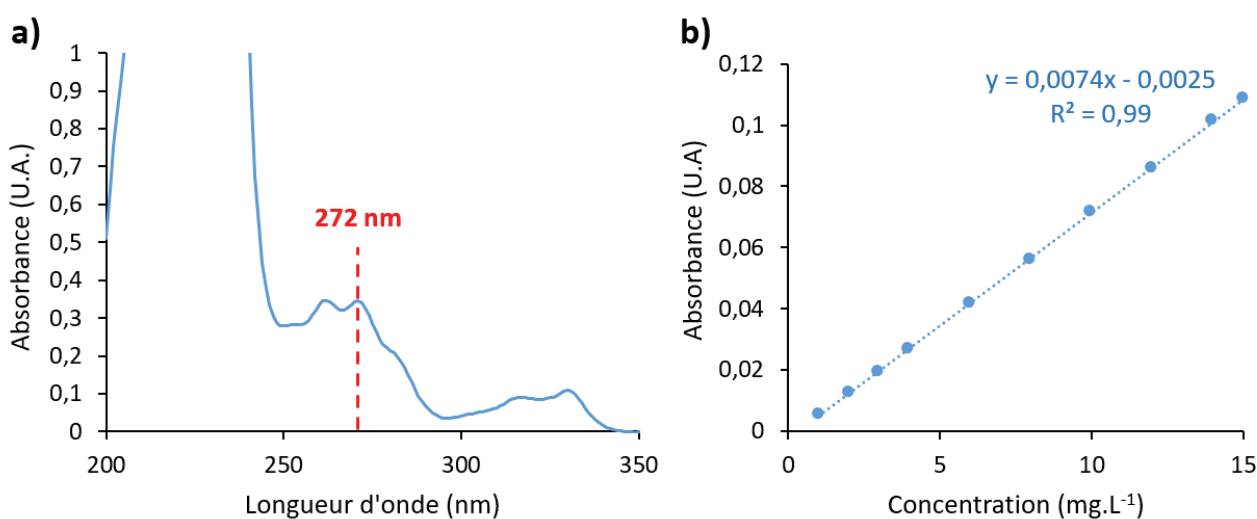
La conductivité des solutions a été mesurée en triplica à température ambiante (21 ± 3 °C) à l'aide d'un conductimètre Mettler Toledo Seven Multi équipé d'une cellule conductimétrique 710 InLab (Mettler Toledo).

2.9 DIFFUSION DE LA LUMIERE (DLS)

La taille et la polydispersité (PDI) des LNP ont été mesurées par la technique de diffusion de la lumière (DLS) par le Zeta Sizer Nano ZS de Malvern Instrument à 25 °C dans des cuvettes jetables Kartell.

2.10 SPECTROPHOTOMETRIE UV-VIS

Les mesures d'absorption des solutions ont été réalisées avec un spectrophotomètre UV-Vis Varian Cary 300 sur des échantillons de 1 mL de solution dans des cuves quartz. La référence utilisée est une cuve identique contenant le même solvant. La quantification du naproxène (NAP) a été effectuée à la longueur d'onde $\lambda = 272$ nm qui correspond à un des maxima d'absorption de la molécule (voir spectre en Figure 5-1a), après réalisation d'une courbe d'étalonnage de 10 solutions étalons (Figure 5-1b).



2.11 FLUORIMETRIE

L'émission des LNP en solution a été étudiée à l'aide du spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B. Les spectres d'émission ont été mesurés entre 400 et 800 nm avec une vitesse de 500 nm.min⁻¹ et des fentes d'excitation et d'émission réglées à 10 nm. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées sont les mêmes que celles du scanner en fluorescence.

2.12 RHEOLOGIE

L'étude rhéologique a été effectuée sur un rhéomètre Anton Paar MCR 502 ou sur un rhéomètre Malvern Kinexus pro + équipés de systèmes cône-plan de diamètre 50 mm et d'angle 1° pour le premier et de diamètre 40 mm et d'angle 4° pour le second.

Les mesures de viscosité des solutions électrospinnées ont été réalisées à une température constante de 25 °C et pour des taux de cisaillement compris entre 1 et 100 s⁻¹ (20 points par décade).

Le suivi de la réaction de réticulation des solutions HA-PVA-HPβCD + EDC-NHS a été effectué en mode oscillatoire en mesurant l'augmentation de la viscosité au cours du temps. Un premier balayage en déformation de 0,1 à 50 % a été réalisé pour des fréquences angulaires de 1 ou 10 rad.s⁻¹ afin de s'assurer de la réponse linéaire du fluide dans les conditions de mesures choisies. La déformation et la fréquence angulaire ont ainsi été respectivement fixées à 10 % et 10 rad.s⁻¹ et la viscosité de la solution a été mesurée 30 min après l'ajout de l'EDC et du NHS pendant une durée de 4 h.

Afin de mesurer la concentration d'enchevêtrement de nos mélanges, 19 solutions de HA-PVA-HPβCD de concentrations totales en solides variant entre 0,18 et 29,3 % w/w_{H2O} mais de ratio massique fixe de 6-6-10 ont été préparées. Leur viscosité a été mesurée à 25 °C entre 1 et 100 s⁻¹ et la viscosité spécifique (η_{sp}) de chaque mélange a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

Avec η la viscosité de la solution et η_0 la viscosité de l'eau à 25 °C soit 0,89 mPa.s.

Les viscosités spécifiques obtenues ont ensuite été tracées en fonction de la concentration totale en solide.

2.13 RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Des spectres RMN du proton ont été exécutés à l'aide d'un spectromètre Avance III HD 400 MHz. Tous les solides étudiés ont été solubilisés à température ambiante pendant 3 h minimum dans du D₂O, à des concentrations de 10 mg.mL⁻¹. Les spectres ont été réalisés à une température de 298 K et à partir de 64 scans.

2.14 CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) a été utilisée pour déterminer avec précision la masse molaire en poids (Mw) de l'acide hyaluronique (HA). Elle a été réalisée à l'aide d'un instrument de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) Shimadzu équipé d'une colonne d'exclusion TOSOH TSK gel SuperMultipore avec une colonne de garde du même matériau et une boucle d'échantillonnage de 100 μL. Les pics d'élution ont été mesurés avec un détecteur d'absorbance UV-VIS, ainsi qu'un détecteur multi angulaire à diffusion de la lumière Wyatt Dawn Helios (MALS) associé au réfractomètre différentiel Wyatt Optilab rEX (dRI). Le tampon d'élution utilisé pour la HPLC est composé de 0,1 mol.L⁻¹ NaNO₃ + 0,01 mol.L⁻¹ PB (tampon sulfate sans sel) à pH 7. Le débit a été fixé à 0,6 ml.min⁻¹ et toutes les mesures ont été réalisées à température ambiante (21 °C). Avant la mesure, l'échantillon a été solubilisé dans le tampon d'élution à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ puis dilué 10

fois. Trois injections répétées ont été effectuées à la concentration finale de 1 mg.mL^{-1} . Le dn/dc utilisé pour calculer le poids moléculaire a été mesuré en mode batch (injection des liquides directement dans le détecteur) à l'aide du logiciel Astra 6.1, en réalisant une courbe d'étalonnage comprenant 5 concentrations comprises entre 0,1 et 1 mg.mL^{-1} . Trois réplicas ont été effectués, permettant d'obtenir la valeur dn/dc de $0,1426 \text{ mL.g}^{-1}$. Les valeurs de masse molaire en poids (M_w) et la dispersité ont été calculées en utilisant le logiciel Astra 6.1.

2.15 SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF

La distribution en masse de la HP β CD a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) en mode positif assisté par un réflectron à l'aide d'un spectromètre de masse Microflex (Brucker). 1 mg de HP β CD a été solubilisé dans 0,5 mL d'eau Milli-Q. Une solution de matrice a été préparée en solubilisant 5 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans 0,5 mL d'un mélange eau:acétonitrile de ratio volumique 1:1. 1 μL de la solution de matrice et 1 μL de la solution de HP β CD ont ensuite été déposés sur une cible en acier inoxydable MALDI et le tout a été laissé à température ambiante ($21 \text{ }^\circ\text{C}$) jusqu'à évaporation complète des solvants. L'ionisation du solide a ensuite été réalisée par un laser N_2 de 337 nm et les composés formés ont été accélérés par une tension de 20 kV. Les valeurs de masse calculées ont été obtenues avec le logiciel FlexAnalysis.

2.16 ESSAIS DE TRACTION

Des essais de traction ont été réalisés à l'aide d'un rhéomètre TA Instruments Discovery DHR 3 équipé de géométries de traction linéaires dédiées à la caractérisation des films. Des échantillons rectangulaires de 5 mm de largeur, de 22 mm de longueur et de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur environ ont été découpés dans de grands échantillons et ont été fixés dans les mors (voir illustration en Figure 5-2).

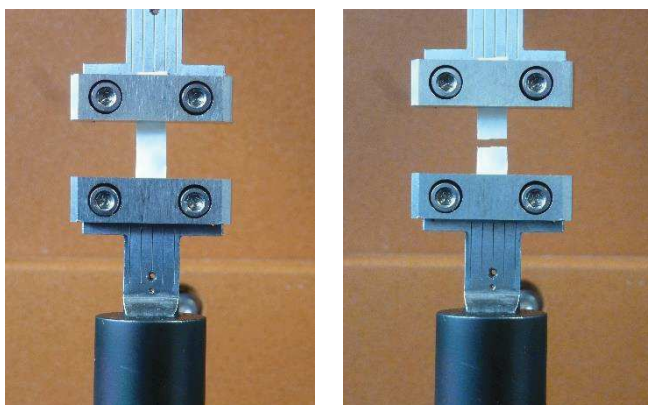


Figure 5-2 : Images d'un échantillon de membrane lors d'un essai de traction avant (à gauche) et après rupture (à droite)

L'épaisseur de chaque échantillon a été mesurée par observation au MEB de chaque section transversale. La longueur initiale de l'échantillon entre les mors a été fixée à 10 mm, la vitesse de traction a été fixée à $50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, à une température de $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Afin de caractériser les membranes à l'état humide, les échantillons ont été d'abord fixés dans les pinces à l'état sec, puis hydratés par de l'eau distillée avant le début de l'essai de traction.

3 CARACTERISATION DES COMPOSANTS

Dans un premier temps, avant tout travail de mise en forme des fibres, nous avons choisi de caractériser avec précision les différents produits utilisés. Les propriétés du PVA (masse molaire et degré d'hydrolyse) étant déjà communiquées par le fournisseur, il a été choisi de se focaliser sur l'HA et la HP β CD.

3.1 L'ACIDE HYALURONIQUE

Comme expliqué précédemment dans le chapitre 1 (paragraphe 2.2), les propriétés de l'acide hyaluronique (HA) sont fortement dépendantes de sa masse molaire. Pour déterminer cette dernière avec précision, l'HA utilisé pour la mise en forme des membranes par electrospinning a été analysé par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Cette technologie permet de séparer les macromolécules en fonction de leur taille en solution et de déterminer une courbe de distribution des masses molaires et évaluer les masses molaires moyennes. La courbe de distribution des masses molaires de l'HA est présentée en Figure 5-3.

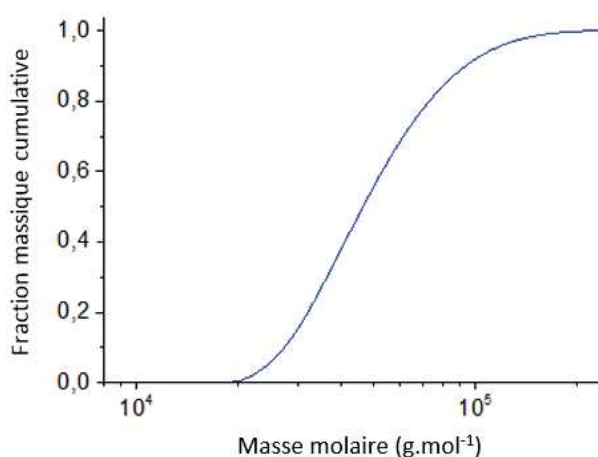


Figure 5-3 : Courbe de distribution des masses molaires (en masse) de l'HA

La masse molaire moyenne en masse du biopolymère varie entre 20 000 et 200 000 g.mol⁻¹, avec une masse molaire moyenne mesurée à 57 000 g.mol⁻¹ et une dispersité de 1,26. De par sa longueur de

chaîne, cet HA présente des propriétés anti-inflammatoires, est inhibiteur de l'angiogenèse et immunosuppresseur ^{167,343}.

3.2 L'HYDROXYPROPYL-B-CYCLODEXTRINE

3.2.1 Calcul du degré de substitution moyen de la HPβCD par RMN du proton

La HPβCD est obtenue à partir de la βCD par substitution de certains groupements hydroxyle par des groupements hydroxypropyl, majoritairement localisés sur les atomes d'oxygène portés par les carbones C2 de chaque unité de glucose (voir Figure 5-4).

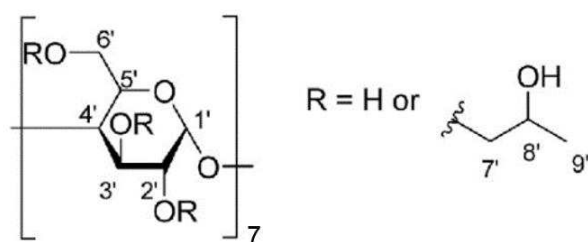


Figure 5-4 : Structure chimique de la HPβCD ³⁴⁴

Afin de déterminer avec précision le degré de substitution (DS) de la HPβCD, la pharmacopée européenne conseille l'utilisation de la spectroscopie RMN du proton. Le spectre obtenu pour le lot de HPβCD utilisé pour mettre en forme les membranes HA-PVA-HPβCD est visible en Figure 5-5.

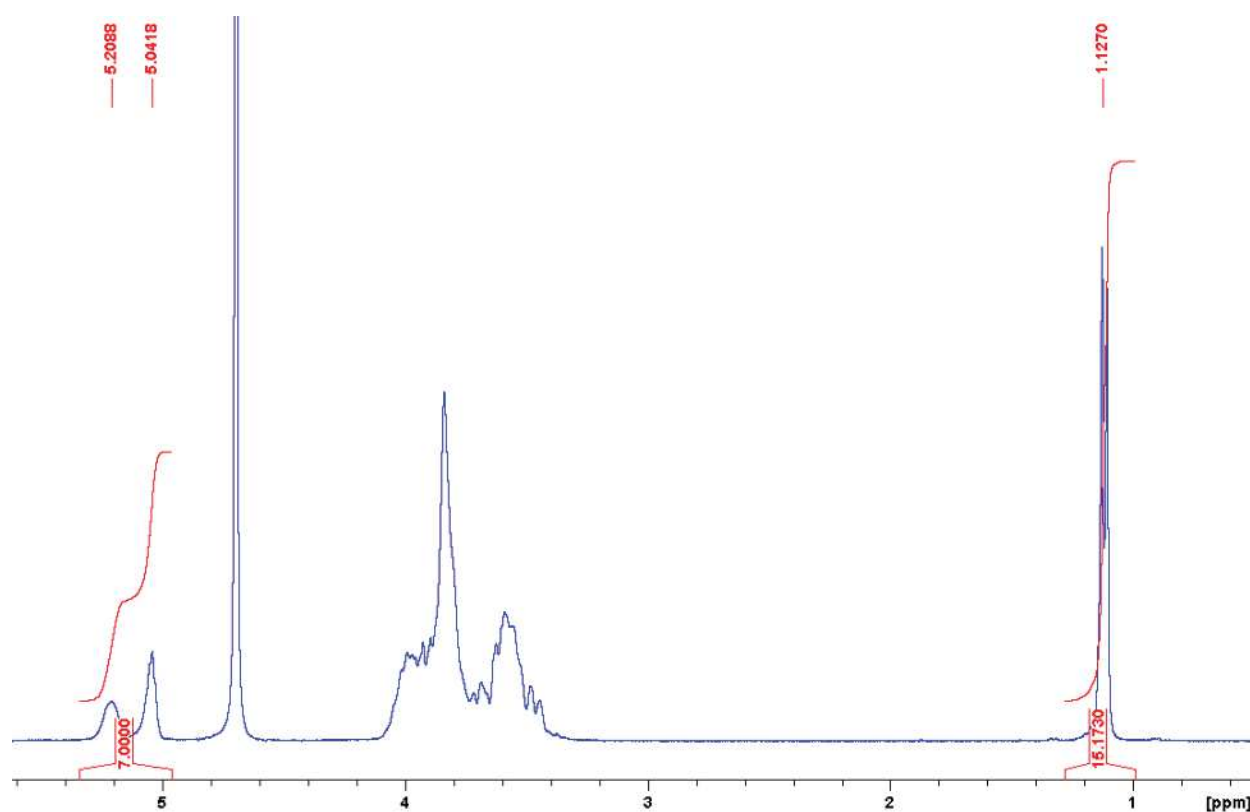


Figure 5-5 : Spectre de ¹H-RMN de la HPβCD

Le spectre ¹H-RMN de la HPβCD présente des signaux correspondant aux groupements méthyles (à 1,1 ppm) et aux 7 protons anomériques par molécule (portés par le carbone C1 des motifs de répétition, visibles entre 5,0 et 5,2 ppm) bien distincts de ceux des autres protons. Il est donc possible de calculer le DS moyen à partir du ratio entre le signal des groupes méthyles présents sur les groupements hydroxypropyles divisé par 3 (car ils présentent 3 protons) et les signaux des H anomériques divisés par 7.

$$DS = \frac{15,173/3}{7,000/7} = 5,1$$

Il y a donc en moyenne 5,1 substituants par molécule de HPβCD, ce qui est en accord avec la valeur annoncé par le fournisseur qui promet un degré de substitution compris entre 2 et 6.

3.2.2 Spectrométrie de masse

La ^1H -RMN de la HP β CD a permis de mesurer le DS moyen du composé, mais afin de déterminer la distribution en masse de la HP β CD, une méthode complémentaire, la spectrométrie de masse a été utilisée. Cette technique physique d'analyse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse molaire. Le spectre de masse de la HP β CD est présenté en Figure 5-6.

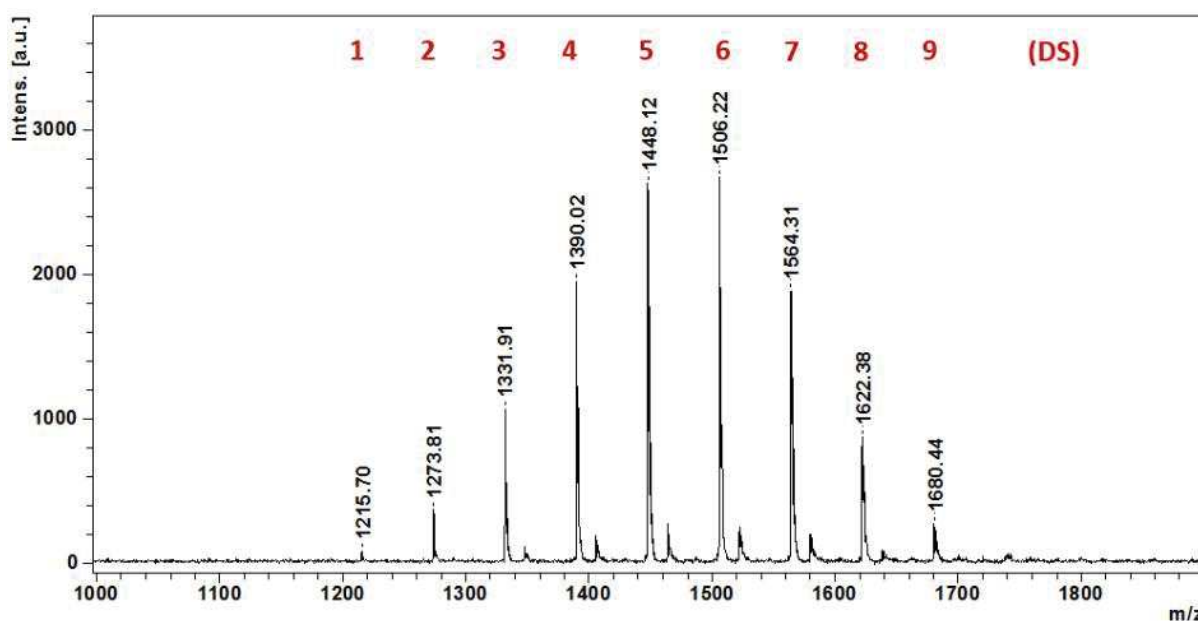


Figure 5-6 : Spectre de masse de la HP β CD obtenu par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le premier pic à $m/z = 1215,70$ correspond à une molécule de HP β CD substituée une fois (DS = 1), combinée à un atome de Na^+ :

$$\text{Masse de la HP}\beta\text{CD (DS = 1)} + \text{Masse du Na}^+ = 1193 + 23 = 1215$$

Le pic $m/z = 1680,44$ correspond, quant à lui, à une molécule de HP β CD substituée neuf fois, toujours combinée à un atome de Na^+ . La HP β CD de DS moyen évalué à 5,1 présente donc une substitution très polydispersée, puisque, dans un même lot, coexistent des molécules substituées 1 à 9 fois. Des pics moins intenses correspondant aux molécules de HP β CD combinées à un ion K^+ sont aussi visibles sur le spectre.

4 FORMATION DES MEMBRANES NANOFIBREUSES HA-PVA-HPβCD

4.1 PREPARATION DES SOLUTIONS

Dans un premier temps, une solution de 10 wt % de PVA est préparée en solubilisant le PVA dans de l'eau à 90 °C, sous chauffage à reflux, pendant 3 h, puis la solution est ensuite laissée refroidir à température ambiante (21 ± 3 °C).

Le HA et la HPβCD, tous deux en poudre, et le PVA déjà solubilisé, sont placés dans un flacon en verre puis de l'eau est ensuite ajoutée de façon à obtenir les concentrations voulues. Le tout est laissé sous agitation magnétique, à température ambiante, pendant 8 h minimum pour s'assurer que la solution obtenue soit bien homogène. Les concentrations de HA et de PVA ont été fixées à 6 % w/w_{H₂O} chacune et la concentration de HPβCD a variée de 0 à 40 % w/w_{H₂O} pour l'étude de l'influence de ce composé sur l'électrospinning, puis a été fixées à 10 % w/w_{H₂O} pour la suite des travaux (mélange 6-6-10).

Si l'on veut obtenir une membrane réticulée, de l'EDC et du NHS sont ajoutés à cette solution et le tout est mélangé 15 min par agitation magnétique puis laissé au repos 15 min afin de permettre l'élimination des bulles qui ont pu se former. Dans un premier temps, les concentrations des deux composés ont été optimisées entre 0 et 3 % w/w_{H₂O} pour l'EDC et 0 et 1 % w/w_{H₂O} pour le NHS puis elles ont été fixées à 2 % w/w_{H₂O} et 1 % w/w_{H₂O}, respectivement, pour la suite des travaux.

4.2 LA FORMATION DES MEMBRANES PAR ELECTROSPINNING

Toutes les expérimentations d'électrospinning sont réalisées dans des enceintes fermées avec une humidité relative (HR) contrôlée par l'injection d'air sec et à température ambiante de 21 ± 3 °C. L'influence de l'HR régulée dans l'ensemble de l'enceinte et en sortie d'aiguille sur la formation des nanofibres a été étudiée. Pour réaliser l'injection d'air avec température et HR contrôlées en sortie d'aiguille, un émetteur spécial est utilisé, son schéma est présenté en Figure 5-7.

