



Université
de Lille

Université de Lille – Faculté de Médecine

Ecole Doctorale Biologie - Santé

Thèse

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques

CONCEPTION ET EVALUATION D'UN PANSEMENT A LIBERATION DE DEUX PRINCIPES ACTIFS POUR LE TRAITEMENT DES PLAIES CHRONIQUES

Présentée et soutenue par

Alejandra MOGROVEJO-VALDIVIA

Le 21 décembre 2018

Membres du Jury

Pr. Sophie GANGLOFF	Université de Reims	Rapporteur
Pr. François ESTOUR	Université de Rouen	Rapporteur
Dr. Hélène VAN DEN BERGHE	Université de Montpellier	Examineur
Dr. Christel NEUT	Université de Lille	Examineur
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN	Université de Lille	Directeur de thèse
Pr. Bernard MARTEL	Université de Lille	Co-Directeur

Remerciements

Je remercie Madame **Sophie GANGLOFF**, Professeur de l'Université de Reims et Monsieur **François ESTOUR**, Professeur de l'Université de Rouen qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Je remercie également Madame **Hélène VAN DEN BERGHE**, Maitre de Conférences de l'Université de Montpellier d'avoir examiné mon travail de thèse.

Je remercie également le Professeur **Juergen SIEPMANN**, Directeur de l'unité INSERM U1008 pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Un grand merci à mon directeur de thèse **Nicolas BLANCHEMAIN**, Maitre de Conférences de l'Université de Lille, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche, pour avoir donné sa confiance et pour la réalisation de ce travail de thèse. Merci Nicolas pour ton encadrement, tes précieux conseils, ta disponibilité, ta patience, ton soutien et surtout pour ton grand optimisme !

Je tiens également à remercier le Professeur **Bernard MARTEL**, mon co-directeur de thèse, de m'avoir donné accès à toutes les ressources de l'unité UMET pour la réalisation de ce travail. Merci également pour tous les conseils donnés, pour m'avoir encadrée tout au long de ces années et aussi pour ta disponibilité et ton soutien.

Je remercié également madame **Christel NEUT**, Maitre de Conférences de l'Université de Lille pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille pour la réalisation des évaluations microbiennes. Merci pour l'encadrement, tous les conseils précieux, la disponibilité, et le soutient pendant ce travail de thèse.

Je remercie aussi toutes les personnes du laboratoire de bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Lille. Merci **Séverine, Isabelle, Charlotte et Carole** pour toute votre aide et votre bonne humeur !

Je remercie aussi toutes les personnes de l'UMET et plus particulièrement **Nicolas TABARY**, Maitre de Conférences de l'Université de Lille pour ton aide dans les analyses des résultats, ton soutien, ta disponibilité et surtout pour les bons moments. Un grand merci à **Catherine CANDELIER**, Assistante Ingénieur en analyses chimiques de l'UMET, pour son aide dans les analyses de l'absorption atomique et pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier au Docteur **Marco LOPEZ**, ingénieur de recherche, pour l'aide dans la réalisation des analyses au MEB et le Docteur **Feng CHAI**, ingénieure de recherche, pour l'aide dans la réalisation des analyses biologiques, pour son encadrement et ses conseils.

Un grand merci à **Mickäel MATON**, ingénieur d'études de l'Université de Lille, collègue et surtout un grand ami. Merci Mickäel pour tous tes conseils, ton soutien dans les moments les plus durs et pour tous les bons moments partagés au laboratoire.

Un grand merci à tous mes collègues thésards et amis du laboratoire INSERM U1008 et UMET de l'Université de Lille. Merci **Carla PALOMINO, Syrine DIMASSI, Alice GAUZIT-AMIEL, Justine MOUGIN, Malo DUFAY, Adrian HERTAULT, Dyhia KERSANI, Maxime BEAURAIN** et **Moussa DIOP**. Merci pour les bons moments passés ensemble, pour les rigolades et pour les jolies promenades après les congrès. Merci aussi à **Maria Jose GARCIA FERNANDEZ**, Maitre de Conférences à l'ILIS et membre de l'équipe INSERM U1008 pour son amitié et les bons moments partagés ensemble. Je remercie aussi tous mes stagiaires : **Rosa, Consuelo, Yushrine, Charles, Tatiana** et **Jeremy**. Merci à tous pour votre aide pendant toute la durée de ce travail. Merci également à **Alexandra MACHADO** et **Monique BONNIER** pour toute votre gentillesse et les bons moments partagés.

Muchísimas gracias a mis amigas **Claudia FLORES** y **Antonella RAFFO** por todo lo que hemos vivido juntas en el periodo del doctorado, por estar ahí siempre, en los buenos momentos y en los no tan buenos. Que nuestra amistad siga siendo así de fuerte.

Agradezco igualmente a toda mi familia, especialmente a mi **padre** a y a mi **madre** y a mis hermanos **Erick** y **Claudia**. Sin ellos no hubiera podido llegar hasta donde estoy ahora. Gracias por enseñarme siempre a enfrentar las cosas y a ser valiente.

Et finalement, je remercie spécialement mon grand amour **Thomas**, pour son altruisme, sa présence à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments et pour sa compréhension pendant la dernière ligne droite de ce travail de thèse.

Principales abréviations

AcOH	: Acide acétique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Argent
AgNP	: Nanoparticules d'argent
AgTT	: Argent Traité Thermiquement
bFGF	: Basic fibroblast growth factor (facteur basique de croissance des fibroblastes)
CDs	: Cyclodextrines
CE	: Constante d'Efficacité
CHT	: Chitosan
CTR	: Acide citrique
EGF	: Epidermal Growth Factor (Facteur de croissance épidermique)
HA	: Acide Hyaluronique
HAS	: Haute Autorité de Santé
HGF	: Hepatocyte Growth Factor (Facteur de croissance des hépatocytes)
IBU	: Ibuprofène
IBU-L	: Ibuprofène Lysinate
IGF- 1	: Insulin-like growth factor-1
K_f	: Constante de formation
MEC	: Matrice extracellulaire
NPs	: Nanoparticules
PCD	: Polymère de cyclodextrine
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PE ⁻	: Polyelectrolyte négati

PE ⁺	: Polyelectrolyte positif
PEM	: Système Polyelectrolyte Multicouche
PET	: Polyéthylène téréphtalate
TBO	: Bleu de Toluidine Ortho
TGF-b1	: Transforming growth factor b1
TGF- α	: Transforming growth factor α
TGF- β	: Transforming growth factor β
TLC	: Technologie Lipido-Colloïde
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)
UMET-ISP	: Unité de Matériaux et Transformations – Ingénierie des Systèmes Polymères
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

Sommaire

Remerciements.....	3
Principales abréviations.....	5
Sommaire	7
Introduction générale	13
1 Etude Bibliographique	17
1.1 La peau, les plaies et leurs traitements	17
1.1.1 Structure et physiologie de la peau	17
1.1.1.1 Structure de la peau	17
1.1.1.2 Les fonctions de la peau.....	18
1.1.2 Cicatrisation des plaies	19
1.1.2.1 Le processus de cicatrisation	19
1.1.2.2 Complexité de la cicatrisation, les plaies chroniques.....	21
1.1.3 Les plaies chroniques principales	22
1.1.3.1 Les brûlures.....	22
1.1.3.2 Les ulcères de pression.....	23
1.1.3.3 Les ulcères de jambe.....	24
1.1.4 Facteurs impliqués dans les plaies chroniques	25
1.1.4.1 Plaies infectées et biofilms	26
1.1.4.2 Diagnostic des plaies infectées	30
1.1.5 Les pansements : Dispositifs médicaux pour traiter les plaies	31
1.1.5.1 Histoire du soin des plaies et du pansement	31
1.1.5.2 Le rôle et classification des pansements	32
1.1.5.3 Les pansements techniques	35
1.1.5.3.1 Les pansements anti-odeurs : le charbon actif	35
1.1.5.3.2 Les pansements pro-cicatrisants.....	36
1.1.5.3.3 Les pansements combinés.....	38
1.1.6 Conclusion	45
1.2 Textiles fonctionnalisés pour le soin des plaies	46
1.2.1 Les supports textiles des pansements	46
1.2.1.1 Fibres textiles obtenues des polymères naturels.....	46
1.2.1.1.1 La cellulose	46
1.2.1.1.2 L'alginate	47
1.2.1.1.3 Le collagène.....	47
1.2.1.2 Fibres textiles obtenues des polymères synthétiques.....	48

1.2.2	La fonctionnalisation de pansements	48
1.2.2.1	L'enrobage des fibres	49
1.2.2.2	Incorporation de microcapsules dans les (nano)fibres.....	49
1.2.2.3	Les fibres échangeuses d'ions	50
1.2.2.4	Les fibres creuses et fibres cœur-peau	50
1.2.2.5	La bio-conjugaison	51
1.2.2.5.1	Le traitement plasma	51
1.2.2.5.2	Greffage physique des textiles par des polymères.....	52
1.2.3	Les systèmes multicouches de polyélectrolytes (PEM).....	59
1.2.3.1	Les polyélectrolytes (PE)	60
1.2.3.1.1	Méthodes de construction des systèmes PEM.....	62
1.2.3.2	Paramètres liés à la construction des systèmes PEM	63
1.2.3.2.1	Mécanisme de la croissance des assemblages.....	63
1.2.3.2.2	Impact du poids moléculaire des polyélectrolytes	65
1.2.3.2.3	Impact du pH et de la force ionique.....	66
1.2.3.2.4	Impact de la température.....	67
1.2.3.2.5	Impact du temps d'immersion.....	68
1.2.3.3	Stabilisation des systèmes PEM.....	69
1.2.3.4	Applications biomédicales des systèmes PEM.....	70
1.2.3.4.1	Application antimicrobienne.....	70
1.2.3.4.2	Application des PEM à la libération de principes actifs	71
1.2.4	Conclusion	73
1.3	Evaluation « <i>in vivo</i> » des pansements	74
1.3.1	Evaluation clinique	74
1.3.1.1	Recommandations de l'Haute Autorité de la Santé (HAS).....	74
1.3.1.2	Types d'études	74
1.3.2	Evaluation préclinique	75
1.3.2.1	Les modèles animaux.....	75
1.3.2.1.1	Les modèles animaux avec des plaies saines.....	75
1.3.2.1.2	Modèles animaux avec des plaies infectées	77
1.3.2.1.3	Modèle animal développé par notre équipe.....	77
1.3.3	Conclusion	79
1.4	Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier de charges	80
1.4.1	Objectifs de la thèse.....	81
1.4.2	Cahier des charges	82
2	Matériels et Méthodes	87
2.1	Matériels.....	87

2.1.1	Support du pansement.....	87
2.1.2	Polymères	87
2.1.2.1	Le chitosan	87
2.1.2.2	Le polymère de cyclodextrine	87
2.1.3	Les principes actifs.....	89
2.1.3.1	Le sulfate d'argent	89
2.1.3.2	L'ibuprofène.....	89
2.2	Méthodes.....	90
2.2.1	Conception du pansement antibactérien	90
2.2.1.1	Fonctionnalisation du PET avec le CHT ou la CD	90
2.2.1.2	Chargement du sulfate d'argent	91
2.2.1.3	Construction du système multicouche polyelectrolyte (PEM)	91
2.2.1.4	Evaluation de la dégradation du système PEM	93
2.2.2	Caractérisations physico-chimiques.....	93
2.2.2.1	Quantification des groupes carboxyliques	93
2.2.2.2	Microscopie électronique à balayage (MEB)	94
2.2.2.3	Capacité d'absorption des exsudats simulés.....	94
2.2.3	Caractérisation, quantification et libération de l'argent.....	94
2.2.3.1	Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNP).....	94
2.2.3.2	Quantification et cinétique de libération de l'argent	95
2.2.4	Incorporation de l'ibuprofène dans le pansement.....	96
2.2.4.1	Caractérisation du complexe IBU-CD	96
2.2.4.1.1	Diagramme de solubilité	96
2.2.4.1.2	Résonance magnétique nucléaire du proton 1H (RMN 1H)	97
2.2.4.2	Etude d'adsorption et de la libération de l'ibuprofène	97
2.2.4.2.1	Cinétique d'adsorption de l'ibuprofène	97
2.2.4.2.2	Isothermes d'adsorption	98
2.2.4.2.3	Cinétique de libération de l'ibuprofène	99
2.2.5	Cytotoxicité.....	100
2.2.6	Evaluation microbiologique in vitro	101
2.2.6.1	Evaluation du sulfate d'argent sur les souches bactériennes	101
2.2.6.1.1	Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	101
2.2.6.1.2	Courbe de croissance bactérienne.....	101
2.2.6.2	Evaluation du pansement à l'argent	101
2.2.6.2.1	Kirby Bauer (Test de Diffusion)	101
2.2.6.2.2	Cinétique de la réduction bactérienne (Kill Time).....	102
2.2.7	Etude in vivo du pansement.....	103