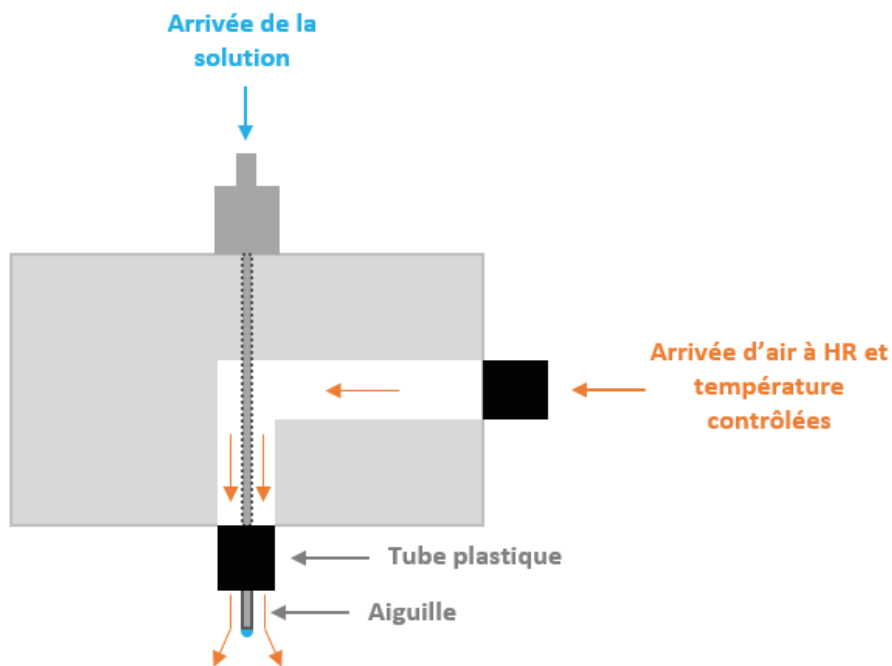


Figure 5-7 : Schéma de l'aiguille avec arrivée d'air à HR et température contrôlées

Celui-ci permet d'injecter de l'air, parallèlement au jet de la solution, avec un débit de $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ et à des HR variables. Dans ce cas, l'air de la cabine n'est pas régulé, l'HR et la température de l'air dans l'enceinte correspondent à celles de la pièce, soit 28 % d'HR et $21 \text{ }^\circ\text{C}$.

L'étude de l'influence de la température est effectuée en régulant l'atmosphère de l'ensemble de la cabine d'électrospinning. L'HR dépendant de la température, une même HR à des températures différentes ne reflétera pas la même quantité de molécules d'eau au sein de l'atmosphère de la cabine. Il a donc été choisi de se placer à température de rosée (Dew point, T_d) constante. La température de rosée est la température à partir de laquelle la vapeur d'eau contenue dans l'air commence à se condenser quand l'atmosphère se refroidit et pour une même teneur en eau de l'air, la température de rosée est fixe et ne dépend pas de la température de l'air. Pour cette étude on se place à $T_d = 1,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (qui correspond à une HR = 30 % et une température de $20 \text{ }^\circ\text{C}$) et seule la température de la cabine va varier entre 20 et $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pour la suite des travaux, il a ensuite été choisi de réguler l'humidité dans l'ensemble de l'enceinte d'électrospinning à $30 \pm 5 \%$ et de réaliser l'électrospinning à température ambiante ($21 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$)

Deux montages d'électrospinning différents sont utilisés pour réaliser les membranes nanofibreuses.

Un premier montage horizontal (Figure 5-8) est composé d'un pousse seringue (Fisherbrand KSD100) sur lequel repose une seringue de 5 mL contenant la solution à electrospinner, d'une aiguille 18 G (diamètre externe de 1,27 mm et diamètre interne de 0,84 mm) reliée à la seringue par une tubulure silicone et connectée à une alimentation haute tension (Spellman SL50P10, 50 kV, 0,2 mA) et d'un collecteur métallique plan relié à la terre.

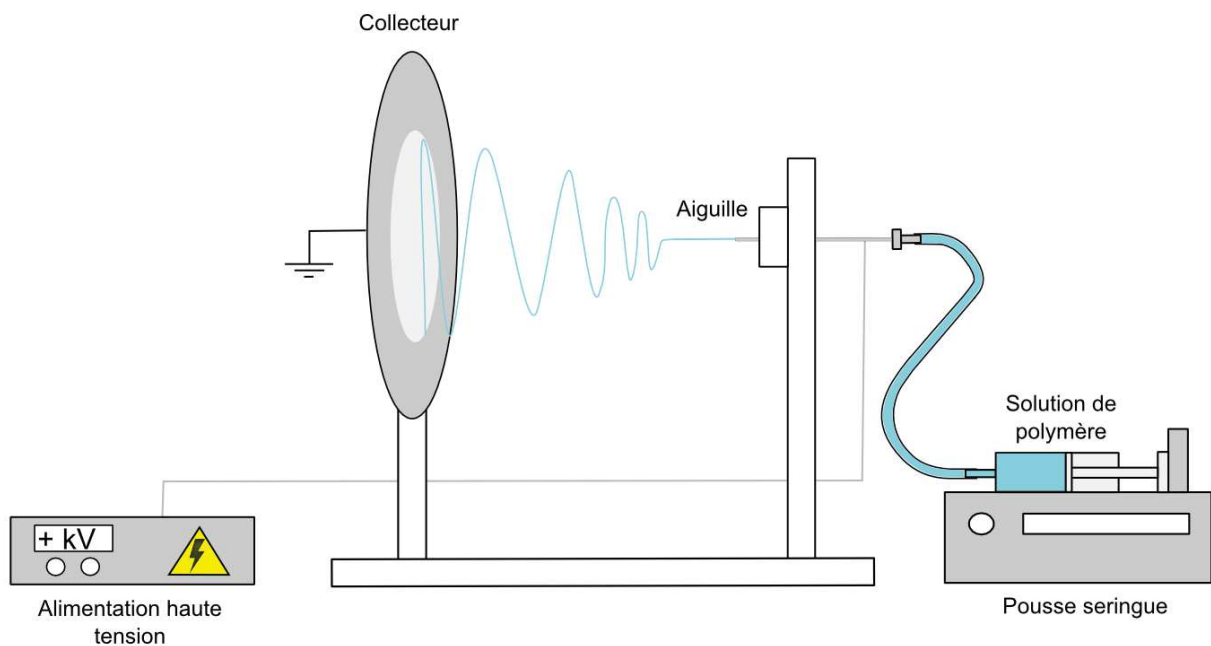


Figure 5-8 : Montage d'electrospinning horizontal à une aiguille

Pour la formation de membranes par electrospinning à partir des solutions composées de 6 % w/w_{H₂O} de HA, 6 % w/w_{H₂O} de PVA et de 10 % w/w_{H₂O} de HPβCD (solution 6-6-10), la tension appliquée à l'aiguille est de 30 kV, le débit est de 0,4 mL.h⁻¹ et la distance aiguille/collecteur est fixée à 12 cm. Pour les solutions de compositions différentes ces paramètres ont pu être adaptés.

Un second montage vertical multi aiguilles (Figure 5-9) est utilisé afin d'augmenter le rendement de production des fibres.

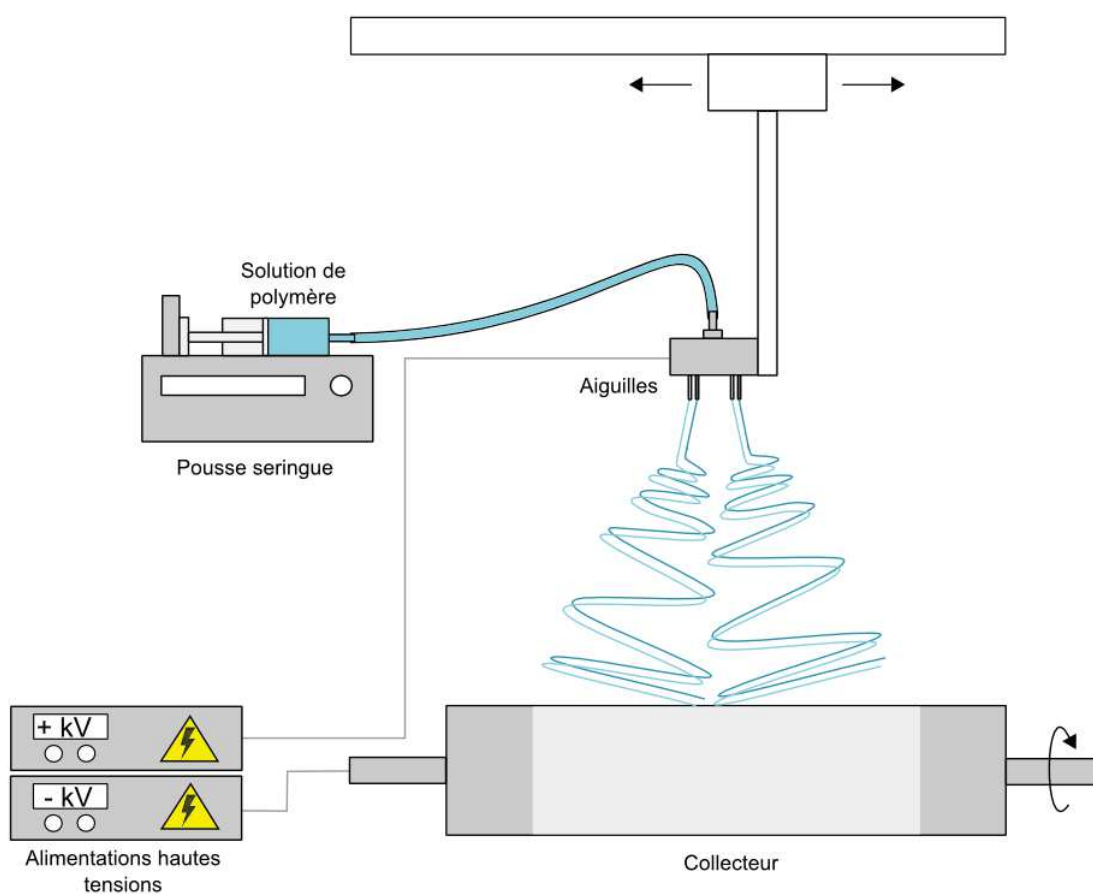


Figure 5-9 : Montage d'électrospinning vertical à quatre aiguilles

Il est composé d'un pousse seringue (Harvard Apparatus, PHD 2000) équipé d'une seringue de 5 mL contenant la solution à electrospinner, reliée à un émetteur composé de quatre aiguilles. Il est soutenu par une plateforme mobile qui permet son déplacement horizontal et, ainsi, permet d'obtenir des membranes d'épaisseur uniforme. L'émetteur est connecté à une alimentation haute tension (Spellman SL60P10, 60 kV) et en dessous de lui se trouve un collecteur cylindrique rotatif dont la vitesse de rotation a été fixée à 45 RPM et qui est relié à une alimentation haute tension de polarité opposé à celle utilisée pour l'émetteur (Spellman SL30N10, -30 kV).

Les conditions d'électrospinning de ce montage pour les solutions 6-6-10 sont les suivantes : la tension appliquée est de 45 kV à l'émetteur multi aiguilles et de -2 kV au collecteur, le débit est de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ et la distance entre l'aiguille et le collecteur est fixée à 12 cm. Comme précédemment, pour les solutions de compositions différentes ces paramètres ont pu être adaptés.

4.3 LA RETICULATION

Pour les fibres auxquelles est ajoutées l'EDC et le NHS, une étape de recuit est nécessaire pour l'activation de la réaction de réticulation. Afin d'étudier les conditions de réticulation, les membranes sont placées en étuve à des températures comprises entre 40 °C et 100 °C pour des durées comprises entre 4 h et 24 h. Après optimisation de la réticulation, le recuit est fixé à 60 °C pendant 24 h pour la suite des travaux. Avant toute autre manipulation, les membranes sont laissées à température ambiante (21 ± 3 °C) pendant 1 h pour refroidir.

4.4 LE LAVAGE ET LE SECHAGE DES FIBRES

Afin d'éliminer l'EDC et le NHS en excès, ainsi que les sous-produits de la réaction de réticulation, les membranes sont placées à l'intérieur de cages métalliques de 6 cm de diamètre et immergées dans de l'eau, changées régulièrement, à température ambiante (21 ± 3 °C) et sous agitation orbital à 25 RPM (Stuart Scientific S05). Dans un premier temps, afin de s'assurer que tout l'EDC et le NHS ont été éliminés, les membranes sont immergées dans 30 mL de PBS pendant 24 h et les spectres d'absorbance UV des solutions sont réalisés entre 200 et 400 nm afin de s'assurer de l'absence des deux composés (absorbance du NHS à 260 nm et de l'EDC à 215 nm). Il a ainsi été déterminé qu'il fallait au minimum un temps d'immersion de 48 h pour ne plus avoir de relargage d'agents réticulants résiduels. Par la suite, il a donc été choisi de réaliser cette étape de lavage pendant 48 h.

Afin d'éliminer l'eau absorbée par les membranes lors de l'étape de lavage, deux méthodes sont testées :

- Séchage à l'air libre : les membranes sont alors laissées à température ambiante (21 ± 3 °C) sous extraction d'air pendant 48 h.
- Lyophilisation : les membranes sont alors placées dans un congélateur à -20 °C pendant 1 h minimum puis placées dans un lyophilisateur à plateau (Cryotec, pilote de paillasse) au préalable refroidit à -20 °C. Les conditions de lyophilisation des membranes sont illustrées en Figure 5-10. Elle se déroule en trois étapes : une première lyophilisation primaire de 4 h à -20 °C et à 0,1 mBar permet d'éliminer l'eau libre, ensuite une montée en température de -20 à 20 °C est réalisée pendant 6 h (soit une rampe de $0,11$ °C.min⁻¹) et suivi d'une lyophilisation

secondaire de 1 h à 20 °C, à 0,05 mbar afin d'éliminer les dernières traces d'eau retenues par adsorption.

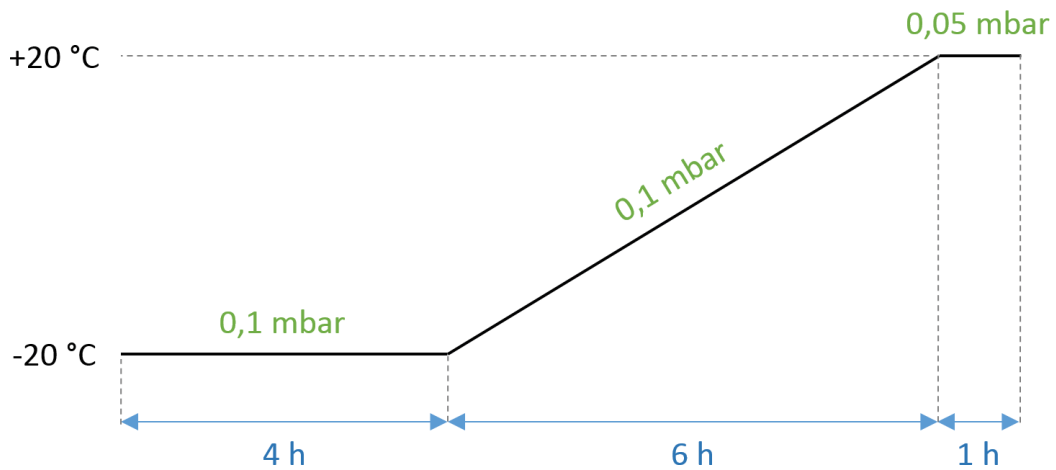


Figure 5-10 : Illustration des différentes étapes de lyophilisation des membranes

La perte de masse des membranes après lavage est mesurée en calculant la différence de masse des matériaux (en trois exemplaires) après recuit et après immersion de 48 h dans l'eau, puis congélation et lyophilisation.

5 ETUDE DE LA BIOCOMPATIBILITE

Des fibroblastes NIH-3T3 sont utilisés pour effectuer un test de cytotoxicité à partir de WST-1, basé sur la mesure de l'activité métabolique des mitochondries cellulaires. Les cellules NIH-3T3 sont cultivées dans du DMEM avec 10 vol. % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 vol. % de pénicilline-streptomycine (PS). Pour réaliser ces essais, des membranes HA-PVA-HP β CD (6-6-10) de 1 cm de diamètre sont placées sur des inserts pour plaque à puits (CellCrown™, Sigma-Aldrich, insert pour plaque 24 puits, voir Figure 5-11) et stérilisées sous UV pendant une nuit entière (soit 14 h minimum).



Figure 5-11 : Photo de membranes HA-PVA-HP β CD montées sur des CellCrown

Deux tests sont effectués : la cytotoxicité directe des matériaux est évaluée, ainsi que la cytotoxicité du milieu après contact avec les membranes. $5 \cdot 10^4$ cellules/puits sont incubées pendant 24 h à 37 °C formant le milieu de culture de départ. En parallèle, des membranes sont placées dans 1 mL de milieu DMEM, 10 vol. % SVF, 1 vol. % PS pendant 24 h à 37 °C. Les milieux dans lesquels ont été immergés les membranes sont prélevés après 24 h et mis en contact avec les cellules et le tout est incubé à 37 °C pendant 24 h (test indirect par relargage). Les membranes sont aussiensemencées directement par le milieu de culture à 37 °C pendant 24 h (test de contact direct). Les deux tests sont illustrés en Figure 5-12.

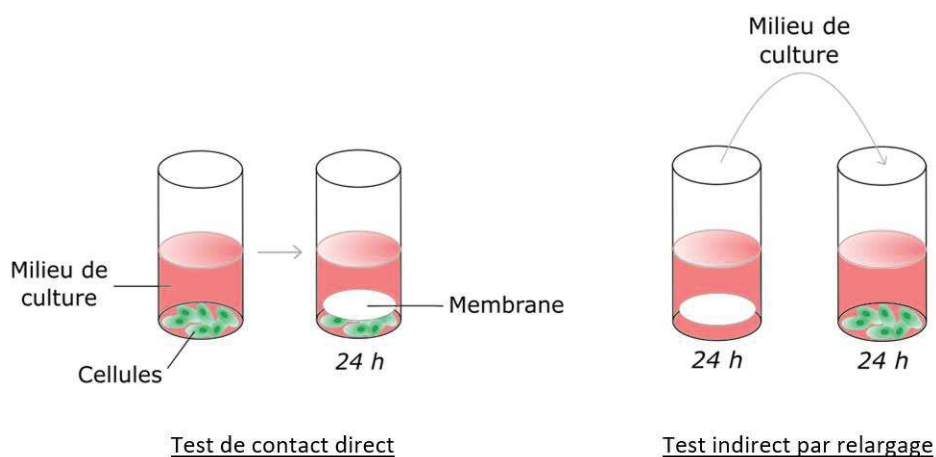


Figure 5-12 : Illustration des différents tests de cytotoxicité réalisés sur les membranes

Des cellules incubées dans du milieu et avec une solution de H_2O_2 à $10 \cdot 10^{-3}$ M sont respectivement utilisés comme contrôle positif et négatif. Des cellules en présence de CellCrown™ vides sont aussi utilisées comme contrôle. L'activité métabolique des mitochondries cellulaires est évaluée 24 h après le début de l'incubation en utilisant le test WST-1. Le réactif WST-1 est ajouté (10 vol. %) aux milieux de culture et le tout est conservé en incubateur pendant 2 h à 37 °C. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm (titrage du formazan soluble) et à 690 nm (soustraction du fond) en utilisant un lecteur de microplaques (Infinite M1000, Tecan). La différence d'absorbance (450 – 690 nm) est directement proportionnelle à l'activité métabolique des mitochondries cellulaires, reflétant la densité des cellules vivantes. Le pourcentage de cellules vivantes est déterminé suivant l'équation :

$$\text{Densité de cellules vivantes (\%)} = \frac{AE - ACP}{ACN - ACP} \times 100$$

Avec AE : absorbance de l'échantillon, ACP : absorbance du contrôle positif (cellules seules), ACN : absorbance du contrôle négatif (cellules avec H_2O_2 $10 \cdot 10^{-3}$ M).

6 ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES MEMBRANES EN PRESENCE DE HYALURONIDASE

6.1 SUIVI DE LA BIODEGRADATION - IMAGERIE DES MEMBRANES AU COURS DU TEMPS

Une solution de hyaluronidase (Hyal) de 50/125 U.mL⁻¹ est préparée en solubilisant la Hyal sous forme de poudre lyophilisée dans du PBS.

Trois membranes de HA-PVA-HP β CD réticulées par EDC-NHS de 15 \pm 0,1 mg sont chacune plongées dans 10 mL de cette solution de Hyal et, en parallèle, trois autres membranes identiques sont immergées dans 10 mL de PBS seul. Le tout est maintenu sous agitation à 33 °C par un Thermomixer C (Eppendorf) équipé d'un support pour tubes de 15 mL. Ces solutions sont renouvelées toutes les 48 h. A intervalles voulus (d'abord tous les jours, puis tous les deux jours et enfin toutes les semaines), des échantillons de membranes d'environ 3x3 mm sont prélevés, rincés à l'eau ultra pure, congelés 1 h, puis lyophilisés suivant les conditions décrites en paragraphe 4.4. Des images de ces échantillons sont ensuite obtenues par MEB.

6.2 SUIVI DE LA BIODEGRADATION - ÉVALUATION DE LA PERTE DE MASSE DES MEMBRANES

Comme décrit au paragraphe précédent, trois membranes de HA-PVA-HP β CD réticulées par EDC-NHS de 30 \pm 0,1 mg sont plongées dans la solution de Hyal et trois autres sont immergées dans du PBS pendant 24 h, sous agitation à 33 °C dans un Thermomixer.

Les membranes sont ensuite extraites des liquides, rincées à l'eau ultra pure, congelées 1 h, puis lyophilisées suivant les conditions décrites en paragraphe 4.4. Puis, elles sont pesées et la perte de masse par rapport à la masse initiale est calculée.

Ces étapes sont ensuite répétées de façon à pouvoir mesurer la perte de masse durant un temps d'immersion total de 28 jours.

7 IMPREGNATION ET RELARGAGE DU NAPROXENE

7.1 FORMATION DE COMPLEXES HPβCD-NAP

Afin d'étudier la formation de complexe entre la HPβCD et le naproxène (NAP), ceux-ci sont formés par évaporation d'une solution aqueuse de NAP et de HPβCD. Pour cela, 230 mg de NAP et 1541 mg de HPβCD (ratio molaire de 1:1) sont placés dans un ballon et 150 mL d'eau est rajoutés. Le tout est agité pendant 48 h, puis placé 1h dans un bain à ultrason et enfin l'eau est évaporée sous pression réduite à 40 °C.

Pour comparaison, un mélange physique de HPβCD et de NAP est aussi réalisé en mélangeant simplement les deux poudres ensemble à l'état solide dans un mortier pendant 1 minute, dans les mêmes proportions.

Le complexe NAP/HPβCD et le mélange physique sont ensuite analysés par spectroscopie IR, ATG et RMN.

7.2 IMPREGNATION

Deux méthodes d'imprégnation des membranes HA-PVA-HPβCD réticulées sont utilisées : par immersion dans une solution aqueuse de naproxène (NAP) et par CO₂ supercritique.

7.2.1 Imprégnation par voie aqueuse

Des membranes nanofibreuses de $30 \pm 0,1$ mg sont placées dans des cages métalliques de 6 cm de diamètre puis plongées dans 500 mL de solution de NAP à 40 mg.L^{-1} à température ambiante (21 °C).

La solubilité dans l'eau du NAP à 25 ° C étant de $15,9 \text{ mg.L}^{-1}$ il a été choisie d'utiliser une solution saturée de NAP afin de garantir que sa concentration reste maximale en solution, même si une partie de celle-ci est absorbée par la membrane.

Le tout est placé 4 h sous agitation orbitale à 25 RPM puis les membranes sont rincées à l'eau ultra pure, congelées pendant 1 h puis lyophilisées suivant les conditions détaillées précédemment.

7.2.2 Imprégnation par CO₂ supercritique

Cette fois, des membranes de $30 \pm 0,1$ mg sont placées dans des supports en téflon et le tout est déposé dans la chambre (0,5 L) du dispositif de dépôt par CO₂ supercritique (SFD-200, 31 Degrees) en présence de 8 mg de NAP par membrane. La chambre a été au préalable chauffée à 50 °C, puis le CO₂ est injecté à l'intérieur avec un débit de $50 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à atteindre 120 bar (environ 5 min). Cette pression est ensuite maintenue pendant 60 min, puis $50 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ de CO₂ sont injectés pendant 5 min afin d'éliminer le NAP en excès et, à la fin du dépôt, la chambre est lentement ventilée jusqu'à revenir à la pression atmosphérique (cela dure en moyenne une dizaine de minutes).