2.2.7.1	Stérilisation des pansements par rayons gamma	103
2.2.7.2	Evaluation in vivo des pansements sur un modèle murin infecté	103
3	Résultats et discussion	111
3.1	Conception, caractérisation et évaluations biologiques et microbiologiques in vitro du pansement à l'argent.....	111
3.1.1	Conception du pansement	111
3.1.1.1	Prétraitement par thermofixation du PET par CHT-CTR ou CD-CTR....	111
3.1.1.2	Chargement de l'argent dans les textiles.....	112
3.1.1.3	Construction du système PEM	116
3.1.1.4	Suivi de la dégradation du système PEM	119
3.1.2	Caractérisation physico-chimique	121
3.1.2.1	Microscopie électronique à balayage (MEB)	121
3.1.2.2	Capacité d'absorption des exsudats simulés.....	124
3.1.2.3	Cinétique de libération de l'argent	125
3.1.3	Etude de la cytocompatibilité des pansements	128
3.1.4	Evaluation microbiologique <i>in vitro</i>	130
3.1.4.1	Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) du sulfate d'argent	130
3.1.4.2	Courbe de croissance.....	131
3.1.4.3	Test de diffusion (Kirby-Bauer)	132
3.1.4.4	Cinétique de réduction bactérienne (Kill time)	133
3.1.5	Conclusion	137
3.2	Activation du pansement avec l'ibuprofène	141
3.2.1	Etude de la complexation entre l'ibuprofène et la CD	141
3.2.1.1	Diagramme de solubilité	141
3.2.1.2	Résonance magnétique nucléaire du proton H1 (RMN 1H).....	143
3.2.2	Etude d'adsorption et libération de l'ibuprofène	145
3.2.2.1	Cinétique d'adsorption	145
3.2.2.2	Isothermes d'adsorption	146
3.2.3	Adsorption et libération de l'IBU-L sur les différents supports.....	148
3.2.3.1	Adsorption	148
3.2.3.2	Cinétique de libération.....	149
3.2.4	Evaluation microbiologique du pansement optimisé	151
3.2.4.1	Test de diffusion (Kirby – Bauer)	151
3.2.4.2	Cinétique de réduction bactérienne	152
3.2.5	Conclusion	154
3.3	Evaluation in vivo des pansements sur un modèle murin.....	157
3.3.1	Stérilisation des pansements par rayonnements gamma (γ).....	157

3.3.1.1	Impact des rayonnements gamma (γ)	157
3.3.1.1.1	Suivi de la dégradation du système PEM	157
3.3.1.1.2	Microscopie électronique à balayage (MEB)	158
3.3.1.1.3	Libération simultanée de l'argent et de l'IBU-L	159
3.3.1.1.4	Evaluation microbiologique in vitro	161
3.3.2	Evaluation in vivo des pansements :	163
3.3.3	Conclusion	166

Introduction générale

Les plaies chroniques représentent un problème de santé publique majeur avec plus de 37 millions de personnes touchées dans le monde, notamment les patients âgés. Parmi les plaies chroniques, les ulcères de jambe, les brûlures ou les escarres présentent un risque infectieux, entraînant une inflammation excessive qui retarde le processus de cicatrisation associé à des douleurs intenses pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. D'autre part, les plaies chroniques affectent le moral des patients. L'inconfort du patient, en raison de la douleur excessive, l'isolement, le stress et la dépression influent négativement sur le système immunitaire augmentant ainsi le temps de guérison, d'où l'importance de traiter immédiatement et efficacement ces plaies. Les professionnels de santé sont confrontés à cette problématique et cherchent donc à mettre en place des thérapeutiques innovantes pour lutter contre l'infection. Une alternative au traitement des plaies infectées est l'utilisation des pansements techniques ou combinés pour offrir une thérapie spécifique selon le diagnostic réalisé par le professionnel de santé. Actuellement sur le marché, il existe une vaste gamme de pansements qui ne cesse d'augmenter. Ils sont constitués de différents biomatériaux et sont parfois combinés avec des substances actives pour fournir une thérapie spécifique selon l'étiologie de la plaie. Parmi ces pansements, les pansements à base d'argent sont largement utilisés pour traiter les plaies infectées ou présentant un risque infectieux. Néanmoins, à cause d'une diffusion de l'argent vers la plaie, les effets toxiques de l'argent envers les fibroblastes et les kératinocytes entraînent une perception limitée de l'efficacité remettant en cause leur bénéfice. Toutefois, la présence d'argent dans les pansements ne traite pas de la problématique de l'inflammation excessive produite par ces plaies infectées et retardant le processus de cicatrisation.

L'objectif de ce travail de thèse consiste à concevoir un pansement contenant deux principes actifs afin d'offrir un traitement antibactérien et antalgique. Dans un premier temps, l'argent a été sélectionné comme agent antibactérien. Son activité antibactérienne est largement démontrée notamment sous sa forme ionisée (Ag^+). La problématique majeure sera de rendre l'argent disponible au niveau de l'interface pansement/plaie tout en limitant sa diffusion au sein de la plaie pour prévenir une éventuelle cytotoxicité. Dans un second temps, l'ibuprofène a été sélectionné comme l'agent antalgique. Son activité en tant que médicament est prouvée et un pansement à l'ibuprofène est commercialisé (*Biatain IBU*). La problématique majeure sera d'incorporer l'ibuprofène dans le pansement en i) contrôlant son profil de libération (dose libérée et temps de libération) et ii) validant qu'il n'impacte pas l'activité antibactérienne assurée par l'argent.

Les laboratoires UMET et U1008 travaillent depuis quelques années sur la fonctionnalisation de textiles par le chitosan ou le polymère de cyclodextrines mais également sur les systèmes multicouches à base de ces deux polyélectrolytes. Pour cette application comme pansements, l'intérêt de combiner les deux approches semble intéressante pour répondre au cahier des charges

complexe de ce type de dispositifs médicaux : i) Former une barrière pour ralentir la diffusion de l'argent dans la plaie et ainsi, réduire le risque de toxicité vers les cellules saines, ii) Obtenir une activité antibactérienne, iii) Maintenir un environnement humide, iv) Libérer de manière contrôlée l'ibuprofène afin de traiter la douleur.

Ainsi, un textile en polyester (PET) a été fonctionnalisé par le chitosan ou la cyclodextrine, tous les deux, réticulés par l'acide citrique afin de développer un textile riche en fonctions carboxyliques pour que l'argent soit ensuite fixé sur le support (activité antibactérienne). Un système multicouche polyélectrolyte (système PEM) a été construit sur le support activé par l'argent, dans le but de former une barrière pour ralentir la diffusion de l'argent et réduire les risques de toxicité envers les cellules saines. Le système PEM est obtenu par empilement de chitosan comme polyélectrolyte positif et de polymère de cyclodextrine comme polyélectrolyte négatif. Le pansement fournira un environnement humide à la plaie et permettra une libération de l'ibuprofène de manière prolongée grâce aux propriétés du polymère de cyclodextrine (complexes d'inclusion). Le but de la thèse est d'obtenir un pansement capable d'éradiquer l'infection et de palier à la douleur, en présentant bien sûr, une innocuité et une activité prolongée, dans le but de limiter le changement quotidien.

Le manuscrit de thèse est organisé en quatre chapitres. Le premier est une étude bibliographique qui permet de poser la problématique des plaies chroniques infectées, les différentes options de traitement mises en place et l'état de l'art des pansements innovants. Un focus sera fait sur les méthodes de fonctionnalisation de surfaces adaptées à ce type de support notamment pour former des systèmes multicouches. Les polyélectrolytes dont le chitosan et le polymère de cyclodextrine seront présentés et discutés au regard de l'application. Finalement, les modèles animaux adaptés pour l'évaluation des pansements seront présentés

Le second chapitre présente les matériels utilisés pour la conception de ce pansement, les molécules pharmacologiques utilisées et les méthodes développées pour son évaluation. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus en trois parties. La première concerne la conception et l'évaluation du pansement pour lui conférer une activité antibactérienne. La seconde concerne l'adsorption et la libération de l'ibuprofène via le système multicouche tout en étudiant les interactions avec le polymère de cyclodextrine. La troisième concerne l'évaluation *in vivo* sur un modèle murin du pansement optimisé après sa stérilisation par rayons gamma. Finalement le dernier chapitre permettra de conclure sur les résultats obtenus et de proposer des perspectives.

Partie 1 : Etude Bibliographique

1 Etude Bibliographique

1.1 La peau, les plaies et leurs traitements

1.1.1 Structure et physiologie de la peau

1.1.1.1 Structure de la peau

La peau est un organe complexe, qui se comporte comme une barrière entre le milieu extérieur et l'intérieur de notre corps. La peau est aussi appelée « tégument », un nom qui provient du latin « *integere* » qui signifie couvrir (1,2). Ce tégument est l'organe le plus vaste de l'organisme représentant 1/3 du poids du corps et possède une surface de 1.5 à 2 m² et environ 2 mm d'épaisseur chez l'adulte (3). Elle est divisée en 3 régions (**Figure 1**) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Il existe des annexes cutanées : les phanères (poils et ongles) et les glandes sébacées et apocrines (1,3).

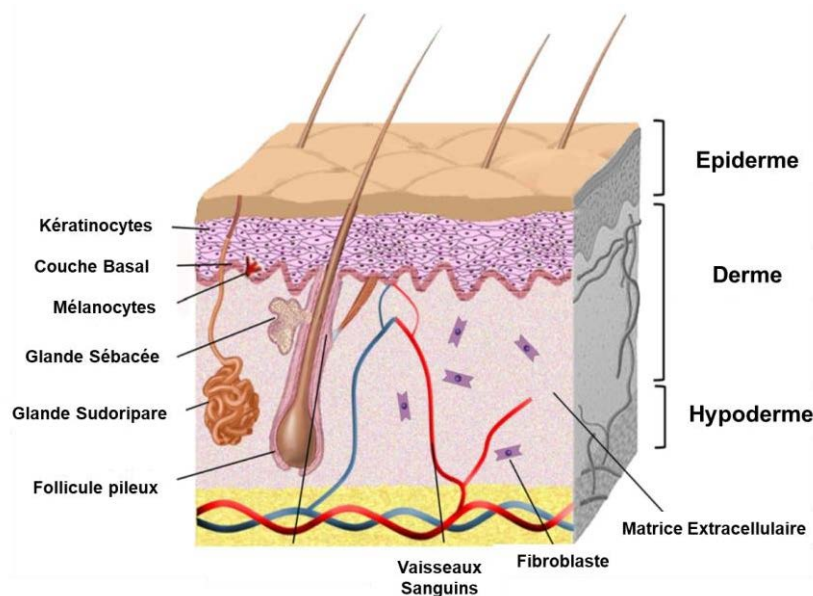


Figure 1. Représentation schématique de la physiologie de la peau (4).

• L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié et pavimenteux en constant renouvellement (1,2). Il comprend quatre sous-couches dénommées (de la profondeur à la surface) : couche basale (stratum basale), couche spinieuse (stratum spinosum), couche granuleuse (stratum granulosum) et couche cornée (stratum corneum) (1). L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires dont les plus abondants sont les kératinocytes (80%), les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Chaque groupe cellulaire assume des fonctions différentes. Les kératinocytes ont un rôle fondamental comme barrière cutanée pour protéger l'organisme contre l'extérieur et les rayonnements UV. Les mélanocytes synthétisent les mélanines qui donnent la pigmentation de la peau et présentent également un rôle photo-protecteur. Les cellules de Langerhans appartiennent

au groupe des cellules dendritiques contenant des antigènes aux lymphocytes T, leur rôle consiste à capturer les antigènes et ensuite à les ré-exprimer pour activer les lymphocytes T. Les cellules de Merkel, quant à elles, sont des cellules neuro-épithéliales qui présentent une fonction mécano-réceptrice (2).