7.3 RELARGAGE

7.3.1 Suivi du relargage dans le PBS

Afin de comparer les propriétés de relargage des membranes nanofibreuses avec un matériau plus dense, des films de même composition que les membranes HA-PVA-HP β CD sont préparés. Le mélange HA, PVA, HP β CD, EDC et NHS est ensuite coulé dans des coupelles en aluminium et le tout est placé en étuve pendant 24 heures à 60 °C. L'imprégnation du NAP dans les films HA-PVA-HP β CD est effectuée de la même manière qu'avec les membranes nanofibreuses.

$30 \pm 0,1$ mg de membrane et $100 \pm 0,1$ mg de film chargés de NAP ainsi que les contrôles (matériaux sans NAP) sont placés dans 10 mL de PBS dans un Thermomixer (40 RPM et 33 °C). A des temps déterminés, 1 ml de la solution surnageante est prélevée, la quantité de NAP est déterminée par spectrophotométrie UV puis le liquide est remplacé dans le milieu initial. Les mesures sont réalisées en triplica.

7.3.2 Suivi du relargage dans la hyaluronidase (Hyal)

Afin de déterminer si la dégradation des membranes par la Hyal influence la cinétique de relargage du NAP, des membranes HA-PVA-HP β CD imprégnées de NAP par voie aqueuse et des membranes contrôles sont cette fois immergées dans 10 mL de solution de 50/125 U.mL⁻¹ de Hyal. Comme pour le suivi du relargage dans le PBS, le tout est placé dans un Thermomixeur et la quantité de NAP est déterminée par spectrophotométrie UV.

8 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES LIPIDIQUE (LNP)

Au cours de cette thèse, deux types de LNP ont été synthétisées, des LNP FRET qui contiennent deux fluorophores, le Dil et le DiD et des LNP Dil qui ne contiennent que du Dil. Les produits utilisés ainsi que les quantités requises pour la réalisation des LNP sont résumés dans le Tableau 5-3 pour les LNP FRET et le Tableau 5-4 pour les LNP Dil.

Tableau 5-3 : Composition de LNP FRET

	Matières premières	Quantité
Phase huileuse	Huile de soja	27,2 mg
	Lipoid-s75	13,3 mg
	Cire	81,5 mg
Fluorophores ajoutés à la phase huileuse	Dil	61,7 µL (10 mM)
	DiD	81,3 µL (10 mM)
Phase aqueuse	Myrjs40™	79 mg
	Eau ultra pure	1800 mg
	Glycérol	1000 mg

Tableau 5-4 : Composition de LNP Dil

	Matières premières	Quantité
Phase huileuse	Huile de soja	102,5 mg
	Lipoid-s75	50 mg
	Cire	307,5 mg
Fluorophore ajouté à la phase huileuse	Dil	80 µL (800 mM)
Phase aqueuse	Myrjs40™	300 mg
	Eau ultra pure	1240 mg

La synthèse des LNP s'est déroulée en plusieurs étapes : une étape d'émulsification et une étape de purification. Dans un premier temps, une phase huileuse est préparée dans laquelle sont incorporés les fluorophores souhaités et les matières lipidiques et, en parallèle, est solubilisé le surfactant composant la phase aqueuse. Les deux phases sont ensuite émulsionnées afin de former les nanoparticules lipidiques et, enfin, les particules obtenues sont purifiées, puis reconcentrées. Ces étapes sont décrites ci-dessous.

La préparation de la phase huileuse : Les trois composés huileux, l'huile de soja, le Lipoid-s75 et la cire sont pesés, puis mélangés à 60 °C de façon à obtenir une solution homogène. Pour faciliter l'homogénéisation du mélange, un solvant tel que l'éthanol ou le dichlorométhane a pu être ajouté puis éliminé par la suite par évaporation sous vide. Le premix huileux est ensuite conservé au congélateur à -20 °C. Le ou les fluorophores, tous deux solubilisés dans l'éthanol, sont rajoutés à ce premix huileux maintenu liquide par un bain à 40°C, puis l'éthanol est évaporé sous flux d'argon.

La préparation de la phase aqueuse : Le Myrjs40TM est solubilisé dans de l'eau ultra pure filtrée par des filtres 0,2 µm (Acrodisc) dans un bain à 70 °C. Le glycérol a pu être ajouté pour augmenter la viscosité du mélange et ainsi éviter toute projection pendant l'étape d'émulsification, il sera ensuite éliminé au cours de la purification par dialyse.

La formation de l'émulsion : La phase aqueuse et la phase huileuse fondue sont mélangées dans un flacon en verre qui est ensuite placé dans un bain à 40 °C. Les particules sont préparées par ultrasonication avec une sonotrode de 3 mm de diamètre (sonicateur AV505, Sonics) dont l'embout est plongé à mi-hauteur du liquide. Une puissance de 25 % est appliquée avec une alternance de périodes de sonication de 10 s et de périodes de repos de 30 s, pour un temps de sonication effectif de 5 min.

La purification : La purification des nanoparticules est réalisée par dialyse dans un grand volume d'eau ultra pure, renouvelée plusieurs fois, pendant 16 h. La membrane de dialyse utilisée (ZemmuTrans/RothT4 12000-14000, 25 mm, ROTH) laisse passer à travers ses pores toutes les molécules de poids moléculaires inférieurs à 12-14 kDa qui n'auraient pas été incorporées dans la synthèse (glycérol, fluorophore...) tout en gardant les LNP au centre de la membrane.

La reconcentration des LNP : La concentration massique des LNP est mesurée par pesée avant et après lyophilisation d'un volume de 100 μ L de LNP dans l'eau. Afin d'obtenir une concentration plus élevée, la solution de LNP est placée dans un flacon de filtration par centrifugation (Amicon, 100 kDa) et le tout est centrifugé (centrifugeuse Eppendorf 5810R) à 4000 RPM, pendant 10 min, à 25 °C. Cette étape est ensuite répétée jusqu'à obtenir la concentration en LNP voulue.

9 ETUDE DE LA STABILITE DES LNP

9.1 STABILITE DES LNP FRET A 4 °C

Afin de s'assurer que les LNP en solution dans l'eau sont stables au cours de leur stockage (avant leur utilisation finale), des solutions de LNP de 1 mg.mL^{-1} sont préparées puis placées au frigo à 4 °C. La distribution en taille ainsi que l'intensité de la fluorescence sont mesurées au cours du temps par DLS pour la première et par fluorimétrie pour la seconde.

9.2 STABILITE DES LNP A 33 °C

Afin de s'assurer de la stabilité des LNP lors des tests de relargage à 33°C, leur stabilité à cette température est étudiée, à la fois dans le PBS et dans la solution de Hyal de 50/125 U.mL⁻¹. Pour cela, des solutions de 1 mg.mL^{-1} de LNP sont préparées dans ces deux milieux, puis placées dans le Thermomixeur à 33 °C sous une agitation de 40 RPM à l'abri de la lumière. Comme précédemment, la distribution de taille ainsi que l'intensité de l'émission sont mesurées au cours du temps par DLS pour la première et par fluorimétrie pour la seconde.

10 FORMATION PAR ELECTROSPINNING DE FIBRES COMPOSITES LNP/HA-PVA-HPβCD ET SUIVI DU RELARGAGE DES LNP

10.1 PREPARATION DES MEMBRANES COMPOSITES

Des solutions de 6 % w/w_{H2O} de HA, 6 % w/w_{H2O} de PVA et 10 % w/w_{H2O} de HPβCD auxquelles sont rajoutées 1 % w/w_{H2O} de LNP (soit FRET soit Dil) sont préparées comme décrit dans le paragraphe 4.1. Suivant si les membranes doivent être réticulées ou non, 2 % w/w_{H2O} de EDC et 1 % w/w_{H2O} de NHS peuvent être ajoutés à la solution.

La formation des nanofibres se déroule ensuite comme détaillé précédemment dans les paragraphes 4.2.

L'influence du recuit sur fibres HA-PVA-HPβCD + LNP est étudiée (pour des températures comprises entre 40 et 60 °C, pendant 24 ou 48 h) afin de déterminer l'incidence de cette étape sur la fluorescence FRET des nanoparticules.

Par la suite, afin de conserver l'intensité de la fluorescence FRET la plus élevée possible, différentes conditions de recuit (températures entre 40 et 60 °C, pendant 24 ou 48 h) sont testées sur les membranes HA-PVA-HPβCD. Pour la poursuite des travaux, les membranes HA-PVA-HPβCD + LNP ont été recuites à 50 °C pendant 24 h.

10.2 DETERMINATION DE LA PERTE EN FLUORESCENCE APRES L'ELECTROSPINNING ET APRES LE RECUIT

Des membranes HA-PVA-HPβCD + LNP non réticulées ayant subi ou non un recuit sont solubilisées dans du PBS de façon à obtenir une concentration en LNP de 0,1 mg.mL⁻¹. De façon à pouvoir déterminer l'influence de l'électrospinning sur la fluorescence des LNP, une solution de HA, PVA, HPβCD et LNP est préparées dans du PBS de manière à obtenir les mêmes concentrations que les fibres solubilisées. Ainsi trois solutions sont obtenues : une solution de HA, PVA, HPβCD et LNP avant électrospinning, une solution de fibres HA-PVA-HPβCD + LNP sans recuit solubilisées dans du PBS et une solution de fibres HA-PVA-HPβCD + LNP après recuit solubilisées dans du PBS (solutions réalisées

en triplica). Leurs spectres d'émission sont enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 532 nm et la perte de fluorescence est calculée à partir des maximums d'émission, c'est-à-dire 669 nm pour le FRET et 568 nm pour le Dil.

10.3 SUIVI DU RELARGAGE DES LNP FRET DANS LE PBS

Trois membranes réticulées HA-PVA-HP β CD + LNP FRET et trois membranes HA-PVA-HP β CD sans LNP sont chacune plongées dans 10 mL de PBS et maintenues sous une agitation de 40 RPM à 33 °C à l'abri de la lumière. A des temps prédéterminés, 1 mL de surnageant est prélevé et la valeur de l'intensité de l'émission FRET mesurée par fluorimétrie est relevée à 669 nm (après excitation à 532 nm). Les solutions de PBS sont changées toutes les 24 h afin d'éviter le vieillissement des LNP qui fausserait les mesures.

Afin de déterminer la concentration en solution des LNP FRET à partir du signal d'émission, une courbe d'étalonnage est déterminée à partir de LNP en solution dans le PBS pour 15 concentrations connues, comprises entre 0,002 et 0,1 mg.mL⁻¹. Cette courbe présente un coefficient de corrélation supérieur à 0,99.

10.4 SUIVI DU RELARGAGE DANS LA HYAL

Trois membranes réticulées HA-PVA-HP β CD + LNP Dil et trois membranes HA-PVA-HP β CD sans LNP sont plongées chacune dans 10 mL de solution de Hyal (50/125 U.mL⁻¹) et maintenues sous une agitation de 40 RPM à 33 °C à l'abri de la lumière. A des temps prédéterminés, 1 mL de surnageant est prélevé et la valeur de l'intensité de l'émission du Dil mesurée par fluorimétrie est relevée à 568 nm (après excitation à 532 nm). Les solutions de Hyal sont changées toutes les 24 h afin d'éviter le vieillissement des LNP qui fausserait les mesures.

Comme précédemment, une courbe d'étalonnage est déterminée à partir de LNP Dil en solution dans la solution de Hyal pour 15 concentrations connues, comprises entre 0,002 et 0,1 mg.mL⁻¹. Cette courbe présente un coefficient de corrélation supérieur à 0,99.

Conclusion

Dans un premier temps, ce chapitre a permis de présenter les différents matériaux employés au cours de ce travail de thèse, ainsi que leurs caractéristiques. Puis, les analyses réalisées ont été détaillées, en présentant les équipements utilisés ainsi que les conditions expérimentales appliquées.

Par la suite, la caractérisation des matières premières ayant servi à la formation des membranes a permis de déterminer que la masse molaire moyenne de l'HA est de $57\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (avec une dispersité de 1,26) et que le DS de l'HP β CD s'élevait à 5,1.

Il a ensuite été choisi de développer en détail le procédé de formation des membranes, en commençant par la réalisation des solutions, puis en détaillant le procédé d'electrospinning qui permet l'élaboration d'un matériau nanofibreux. La réticulation des membranes, puis leur lavage et séchage ont ensuite été abordés, puis, les procédés de mesure de la cytotoxicité et de la biodégradabilité des membranes HA-PVA-HP β CD ainsi formées ont ensuite été détaillés.

Par la suite, dans le but de fonctionnaliser ces membranes nanofibreuses, les différentes méthodes d'imprégnation du naproxène au sein du matériau ont été présentées et le protocole de suivi du relargage a été développé. Enfin, la synthèse des nanoparticules lipidiques (LNP) a été détaillée en présentant les différentes étapes de la formulation, les conditions requises, ainsi que l'étude de stabilité des molécules ainsi formées. Toujours dans un but de fonctionnalisation du matériau, la formation de membranes composites LNP/HA-PVA-HP β CD, puis la méthode de suivi du relargage des LNP ont été présentés.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de thèse était d'élaborer un matériau biocompatible et nanostructuré par electrospinning de polysaccharides, afin de créer une nouvelle génération de pansements profitant à la fois des bénéfices apportés par les propriétés intrinsèques des macromolécules choisies et par la structuration nanofibreuse du matériau final. Afin de conférer à ce dernier une activité thérapeutique, sa fonctionnalisation, soit par imprégnation directe d'un principe actif soit par l'ajout de nanoparticules au sein des fibres, a par la suite été étudiée.

Dans le but de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques pouvant altérer la biocompatibilité du matériau final, la mise en forme par electrospinning de polymères en solution a été réalisée dans l'eau pure. Cependant, ce solvant idéal d'un point de vue applicatif, s'est révélé difficile à mettre en œuvre de par ses propriétés de tension de surface élevée et de tension de vapeur saturante assez faible, mais limite également le choix des polymères qui doivent être solubles pour être electrospinnés. Une première partie des travaux de thèse a donc consisté à proposer des stratégies permettant d'electrospinner les polysaccharides à partir de solutions aqueuses. L'ajout d'un polymère porteur, la modification chimique de la macromolécule ou encore l'ajout d'un flux d'air chaud ont été envisagés. Parmi tous les polymères répertoriés, l'acide hyaluronique (HA) a été retenu pour ses propriétés de biocompatibilité et de bioactivité, prometteuses pour des applications biomédicales.

Des nanofibres à base d'HA, de diamètre moyen 162 ± 68 nm, ont ensuite été obtenues par electrospinning en voie aqueuse. L'ajout d'un polymère porteur au HA, l'alcool polyvinylique (PVA), ainsi que d'un oligosaccharide, la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD) à hauteur de 10 % w/w_{H₂O} a permis de stabiliser le procédé d'electrospinning pour assurer l'homogénéité du dépôt formé et faciliter la mise en forme des fibres. La HP β CD, par ses interactions intermoléculaires avec le HA et le PVA, stabilise le procédé d'electrospinning et permet d'augmenter le ratio massique HA:PVA à 1:1, ce qui est bien supérieur aux valeurs rapportées dans la littérature.

Les fibres ainsi formées étant par nature hydrosolubles, l'ajout d'une étape de réticulation a été envisagée pour obtenir un matériau final insoluble et stable au contact de solutions aqueuses ou de milieux humides en vue de son utilisation comme pansement. Les membranes HA-PVA-HP β CD préalablement formées ont été réticulées *in situ* par l'ajout de 2 % w/w_{H₂O} d'EDC et de 1 % w/w_{H₂O} de NHS à la solution initiale de HA-PVA-HP β CD. Parmi toutes les stratégies de réticulation disponibles, le couple EDC/NHS a été choisi pour sa toxicité bien moindre en comparaison de nombreux agents réticulant. La réaction de réticulation a, par la suite, été activée par une étape de recuit à 60 °C pendant 24 h des fibres formées par electrospinning, ce qui permet d'obtenir un matériau final insoluble. Cette réticulation a été caractérisée par spectroscopie infrarouge et par microscopie électronique à balayage

environnementale. L'ajout d'une étape de lyophilisation du matériau final après lavage des fibres a permis la conservation de la nanostructuration des membranes.

Les membranes HA-PVA-HP β CD, présentant de bonnes propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, ont été utilisées par la suite en tant que matériau support pour la libération contrôlée de principes actifs. En utilisant le naproxène comme molécule modèle, il a été démontré que ce composé pouvait être facilement imprégné dans les membranes, soit par immersion en solution aqueuse, soit par CO₂ supercritique. Le principe actif a été libéré des matériaux nanofibreux pendant plusieurs jours, avec un maximum de libération au cours des premières 24 heures. Ainsi, les membranes HA-PVA-HP β CD sont des candidates idéales pour administrer le naproxène directement à la plaie, avec une phase de libération rapide concomitante à l'activité inflammatoire connue lors de la cicatrisation des plaies laissant envisager une réduction des douleurs les plus aiguës.

Par la suite, la fonctionnalisation des nanofibres HA-PVA-HP β CD par incorporation de nanoparticules lipidiques (LNP) dans la solution à électrospinner a été menée avec succès.

L'utilisation de la technologie Förster Resonance Energy Transfer (FRET) a permis de montrer que des LNP conservent leur structure colloïdale au sein des fibres après leur mise en forme par électrospinning, mais aussi une fois les fibres solubilisés dans du PBS, où, 68 ± 4 % des LNP sont retrouvées intactes. L'étude de la libération des LNP à partir des fibres composites HA-PVA-HP β CD/LNP a montré un relargage de LNP, aussi bien en solution aqueuse qu'en présence de hyaluronidase. Cette libération se prolonge sur plusieurs semaines et de manière plus importante en présence de l'enzyme. En effet, après 28 jours, $58,4 \pm 5,5$ % de LNP intactes ont été libérées du matériau composite en présence de hyaluronidase, contre $17,9 \pm 3,1$ % seulement dans le PBS. Ainsi si un principe actif est encapsulé dans les nanoparticules lipidiques, ce type de fonctionnalisation des fibres présage d'une libération prolongée de principes actifs sur des périodes de l'ordre de la semaine, voire de plusieurs semaines.

Ce travail propose donc une approche simple et efficace pour former, dans l'eau pure, des membranes nanofibreuses stables à base d'HA grâce à l'ajout de PVA et d'HP β CD qui peuvent être utilisées pour le développement de pansements fonctionnels biocompatibles permettant l'encapsulation-relargage de composés actifs. Cependant, dans le futur, il pourrait être intéressant de continuer à développer certains aspects de la mise en forme des membranes portant tant sur le procédé d'électrospinning lui-même, que sur la fonctionnalisation des matériaux, mais aussi sur l'étude du relargage des principes actifs.

Du point de vue du procédé electrospinning, au cours de ces travaux, la vitesse de formation des nanofibres a été un point limitant dans la mise en forme des matériaux nanofibreux. En effet, le rendement du procédé d'electrospinning est très faible (le débit de solution est dans notre cas de $0,4 \text{ mL.h}^{-1}$ avec un émetteur à une seule aiguille), il faut donc environ 1 h d'electrospinning pour former une membrane de 30 mg environ. Si le rendement a pu être en partie amélioré en cours de thèse grâce à la mise en place d'un nouvel émetteur multi-aiguilles (qui permet de multiplier par deux le débit de solution), la mise en place d'un émetteur sans aiguille a aussi été envisagée. Dans ce cas, les jets de solutions sont initiés à partir d'une surface de liquide (comme un disque en rotation dans une solution de polymère, voir Figure 13) et non d'une ou plusieurs aiguilles ce qui permet d'obtenir jusqu'à plusieurs dizaines de jets en parallèle.

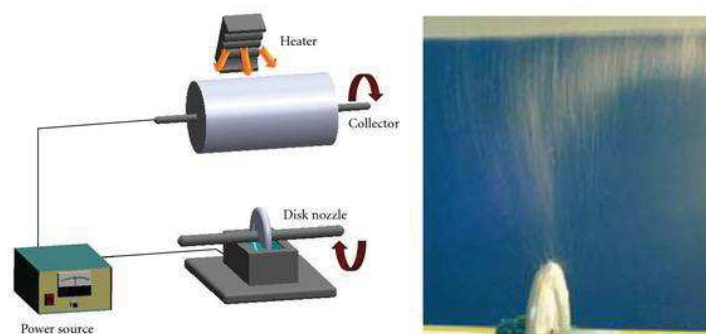


Figure 13 : Exemple de montage pour electrospinning sans aiguille ³⁴⁵

Durant les travaux de thèse, des essais d'electrospinning des solutions HA-PVA-HP β CD ont été menés avec ce type de montage, cependant la viscosité élevée du mélange, ainsi que la tension limitée à 60 kV du générateur haute tension, ne permettent pas la formation de nanofibres dans ces conditions. Cependant, il pourrait être envisagé d'adapter la solution HA-PVA-HP β CD en réduisant sa viscosité, d'accroître la puissance du générateur ou encore de faire varier la géométrie de l'émetteur (par exemple en ajoutant des crans sur le disque permettant ainsi de créer un effet de pointe) afin d'espérer pouvoir réaliser l'electrospinning du mélange en l'absence d'aiguille et ainsi augmenter considérablement le rendement de formation des membranes nanofibreuses.

Les différentes stratégies de fonctionnalisation mises en place sur les membranes HA-PVA-HP β CD pourraient s'adresser à diverses molécules actives qui requièrent des cinétiques de libération différentes, pour intervenir à des étapes clés et distinctes dans la cicatrisation d'une plaie. Il pourrait

ainsi être envisagé, à partir d'une même membrane, un relargage consécutif de principes actifs directement imprégnés dans les membranes et encapsulés dans les LNP elles-mêmes incluses au sein des fibres afin de profiter des deux cinétiques de relargage dans un même matériau. Pour atteindre cet objectif, il faudra cependant s'assurer que les deux types de fonctionnalisation sont compatibles et que la post fonctionnalisation des membranes par un principe actif ne détériore pas l'intégrité colloïdale des nanoparticules, en particulier dans le cas spécifique de l'imprégnation par CO₂ supercritique.

Les essais de relargage du naproxène et des LNP, menés par immersion directe et totale des membranes dans le PBS et en présence de hyaluronidase ont montré une libération significative des principes actifs ou particules depuis le matériau nanofibreux. Néanmoins, l'application des membranes sur la peau, implique que, bien qu'en contact avec des liquides physiologiques, celles-ci ne soient pas totalement immergées dans des solutions aqueuses. Cette différence de milieu pourrait donc être amenée à faire varier la vitesse de libération du naproxène ou des LNP. Afin de déterminer avec plus de précision les cinétiques de libération de ces principes actifs au contact de la plaie, il pourrait donc être envisagé de réaliser des essais de relargage sur des peaux synthétiques ou encore directement sur de petits animaux.