- **Le derme**

Le derme est un tissu conjonctif vascularisé et innervé qui protège le corps contre les blessures mécaniques (1). Le derme contient dans sa structure des cellules comme les fibroblastes, les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques dermiques. Il contient aussi trois types de fibres : l'élastine, le collagène, la réticuline, et la substance fondamentale qui est constituée en grande partie de polysaccharides dont l'acide hyaluronique, et des protéines (1,2).

- **L'hypoderme**

C'est la couche la plus profonde de la structure de la peau. Ses fonctions principales consistent à amortir les chocs et à protéger le corps du froid par un mécanisme d'isolation. L'hypoderme contient dans sa structure des cellules adipeuses où dérivent des cellules souches qui peuvent être utilisées pour produire des facteurs de croissance tels que VEGF, IGF, HGF et TGF- β 1 afin de stimuler la synthèse et la migration des fibroblastes (2).

1.1.1.2 Les fonctions de la peau

La peau assure plusieurs rôles importants. D'une part, elle se comporte comme une barrière physique protégeant les organes et les tissus contre le milieu extérieur et les agressions mécaniques. D'autre part, la peau est la première ligne de défense contre les microorganismes grâce à la production de peptides antimicrobiens, de cellules de Langerhans épidermiques résidentes et de cellules T épidermiques transitoires. Il faut aussi mentionner que les kératinocytes situés dans la couche cornée présentent une structure de type « scaffold » qui empêche la pénétration des bactéries. La peau protège l'organisme contre les rayonnements UV; la couche cornée les reflète pour réduire la dose d'exposition, et parallèlement l'activité des mélanocytes augmente au moment de l'exposition pour que l'ADN réduise l'absorption des rayonnements UV (1,2).

D'un autre côté, les terminaisons nerveuses situées dans la peau permettent à l'organisme de percevoir des sensations différentes tels que le toucher, les vibrations, la température, la pression ou la douleur ; ce sont différents récepteurs comme les corpuscules de Meissner, Pacinian, Ruffini, des thermorécepteurs et des récepteurs cellulaires de Merkel qui détectent les sensations et les transmettent au système nerveux central. Le derme et l'hypoderme sont hautement vascularisés au contraire de l'épiderme. Les vaisseaux sanguins sont d'importants réservoirs et ont un rôle fondamental pour la thermorégulation et la nutrition (1,2).

La peau est un organe qui est en constant renouvellement, de la couche la plus profonde jusqu'à sa surface pour remplacer les cellules vieillissantes. Après 45 jours les kératinocytes ont migré vers la surface de la peau où ils se détachent en emportant microorganismes et autres substances. Lorsque la peau présente une blessure aiguë, celle-ci cicatrise grâce à ce processus de renouvellement cutané qui malheureusement s'estompe en vieillissant. La fonction principale de la peau est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (bactéries, chaleur, froid etc.), d'où l'importance de maintenir sa parfaite intégrité. Une plaie d'origine accidentelle, causée par une maladie, ou consécutive à une opération chirurgicale favorisera la pénétration des agents pathogènes en déclenchant des complications sévères.

1.1.2 Cicatrisation des plaies

1.1.2.1 Le processus de cicatrisation

Une plaie est la rupture de la continuité de la peau, des muqueuses ou des organes, généralement associée à une perte de substance. Dès qu'une plaie est formée, plusieurs voies cellulaires coordonnées sont activées dans le but de restaurer l'intégrité du tissu. Ce processus est connu sous le nom de cicatrisation (**Figure 2**) et se déroule pendant environ 14 jours pour les plaies aiguës. Ce type de plaies inclue les brûlures de première degré, les greffes, les plaies chirurgicales, les morsures, les abcès, les gelures et les dermabrasions profondes (5). Le processus de cicatrisation se divise en 4 phases qui se chevauchent : hémostase, inflammation, prolifération et remodelage.

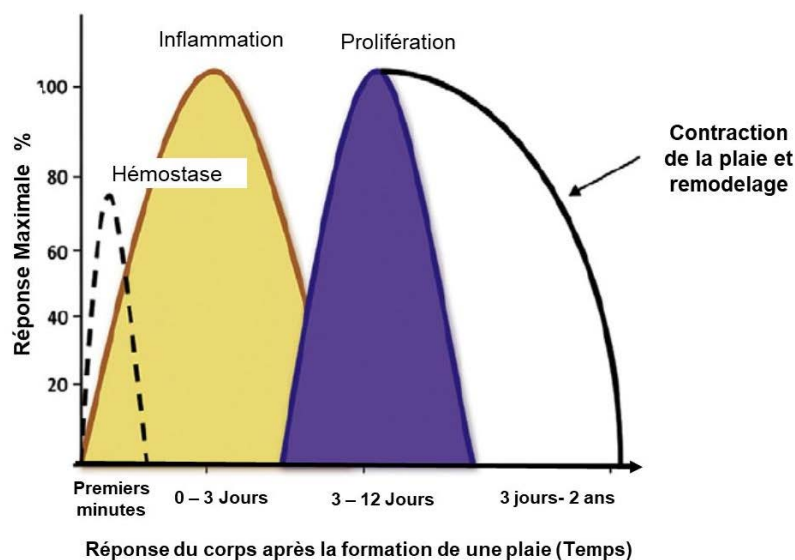


Figure 2. Schéma des quatre phases du processus de cicatrisation cutanée. Adapté de Akik et al., 2014 (6).

- **Hémostase**

Lors de la formation d'une plaie, la cascade de coagulation commence et produit le tampon hémostatique, un caillot composé de fibrine (**Figure 3A**). En même temps, le tissu endommagé

libère l'adénosine diphosphate (ADP) qui conduit à l'agglutination des plaquettes. Le contact entre les plaquettes et le collagène ainsi que la présence de substances comme la thrombine et la fibronectine induisent la libération de cytokines, de facteurs de croissance et de sérotonine afin d'assurer la chimiotaxie pour les neutrophiles et macrophages. Les cytokines induisent le phénomène de vasoconstriction grâce à la formation d'un caillot pour limiter la perte de sang (7,8).

- **Inflammation**

La phase inflammatoire du processus de cicatrisation (**Figure 3B**) ressemble à un « nettoyage de la plaie » : cette phase a pour but la prévention de l'infection (7). Suite à la formation du caillot, plusieurs phénomènes ont lieu : la perméabilité vasculaire, la libération de cytokines (IGF1, TGF- β , TNF, et PDGF), de prostaglandines et de facteurs de croissance pour stimuler la migration des neutrophiles vers la plaie qui assurent la phagocytose des tissus endommagés et des bactéries. Les macrophages résultent des monocytes pour migrer vers la plaie à la différence des neutrophiles, qui restent dans la plaie jusqu'à la fin de la cicatrisation. Les macrophages conservent les facteurs de croissance (TGF- β , EGF), qui sont importants pour la réponse inflammatoire, le débridement, la stimulation de l'angiogenèse et la formation du tissu de granulation.

Les lymphocytes participent aussi à la phase d'inflammation. Leur rôle est la production de la matrice extracellulaire (MEC) et du collagène. La phase inflammatoire du processus de cicatrisation doit prendre le temps nécessaire pour assurer l'élimination des bactéries et des tissus endommagés pour avoir une plaie « propre ». Néanmoins, une phase d'inflammation persistante peut endommager les tissus et retarder la phase de prolifération conduisant à une plaie chronique plus difficile à traiter (7,8).

- **Prolifération**

Suite à la phase d'inflammation, la plaie est prête à produire de nouveaux tissus dermiques et épidermiques (**Figure 3C**). L'angiogenèse se présente par une combinaison des étapes de prolifération et migration stimulées par des facteurs de croissance VEGF avec des cytokines pour déclencher la néovascularisation et la réparation des vaisseaux endommagés. Des cytokines et des facteurs de croissance (bFGF, FGF, TGF- α , EGF et TGF- β) interviennent aussi dans la formation des nouveaux vaisseaux sanguins.

Les fibroblastes résultent de facteurs de croissance tels que PDGF, bFGF ou EGF. Les fibroblastes atteignent la plaie et prolifèrent à partir de cytokines libérées par les plaquettes, les macrophages et les lymphocytes. Le rôle des fibroblastes est la production de protéines structurelles pour la reconstruction des tissus dont le collagène, le principal et le plus important constituant de la MEC. Une fois la MEC restructurée, les fibroblastes deviennent des myofibroblastes pour favoriser la fermeture de la plaie (7,8).

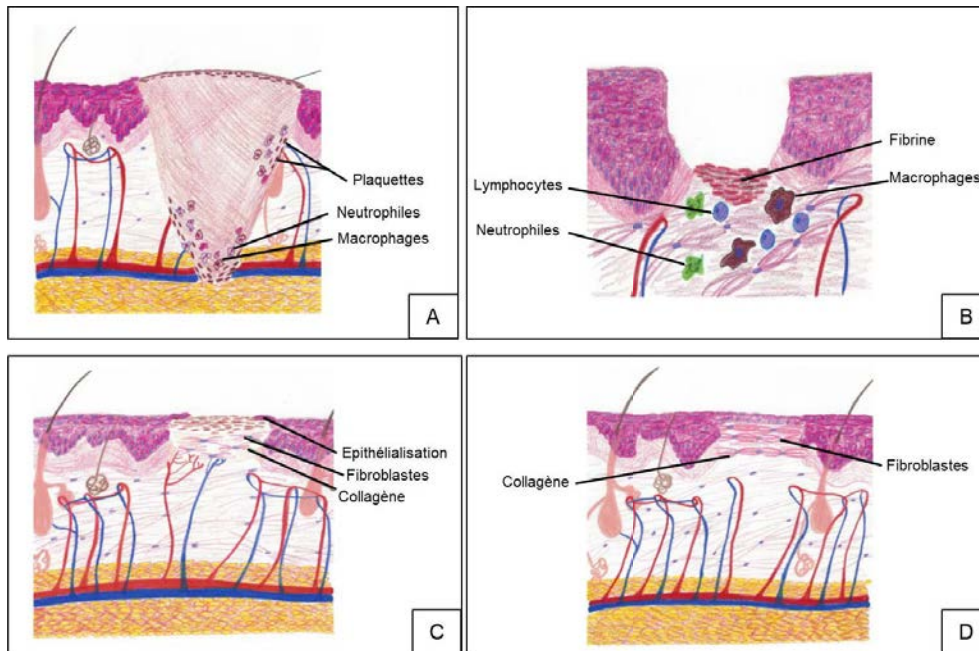


Figure 3. Schéma des étapes de la cicatrisation, (A) phase d'hémostase, (B) phase d'inflammation, (C) phase proliférative, (D) phase de remodelage (8).

Lorsque le tissu de granulation et le collagène sont reformés dans la plaie, l'épithélium commence à se restaurer ; les cellules épithéliales (kératinocytes) migrent jusqu'à couvrir la plaie et atteignent la MEC. Un processus embryologique appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » donne de la mobilité aux cellules pour que celles-ci arrivent à la surface de la plaie afin d'assurer la phase d'épithérialisation (7).

- **Remodelage**

La quatrième et dernière phase de la cicatrisation (**Figure 3D**) est très longue. Cette phase consiste au développement de l'épithélium et à la maturation de la plaie. Les fibroblastes aident à remplacer le collagène de type III par le collagène de type I qui est plus résistant à la tension et devient la protéine prédominante de la cicatrice formée. Malgré tout ce processus de remodelage, la cicatrice ne redevient jamais comme la peau saine et ne récupère jamais la tension d'origine (7,8).

1.1.2.2 Complexité de la cicatrisation, les plaies chroniques

La cicatrisation d'une plaie aiguë dure environ 14 jours et est suivie d'une période d'environ deux ans pour le remodelage complet des tissus endommagés. Néanmoins, ils existent divers facteurs liés aux plaies ou aux patients qui retardent la cicatrisation et entraînent des plaies chroniques, lesquelles ne montrent pas de signes de cicatrisation après 4 à 6 semaines (9,10). Les plaies chroniques représentent un problème de santé publique majeur, elles affectent 37 millions de personnes dans le monde et génèrent des coûts très élevés pour leurs traitements (8).