RÉFÉRENCES

1. Shah, J. B. The History of Wound Care. *J Am Col Certif Wound Spec* **3**, 65–66 (2012).
2. Smith, L. A history of materials and practices for wound management.
3. Cope, Z. The treatment of wounds through the ages. *Medical History* **2**, 163–174 (1958).
4. Naseri-Nosar, M. & Ziora, Z. M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydrate Polymers* **189**, 379–398 (2018).
5. Miguel, S. P. *et al.* Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **169**, 60–71 (2018).
6. Agarwal, S. & Greiner, A. On the way to clean and safe electrospinning—green electrospinning: emulsion and suspension electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies* **22**, 372–378 (2010).
7. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. (Springer International Publishing, 2015).
8. Kouassi, M.-C. Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. (Normandie, 2017).
9. Chawla, S. P., Kanatt, S. R. & Sharma, A. K. Chitosan. in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (eds. Ramawat, K. G. & Mérillon, J.-M.) 1–24 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-03751-6_13-1.
10. Liu, J., Willför, S. & Xu, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **5**, 31–61 (2015).
11. Ruff, Y. Biopolymères dynamiques : Oligo- et polysaccharides. (Strasbourg 1, 2008).
12. Maver, T. *et al.* *Bioactive Polysaccharide Materials for Modern Wound Healing*. (Springer International Publishing, 2018).
13. Prestegard, J. H., Liu, J. & Widmalm, G. Oligosaccharides and Polysaccharides. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. *et al.*) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
14. Martínez, J. P., Falomir, M. P. & Gozalbo, D. Chitin: A Structural Biopolysaccharide with Multiple Applications. in *eLS* (American Cancer Society, 2014). doi:10.1002/9780470015902.a0000694.pub3.
15. Aguda, R. & Ayoub, A. The State of the Art: Introduction to Spinning. in *Polysaccharide-based Fibers and Composites* 1–11 (Springer, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-56596-5_1.
16. Bogoeva-Gaceva, G. *et al.* Natural fiber eco-composites. *Polymer Composites* **28**, 98–107 (2007).
17. Hsieh, Y. L. 1 - Chemical structure and properties of cotton. in *Cotton* (eds. Gordon, S. & Hsieh, Y.-L.) 3–34 (Woodhead Publishing, 2007). doi:10.1533/9781845692483.1.3.
18. Arenas, J. P. & Crocker, M. J. Recent Trends in Porous Sound-Absorbing Materials. *SOUND & VIBRATION* **44**, 12–17 (2010).
19. Hooshmand, S., Aitomäki, Y., Skrifvars, M., Mathew, A. P. & Oksman, K. All-cellulose nanocomposite fibers produced by melt spinning cellulose acetate butyrate and cellulose nanocrystals. *Cellulose* **21**, 2665–2678 (2014).
20. Brazinsky, I., Williams, A. G. & LaNieve, H. L. The dry spinning process: Comparison of theory with experiment. *Polymer Engineering & Science* **15**, 834–841 (1975).
21. Kong, L. & Ziegler, G. R. Fabrication of κ -Carrageenan Fibers by Wet Spinning: Spinning Parameters. *Materials (Basel)* **4**, 1805–1817 (2011).
22. East, G. C. & Qin, Y. Wet spinning of chitosan and the acetylation of chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science* **50**, 1773–1779 (1993).

23. Hattori, M., Shimaya, Y., Saito, M. & Okajima, K. Gel Spinning from Cellulose/Aqueous Calcium Thiocyanate System and the Fiber Properties. *Sen'i Gakkaishi* **55**, 149–154 (1999).
24. Chang, H. *et al.* Gel Spinning of Polyacrylonitrile/Cellulose Nanocrystal Composite Fibers. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**, 610–616 (2015).
25. Homayoni, H., Ravandi, S. A. H. & Valizadeh, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* **77**, 656–661 (2009).
26. Brenner, E. K., Schiffman, J. D., Thompson, E. A., Toth, L. J. & Schauer, C. L. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* **87**, 926–929 (2012).
27. Sutjarittangtham, K. *et al.* Fabrication of natural tapioca starch fibers by a modified electrospinning technique. *Chiang Mai Journal of Science* **41**, 213–223 (2014).
28. Doshi, J. & Reneker, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* **35**, 151–160 (1995).
29. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **28**, 325 – 347 (2010).
30. Taylor, G. Electrically Driven Jets. *Proc. R. Soc. Lond.* **313**, (1969).
31. Greiner, A. & Wendorff, J. H. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 5670–5703 (2007).
32. Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A. & Yamamoto, H. Electrospinning of Chitosan. *Macromolecular Rapid Communications* **25**, 1600–1605 (2004).
33. Karim, M. R. *et al.* Preparation and characterization of electrospun pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **78**, 336–342 (2009).
34. Schiffman, J. D. & Schauer, C. L. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews* **48**, 317–352 (2008).
35. Min, B.-M. *et al.* Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer* **45**, 7137–7142 (2004).
36. Pakravan, M., Heuzey, M.-C. & Ajji, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer* **52**, 4813 – 4824 (2011).
37. Liu, Y. *et al.* Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* **83**, 1011–1015 (2011).
38. Um, I. C., Fang, D., Hsiao, B. S., Okamoto, A. & Chu, B. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* **5**, 1428–1436 (2004).
39. Mele, E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. *Journal of Materials Chemistry B* **4**, 4801–4812 (2016).
40. Lee, K. Y., Jeong, L., Kang, Y. O., Lee, S. J. & Park, W. H. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1020–1032 (2009).
41. Wilm, M. S. & Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **136**, 167–180 (1994).
42. Hagh, A. K. & Akbari, M. Trends in electrospinning of natural nanofibers. *physica status solidi (a)* **204**, 1830–1834 (2007).
43. Fong, H., Chun, I. & Reneker, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **40**, 4585 – 4592 (1999).
44. Smallwood, I. M. *Handbook of Organic Solvent Properties*. (Elsevier, 1996). doi:10.1016/C2009-0-23646-4.

45. Frey, M. W. Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives. *Polymer Reviews* **48**, 378–391 (2008).
46. Azeredo, H. M. C. & Waldron, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends in Food Science & Technology* **52**, 109–122 (2016).
47. Zeiger, E., Gollapudi, B. & Spencer, P. Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **589**, 136–151 (2005).
48. Leung, H.-W. Ecotoxicology of Glutaraldehyde: Review of Environmental Fate and Effects Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49**, 26–39 (2001).
49. Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. & Chen, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact* **10**, 99 (2011).
50. Wang, X. *et al.* Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments. *Polymer* **46**, 4853–4867 (2005).
51. Koski, A., Yim, K. & Shivkumar, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters* **58**, 493–497 (2004).
52. Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y. & Sheng, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* **41**, 423–432 (2005).
53. Theron, S. A., Zussman, E. & Yarin, A. L. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer* **45**, 2017–2030 (2004).
54. Uyar, T. & Besenbacher, F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers. *European Polymer Journal* **45**, 1032–1037 (2009).
55. Ahire, J. J., Robertson, D. D., van Reenen, A. J. & Dicks, L. M. T. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **86**, 143–148 (2017).
56. Chen, G., Guo, J., Nie, J. & Ma, G. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. *Polymer* **83**, 12–19 (2016).
57. Ji, Y. *et al.* Dual-Syringe Reactive Electrospinning of Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* **6**, 811–817 (2006).
58. Ji, Y. *et al.* Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* **27**, 3782–3792 (2006).
59. Kim, I. L., Khetan, S., Baker, B. M., Chen, C. S. & Burdick, J. A. Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials* **34**, 5571–5580 (2013).
60. Chanda, A. *et al.* Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **116**, 774–785 (2018).
61. Janković, B., Pelipenko, J., Škarabot, M., Mušević, I. & Kristl, J. The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* **455**, 338–347 (2013).
62. Kim, K.-O., Akada, Y., Kai, W., Kim, B.-S. & Kim, I.-S. Cells Attachment Property of PVA Hydrogel Nanofibers Incorporating Hyaluronic Acid for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **02**, 353 (2011).

63. Pelipenko, J., Kristl, J., Janković, B., Baumgartner, S. & Kocbek, P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* **456**, 125–134 (2013).
64. Tomihata, K. & Ikada, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 243–251 (1997).
65. Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. A. & Langer, R. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules* **6**, 386–391 (2005).
66. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**, 603 – 632 (2006).
67. Qin, C. *et al.* Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* **63**, 367–374 (2006).
68. Sogias, I. A., Khutoryanskiy, V. V. & Williams, A. C. Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**, 426–433 (2010).
69. Paipitak, K., Pornpra, T., Mongkontalang, P., Techitdheer, W. & Pecharapa, W. Characterization of PVA-Chitosan Nanofibers Prepared by Electrospinning. *Procedia Engineering* **8**, 101 – 105 (2011).
70. Jia, Y.-T. *et al.* Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate Polymers* **67**, 403 – 409 (2007).
71. Fathollahipour, S., Mehrizi, A. A., Ghaee, A. & Koosha, M. Electrospinning of PVA/chitosan nanocomposite nanofibers containing gelatin nanoparticles as a dual drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103**, 3852–3862 (2015).
72. Lin, T., Fang, J., Wang, H., Cheng, T. & Wang, X. Using chitosan as a thickener for electrospinning dilute PVA solutions to improve fibre uniformity. *Nanotechnology* **17**, 3718 (2006).
73. Biranje, S., Madiwale, P. & Adivarekar, R. V. Electrospinning of chitosan/PVA nanofibrous membrane at ultralow solvent concentration. *Journal of Polymer Research* **24**, 1–10 (2017).
74. Sajeev, U. S., Anand, K. A., Menon, D. & Nair, S. Control of nanostructures in PVA, PVA/chitosan blends and PCL through electrospinning. *Bull Mater Sci* **31**, 343–351 (2008).
75. Cui, Z. *et al.* Electrospinning and crosslinking of polyvinyl alcohol/chitosan composite nanofiber for transdermal drug delivery. *Advances in Polymer Technology* 1–12 (2017) doi:10.1002/adv.21850.
76. Mengistu Lemma, S., Bossard, F. & Rinaudo, M. Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly(ethylene oxide). *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1790 (2016).
77. Rieger, K. A., Birch, N. P. & Schiffman, J. D. Electrospinning chitosan/poly(ethylene oxide) solutions with essential oils: Correlating solution rheology to nanofiber formation. *Carbohydrate Polymers* **139**, 131–138 (2016).
78. Duan, B., Dong, C., Yuan, X. & Yao, K. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **15**, 797–811 (2004).
79. Spasova, M., Manolova, N., Paneva, D. & Rashkov, I. Preparation of chitosan-containing nanofibres by electrospinning of chitosan/poly(ethylene oxide) blend solutions. *e-Polymers* **4**, (2004).
80. Bhattarai, N., Edmondson, D., Veisoh, O., Matsen, F. A. & Zhang, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* **26**, 6176–6184 (2005).

81. Wei, H., Zhang, F., Zhang, D., Liu, Y. & Leng, J. Shape-memory behaviors of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) composite nanofibrous membranes. *Journal of Applied Polymer Science* **132**, (2015).
82. Garcia, C. E. G., Martínez, F. A. S., Bossard, F. & Rinaudo, M. Biomaterials Based on Electrospun Chitosan. Relation between Processing Conditions and Mechanical Properties. *Polymers* **10**, 257 (2018).
83. Alipour, S. M., Nouri, M., Mokhtari, J. & Bahrami, S. H. Electrospinning of poly(vinyl alcohol)–water-soluble quaternized chitosan derivative blend. *Carbohydrate Research* **344**, 2496–2501 (2009).
84. Yang, D. *et al.* In Situ Mineralization of Hydroxyapatite on Electrospun Chitosan-Based Nanofibrous Scaffolds. *Macromolecular Bioscience* **8**, 239–246 (2008).
85. Du, J. & Hsieh, Y.-L. Nanofibrous membranes from aqueous electrospinning of carboxymethyl chitosan. *Nanotechnology* **19**, 125707 (2008).
86. Du, J. & Hsieh, Y.-L. PEGylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning. *Cellulose* **14**, 543–552 (2007).
87. Amsden, B. G., Sukarto, A., Knight, D. K. & Shapka, S. N. Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial. *Biomacromolecules* **8**, 3758–3766 (2007).
88. Zhou, Y. *et al.* Electrospun Water-Soluble Carboxyethyl Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Nanofibrous Membrane as Potential Wound Dressing for Skin Regeneration. *Biomacromolecules* **9**, 349–354 (2008).
89. Mincheva, R., Manolova, N. & Rashkov, I. Bicomponent aligned nanofibers of N-carboxyethylchitosan and poly(vinyl alcohol). *European Polymer Journal* **43**, 2809–2818 (2007).
90. Zeng, Q. *et al.* Preparation and hemocompatibility of electrospun O-carboxymethyl chitosan/PVA nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, (2016).
91. Han, J. *et al.* Electrospinning of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan and poly(ethylene oxide) blend aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **83**, 270–276 (2011).
92. Romano, I. *et al.* Photo-polymerisable electrospun fibres of N-methacrylate glycol chitosan for biomedical applications. *RSC Adv.* **5**, 24723–24728 (2015).
93. Xin, S. *et al.* Carboxymethyl chitin/organic rectorite composites based nanofibrous mats and their cell compatibility. *Carbohydrate Polymers* **90**, 1069–1074 (2012).
94. Shalumon, K. T. *et al.* Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* **77**, 863–869 (2009).
95. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **37**, 106 – 126 (2012).
96. Safi, S., Morshed, M., Hosseini Ravandi, S. A. & Ghiaci, M. Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide). *Journal of Applied Polymer Science* **104**, 3245–3255 (2007).
97. Lu, J.-W., Zhu, Y.-L., Guo, Z.-X., Hu, P. & Yu, J. Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer* **47**, 8026 – 8031 (2006).
98. Bonino, C. A. *et al.* Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions. *Small* **8**, 1928–1936 (2012).
99. Saquing, C. D. *et al.* Alginate–Polyethylene Oxide Blend Nanofibers and the Role of the Carrier Polymer in Electrospinning. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **52**, 8692–8704 (2013).

100. Rošic, R. *et al.* The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *European Polymer Journal* **48**, 1374 – 1384 (2012).
101. Nie, H. *et al.* Effect of poly(ethylene oxide) with different molecular weights on the electrospinnability of sodium alginate. *Polymer* **50**, 4926–4934 (2009).
102. Chen, X. *et al.* Synthesis of amphiphilic alginate derivatives and electrospinning blend nanofibers: a novel hydrophobic drug carrier. *Polym. Bull.* **72**, 3097–3117 (2015).
103. Yang, J. M. *et al.* Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly(γ -glutamic acid) electrospun fiber. *Materials Science and Engineering: C* **66**, 170–177 (2016).
104. Covelo, A., Gómez, K. K., Corona-Lira, P., Ramírez-Reivich, A. C. & Hernández, M. Electrochemical characterization of PVA/SA nanofibers obtained by electrospinning processing. *Surface and Interface Analysis* 1–6 (2018) doi:10.1002/sia.6412.
105. Islam, M. S. & Karim, M. R. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **366**, 135 – 140 (2010).
106. Rafiq, M., Hussain, T., Abid, S., Nazir, A. & Masood, R. Development of sodium alginate/PVA antibacterial nanofibers by the incorporation of essential oils. *Mater. Res. Express* **5**, 035007 (2018).
107. Shen, W. & Hsieh, Y.-L. Biocompatible sodium alginate fibers by aqueous processing and physical crosslinking. *Carbohydrate Polymers* **102**, 893–900 (2014).
108. Zhang, S. *et al.* Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **90A**, 671–679 (2008).
109. Pandya, D. S., Arinze, T. & Collins, G. Elevated temperature electrospinning of aqueous gelatin solution and crosslinking for tissue engineering applications. in *Proceedings of the 2010 IEEE 36th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC)* 1–2 (2010). doi:10.1109/NEBC.2010.5458180.
110. Yang, C., Wu, X., Zhao, Y., Xu, L. & Wei, S. Nanofibrous scaffold prepared by electrospinning of poly(vinyl alcohol)/gelatin aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science* **121**, 3047–3055 (2010).
111. Moon, S. & Farris, R. J. Electrospinning of heated gelatin-sodium alginate-water solutions. *Polymer Engineering & Science* **49**, 1616–1620 (2009).
112. Lopez, C. G., Rogers, S. E., Colby, R. H., Graham, P. & Cabral, J. T. Structure of Sodium Carboxymethyl Cellulose Aqueous Solutions: A SANS and Rheology Study. *J Polym Sci B Polym Phys* **53**, 492–501 (2015).
113. Zulkifli, F. H., Hussain, F. S. J., Rasad, M. S. B. A. & Mohd Yusoff, M. Nanostructured materials from hydroxyethyl cellulose for skin tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* **114**, 238–245 (2014).
114. Frenot, A., Henriksson, M. W. & Walkenström, P. Electrospinning of cellulose-based nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* **103**, 1473–1482 (2007).
115. Basu, P. *et al.* PEO–CMC blend nanofibers fabrication by electrospinning for soft tissue engineering applications. *Materials Letters* **195**, 10–13 (2017).
116. El-Newehy, M. H. *et al.* Preparation of biocompatible system based on electrospun CMC/PVA nanofibers as controlled release carrier of diclofenac sodium. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **53**, 566–573 (2016).

117. Khorshidi, S. *et al.* Effect of crosslinking procedure on structural, thermal, and functional performances of cellulosic nanofibers: A comparison between chemical and photochemical crosslinking. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, (2016).
118. Zulkifli, F. H., Shahitha, F., Yusuff, M. M., Hamidon, N. N. & Chahal, S. Cross-Linking Effect on Electrospun Hydroxyethyl Cellulose/Poly(Vinyl Alcohol) Nanofibrous Scaffolds. *Procedia Engineering* **53**, 689–695 (2013).
119. Chahal, S., Hussain, F. S. J., Kumar, A., Rasad, M. S. B. A. & Yusoff, M. M. Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility of electrospun hydroxyethyl cellulose/poly (vinyl) alcohol nanofibrous composite biomaterial for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Science* **144**, 17–29 (2016).
120. Peresin, M. S., Habibi, Y., Zoppe, J. O., Pawlak, J. J. & Rojas, O. J. Nanofiber Composites of Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanocrystals: Manufacture and Characterization. *Biomacromolecules* **11**, 674–681 (2010).
121. Peresin, M. S. *et al.* Crosslinked PVA nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals: Water interactions and thermomechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science* **131**, (2014).
122. Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. & Ball, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **23**, 85–112 (1998).
123. Jaiturong, P. *et al.* Preparation of glutinous rice starch/polyvinyl alcohol copolymer electrospun fibers for using as a drug delivery carrier. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 239–247 (2018).
124. Zhi, L. & Ji-Huan, H. Polyvinyl alcohol/starch composite nanofibers by bubble electrospinning. *Thermal Science* **18**, 1473–1475 (2014).
125. Hemamalini, T. & Giri Dev, V. R. Comprehensive review on electrospinning of starch polymer for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **106**, 712–718 (2018).
126. Silva, I. *et al.* Scaffolds based on hydroxypropyl starch: Processing, morphology, characterization, and biological behavior. *Journal of Applied Polymer Science* **127**, 1475–1484 (2010).
127. Jiang, H., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B. & Chen, W. Optimization and Characterization of Dextran Membranes Prepared by Electrospinning. *Biomacromolecules* **5**, 326–333 (2004).
128. Qian, Y. F., Zheng, L. J., Song, R. Y. & Du, B. Electrospinning of Pullulan Nanofibers for Food Package Materials. *Advanced Materials Research* 1321–1325 (2013) doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.821-822.1321.
129. Stijnman, A. C., Bodnar, I. & Hans Tromp, R. Electrospinning of food-grade polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **25**, 1393–1398 (2011).
130. Casper, C. L., Yamaguchi, N., Kiick, K. L. & Rabolt, J. F. Functionalizing Electrospun Fibers with Biologically Relevant Macromolecules. *Biomacromolecules* **6**, 1998–2007 (2005).
131. Schultz, K. M. *et al.* Electrospinning covalently cross-linking biocompatible hydrogelators. *Polymer* **54**, 363–371 (2013).
132. Tort, S. & Acartürk, F. Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine. *Carbohydrate Polymers* **152**, 802–814 (2016).
133. Rockwell, P. L., Kiechel, M. A., Atchison, J. S., Toth, L. J. & Schauer, C. L. Various-sourced pectin and polyethylene oxide electrospun fibers. *Carbohydrate Polymers* **107**, 110–118 (2014).

134. Cui, S. *et al.* Reducing the content of carrier polymer in pectin nanofibers by electrospinning at low loading followed with selective washing. *Materials Science and Engineering: C* **59**, 885–893 (2016).
135. Norouzi, M., Boroujeni, S. M., Omidvarkordshouli, N. & Soleimani, M. Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials* **4**, 1114–1133 (2015).
136. Yildirimer, L., Thanh, N. T. K. & Seifalian, A. M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in Biotechnology* **30**, 638–648 (2012).
137. Lee, D. H., Oh, J.-H. & Chung, J. H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of Dermatological Science* **83**, 174–181 (2016).
138. Mogoşanu, G. D. & Grumezescu, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics* **463**, 127–136 (2014).
139. Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.-O., Jafari, S.-H. & Supaphol, P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies* **21**, 77–95 (2009).
140. Shechter, R. & Schwartz, M. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends in Molecular Medicine* **19**, 135–143 (2013).
141. Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S. & Alman, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci* **70**, 2059–2081 (2013).
142. Guo, S. & DiPietro, L. A. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* **89**, 219–229 (2010).
143. Field, C. K. & Kerstein, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. *The American Journal of Surgery* **167**, S2–S6 (1994).
144. Kamoun, E. A., Kenawy, E.-R. S. & Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research* **8**, 217–233 (2017).
145. Dhivya, S., Padma, V. V. & Santhini, E. Wound dressings – a review. *Biomedicine (Taipei)* **5**, (2015).
146. Jones, V., Grey, J. E. & Harding, K. G. Wound dressings. *BMJ* **332**, 777–780 (2006).
147. Ramos-e-Silva, M. & Ribeiro de Castro, M. C. New dressings, including tissue-engineered living skin. *Clinics in Dermatology* **20**, 715–723 (2002).
148. Zhou, J. *et al.* Tissue engineering of heart valves: PEGylation of decellularized porcine aortic valve as a scaffold for in vitro recellularization. *BioMedical Engineering OnLine* **12**, 87 (2013).
149. Youngstrom, D. W., Barrett, J. G., Jose, R. R. & Kaplan, D. L. Functional Characterization of Detergent-Decellularized Equine Tendon Extracellular Matrix for Tissue Engineering Applications. *PLOS ONE* **8**, e64151 (2013).
150. Neergaard-Petersen, S. *et al.* Fibrin Clot Structure and Platelet Aggregation in Patients with Aspirin Treatment Failure. *PLOS ONE* **8**, e71150 (2013).
151. Abrigo, M., McArthur, S. L. & Kingshott, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromolecular Bioscience* **14**, 772–792 (2014).
152. Zhang, Y., Lim, C. T., Ramakrishna, S. & Huang, Z.-M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci: Mater Med* **16**, 933–946 (2005).
153. Gopal, R. *et al.* Electrospun nanofibrous filtration membrane. *Journal of Membrane Science* **281**, 581–586 (2006).

154. Liu, C. *et al.* Electrospun ZIF-based hierarchical carbon fiber as an efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. *J. Mater. Chem. A* **5**, 1211–1220 (2017).
155. Goldberg, M., Langer, R. & Jia, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **18**, 241–268 (2007).
156. Yoo, H. S., Kim, T. G. & Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1033–1042 (2009).
157. Hu, X. *et al.* Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* **185**, 12–21 (2014).
158. Yang, Y., Jia, Z., Liu, J., Wang, L. & Guan, Z. The effects of flow rate and the distance between the nozzle and the target on the operating conditions of electrospinning. *Journal of Polymer Engineering* **28**, 67–86 (2011).
159. Stern, R. & Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem. Rev.* **106**, 818–839 (2006).
160. Aya, K. L. & Stern, R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair and Regeneration* **22**, 579–593 (2014).
161. Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R. & Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* **29**, 17–25 (2007).
162. Kadi, S. Systèmes associatifs à base d'acide hyaluronique modifié : synthèse et étude des relations structure/propriétés rhéologiques. (Université de Grenoble, 2007).
163. Chen, W. Y. & Abatangelo, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* **7**, 79–89 (1999).
164. Frenkel, J. S. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal* **11**, 159–163 (2012).
165. Longinotti, C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: A review. *Burns & Trauma* **2**, 162 (2014).
166. Pardue, E. L., Ibrahim, S. & Ramamurthi, A. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* **4**, 203–214 (2008).
167. Petrey, A. C. & de la Motte, C. A. Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Front Immunol* **5**, (2014).
168. Moura, L. I. F., Dias, A. M. A., Carvalho, E. & de Sousa, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia* **9**, 7093–7114 (2013).
169. Chen, W. Y. J. & Abatangelo, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* **7**, 79–89 (1999).
170. Barrois, B. *et al.* Efficacy and Tolerability of Hyaluronan (ialuset®) in the Treatment of Pressure Ulcers. *Drugs R D* **8**, 267–273 (2007).
171. Abbruzzese, L. *et al.* Effectiveness and Safety of a Novel Gel Dressing in the Management of Neuropathic Leg Ulcers in Diabetic Patients: A Prospective Double-Blind Randomized Trial. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* **8**, 134–140 (2009).
172. Ialuset® crème et compresse (Dispositif médical). *Laboratoires Genevrier* <http://www.laboratoires-genevrier.com/produits/ialuset-creme-et-compresse/>.
173. Yan, Y. 2 - Developments in fibers for technical nonwovens. in *Advances in Technical Nonwovens* (ed. Kellie, G.) 19–96 (Woodhead Publishing, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100575-0.00002-4.