De manière générale, la cicatrisation des plaies chroniques reste bloquée dans la phase d'inflammation. Ce type de plaies possède des caractéristiques communes malgré leur étiologie,

comme des niveaux excessifs de cytokines pro-inflammatoires, des protéases, des cellules en vieillissement ainsi que l'existence de cellules sensibles à l'infection.

Dans les plaies chroniques, les niveaux élevés de protéases conduisent à la destruction de la MEC et à la dégradation des facteurs de croissance. Ceci provoque une inflammation excessive et par conséquent prolonge la phase inflammatoire de la cicatrisation. Une autre caractéristique des plaies chroniques est la présence de cellules vieillissantes, lesquelles n'ont pas la capacité à proliférer (10).

1.1.3 Les plaies chroniques principales

Il existe différents types de plaies qui peuvent devenir chroniques. Les étiologies comprennent notamment : les plaies du pied diabétique, les moignons d'amputation, les brûlures avec cicatrisation étendue, les ulcères par pression (escarres) et les ulcères de jambe. De toutes ces étiologies, seules les 3 dernières seront décrites dans ce manuscrit car le pansement développé dans ce projet est destiné plus particulièrement au soin ces trois types de plaies.

1.1.3.1 Les brûlures

Une brûlure est définie par une blessure qui détruit l'intégrité de la peau après une exposition de type thermique, électrique, chimique ou aux radiations. Le challenge pour leurs traitements est de prévenir l'infection (11). Le français Ambroise Paré (1510) a été le premier à classifier les brûlures selon leurs profondeurs en termes de sévérité (8). La sévérité d'une brûlure implique la surface touchée et la profondeur, lesquelles déterminent les conditions de morbidité et de mortalité (8,12). Une brûlure sévère endommage la peau et diminue son rôle de protection et par conséquent, provoque la perte de tissus. De plus, les brûlures détériorent la fonction de thermorégulation et la capacité de l'organisme pour la rétention d'eau et de chaleur qui conduit dans certains cas à l'hypothermie (13). Les brûlures peuvent être classifiées en 3 degrés selon leurs profondeurs (**Figure 4**) :

- **Brûlures de premier degré**

Ce type de brûlure correspond à un érythème (rougeur persistante) qui affecte seulement les couches superficielles de l'épiderme (couche basale atteinte) sans perte de tissus. La vasodilatation qui provoque le passage des fluides vers les tissus peut produire des œdèmes locaux (gonflement de la peau). Les brûlures de premier degré provoquent des prurits légers et ils ont une période de guérison d'une semaine sans cicatrice (8,14).

- **Brûlures de deuxième degré**

La présence de phlyctènes (bulles, cloques, ampoules) est la principale caractéristique de ce type de brûlure. Les phlyctènes sont remplies d'un liquide transparent et entourées par une zone rouge (érythème), les vaisseaux sanguins sont également dilatés mais pas endommagés. Les

phlyctènes superficielles atteignent l'épiderme et ils ont un aspect rouge vif, présentant une douleur intense au contact. Ils cicatrisent entre 15 et 20 jours sans cicatrice (14).

- **Brûlures de troisième degré**

Les brûlures de troisième degré touchent le tissu sous-cutané (8). Une zone blanche ou brunâtre, cartonnée, dure et douloureuse est la principale caractéristique de ce type de plaie. La brûlure se produit en profondeur et affecte les vaisseaux sanguins, les réservoirs cellulaires et les nerfs. Une brûlure de troisième degré a besoin d'une prise en charge d'urgence dans le but de prévenir l'infection qui retarde la guérison (14).

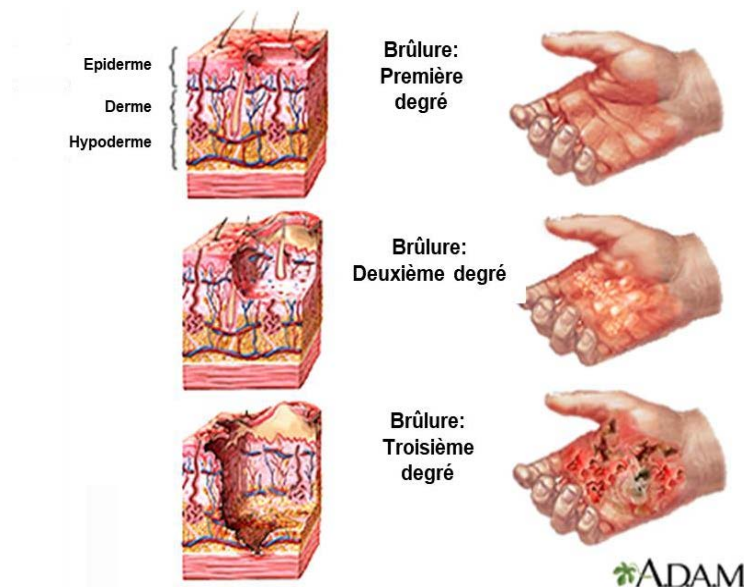


Figure 4. Classification des brûlures en fonction de leur profondeur (15).

1.1.3.2 Les ulcères de pression

Les ulcères de pression, dénommés aussi « escarres » (**Figure 5**) sont des lésions locales généralement situées dans des zones osseuses (8,16,17), causées par la pression ou friction conduisant à la constriction des vaisseaux sanguins qui provoque dans certains cas la nécrose des tissus (16,17). Les ulcères par pression sont définis, par stade, selon la profondeur du dommage (14,17):

- Stade 0 : Rougeur cutanée.
- Stade I : Présence d'érythème sans contusion, présence ou non de la douleur.
- Stade II : Plaie superficielle sèche ou humide qui implique derme et épiderme.
- Stade III : Perte de substances et tissus nécrotiques qui atteint l'hypoderme. La base de l'escarre est indolore.
- Stade IV : Grande perte de substance qui atteint les articulations, les muscles ou les os.

Les ulcères de pression sont douloureux et affectent la qualité de vie des patients tant dans l'aspect physique que psychologique. Chaque stade de la pathologie a un traitement spécifique (17) mais la règle de base est la réduction de la pression externe, le débridement de la peau et surtout le contrôle de l'infection, laquelle est la cause principale du retard de cicatrisation (16).