174. Sánchez-Soto, P. J., Ginés, J. M., Arias, M. J., Novák, C. & Ruiz-Conde, A. Effect of Molecular Mass on the Melting Temperature, Enthalpy and Entropy of Hydroxy-Terminated PEO. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **67**, 189–197 (2002).
175. Wiśniewska, M. *et al.* Effect of polyvinyl alcohol adsorption on the mixed alumina–silica–titania suspension stability. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **23**, 265–272 (2015).
176. Hassan, C. M., Trakampan, P. & Peppas, N. A. Water Solubility Characteristics of Poly(vinyl alcohol) and Gels Prepared by Freezing/Thawing Processes. in *Water Soluble Polymers* 31–40 (Springer, Boston, MA, 2002). doi:10.1007/0-306-46915-4_3.
177. Niamlang, P., Tongrain, T., Ekabutr, P., Chuysinuan, P. & Supaphol, P. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) films containing tetracycline hydrochloride-loaded quaternized chitosan nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **38**, 36–44 (2017).
178. Fenelon, V. C. *et al.* Different strategies for cyclodextrin production: Ultrafiltration systems, CGTase immobilization and use of a complexing agent. *Carbohydrate Polymers* **192**, 19–27 (2018).
179. Brewster, M. E. & Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 645–666 (2007).
180. Loftsson, T. & Duchêne, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **329**, 1–11 (2007).
181. Banik, A., Gogoi, P. & Saikia, M. D. Interaction of naproxen with β -cyclodextrin and its derivatives/polymer: experimental and molecular modeling studies. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **72**, 449–458 (2012).
182. Davis, M. E. & Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 1023–1035 (2004).
183. Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M. & Järvinen, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2**, 335–351 (2005).
184. Zafar, N., Fessi, H. & Elaissari, A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics* **461**, 351–366 (2014).
185. Oster, M. Elaboration of functional cyclodextrin based nanofibres for biomedical application. (Strasbourg, 2014).
186. Otero-Espinar, F. J., Torres-Labandeira, J. J., Alvarez-Lorenzo, C. & Blanco-Méndez, J. Cyclodextrins in drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **20**, 289–301 (2010).
187. Puglisi, G., Ventura, C. A., Spadaro, A., Campana, G. & Spampinato, S. Differential Effects of Modified β -Cyclodextrins on Pharmacological Activity and Bioavailability of 4-Biphenylacetic Acid in Rats after Oral Administration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **47**, 120–123 (1995).
188. Santucci, L. *et al.* Placebo-controlled comparison of piroxicam- β -cyclodextrin, piroxicam, and indomethacin on gastric potential difference and mucosal injury in humans. *Digest Dis Sci* **37**, 1825–1832 (1992).
189. Uekama, K., Hirayama, F. & Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem. Rev.* **98**, 2045–2076 (1998).
190. Gould, S. & Scott, R. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology* **43**, 1451–1459 (2005).

191. Woldum, H. S., Larsen, K. L. & Madsen, F. Cyclodextrin Controlled Release of Poorly Water-Soluble Drugs from Hydrogels. *Drug Delivery* **15**, 69–80 (2008).
192. Tabuchi, R. *et al.* Biomaterials based on freeze dried surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with sulfobutyl ether β -cyclodextrin gel in wound dressing applications. *International Journal of Pharmaceutics* **511**, 1080–1087 (2016).
193. Aubert-Viard, F. *et al.* Chitosan finishing nonwoven textiles loaded with silver and iodide for antibacterial wound dressing applications. *Biomed. Mater.* **10**, 015023 (2015).
194. Wathoni, N. *et al.* Enhancement of curcumin wound healing ability by complexation with 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin in sacran hydrogel film. *International Journal of Biological Macromolecules* **98**, 268–276 (2017).
195. Narayanan, G., Ormond, B. R., Gupta, B. S. & Tonelli, A. E. Efficient wound odor removal by β -cyclodextrin functionalized poly (ϵ -caprolactone) nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* **132**, (2015).
196. Narayanan, G., Boy, R., Gupta, B. S. & Tonelli, A. E. Functional Nanofibers Containing Cyclodextrins. in *Polysaccharide-based Fibers and Composites: Chemical and Engineering Fundamentals and Industrial Applications* (eds. Lucia, L. & Ayoub, A.) 29–62 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-56596-5_3.
197. Celebioglu, A. & Uyar, T. Cyclodextrin nanofibers by electrospinning. *Chem. Commun.* **46**, 6903–6905 (2010).
198. Celebioglu, A. & Uyar, T. Electrospinning of Polymer-free Nanofibers from Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Langmuir* **27**, 6218–6226 (2011).
199. Celebioglu, A. & Uyar, T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives. *Nanoscale* 621–631 (2012).
200. Celebioglu, A. & Uyar, T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: Electrospun nanofibers from native cyclodextrins. *Journal of Colloid and Interface Science* **404**, 1–7 (2013).
201. Celebioglu, A. & Uyar, T. Electrospun gamma-cyclodextrin ([γ]-CD) nanofibers for the entrapment of volatile organic compounds. *RSC Adv.* **3**, 22891–22895 (2013).
202. Zhang, W., Chen, M. & Diao, G. Electrospinning β -cyclodextrin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane for molecular capture. *Carbohydrate Polymers* **86**, 1410–1416 (2011).
203. Kayaci, F. & Uyar, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers* **90**, 558–568 (2012).
204. Uyar, T., Nur, Y., Hacaloglu, J. & Besenbacher, F. Electrospinning of functional poly(methyl methacrylate) nanofibers containing cyclodextrin-menthol inclusion complexes. *Nanotechnology* **20**, 125703 (2009).
205. Malanga, M. *et al.* “Back to the Future”: A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **105**, 2921–2931 (2016).
206. Azarbayjani, A. F., Lin, H., Yap, C. W., Chan, Y. W. & Chan, S. Y. Surface tension and wettability in transdermal delivery: a study on the in-vitro permeation of haloperidol with cyclodextrin across human epidermis. *J. Pharm. Pharmacol.* **62**, 770–778 (2010).
207. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. & Tan, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **42**, 261 – 272 (2001).
208. Zong, X. *et al.* Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* **43**, 4403–4412 (2002).

209. Wang, C., Wang, Y. & Hashimoto, T. Impact of Entanglement Density on Solution Electrospinning: A Phenomenological Model for Fiber Diameter. *Macromolecules* **49**, 7985–7996 (2016).
210. Kong, L. & Ziegler, G. R. Molecular Entanglement and Electrospinnability of Biopolymers. *J Vis Exp* (2014) doi:10.3791/51933.
211. McKee, M. G., Wilkes, G. L., Colby, Ralph. H. & Long, T. E. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules* **37**, 1760–1767 (2004).
212. Shenoy, S. L., Bates, W. D., Frisch, H. L. & Wnek, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer* **46**, 3372–3384 (2005).
213. McKee, M. G., Hunley, M. T., Layman, J. M. & Long, T. E. Solution Rheological Behavior and Electrospinning of Cationic Polyelectrolytes. *Macromolecules* **39**, 575–583 (2006).
214. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J. D., Hirvonen, J. K. & Tan, N. C. B. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* **42**, 8163 – 8170 (2001).
215. Cai, Y. & Gevelber, M. The effect of relative humidity and evaporation rate on electrospinning: fiber diameter and measurement for control implications. *J Mater Sci* **48**, 7812–7826 (2013).
216. Huang, L., Bui, N.-N., Manickam, S. S. & McCutcheon, J. R. Controlling electrospun nanofiber morphology and mechanical properties using humidity. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **49**, 1734–1744 (2011).
217. Nezarati, R. M., Eifert, M. B. & Cosgriff-Hernandez, E. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng Part C Methods* **19**, 810–819 (2013).
218. Vrieze, S. D. *et al.* The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J Mater Sci* **44**, 1357–1362 (2008).
219. Medeiros, E. S. *et al.* Electrospun Nanofibers of Poly(vinyl alcohol) Reinforced with Cellulose Nanofibrils. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **2**, 1–12 (2008).
220. Fong, H., Chun, I. & Reneker, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* **40**, 4585 – 4592 (1999).
221. Liang, T., Parhizkar, M., Edirisinghe, M. & Mahalingam, S. Effect of humidity on the generation and control of the morphology of honeycomb-like polymeric structures by electrospinning. *European Polymer Journal* **61**, 72–82 (2014).
222. Bonino, C. A. *et al.* Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers* **85**, 111–119 (2011).
223. Nakagawa, yuya, Wei, K., Byoung-Sulik, K. & Ick-Soo, K. Morphology controlled electrospun poly(vinyl pyrrolidone) fibers: effects of organic solvent and relative humidity. *Journal of Materials Science and Engineering with Advanced Technology* **2**, 97–112 (2010).
224. Zaarour, B., Zhu, L., Huang, C. & Jin, X. Controlling the Secondary Surface Morphology of Electrospun PVDF Nanofibers by Regulating the Solvent and Relative Humidity. *Nanoscale Research Letters* **13**, 285 (2018).
225. Medeiros, E. S., Mattoso, L. H. C., Offeman, R. D., Wood, D. F. & Orts, W. J. Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers. *Can. J. Chem.* **86**, 590–599 (2008).
226. Collins, M. N. & Birkinshaw, C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Mater Sci: Mater Med* **19**, 3335–3343 (2008).
227. Khunmanee, S., Jeong, Y. & Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng* **8**, (2017).

228. Shelby, M. D., Gutierrez-Espeleta, G. A., Generoso, W. M. & McFee, A. F. Mouse dominant lethal and bone marrow micronucleus studies on methyl vinyl sulfone and divinyl sulfone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **250**, 431–437 (1991).
229. La Rocca, P. T., Carlson, G. P. & Fuller, G. C. Relationship between sulfhydryl reactivity and toxicity of vinyl sulfone molluscicidal agents. *Toxicology and Applied Pharmacology* **31**, 222–232 (1975).
230. Ahmad, Z. *et al.* Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. *Regen Biomater* **2**, 77–85 (2015).
231. Cornwell, K. G., Lei, P., Andreadis, S. T. & Pins, G. D. Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions. *J. Biomed. Mater. Res.* **80A**, 362–371 (2007).
232. Buttafoco, L. *et al.* Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* **27**, 724–734 (2006).
233. Lepvrier, E., Doigneaux, C., Moullintraffort, L., Nazabal, A. & Garnier, C. Optimized Protocol for Protein Macrocomplexes Stabilization Using the EDC, 1-Ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide, Zero-Length Cross-Linker. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac502561e> (2014) doi:10.1021/ac502561e.
234. Tomihata, K. & Ikada, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 243–251 (1997).
235. Park, S.-N., Lee, H. J., Lee, K. H. & Suh, H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen–hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomaterials* **24**, 1631–1641 (2003).
236. Huerta-Angeles, G. *et al.* Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of substitution suitable for production of water resistant nanofibers. *Carbohydrate Polymers* **137**, 255–263 (2016).
237. Shah, C. B. & Barnett, S. M. Swelling behavior of hyaluronic acid gels. *Journal of Applied Polymer Science* **45**, 293–298 (1992).
238. Buhren, B. A. *et al.* Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *European Journal of Medical Research* **21**, (2016).
239. Csoka, A. B., Frost, G. I. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* **20**, 499–508 (2001).
240. Frost, G. I., Csóka, T. B., Wong, T. & Stern, R. Purification, Cloning, and Expression of Human Plasma Hyaluronidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**, 10–15 (1997).
241. Nieuwoudt, A., Appleby, C. E. & Mukhopadhyay, S. Native Tissue Repair and Principles of Wound Healing: Introducing the Concept of Regenerative Surgery in Vaginal Prolapse Repair. *Journal of Clinical Gynecology and Obstetrics* **4**, 197–202 (2015).
242. Kenawy, E.-R. *et al.* Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* **81**, 57–64 (2002).
243. Gilchrist, S. E. *et al.* Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections. *Journal of Controlled Release* **170**, 64–73 (2013).
244. Huang, L.-Y., Branford-White, C., Shen, X.-X., Yu, D.-G. & Zhu, L.-M. Time-engineered biphasic drug release by electrospun nanofiber meshes. *International Journal of Pharmaceutics* **436**, 88–96 (2012).

245. Jiang, H., Wang, L. & Zhu, K. Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release* **193**, 296–303 (2014).
246. Lu, Y. *et al.* Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **8**, 654–677 (2016).
247. Khalf, A. & Madihally, S. V. Recent advances in multiaxial electrospinning for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **112**, 1–17 (2017).
248. Xu, X. *et al.* Preparation of Core-Sheath Composite Nanofibers by Emulsion Electrospinning. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 1637–1642 (2006).
249. Hu, J., Prabhakaran, M. P., Tian, L., Ding, X. & Ramakrishna, S. Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility. *RSC Adv.* **5**, 100256–100267 (2015).
250. Kim, G.-M., Simon, P. & Kim, J.-S. Electrospun PVA/HAp nanocomposite nanofibers: biomimetics of mineralized hard tissues at a lower level of complexity. *Bioinspir. Biomim.* **3**, (2008).
251. Zhang, Z. *et al.* Fabrication of silver nanoparticles embedded into polyvinyl alcohol (Ag/PVA) composite nanofibrous films through electrospinning for antibacterial and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activities. *Materials Science and Engineering: C* **69**, 462–469 (2016).
252. Zhang, C.-L. & Yu, S.-H. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4423–4448 (2014).
253. Chunder, A., Sarkar, S., Yu, Y. & Zhai, L. Fabrication of ultrathin polyelectrolyte fibers and their controlled release properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58**, 172–179 (2007).
254. Park, C. H., Kim, K.-H., Lee, J.-C. & Lee, J. In-situ nanofabrication via electrohydrodynamic jetting of countercharged nozzles. *Polym. Bull.* **61**, 521–528 (2008).
255. Dong, H., Wang, D., Sun, G. & Hinestroza, J. P. Assembly of Metal Nanoparticles on Electrospun Nylon 6 Nanofibers by Control of Interfacial Hydrogen-Bonding Interactions. *Chem. Mater.* **20**, 6627–6632 (2008).
256. Rujitanaroj, P., Pimpha, N. & Supaphol, P. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer* **49**, 4723–4732 (2008).
257. Zahedi, P. *et al.* Preparation and performance evaluation of tetracycline hydrochloride loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) blends. *Journal of Applied Polymer Science* **124**, 4174–4183 (2012).
258. Kim, K. *et al.* Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *Journal of Controlled Release* **98**, 47–56 (2004).
259. Semnani, K., Shams-Ghahfarokhi, M., Afrashi, M., Fakhrali, A. & Semnani, D. Antifungal Activity of Eugenol Loaded Electrospun PAN Nanofiber Mats Against *Candida Albicans*. *Curr Drug Deliv* **15**, 860–866 (2018).
260. Santos, V. A. dos, Viera, P. V. A., Oliveira, A. M. de, Zanin, M. H. A. & Borsatti, M. A. Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. *Braz Oral Res* **28**, 1–6 (2014).
261. Jiang, H., Fang, D., Hsiao, B., Chu, B. & Chen, W. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **15**, 279–296 (2004).

262. Jiang, Y.-N., Mo, H.-Y. & Yu, D.-G. Electrospun drug-loaded core–sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *International Journal of Pharmaceutics* **438**, 232–239 (2012).
263. Meng, Z. X. *et al.* Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84**, 97–102 (2011).
264. Xu, X., Chen, X., Ma, P., Wang, X. & Jing, X. The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **70**, 165–170 (2008).
265. Liu, S. *et al.* Inhibition of orthotopic secondary hepatic carcinoma in mice by doxorubicin-loaded electrospun polylactide nanofibers. *J. Mater. Chem. B* **1**, 101–109 (2012).
266. Xie, J., Tan, R. S. & Wang, C.-H. Biodegradable microparticles and fiber fabrics for sustained delivery of cisplatin to treat C6 glioma in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **85A**, 897–908 (2008).
267. Wright, V. Historical overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Rheumatol.* **34 Suppl 1**, 2–4 (1995).
268. Barnes, P. J., Adcock, I., Spedding, M. & Vanhoutte, P. M. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* **14**, 436–441 (1993).
269. Vane, J. R. & Botting, R. M. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine* **104**, 2S-8S (1998).
270. Donnell, J. R. & Frisbie, D. D. Use of firocoxib for the treatment of equine osteoarthritis. *Veterinary Medicine: Research and Reports* **5**, 159–168 (2014).
271. Gøtzsche, P. C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ* **320**, 1058–1061 (2000).
272. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J Int Med Res* **37**, 1528–1542 (2009).
273. Xu, W. & Larbi, A. Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. *Experimental Gerontology* **107**, 98–101 (2018).
274. Chen, M. R. & Dragoo, J. L. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* **21**, 540–549 (2013).
275. Lisboa, F. A. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may affect cytokine response and benefit healing of combat-related extremity wounds. *Surgery* **161**, 1164–1173 (2017).
276. NAPROXÈNE SODIQUE TEVA - EurekaSanté par VIDAL. *EurekaSanté* <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-gp1600-NAPROXENE-SODIQUE-TEVA.html>.
277. NAPROSYNE - EurekaSanté par VIDAL. *EurekaSanté* <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-onapro01-NAPROSYNE.html>.
278. NAPROXÈNE SODIQUE EG - EurekaSanté par VIDAL. <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-gp5274-NAPROXENE-SODIQUE-EG.html>.
279. Yalkowsky, S. H., He, Y., Jain, P., He, Y. & Jain, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. (CRC Press, 2016). doi:10.1201/EBK1439802458.
280. Erden, N. & Çelebi, N. A study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* **48**, 83–89 (1988).

281. Grandelli, H. E., Stickle, B., Whittington, A. & Kiran, E. Inclusion complex formation of β -cyclodextrin and Naproxen: a study on exothermic complex formation by differential scanning calorimetry. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* **77**, 269–277 (2013).
282. Wang, J. & Warner, I. M. Studies of the Naproxen: β -Cyclodextrin Inclusion Complex. *Microchemical Journal* **48**, 229–239 (1993).
283. Otero-Espinar, F. J., Anguiano-Igea, S., García-González, N., Vila-Jato, J. L. & Blanco-Méndez, J. Interaction of naproxen with β -cyclodextrin in solution and in the solid state. *International Journal of Pharmaceutics* **79**, 149–157 (1992).
284. Canbolat, M. F., Celebioglu, A. & Uyar, T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **115**, 15–21 (2014).
285. Das, S. & Subuddhi, U. Cyclodextrin Mediated Controlled Release of Naproxen from pH-Sensitive Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels for Colon Targeted Delivery. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 14192–14200 (2013).
286. Ganza-Gonzalez, A., Vila-Jato, J. L., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F. J. & Blanco-Méndez, J. A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* **106**, 179–185 (1994).
287. Lee, B.-J. & Lee, J.-R. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water-soluble naproxen by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 22–26 (1995).
288. Frijlink, H. W. *et al.* The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharm. Res.* **8**, 380–384 (1991).
289. Mura, P., Maestrelli, F. & Cirri, M. Ternary systems of naproxen with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and aminoacids. *International Journal of Pharmaceutics* **260**, 293–302 (2003).
290. Bettinetti, G., Gazzaniga, A., Mura, P., Giordano, F. & Setti, M. Thermal behaviour and dissolution properties of naproxen in combinations with chemically modified β -Cyclodextrins. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **18**, 39–53 (1992).
291. Espinar, F. J. O., Igea, S. A., Méndez, J. B. & Jato, J. L. V. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* **70**, 35–41 (1991).
292. Otero-Espinar, F. J., Anguiano-Igea, S., García-Gonzalez, N., Vila-Jato, J. L. & Blanco-Méndez, J. Oral bioavailability of naproxen- β -cyclodextrin inclusion compound. *International Journal of Pharmaceutics* **75**, 37–44 (1991).
293. Junco, S., Casimiro, T., Ribeiro, N., Ponte, M. N. D. & Marques, H. C. A Comparative Study of Naproxen – Beta Cyclodextrin Complexes Prepared by Conventional Methods and Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Inclusion Phenomena* **44**, 117–121 (2002).
294. Junco, S., Casimiro, T., Ribeiro, N., Ponte, M. N. D. & Marques, H. M. C. Optimisation of Supercritical Carbon Dioxide Systems for Complexation of Naproxen : Beta-Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena* **44**, 69–73 (2002).
295. Kayaci, F., Ertas, Y. & Uyar, T. Enhanced Thermal Stability of Eugenol by Cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated in Electrospun Polymeric Nanofibers. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8156–8165 (2013).

296. Kayaci, F., Sen, H. S., Durgun, E. & Uyar, T. Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol–cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. *Food Research International* **62**, 424–431 (2014).
297. Javadzadeh, Y. *et al.* Preparation and physicochemical characterization of naproxen–PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **81**, 498–502 (2010).
298. Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **101**, 238–250 (2014).
299. Davies, O. R. *et al.* Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 373–387 (2008).
300. Champeau, M., Thomassin, J.-M., Tassaing, T. & Jérôme, C. Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. *Journal of Controlled Release* **209**, 248–259 (2015).
301. Brunner, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* **67**, 21–33 (2005).
302. Duarte, A. R. C., Costa, M. S., Simplício, A. L., Cardoso, M. M. & Duarte, C. M. M. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **308**, 168–174 (2006).
303. Kazarian, S. G. & Martirosyan, G. G. Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR–IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP. *International Journal of Pharmaceutics* **232**, 81–90 (2002).
304. Hussain, Y. A. & Grant, C. S. Ibuprofen impregnation into submicron polymeric films in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* **71**, 127–135 (2012).
305. Ma, S.-L., Lu, Z.-W., Wu, Y.-T. & Zhang, Z.-B. Partitioning of drug model compounds between poly(lactic acid)s and supercritical CO₂ using quartz crystal microbalance as an in situ detector. *The Journal of Supercritical Fluids* **54**, 129–136 (2010).
306. Shen, Z. *et al.* CO₂-assisted fiber impregnation. *Polymer* **49**, 1579–1586 (2008).
307. Dias, A. M. A. *et al.* Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. *International Journal of Pharmaceutics* **408**, 9–19 (2011).
308. Cortesi, A., Alessi, P., Kikic, I., Kirchmayer, S. & Vecchione, F. Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization. *The Journal of Supercritical Fluids* **19**, 61–68 (2000).
309. López-Periago, A. *et al.* Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug–matrix interactions. *The Journal of Supercritical Fluids* **48**, 56–63 (2009).
310. Argemí, A., López-Periago, A., Domingo, C. & Saurina, J. Spectroscopic and chromatographic characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**, 456–462 (2008).
311. Masmoudi, Y., Ben Azzouk, L., Forzano, O., Andre, J.-M. & Badens, E. Supercritical impregnation of intraocular lenses. *The Journal of Supercritical Fluids* **60**, 98–105 (2011).
312. Natu, M. V., Gil, M. H. & de Sousa, H. C. Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications. *The Journal of Supercritical Fluids* **47**, 93–102 (2008).

313. Braga, M. E. M. *et al.* Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. *The Journal of Supercritical Fluids* **44**, 245–257 (2008).
314. Dias, A. M. A. *et al.* Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids* **74**, 34–45 (2013).
315. Škerget, M., Knez, Ž. & Knez-Hrnčič, M. Solubility of Solids in Sub- and Supercritical Fluids: a Review. *J. Chem. Eng. Data* **56**, 694–719 (2011).
316. Sun, X.-Z., Williams, G. R., Hou, X.-X. & Zhu, L.-M. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **94**, 147–153 (2013).
317. Li, J., Chen, J. & Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* **25**, 9–18 (2007).
318. Nesseem, D. I., Eid, S. F. & El-Houseny, S. S. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sciences* **89**, 430–438 (2011).
319. Crespy, D. Chapter 7: Electrospinning of Nanoparticles. in *Electrospinning* 121–135 (2015). doi:10.1039/9781849735575-00121.
320. Zhang, C.-L. & Yu, S.-H. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4423–4448 (2014).
321. Salata, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* **2**, 3 (2004).
322. Nam, J.-M., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* **301**, 1884–1886 (2003).
323. Ho, P.-L. Magnetic nanoparticles for pathogen detection. *Pathology* **46**, S45 (2014).
324. Tan, W. *et al.* Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Medicinal Research Reviews* **24**, 621–638 (2004).
325. Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S. & Moudgil, B. Nanoparticles for bioimaging. *Advances in Colloid and Interface Science* **123–126**, 471–485 (2006).
326. Nasimi, P. & Haidari, M. Medical Use of Nanoparticles: Drug Delivery and Diagnosis Diseases. *International Journal of Green Nanotechnology* **1**, 1943089213506978 (2013).
327. Rizvi, S. A. A. & Saleh, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J* **26**, 64–70 (2018).
328. Kohane, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **96**, 203–209 (2007).
329. Delmas, T. *et al.* Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *Journal of Colloid and Interface Science* **360**, 471–481 (2011).
330. Navarro, F. P. *et al.* Lipid nanoparticle vectorization of indocyanine green improves fluorescence imaging for tumor diagnosis and lymph node resection. *J Biomed Nanotechnol* **8**, 730–741 (2012).
331. Lainé, A.-L. *et al.* Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *Journal of Controlled Release* **188**, 1–8 (2014).
332. Goutayer, M. *et al.* Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: Assessment by in vivo fluorescence imaging. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **75**, 137–147 (2010).
333. Mérian, J. Développement et caractérisation in vivo de nanoparticules lipidiques biocompatibles au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence et nucléaire. (Paris 5, 2012).

334. Fortin, P.-Y. *et al.* Detection of brain tumors using fluorescence diffuse optical tomography and nanoparticles as contrast agents. *J Biomed Opt* **17**, 126004 (2012).
335. Navarro, F. P. *et al.* Preparation and characterization of mTHPC-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **130**, 161–169 (2014).
336. Bayon, E. Nouveau système de délivrance d'antigènes à base de nanoparticules lipidiques (Lipidots) pour formulation vaccinale. (Université Grenoble Alpes, 2018).
337. Racine, L. *et al.* Time-Controllable Lipophilic-Drug Release System Designed by Loading Lipid Nanoparticles into Polysaccharide Hydrogels. *Macromol. Biosci.* (2017) doi:10.1002/mabi.201700045.
338. Gravier, J. *et al.* FRET Imaging Approaches for in Vitro and in Vivo Characterization of Synthetic Lipid Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **11**, 3133–3144 (2014).
339. Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *JBO* **6**, 287–292 (2001).
340. Gravier, J. *et al.* FRET Imaging Approaches for in Vitro and in Vivo Characterization of Synthetic Lipid Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **11**, 3133–3144 (2014).
341. Jacquart, A. *et al.* LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging. *J Biomed Opt* **18**, 101311 (2013).
342. Varache, M., Escudé, M., Laffont, C., Rustique, E. & Couffin, A.-C. Development and validation of an HPLC-fluorescence method for the quantification of IR780-oleyl dye in lipid nanoparticles. *Int J Pharm* **532**, 779–789 (2017).
343. Pardue, E. L., Ibrahim, S. & Ramamurthi, A. Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* **4**, 203–214 (2008).
344. Chay, S. K. *et al.* Evaluation of the taste-masking effects of (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin on ranitidine hydrochloride; a combined biosensor, spectroscopic and molecular modelling assessment. *RSC Adv.* **8**, 3564–3573 (2018).
345. Huang, C. *et al.* Needleless Electrospinning of Polystyrene Fibers with an Oriented Surface Line Texture. *Journal of Nanomaterials* (2012) doi:10.1155/2012/473872.
346. Zhang, Q. *et al.* Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today* (2017) doi:10.1016/j.drudis.2017.05.007.
347. Li, L. & Hsieh, Y.-L. Ultra-fine polyelectrolyte fibers from electrospinning of poly(acrylic acid). *Polymer* **46**, 5133–5139 (2005).
348. Li, J. *et al.* Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 114–120 (2006).
349. Celebioglu, A. & Uyar, T. Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives. *Nanoscale* 621–631 (2012).
350. Kayaci, F. & Uyar, T. Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers* **90**, 558–568 (2012).
351. Uyar, T., Balan, A., Toppare, L. & Besenbacher, F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanofibers. *Polymer* **50**, 475–480 (2009).
352. Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743–1754 (1998).

353. Sadlej-Sosnowska, N., Kozerski, L., Bednarek, E. & Sitkowski, J. Fluorometric and NMR Studies of the Naproxen–Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solutions. *Journal of Inclusion Phenomena* **37**, 383–394 (2000).
354. Canbolat, M. F., Celebioglu, A. & Uyar, T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **115**, 15–21 (2014).
355. Krischak, G. D., Augat, P., Claes, L., Kinzl, L. & Beck, A. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *J Wound Care* **16**, 76–78 (2007).
356. Ting, S. S. T., Tomasko, D. L., Foster, N. R. & Macnaughton, S. J. Solubility of naproxen in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **32**, 1471–1481 (1993).
357. Olesen, B. W. THERMAL COMFORT. *Technical review - Bruel & Kjaer English ed.* 3–41 (1982).
358. Guillory, J. K. Handbook of Aqueous Solubility Data By Samuel H. Yalkowsky and Yan He. CRC Press, Boca Raton, FL. 2003. xii + 1496 pp. 18 × 26 cm. ISBN 0-89493-1532-8. \$299.95. *J. Med. Chem.* **46**, 4213–4213 (2003).
359. Sun, X.-Z., Williams, G. R., Hou, X.-X. & Zhu, L.-M. Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **94**, 147–153 (2013).
360. Nesseem, D. I., Eid, S. F. & El-Houseny, S. S. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sciences* **89**, 430–438 (2011).

COMMUNICATIONS LIEES AUX TRAVAUX DE THESE

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été valorisés de différentes manières, par la publication d'un article ou lors de communication orales ou écrites.

Article publié :

M. SEON-LUTZ, A.-C. COUFFIN, S. VIGNOUD, G. SCHLATTER, et A. HEBRAUD, « Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid / cyclodextrin nanofibers: Towards wound dressing with controlled drug release », *Carbohydr. Polym.*, vol. 207, p. 276-287, mars 2019.

Communications :

M. SEON-LUTZ, A.-C. COUFFIN, S. VIGNOUD, G. SCHLATTER, et A. HEBRAUD, Electrospin, 4th international conference on electrospinning, Otranto, Italie, juin 2016 (Poster)

M. SEON-LUTZ, A.-C. COUFFIN, S. VIGNOUD, G. SCHLATTER, et A. HEBRAUD, 2nd International EPNOE Junior Scientists meeting, Sofia Antipolis, France, octobre 2016 (Présentation orale)

M. SEON-LUTZ, A.-C. COUFFIN, S. VIGNOUD, G. SCHLATTER, et A. HEBRAUD, Nanotech, Anaheim, Etats-Unis, mai 2018 Nanotech (Poster)

M. SEON-LUTZ, A.-C. COUFFIN, S. VIGNOUD, G. SCHLATTER, et A. HEBRAUD, Nanotech, Boston, Etats-Unis, Juin 2019 Nanotech (Présentation orale)

Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid / cyclodextrin nanofibers: towards wound dressing with controlled drug release

Morgane Seon-Lutz^{1,3}, Anne-Claude Couffin^{1,2}, Séverine Vignoud^{1,2}, Guy Schlatter³, Anne Hébraud³

¹CEA-LETI, Microtechnologies for Biology and Healthcare Division, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

²Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

³ ICPEES, Institut de Chimie et Procédé pour l'Énergie l'Environnement et la Santé, CNRS UMR 7515, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

*Corresponding author: Anne Hébraud, anne.hebraud@unistra.fr

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is widely investigated due to its high potential for wound dressing applications. The fabrication of biomimetic HA-based scaffolds by electrospinning is thus extensively studied. However, HA is often dissolved in toxic organic solvents to allow the efficient production of electrospun nanofibers. Indeed, although HA is soluble in water, its ionic nature leading to long-range electrostatic interactions and the presence of counter ions induce a dramatic increase of the viscosity of aqueous HA solutions without insuring enough chain entanglements necessary for a stable and efficient electrospinning. In this study, biocompatible insoluble HA-based nanofibers were fabricated by electrospinning in pure water. To this end, poly(vinyl alcohol) (PVA) was added as a carrier polymer and it was found that the addition of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) stabilized the process of electrospinning and led to the efficient formation of uniform nanofibrous scaffolds. An in situ crosslinking process of the scaffolds is also proposed, insuring a whole fabrication process without any toxicity. Furthermore, the beneficial presence of HP β CD in the HA-based scaffolds paves the way for wound dressing applications with controlled drug encapsulation-release properties. As a proof of concept, naproxen (NAP), a non-steroidal anti-inflammatory drug was chosen as a model drug. NAP was impregnated into the scaffolds either in aqueous solution or under supercritical CO₂. The resulting functional scaffolds showed a regular drug release profile along several days without losing the fibrous structure. This study proposes a simple approach to form stable HA-based nanofibrous scaffolds

embedding HP β CD using water as the only solvent, enabling the development of safe functional wound dressings.

Keywords

Nanofibers, hyaluronic acid, electrospinning, wound dressing, cyclodextrin, drug release

1. Introduction

Scaffolds produced by electrospinning present high surface/volume ratio, porosity and three-dimensional organization, which make these types of materials ideal candidates for wound dressing applications. Indeed, electrospun nanofibers can be applied as exudate absorbers, membranes for oxygen and vapor permeation, barriers against microbial colonization (Mele, 2016). Furthermore, drugs can be embedded in electrospun scaffolds. Their possible controlled release to a targeted site, lowering side effects compared to oral or parenteral administration, was demonstrated (Q. Zhang et al., 2017).

Nanofibrous membranes are capable of mimicking the structure of the native extracellular matrix (ECM), which is mainly composed of proteins and polysaccharides fibers ranging from tens to several hundreds of nanometers in diameter (Lee, Jeong, Kang, Lee, & Park, 2009). Hyaluronic acid (HA) is a linear natural polysaccharide composed of alternating (1 \rightarrow 4)- β linked D-glucuronic and (1 \rightarrow 3)- β linked N-acetyl-D-glucosamine residues. It can be found in the ECM of connective tissues. HA is involved in different steps during the wound healing, activating and moderating the inflammatory response and reducing scar formation (W. Y. Chen & Abatangelo, 1999; Kogan, Šoltés, Stern, & Gemeiner, 2007). In order to produce structures that are as close as possible to those of natural tissues, electrospinning of HA, is highly desirable. Because HA is a water soluble polymer, its electrospinning in water is particularly interesting for obvious toxicity reasons. However, it is difficult to electrospin from pure water due to its high surface tension, and chain stiffness that results from the long-electrostatic interactions and intramolecular hydrogen bonds, increasing the viscosity without favoring chain entanglements (L. Li & Hsieh, 2005; Shenoy, Bates, Frisch, & Wnek, 2005). Therefore, it has been electrospun at high pH in aqueous ammonium solutions (Brenner, Schiffman, Thompson, Toth, &

Schauer, 2012), or in the presence of DMF at 40°C to reduce the surface tension and viscosity (Junxing Li et al., 2006).

To the best of our knowledge, the only way reported to form nanofibers from pure HA solutions in water was carried out using an electro-blowing process combining air flow, heating and electrospinning (Um, Fang, Hsiao, Okamoto, & Chu, 2004; X. Wang et al., 2005). Otherwise, in order to stabilize the process and obtain regular nanofibers, HA has been blended with uncharged carrier polymers such as poly(ethylene oxide) (PEO) with a maximum HA:PEO weight ratio of 2:1 (Ahire, Robertson, van Reenen, & Dicks, 2017; Ji, Ghosh, Li, et al., 2006; Ji, Ghosh, Shu, et al., 2006; I. L. Kim, Khetan, Baker, Chen, & Burdick, 2013). However, PEO has a low melting temperature, between 40 and 80 °C depending on the molar mass (Sánchez-Soto, Ginés, Arias, Novák, & Ruiz-Conde, 2002), which subsequently limits potential annealing that may be necessary to crosslink the final material. Another carrier polymer, poly(vinyl alcohol) (PVA), with a higher melting temperature, that could allow annealing, has also been used in combination with HA but with a HA:PVA weight ratio that never exceeded 2:8 (Janković, Pelipenko, Škarabot, Mušević, & Kristl, 2013; K.-O. Kim, Akada, Kai, Kim, & Kim, 2011; Pelipenko, Kristl, Janković, Baumgartner, & Kocbek, 2013).

Among the molecules which are well-known for their easiness to be electrospun in water, cyclodextrin (CD), an FDA approved cyclic oligosaccharides consisting of 6, 7 or 8 (α -1,4-)-linked α -D-glucopyranose forming a truncated conic shape, shows a high potential of application. Indeed, CD can be electrospun in water without the addition of a carrier polymer thanks to the presence of favorable supramolecular interactions (Celebioglu & Uyar, 2012). Furthermore, it has been reported that CD can improve the stability of the electrospinning process as observed in the cases of PVA/ β -CD (W. Zhang, Chen, & Diao, 2011), zein/ α -, β - or γ -CD (Kayaci & Uyar, 2012) and PMMA/ α -, β - or γ -CD (Uyar, Balan, Toppare, & Besenbacher, 2009) systems. Moreover, the conic shape of CDs shows a hydrophobic internal cavity and a hydrophilic external surface (Szejtli, 1998) favoring the formation of noncovalent supramolecular host-guest inclusion complexes with a wide range of compounds including drugs (Loftsson, Jarho, Måsson, & Järvinen, 2005). Inclusion into CD cavities has been reported as a successful strategy for increasing solubility and stability of drugs via supramolecular associations. Such complexes diffuse easier than the free drug which may enhance the drug bioavailability in the case when the solubility is the rate-limiting step (Otero-Espinar, Torres-Labandeira, Alvarez-Lorenzo, & Blanco-Méndez, 2010). There are many derivatives of CDs, among them, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) has shown a growing interest due to its improved complexation efficiency as well as its high water solubility (Banik, Gogoi, & Saikia, 2012; Gould & Scott, 2005).

In the present work, our hypothesis was that HP β CD could be a molecule of choice favoring the efficient processing of HA by electrospinning in water while bringing to the produced scaffolds drug encapsulation-release properties. Thus, one goal was to produce in an efficient manner HA-PVA-HP β CD electrospun nanofibers. However, both HA, PVA and HP β CD are soluble in water, and thus cannot be used directly as substrate for drug release because of prematurely aqueous dissolution in physiological conditions. Different studies have focused on the use of modified HA to allow a crosslinking step after electrospinning, involving a modification step of HA before its processing (Ji, Ghosh, Li, et al., 2006; I. L. Kim et al., 2013). It was also reported that efficient *in situ* crosslinking of non-modified HA is possible by using water soluble carbodiimide (Tomihata & Ikada, 1997). Here, an *in situ* crosslinking process with (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) is proposed. In order to prove that HA-PVA-HP β CD scaffolds can be used for drug delivery applications, naproxen (NAP) was selected as a model molecule to investigate the adsorption and release properties of the nanofibrous membranes. NAP is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) well-known to form inclusion complexes with HP β CD and commonly administered for the treatment of pain and inflammation, (Banik et al., 2012; Canbolat, Celebioglu, & Uyar, 2014; Sadlej-Sosnowska, Kozerski, Bednarek, & Sitkowski, 2000). Indeed, immediately after the injury, the natural response of the body results in an inflammatory phase. During this period, the administration of low-dose of NSAID is known to be beneficial because of its antiphlogistic and analgesic properties (M. R. Chen & Dragoo, 2013; Krischak, Augat, Claes, Kinzl, & Beck, 2007; Velnar, Bailey, & Smrkolj, 2009). Moreover, Lisboa et al. reported that treatment with NSAID of postoperative wounds decreases the concentrations of inflammatory cytokines and may contribute to a more favorable inflammatory response showing successful wound healing (Lisboa et al., 2017). Thus, NAP was loaded in the fibrous mat by impregnation either in aqueous solution or in supercritical CO₂ (Junco, Casimiro, Ribeiro, Ponte, & Marques, 2002a, 2002b; Ting, Tomasko, Foster, & Macnaughton, 1993). Finally, the release profiles were examined as a function of the drug loading methods.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP β CD, 97 %, Acros organics, DS = 5,1 determined by ¹H NMR as described in Malanga et al. (Malanga et al, 2016), see Fig. S2 for ¹H NMR spectrum and Fig. S3 for MALDI-TOF spectrum,), polyvinyl alcohol (PVA, Mowiol 18-88, Mw \approx 130 kg.mol⁻¹, 86.7-88.7 mol % hydrolysis, Sigma Aldrich), hyaluronic acid sodium salt (HA, cosmetic grade, Contipro, Mw = 57 kg.mol⁻¹

¹, $\bar{M}_n = 1.26$, determined by SEC, more details in Supplementary material), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, purum $\geq 98.0\%$ Fluka, Sigma Aldrich), N-Hydroxysuccinimide (NHS, 98+ % Alfa Aesar) and naproxen (NAP, Purity $\geq 99\%$, Bertin pharma) were used without further purification.

The water used as solvent was obtained from Millipore Milli-Q ultrapure water system (18.2 M Ω .cm).

2.2. Electrospinning

Firstly, 10 wt % PVA was dissolved in ultra-pure water by stirring 3 h at 90 °C under reflux and the obtained solution was left at room temperature to cool down (21 ± 3 °C). The selected compounds, HA and HP β CD were dissolved in water and mixed with PVA solution to obtain final blendings at desired concentrations. For HA and PVA polymers, the final concentrations of solutions were fixed at 6 % (w/w_{H2O}) whereas for HP β CD, the amount ranged from 0 to 40 % (w/w_{H2O}). Once mixed together, the final HA-PVA-HP β CD solution was stirred at room temperature for a minimum of 8 hours.

Then, 30 minutes before the electrospinning, both crosslinker reagents 2 % (w/w_{H2O}) of EDC and 1 % (w/w_{H2O}) NHS were dissolved in the HA-PVA-HP β CD solutions. All the unspecified percentages of this study are expressed in percentage of weight by weight of water (% w/w_{H2O}).

A homemade device with vertical jet direction and set up in a closed booth with controlled relative humidity, was used for electrospinning process. The device was composed of a multi-needles emitter (four 18 G needles) connected to a positive high-voltage power supply (Spellman SL10, +60 kV) and a rotating cylindrical collector connected to a negative high-voltage power supply (Spellman SL10, -30 kV). The emitter is mounted on a moving platform, allowing the formation of a membrane with uniform thickness. The polymer solution was pushed through the needle via a silicon feedline connected to a 5 mL syringe activated by a syringe pump (Harvard Apparatus, PHD 2000). The flow rate was set at 0.8 mL.h⁻¹, the needle and collector were separated from each other by 12 cm and the applied voltages at the emitter and the collector were respectively 45 and -2 kV. The relative humidity inside the booth was fixed at $30 \pm 5\%$.

2.3. CROSSLINKING AND FREEZE-DRYING

To activate the crosslinking reaction in the fibers, all membranes were annealed in an oven at 60 °C for 24 h and then left at room temperature for 1h to cool down. They were then immersed in a large crystallizer filled with water for 48 h (the water was changed several times during this period) in order to remove the residual EDC and NHS reagents and the byproducts. After this washing step, the membranes were dried in ambient conditions at 21 ± 3 °C, or placed in a freezer at -20 °C for 2 h and

then freeze-dried (4 h at -20 °C and 0.1 mbar, then at 0.1 mbar increase in temperature up to 20 °C at 0.1 °C.min⁻¹ and 1 h at 20 °C and 0.05 mbar). The complete elimination of EDC and NHS was verified by UV spectroscopy: membrane samples were immersed in PBS for 24 h, and the absorbance of the supernatant solution at 212 nm (maximum of absorbance for EDC and NHS) was measured. If there was zero absorbance, the membranes were then considered as ready to use.

2.4. In Vitro cytotoxicity

In vitro cytotoxicity measurements were performed according to the protocol previously described by Racine et al. (Racine et al., 2017). Briefly, electrospun membranes of 1 cm diameter were mounted on 24 well plate inserts (CellCrown) and sterilized under UV over a night. First, direct cytotoxicity was evaluated, where the materials are immersed in contact with culture medium (fibroblast cells in DMEM, new born calf serum (NBS) and Penicillin Streptomycin (PS)). Then, indirect cytotoxicity measurements were also performed, for which the membranes were first immersed in medium composed of DMEM, NBS and PS and then, the supernatant were remove and put in contact with culture medium. Empty CellCrowns were used as controls.

2.5. Drug loading

Naproxen (NAP) was loaded within membranes either by solution impregnation or by supercritical carbon dioxide (scCO₂) assisted impregnation. Each drug loading and release experiment was conducted in triplicate.

For the solution impregnation, electrospun membranes (30 ± 0.1 mg) were dipped into 500 mL of aqueous solution of NAP (40 mg.L⁻¹) at room temperature for 4 h on an orbital shaker (Stuart Scientific S05, at 25 rpm), then rinsed in distilled water and finally freeze-dried for 12 h using the same conditions as described previously.

For scCO₂ assisted impregnation, the membrane (30 ± 0.1 mg) was placed into the high pressure chamber (0.5 L) of the supercritical CO₂ deposition device (SFD-200, 31 Degrees) with 8 mg of NAP powder. CO₂ was injected at a flow rate of 50 g.min⁻¹ until reaching 120 bar (at 50 °C) and this pressure was maintained for 60 min. Then 50 g.min⁻¹ of CO₂ was injected in the chamber for 5 min in order to eliminate the excess of NAP and, at the end of the experiment, the system was slowly vented.

2.6. Drug release measurements

Drug loaded materials were placed into vials filled with 10 mL of phosphate buffer solution in a horizontal incubation shaker (Ecotron Infors HT, at 40 rpm and 33 °C, average temperature of the skin (Olesen, 1982)). At predetermined time points, 1 mL of the supernatant solution was taken out and the medium was returned to the system. The amount of drug was determined by UV-spectrophotometry (Varian Cary 300) at 272 nm (the absorption spectrum of naproxen is available in Fig. 7S in Supplementary information). The calibration curve was prepared by using stock solutions in 10 different concentrations between 1 and 15 mg.L⁻¹ of NAP. It showed linearity and acceptability with $R^2 \geq 0.99$. The experiments were conducted in triplicate and HA-PVA-HP β CD membranes without NAP were used as control.

In order to compare the drug release properties of nanofibers to a denser material, HA-PVA-HP β CD films were prepared. The HA-PVA- HP β CD solutions (6%, 6%, 10 %w/w_{H₂O}) were prepared as previously described and 2 % (w/w_{H₂O}) of EDC and 1 % (w/w_{H₂O}) NHS were added 30 min before pouring the solution into aluminum cups. The cast solution was then dried in an oven for 24 h at 60 °C. The impregnation of NAP into the films, was conducted in the same way as with the electrospun membranes.

2.7. Characterization

The structure and size of the nanofibers were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) on TESCAN Vega 3 (5 kV, 5 mm working distance, SE detector). Before imaging membranes, the samples were gold sputtered (Quorum Technologies Q150RS, for 100 s and at 20 mA). To measure the diameter of fibers, 100 measurements per sample were done on four different pictures and Image J software was used to determine the average diameter and the standard deviation.

The swelling of the fibers was studied by Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) on a Quanta FEG 250 (at 10 kV, relative humidities (RH) ranging from 20 to 90 % at 3 °C).

Surface tension of the HA-PVA-HP β CD solutions was measured at room temperature using pendant drop method on a Teclis Scientific Tracker tensiometer with a 500 μ L SGE Analytical Science glass syringe and a 18 G needle.

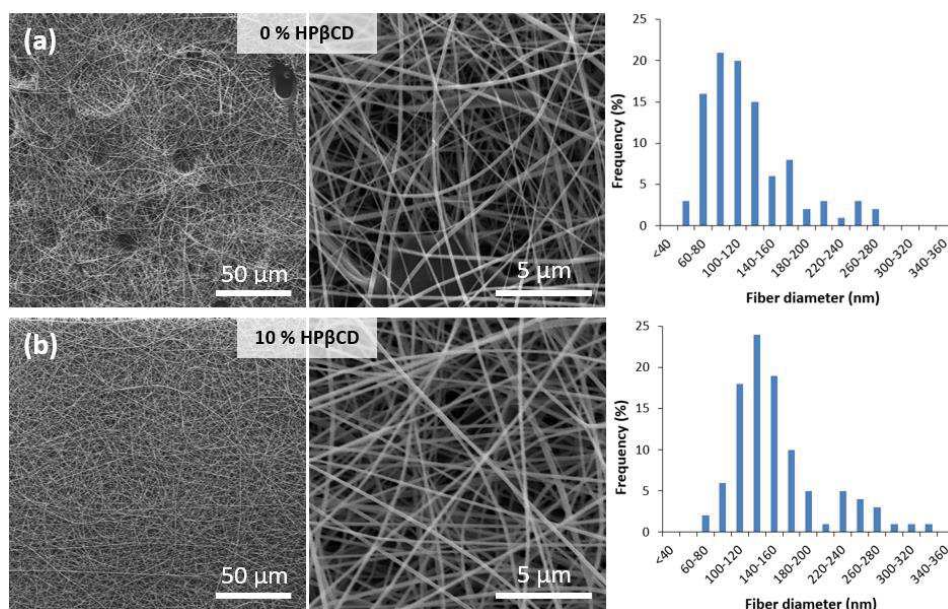
Rotational rheological assays were performed using a Anton Paar MCR 502 rheometer with a cone-plate system (CP50-1: cone diameter 50 mm, cone angle 1°) at a constant temperature of 25.0 °C. The viscosity of HA-PVA-HP β CD solutions were recorded for shear rates ranging from 1 to 100 s⁻¹. Raw materials and fibers were chemically characterized by infrared spectroscopy using the Attenuated Total Reflectance (ATR) mode with a Thermo scientific Nicolet iS10 spectrometer (spectra of 32 scans recorded in a range from 4000 to 400 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹).

The conductivity was measured at room temperature using a Mettler Toledo Seven Multi conductivity meter with a conductivity cell 710 InLab (Mettler Toledo).

3. Results and discussion

3.1. Electrospinning and crosslinking of HA-PVA-HP β CD nanofibers in water

One goal of this work was to prepare HA-based nanofibrous scaffolds in an efficient manner using only water as solvent during the electrospinning process. Thus, the solvent residue leakage from final materials should be limited thereby avoiding any toxic issue in future wound healing process. By using only water in whole manufacturing, the scale-up of the process is expected to proceed easily. The preparation of HA-based nanofibers under efficient and very stable electrospinning in pure water remains a challenge. In the present study, PVA was added as template polymer to HA solutions at different concentrations and the mixtures were subsequently electrospun. The highest HA:PVA ratio, of 1:1, to form electrospun nanofibers was obtained for concentrations of 6 % (w/w_{H₂O}) of each polymer in water. However, for this composition, the jet emitted from the Taylor cone was not stable and the formed nanofiber presented many defects such as beads and droplets (Fig. 1a). Knowing that several kinds of CDs allow the improvement of the stability of the electrospinning process, our hypothesis was that HP β CD could fulfill this behavior with HA.



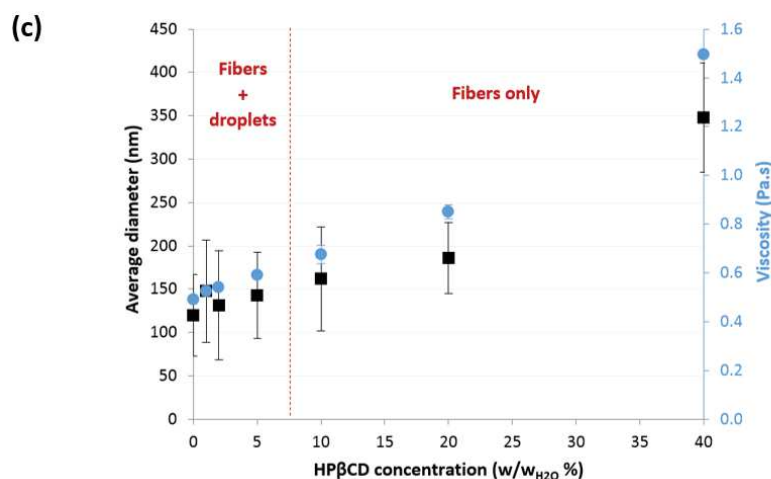


Figure 1: SEM images and fiber diameter distributions of HA-PVA-HPβCD fibers obtained from solutions of 6 % (w/w_{H2O}) HA, 6 % (w/w_{H2O}) PVA and a) 0 % (w/w_{H2O}) of HPβCD, b) 10 % (w/w_{H2O}) of HPβCD. c) Influence of the concentration of HPβCD on the average diameter of HA-PVA-HPβCD fibers and viscosity of HA-PVA-HPβCD solutions. ■, average diameter of the fibers; ●, viscosity of the HA-PVA-HPβCD solutions.

As expected, Fig. 1b shows that the addition of HPβCD in HA-PVA mixtures prevented the formation of droplets, favored the processability and led to the stable production of nanofibers during several hours of electrospinning. Nevertheless, the addition of HPβCD did not allow the decrease of the amount of PVA which appears as a key material in the formation of HA-based nanofibers. As shown in Fig. 1c, the average fiber diameter increases with the HPβCD concentration, ranging from 120 ± 50 nm for 0 % (w/w_{H2O}) of HPβCD to 348 ± 51 nm for 40 % (w/w_{H2O}) of HPβCD. For HPβCD concentrations lower than 10 % (w/w_{H2O}), many defects such as droplets were visible on the produced fibrous scaffolds. From 10 % (w/w_{H2O}) of HPβCD, the scaffolds are defect free and the nanofibers present a uniform geometry. The beneficial role of HPβCD in the process of electrospinning was investigated. We first thought that HPβCD acted as a surfactant. Indeed, when HPβCD is added in water, the surface tension decreases from 70.1 mN.m^{-1} for pure milli-Q water to 57 mN.m^{-1} for an aqueous solution with 10 % (w/w_{H2O}) HPβCD and 49.5 mN.m^{-1} with 40 % (w/w_{H2O}) HPβCD (Fig. S4). However, for the HA-PVA-HPβCD solutions the surface tension remains constant at 47 mN.m^{-1} . This value is imposed by the polymers and more specifically by PVA. Thus, HPβCD does not play a prevalent effect on the surface tension allowing the enhancement of the nanofiber production by electrospinning. The effect of HPβCD on the viscosity of the processed solution was also investigated (Fig 1c.). An increase of the viscosity of HA-PVA-HPβCD solutions with the concentration of HPβCD was observed, being tripled between 0 and 40 % (w/w_{H2O}) of HPβCD. The increase of the viscosity at a given amount of HA and PVA with the concentration of HPβCD could be ascribed to intermolecular interactions between HPβCD and both HA

and PVA. Indeed, HA and PVA exhibit favorable chemical structures allowing efficient hydrogen interactions with HP β CD, responsible of the increase of viscosity propitious to obtain uniform nanofibers.

The increase of the average diameter of the fibers with the concentration of HP β CD can be explained by the increase of the viscosity. Indeed, the viscosity generate a force opposed to the electrostatic repulsion, which is responsible for the reduction and the thinning of the jet of solution. But this phenomenon can also be explained by a change in the conductivity of the mixtures. Indeed, Uyar et al. prove that adding α , β or γ -CD could cause a change in the conductivity of polymer solutions (Kayaci & Uyar, 2012; Uyar et al., 2009). We also observed a decrease in conductivity of HA-PVA-HP β CD mixtures (with 6 % (w/w_{H2O}) of HA and 6 % (w/w_{H2O}) PVA) with the increase in HP β CD concentration. It varies from 4.1 mS.cm⁻¹ for a solution without HP β CD, to 3.3 mS.cm⁻¹ for a solution containing 10 % (w/w_{H2O}) of HP β CD and 1.6 mS.cm⁻¹ for 40 % (w/w_{H2O}) of HP β CD. A less conductive solution limits the stretching of the solution jet during electrospinning because of the decrease in the number of charges, which leads to the formation of fibers with higher diameters (Zong et al., 2002).

The following parts of the study focused on scaffolds obtained from HA-PVA-HP β CD solutions with 6 % (w/w_{H2O}) of HA, 6 % (w/w_{H2O}) of PVA and 10 % (w/w_{H2O}) of HP β CD allowing the formation of uniform nanofibers with the lowest PVA and HP β CD concentrations. For these concentrations, the specific viscosity was well above the entanglement concentration measured for the HA-PVA-HP β CD system, which is necessary to form fibers by electrospinning (Fig. S5) (C. Wang, Wang, & Hashimoto, 2016).

The constituents of the fibers being all soluble in water, it is necessary to crosslink the membranes to envisage wound dressing applications. Among the available crosslinking agents, EDC, a water soluble carbodiimide was chosen with NHS as coupling agents because they induce, in contrast with other reagents, less toxicity issues (Ahmad et al., 2015; Cornwell, Lei, Andreadis, & Pins, 2007). The coupling of EDC with NHS is known to form ester bonds between carboxylic acid groups and hydroxyl groups of HA itself or other molecules present at its side (Tomihata & Ikada, 1997).

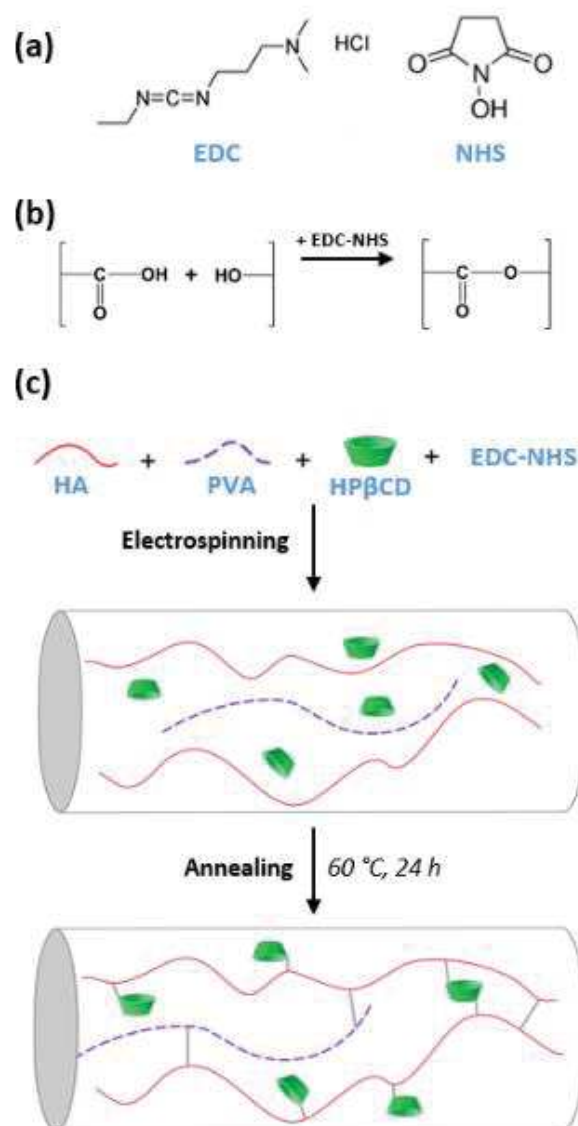


Figure 2: a) Chemical structures of EDC and NHS. b) Reaction scheme of in situ crosslinking. c) Structure of crosslinked HA-PVA-HP β CD fibers.

In order to broaden the scope of applications, it could be envisaged to incorporate functional compounds in the electrospun fibers. Because the bioactivity of such compounds could be lost during heating, the mildest annealing conditions allowing an efficient crosslinking were sought. Thus, an annealing step at 60 °C during 24 h was necessary to ensure the crosslinking for which the reaction scheme and the proposed resulting structure of the nanofibers are shown in Fig. 2.

Using IR spectroscopy and electron microscopies, crosslinked nanofibers were characterized in terms of chemical structure and morphology in order to evidence crosslinking step and insoluble properties of final material. Fig. 3 shows the IR spectra of HA-PVA-HP β CD uncrosslinked and crosslinked

nanofibers compared with those of HA, PVA and HP β CD alone. On the five spectra, the bands observed at 3340, 2930 and 1027 cm^{-1} were assigned to stretching vibration of -OH, -CH $_2$ and C-O respectively. For HA-PVA-HP β CD nanofibers, the band at 1256 cm^{-1} of -OH from PVA and the characteristic band at 1620 cm^{-1} from N-H of HA clearly appeared on the spectrum, which evidenced the presence of the two compounds in the final material. Unfortunately, for HP β CD there is no visible characteristic band that identifies the compound in presence of HA and PVA. The band at 1730 cm^{-1} , related to carbonyl groups of residual vinyl acetate groups in PVA, appears in both uncrosslinked and crosslinked HA-PVA-HP β CD nanofibers spectra. This band is also attributed to the ester groups formed during the crosslinking step. The absorbance at 1730 cm^{-1} was measured relatively to the intensity of the -CH $_2$ band at 2930 cm^{-1} as a reference which remains unchanged during the crosslinking reaction. An increase of $73 \pm 17 \%$ of the A_{1730}/A_{2930} ratio was assigned to the crosslinking, proving the formation of ester bonds during this step of the process.

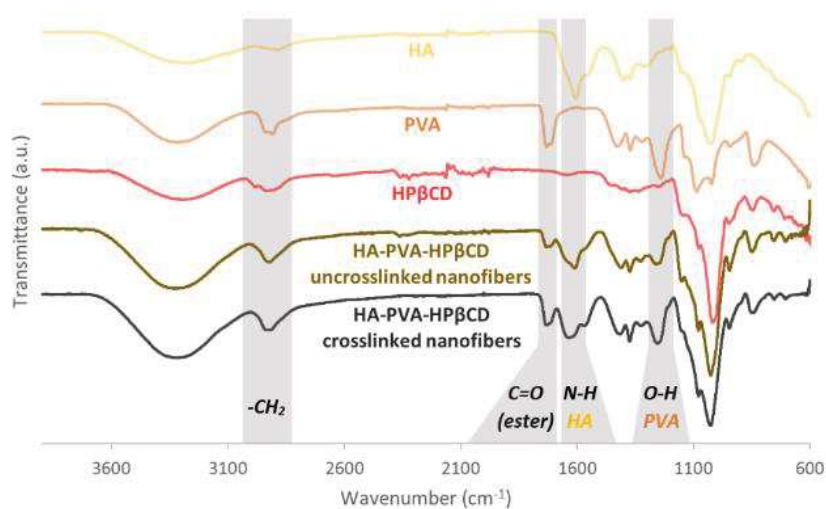


Figure 3: IR spectra of HA, PVA, HP β CD and HA-PVA-HP β CD uncrosslinked and crosslinked nanofibers.

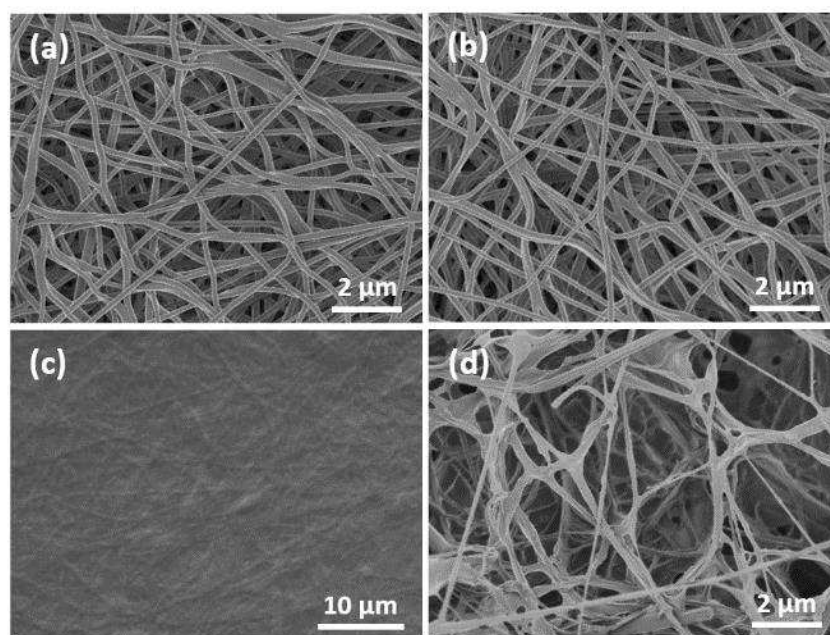


Figure 4: SEM images of cross-linked HA-PVA-HP β CD nanofibers. a) Before annealing. b) After annealing. c) After soaking in water for 48 h and drying in ambient conditions. d) After soaking in water for 48 h and freeze-drying.

Fig. 4 shows SEM images of HA-PVA-HP β CD nanofibers, before and after their crosslinking, after soaking in water for 48 h and drying in ambient conditions and after soaking in water and freeze-drying. As evidenced by SEM images, the fibers before (Fig. 4a) and after (Fig. 4b) annealing are smooth and uniform with no significant effect on the fiber diameter (i.e. 156 ± 31 nm before and 171 ± 68 nm after the thermal treatment). However, due to the propensity of crosslinked HA to swell in water (Huerta-Angeles et al., 2016; Shah & Barnett, 1992), the nanofibers fused and formed a film after soaking in water and drying in ambient conditions (Fig. 4c). As already observed in previous studies (Ji, Ghosh, Li, et al., 2006; Ji, Ghosh, Shu, et al., 2006), the addition of a freeze-drying step after immersion in water was carried out in order to keep the nanofibrous and porous morphology (Fig. 4d). To verify that the nanoporous structure is not due to the freeze drying step, an HA-PVA-HP β CD continuous film of the same composition as the fibers was immersed in water and freeze-dried in the same conditions. SEM pictures of the freeze-dried film showed that the material did not exhibit any porosity (Fig. S6). The nanostructure of the final membrane is therefore due to the combination of the electrospinning and freeze-drying steps.

In order to get more insight into the behavior of the membrane when it is in contact with a wound, a moist environment, the swelling of the nanofibers was investigated by environmental SEM (ESEM) as

a function of the relative humidity (RH). The pictures of uncrosslinked and crosslinked nanofibers and the variation of their average diameter as a function of RH are given in Fig. 5. The uncrosslinked fibers show a significant swelling between 60 % and 70 % of RH characterized by an increase of the average diameter from 259 ± 70 nm to 422 ± 126 nm respectively. When the RH reached 90 %, the fibers have completely fused to form a continuous film. On the contrary, the average diameter of crosslinked fibers remains constant whatever the RH. At a RH of 90 %, the fibers could be distinguished from each other even if they started to fuse in some points. This finding suggests that the crosslinking step is crucial to avoid any dissolution and fusion of the nanofibers themselves while limiting the swelling of final material. Unfortunately, as seen previously (Fig. 4c), this result is valid only in gaseous atmosphere, when the membrane is completely immersed in water, the crosslinking is not sufficient to prevent the fusing of fibers. The addition of a freeze-drying step is then necessary to preserve the fibrous structure of membranes.

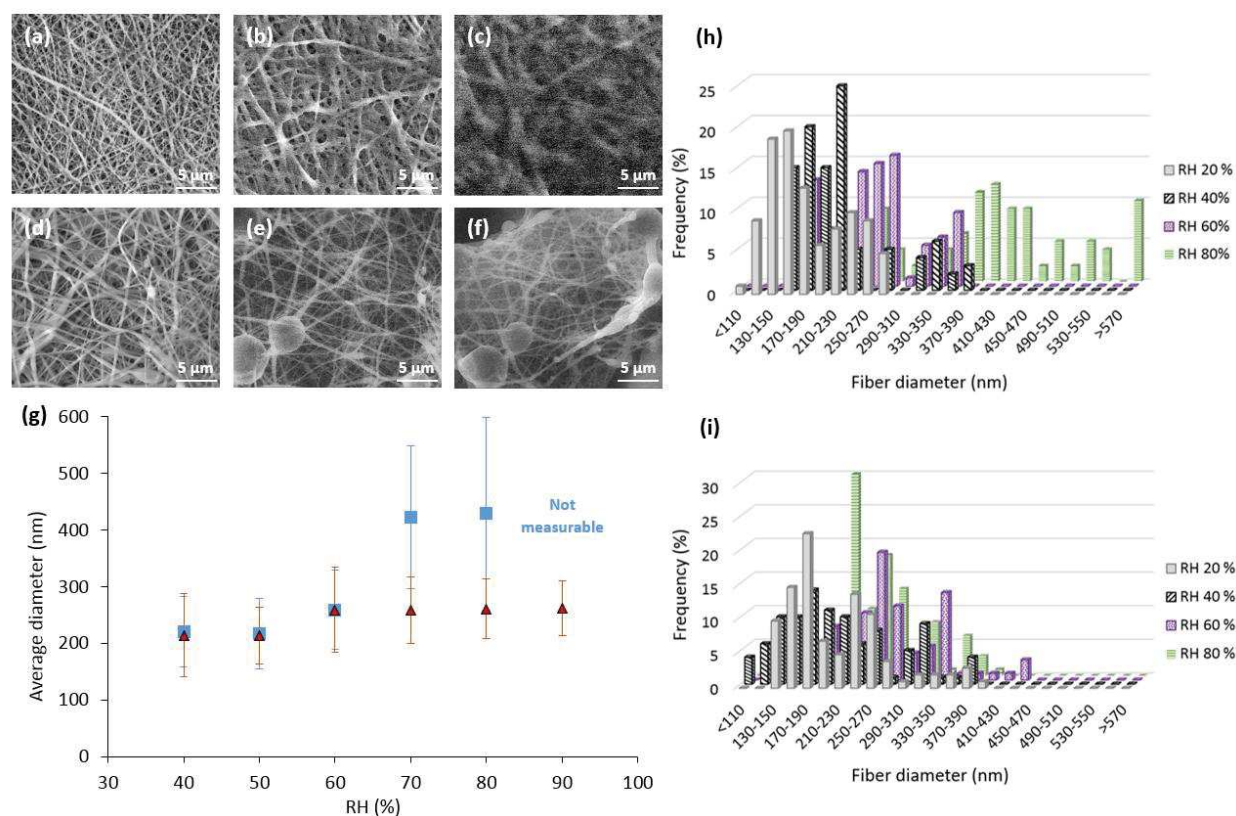


Figure 5: ESEM images of HA-PVA-HP β CD uncrosslinked fibers at a) RH = 40 %, b) RH = 70 %, c) RH = 90 %. Crosslinked fibers at d) RH = 40 %, e) RH = 70 %, f) RH = 90 %. g) Average diameter of the fibers as a function of RH of uncrosslinked fibers (■) and crosslinked fibers (▲), h) Fiber diameter distribution of HA-PVA-HP β CD uncrosslinked fibers, i) Fiber diameter distribution of HA-PVA-HP β CD crosslinked fibers

3.2. Towards wound dressing applications with controlled drug release properties

As the fibrous membrane is expected to be used for wound dressing, cytotoxicity tests were performed to demonstrate that it is not harmful to cells growing in contact with it. Moreover, cells were also cultured in the supernatant obtained after immersing the membrane for 24 h in culture medium composed of DMEM, NBCS and PS, in order to prove that no harmful product is released either in the liquid surrounding the fibers due to its degradation, as such product could migrate toward the wound.

The cytotoxicity of the HA-PVA-HP β CD nanofibers was evaluated after 24 h using NIH3T3 fibroblasts as cell model by WST-1 cytotoxicity assay which quantifies the metabolic activity of cell mitochondria reflecting the density of living cells (Fig. 6). The density of living cells cultured in medium which were in contact with HA-PVA-HP β CD nanofibers and in the supernatant was comparable to the positive and the CellCrown controls. This result confirms that HA-PVA-HP β CD membranes presented no cytotoxic behavior.

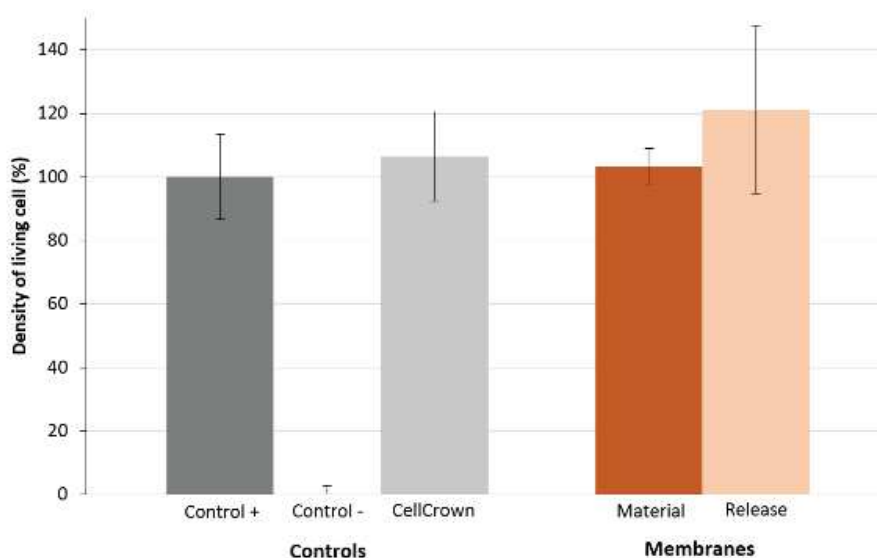


Figure 6: Density of living NIH3T3 fibroblasts after 24 h of incubation in direct (material) or indirect (release) contact with HA-PVA-HP β CD membranes. Control +: cells incubated in medium only, Control -: cells incubated in medium and H₂O₂ 10⁻² M, CellCrown: cells incubated in presence of empty cell crowns.

Beyond the biocompatibility of the final material, its loading and release capacity was investigated following impregnation of a drug within nanofibers. Two impregnation procedures were then tested in order to load naproxen (NAP) in the nanofibrous membranes. First, the membranes were immersed

in an aqueous solution containing the drug. This loading process is easy to perform but NAP being only slightly soluble in water (15.9 mg.L^{-1} at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Guillory, 2003)), the amount of drug that can be impregnated into the fibers is limited. Moreover, this process is time-consuming; the immersion step takes place in around 4 h, followed by a freezing and a freeze-drying step of 14 h necessary to keep the fibrous aspect. A second loading process was then developed using supercritical CO_2 (scCO_2). This supercritical fluid technology is promising for polymer implants since it allows the loading of drugs into an already manufactured matrix. The material is processed with solvent residue-free conditions and under mild temperature which is suitable for the loading of sensitive drugs because scCO_2 can solubilize many compounds and carry them into the material (Champeau, Thomassin, Tassaing, & Jérôme, 2015). Moreover the complexation of NAP with CD using scCO_2 has been reported in literature and showed similar properties to freeze-dried and spray-dried complexes and, unlike complexation by kneading, there is no remaining part of unencapsulated NAP (Junco et al., 2002a, 2002b). SEM pictures of HA-PVA-HP β CD nanofibers were taken after the loading of NAP in the membrane by immersion in aqueous solution as well as by scCO_2 (Fig. 7), showing that the nanofibrous morphology was preserved after each impregnation procedure.

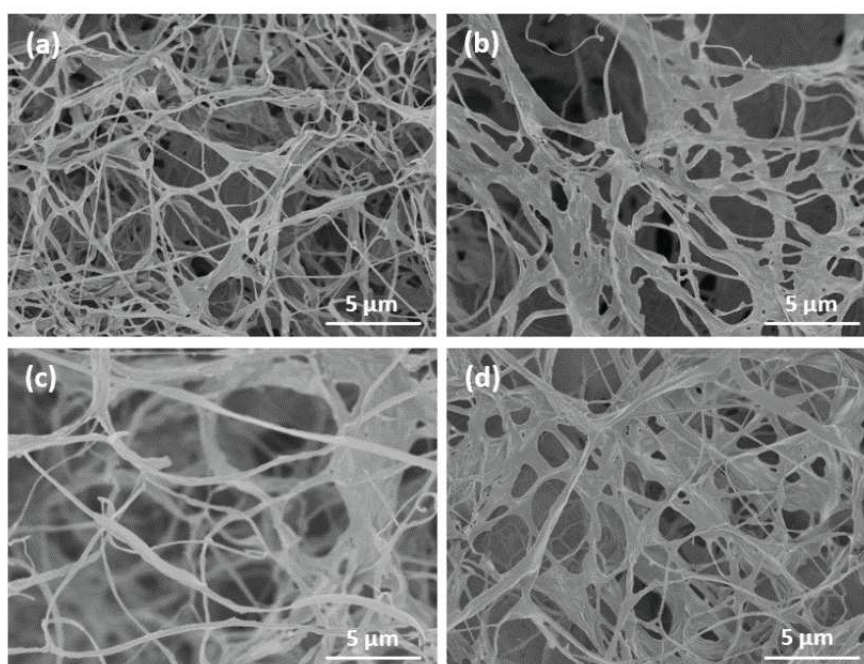


Figure 7: SEM images of HA-PVA-HP β CD fibers. a) After supercritical CO_2 impregnation. b) After impregnation by immersion. c) After supercritical CO_2 impregnation and 6 days of NAP release in PBS. d) After impregnation by immersion and 6 days of release in PBS.

The release kinetics of NAP from HA-PVA-HP β CD nanofibrous membranes impregnated either by aqueous solutions or supercritical CO₂ are shown in Fig. 8. The behavior of the nanofibrous membranes (30 ± 0.1 mg) were also compared with the one of continuous films of same composition (100 ± 0.1 mg, average thickness of 0.15 ± 0.01 mm). For each sample, after a slight burst release of the drug, a plateau was reached more or less rapidly depending on the samples. For materials impregnated in aqueous solutions, the total amount of released drug was more than two times higher for the nanofibrous membranes than for the films. The same feature was observed for the procedure under scCO₂ conditions for which the membranes released 5 times more drugs than the films. Moreover, the release profiles revealed that, for the films impregnated in aqueous solutions, 95 % of the amount of drug was released after only 2h30.

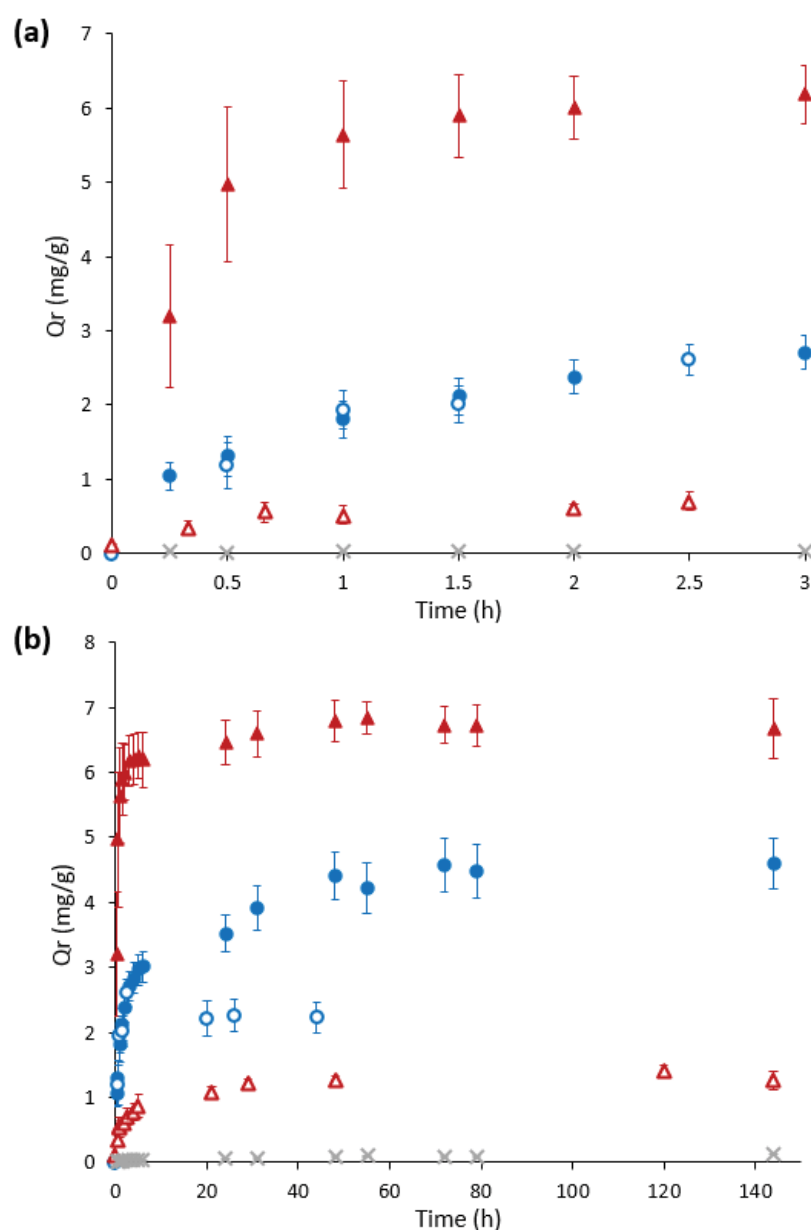


Figure 8: Amount of released NAP (Q_r) in PBS from HA-PVA-HP β CD membranes and films impregnated in scCO₂ and in aqueous solution during a) the first 6 hours (off-set) and b) during 150 h. Membrane impregnated in scCO₂ (▲); membrane impregnated in aqueous solution (●); film impregnated in aqueous solution (○); film impregnated in scCO₂ (△); control (x).

In comparison, the membranes showed a lower burst release effect, as 95 % release of NAP is reached only after 24 h in the case of scCO₂ impregnation procedure and after 48 h in the case of the impregnation in aqueous solutions. These observations seem to show that in the case of 0.15 mm thick films, naproxen does not absorb deep into the film but only near the surface, allowing the fast release of the drug. In the case of fibers of diameters of 170 nm, however the larger surface to volume ratio allows the penetration of the drug into the core of the fibers. A sustainable release of naproxen in

higher quantity is then obtained, which is in agreement with similar systems previously reported in the literature (Sun, Williams, Hou, & Zhu, 2013).

It has been shown that the inflammatory phase of a wound starts few minutes after the injury and reaches its maximum after around 24 hours (Jie Li, Chen, & Kirsner, 2007; Nieuwoudt, Appleby, & Mukhopadhyay, 2015). To benefit from the anti-inflammatory and analgesic effect of NAP, it is therefore important to deliver the NSAID at the right time. Thanks to their properties allowing a maximum of release during the first 24 hours, the HA-PVA-HP β CD membranes are ideal candidates to deliver NAP directly to the wound, thereby avoiding or weakening the side effects due to oral administration (Nesseem, Eid, & El-Houseny, 2011).

Moreover, SEM pictures of the nanofibers taken after 6 days of immersion in PBS (Fig. 7c-d) demonstrated that the nanofibrous morphology of the membranes did not evolve during the release phase. Such result is of prime importance because the integrity of the membrane and its cell support function will be preserved for longer durations.

4. Conclusion

The present article demonstrated the preparation of biocompatible and water-insoluble functional nanofibrous scaffolds embedding both HA and HP β CD by electrospinning in pure water and in situ crosslinking.

Electrospinning of HA with PVA as a carrier polymer allowed the processing in water but with poor efficiency and the scaffolds showed many defects. Here, it was demonstrated that the addition of 10 % (w/w_{H₂O}) of HP β CD in the solution stabilized the process of electrospinning and led to the efficient formation of uniform nanofibrous scaffolds. Such result was ascribed to favorable intermolecular interactions between HP β CD and both HA and PVA leading to the increase of the viscosity of the solution and allowing finally the production of uniform nanofibers. While insuring stable electrospinning during hours, an HA:PVA weight ratio of 1:1 was reached, a much higher ratio than what it was previously reported in the literature.

The produced HA-PVA-HP β CD nanofibrous scaffolds having good biocompatible properties, their use as support materials for controlled drug release were investigated. Using naproxen as a model drug, it has been shown that this molecule could be easily impregnated into the scaffolds either in aqueous solution or under supercritical CO₂. The functional nanofibrous scaffolds showed a sustainable drug release profile along more than 48 h, with a maximum of release during the first 24 hours. Thus, the

scaffolds are ideal candidates to deliver a drug directly to the wound, with a fast enough kinetics to counter the inflammation and avoid acute pain.

The proposed strategy allowed the efficient production of hyaluronic acid based nanofibrous scaffolds embedding HP β CD using only water as solvent insuring thus a whole fabrication process without any toxicity. Last but not least, thanks to possible host-guest supramolecular interactions between HP β CD and a wide variety of molecules, scaffolds with drug encapsulation and release properties can be envisaged for diverse biomedical applications.

5. Acknowledgements

The authors thank the Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) for financial support. Mathilde Menneteau and Fabrice Navarro are also acknowledged for the design and evaluation of cytotoxicity experiments and Fanny Caputo for the SEC measurements. The authors would also like to thank Didier Gasparutto and Christine Saint-Pierre for the MS analysis. This work is also supported by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02)"

References

- Ahire, J. J., Robertson, D. D., van Reenen, A. J., & Dicks, L. M. T. (2017). Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *86*, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.006>
- Ahmad, Z., Shepherd, J. H., Shepherd, D. V., Ghose, S., Kew, S. J., Cameron, R. E., ... Rushton, N. (2015). Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. *Regenerative Biomaterials*, *2*(2), 77–85. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv005>
- Banik, A., Gogoi, P., & Saikia, M. D. (2012). Interaction of naproxen with β -cyclodextrin and its derivatives/polymer: experimental and molecular modeling studies. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, *72*(3–4), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0014-7>
- Brenner, E. K., Schiffman, J. D., Thompson, E. A., Toth, L. J., & Schauer, C. L. (2012). Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 926–929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.033>
- Canbolat, M. F., Celebioglu, A., & Uyar, T. (2014). Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *115*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.021>
- Celebioglu, A., & Uyar, T. (2012). Electrospinning of nanofibers from non-polymeric systems: polymer-free nanofibers from cyclodextrin derivatives, 621–631.
- Champeau, M., Thomassin, J.-M., Tassaing, T., & Jérôme, C. (2015). Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. *Journal of Controlled Release*, *209*, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.002>
- Chen, G., Guo, J., Nie, J., & Ma, G. (2016). Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. *Polymer*, *83*, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.12.002>
- Chen, M. R., & Dragoo, J. L. (2013). The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *21*(3), 540–549. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-2095-2>
- Chen, W. Y., & Abatangelo, G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *7*(2), 79–89.
- Cornwell, K. G., Lei, P., Andreadis, S. T., & Pins, G. D. (2007). Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell–matrix interactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *80A*(2), 362–371. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30893>
- Gould, S., & Scott, R. C. (2005). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(10), 1451–1459. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>
- Guillory, J. K. (2003). Handbook of Aqueous Solubility Data By Samuel H. Yalkowsky and Yan He. CRC Press, Boca Raton, FL. 2003. xii + 1496 pp. 18 × 26 cm. ISBN 0-89493-1532-8. \$299.95. *Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(19), 4213–4213. <https://doi.org/10.1021/jm0303251>
- Huerta-Angeles, G., Brandejsová, M., Knotková, K., Hermannová, M., Moravcová, M., Šmejkalová, D., & Velebný, V. (2016). Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of

- substitution suitable for production of water resistant nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 137, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.077>
- Janković, B., Pelipenko, J., Škarabot, M., Mušević, I., & Kristl, J. (2013). The design trend in tissue-engineering scaffolds based on nanomechanical properties of individual electrospun nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1–2), 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.083>
- Ji, Y., Ghosh, K., Li, B., Sokolov, J. C., Clark, R. A. F., & Rafailovich, M. H. (2006). Dual-Syringe Reactive Electrospinning of Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogel Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience*, 6(10), 811–817. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600132>
- Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X. Z., Li, B., Sokolov, J. C., Prestwich, G. D., ... Rafailovich, M. H. (2006). Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*, 27(20), 3782–3792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.037>
- Junco, S., Casimiro, T., Ribeiro, N., Ponte, M. N. D., & Marques, H. C. (2002a). A Comparative Study of Naproxen – Beta Cyclodextrin Complexes Prepared by Conventional Methods and Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44(1–4), 117–121. <https://doi.org/10.1023/A:1023022008337>
- Junco, S., Casimiro, T., Ribeiro, N., Ponte, M. N. D., & Marques, H. M. C. (2002b). Optimisation of Supercritical Carbon Dioxide Systems for Complexation of Naproxen : Beta-Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44(1–4), 69–73. <https://doi.org/10.1023/A:1023028815180>
- Kayaci, F., & Uyar, T. (2012). Electrospun zein nanofibers incorporating cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.078>
- Kim, I. L., Khetan, S., Baker, B. M., Chen, C. S., & Burdick, J. A. (2013). Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct {MSC} chondrogenesis through mechanical and adhesive cues. *Biomaterials*, 34(22), 5571–5580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.004>
- Kim, K.-O., Akada, Y., Kai, W., Kim, B.-S., & Kim, I.-S. (2011). Cells Attachment Property of PVA Hydrogel Nanofibers Incorporating Hyaluronic Acid for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(04), 353. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2011.24044>
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29(1), 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>
- Krischak, G. D., Augat, P., Claes, L., Kinzl, L., & Beck, A. (2007). The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *Journal of Wound Care*, 16(2), 76–78. <https://doi.org/10.12968/jowc.2007.16.2.27001>
- Lee, K. Y., Jeong, L., Kang, Y. O., Lee, S. J., & Park, W. H. (2009). Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(12), 1020–1032. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.006>
- Li, Jie, Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Li, Junxing, He, A., Han, C. C., Fang, D., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2006). Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications*, 27(2), 114–120. <https://doi.org/10.1002/marc.200500726>

- Li, L., & Hsieh, Y.-L. (2005). Ultra-fine polyelectrolyte fibers from electrospinning of poly(acrylic acid). *Polymer*, 46(14), 5133–5139. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.039>
- Lisboa, F. A., Bradley, M. J., Hueman, M. T., Schobel, S. A., Gaucher, B. J., Styrnisdottir, E. L., ... Elster, E. A. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may affect cytokine response and benefit healing of combat-related extremity wounds. *Surgery*, 161(4), 1164–1173. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.10.011>
- Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., & Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(2), 335–351. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>
- Mele, E. (2016). Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(28), 4801–4812. <https://doi.org/10.1039/C6TB00804F>
- Nesseem, D. I., Eid, S. F., & El-Houseny, S. S. (2011). Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sciences*, 89(13), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.026>
- Nieuwoudt, A., Appleby, C. E., & Mukhopadhyay, S. (2015). Native Tissue Repair and Principles of Wound Healing: Introducing the Concept of Regenerative Surgery in Vaginal Prolapse Repair. *Journal of Clinical Gynecology and Obstetrics*, 4(2), 197–202. <https://doi.org/10.14740/jcgo.v4i2.336>
- Olesen, B. W. (1982). THERMAL COMFORT. *Technical Review - Bruel & Kjaer English Ed.*, (2), 3–41.
- Otero-Espinar, F. J., Torres-Labandeira, J. J., Alvarez-Lorenzo, C., & Blanco-Méndez, J. (2010). Cyclodextrins in drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20(4), 289–301. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(10\)50046-7](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(10)50046-7)
- Pelipenko, J., Kristl, J., Janković, B., Baumgartner, S., & Kocbek, P. (2013). The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.078>
- Racine, L., Guliyeva, A., Wang, I., Larreta-Garde, V., Auzély-Velty, R., & Texier, I. (2017). Time-Controllable Lipophilic-Drug Release System Designed by Loading Lipid Nanoparticles into Polysaccharide Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700045>
- Sadlej-Sosnowska, N., Kozerski, L., Bednarek, E., & Sitkowski, J. (2000). Fluorometric and NMR Studies of the Naproxen–Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solutions. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 37(1–4), 383–394. <https://doi.org/10.1023/A:1008114815223>
- Sánchez-Soto, P. J., Ginés, J. M., Arias, M. J., Novák, C., & Ruiz-Conde, A. (2002). Effect of Molecular Mass on the Melting Temperature, Enthalpy and Entropy of Hydroxy-Terminated PEO. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67(1), 189–197. <https://doi.org/10.1023/A:1013758518721>
- Shah, C. B., & Barnett, S. M. (1992). Swelling behavior of hyaluronic acid gels. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(2), 293–298. <https://doi.org/10.1002/app.1992.070450211>
- Shenoy, S. L., Bates, W. D., Frisch, H. L., & Wnek, G. E. (2005). 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. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.011>

- Sun, X.-Z., Williams, G. R., Hou, X.-X., & Zhu, L.-M. (2013). Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 147–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.064>
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>
- Ting, S. S. T., Tomasko, D. L., Foster, N. R., & Macnaughton, S. J. (1993). Solubility of naproxen in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 32(7), 1471–1481. <https://doi.org/10.1021/ie00019a022>
- Tomihata, K., & Ikada, Y. (1997). Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(2), 243–251.
- Um, I. C., Fang, D., Hsiao, B. S., Okamoto, A., & Chu, B. (2004). Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules*, 5(4), 1428–1436. <https://doi.org/10.1021/bm034539b>
- Uyar, T., Balan, A., Toppare, L., & Besenbacher, F. (2009). Electrospinning of cyclodextrin functionalized poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanofibers. *Polymer*, 50(2), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.11.021>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Wang, C., Wang, Y., & Hashimoto, T. (2016). Impact of Entanglement Density on Solution Electrospinning: A Phenomenological Model for Fiber Diameter. *Macromolecules*, 49(20), 7985–7996. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b00519>
- Wang, X., Um, I. C., Fang, D., Okamoto, A., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2005). Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments. *Polymer*, 46(13), 4853–4867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.058>
- Zhang, Q., Li, Y., Lin, Z. Y. (William), Wong, K. K. Y., Lin, M., Yildirimer, L., & Zhao, X. (2017). Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.007>
- Zhang, W., Chen, M., & Diao, G. (2011). Electrospinning β -cyclodextrin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane for molecular capture. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1410–1416. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.062>
- Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43(16), 4403–4412. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00275-6)

Élaboration et caractérisation de matériaux nanofibreux fonctionnels à base d'acide hyaluronique et de nanoparticules lipidiques pour des applications à usage biomédical

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide dont les propriétés de biocompatibilité et de bioactivité en font un composé très intéressant pour l'élaboration de pansements. Dans ce travail, des stratégies d'élaboration de membranes biomimétiques nanofibreux à base d'HA, ont été développées par électrospinning en utilisant l'eau pure comme solvant afin de s'affranchir de tout problème de toxicité. Pour cela, de l'alcool polyvinylique ainsi que de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine ont été ajoutés pour former des membranes uniformes. Un procédé de réticulation *in situ* de ces matériaux a également été proposé afin d'assurer la tenue de la structure fibreuse lors de son utilisation en tant que pansement. Pour ouvrir les champs d'application, différentes voies de fonctionnalisation de ces matériaux ont été envisagées. La première, a consisté en l'imprégnation directe de naproxène, une molécule modèle aux propriétés anti-inflammatoires, dans les membranes par immersion dans une solution aqueuse ou par CO₂ supercritique. La seconde voie a reposé sur l'incorporation, au sein des fibres, de nanoparticules lipidiques pouvant elles-mêmes encapsuler et délivrer des principes actifs.

Mots clés : Nanofibres, acide hyaluronique, électrospinning, pansement, cyclodextrine, nanoparticules lipidiques

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide for which biocompatibility and bioactivity properties make it a very interesting compound as wound dressings. In this work, biocompatible insoluble HA-based nanofibrous dressings were designed by electrospinning in pure water in order to overcome any toxicity issues. To this purpose, poly(vinyl alcohol) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin were added to form uniform nanofibrous scaffolds. An *in situ* crosslinking process of the scaffolds is also investigated to ensure the stability of the fibrous structure during the use of the dressing. For opening the scope of wound application, various pathways of functionalization of these materials have been envisaged. The first one was the direct impregnation of naproxen, a model drug with anti-inflammatory properties, into the scaffolds either in aqueous solution or under supercritical CO₂. The second way is based on the incorporation, within nanofibers, of lipid nanoparticles in which drugs can be encapsulated and then delivered to its wound sites.

Keywords: Nanofibers, hyaluronic acid, electrospinning, wound dressing, cyclodextrin, lipidic nanoparticles