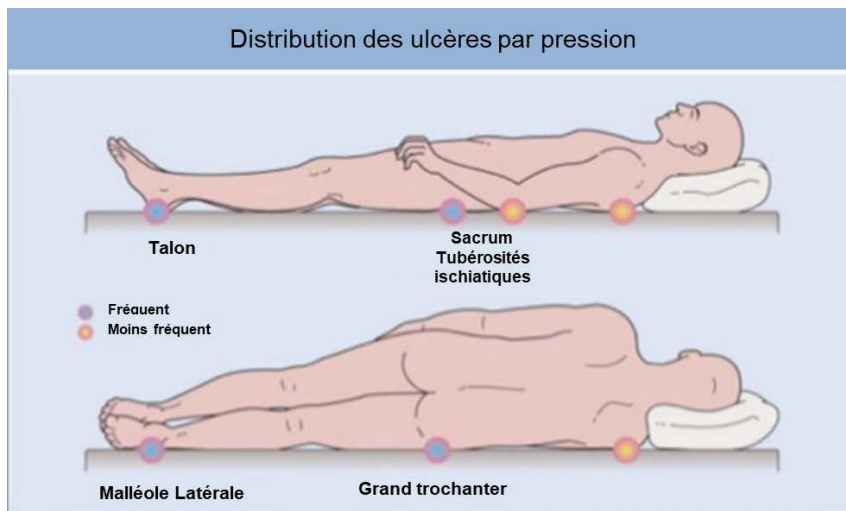


Figure 5. Schéma de la distribution des ulcères par pression (18).

1.1.3.3 Les ulcères de jambe

Les ulcères de jambe sont définis comme la perte du tissu épithélial qui affecte les zones entre le genou et la malléole (19,20). La perte de substance occasionnée par ce type de lésion peut atteindre l'os. La plupart des ulcères de jambe sont d'origine veineuse (70%) en comparaison avec les ulcères de jambe de type artériels (25%) (18). Les ulcères se forment à cause d'une altération sanguine dans le réseau artérioveineux et sont fréquents chez les personnes âgées, principalement les femmes (14).

Les ulcères de jambe de type veineux se produisent à cause de l'insuffisance valvulaire des veines qui conduit à une hyperpression veineuse et ensuite à l'apparition de varices, ou dans les cas plus graves de thromboses veineuses profondes. L'obésité provoque une inflammation veineuse pouvant conduire à une insuffisance veineuse qui peut devenir chronique. Les ulcères de jambe de type artériels, d'autre part, sont liés à une hypoxie cellulaire qui entraîne une nécrose. Le **Tableau 1** décrit les différences en termes de localisation, aspect et symptômes des ulcères d'origine veineux ou artériels. Néanmoins, la similarité entre ces types d'ulcères est qu'ils ne cicatrisent pas avant 6 semaines, avec une tendance à l'infection (14,21).

Tableau 1. Comparaison entre les ulcères de jambe de type veineux et artériels. Modifié de Morton et al (18).

Type d'ulcère	Localisation	Description / aspect	Symptômes
Ulcère Veineux	Tiers inférieur de la jambe. (Figure 6a)	Lésions uniques ou multiples, forme irrégulière, profonde et rarement nécrosée. Présence d'eczéma veineux et d'œdème (Figure 6b).	Douleur prolongée. Gonflement.
Ulcère Artériel	Autour ou au-dessus des chevilles, proéminences osseuses.	Bordures bien marquées, lit de la plaie sec et nécrosé, signes d'insuffisance artérielle (Figure 6c).	Douleur sévère, qui s'aggrave avec l'élévation de la jambe.

La chronicité des ulcères de jambe est due à une inflammation persistante qui conduit à une douleur intense, surtout au moment du changement de pansement et au débridement. La présence d'infection contribue à cette douleur due à une réponse inflammatoire. L'inflammation est apportée par la libération de médiateurs qui stimulent la production d'enzymes et de radicaux libres produisant des dommages tissulaires (22).



Figure 6. Zone de formation des ulcères de jambe (18) (a). Ulcère de jambe de type veineux (b) (20). Ulcère de jambe de type artériel (c) (20).

1.1.4 Facteurs impliqués dans les plaies chroniques

La cicatrisation est un processus complexe qui dans certaines plaies, notamment chroniques, est longue ou n'est jamais parfaite. La guérison complète des plaies ne dépend pas seulement des facteurs liés au patient ou à la plaie, mais aussi aux compétences et connaissances des professionnels de santé. Leur diagnostic peut avoir un impact important dans l'évaluation des plaies et du traitement à appliquer. Pour cette raison, il est important d'avoir des stratégies orientées vers le patient c'est-à-dire, identifier leurs besoins et inquiétudes, et les obstacles liés à la cicatrisation. Il faut néanmoins prendre en compte que le taux de cicatrisation peut varier d'un patient à l'autre (23).

La taille d'une plaie, sa profondeur ou sa localisation anatomique sont des caractéristiques qui peuvent indiquer aux professionnels de santé s'il y a ou non un risque de chronicité. Néanmoins, l'apparition de cellules sénescentes, celles qui ne répliquent pas, peut avoir un préjudice sur la cicatrisation. Par exemple, les fibroblastes sénescents provoquent un stress oxydatif et libèrent des cytokines pro-inflammatoires; un taux de plus de 15% de fibroblastes sénescents peut jouer contre le processus de cicatrisation (24).

Les plaies de surface majeure ne cicatrisent pas assez rapidement, à la différence des plaies de surface mineure (23). Une étude menée par Margolis *et al.* a conclu que les patients présentant des plaies avec une surface majeure de 2 cm² ou avec une profondeur atteignant les tendons, les ligaments, les articulations ou l'os présentent une cicatrisation réduite de 22% après 20 semaines (25). De même, les plaies nécrosées sont un obstacle au diagnostic, d'où l'importance d'effectuer une détersion efficace (23).

Concernant les facteurs physiques liés aux patients, il existe des pathologies sous-jacentes, telles que le diabète, l'obésité, la malnutrition, les maladies vasculaires et la mobilité réduite qui ont un impact important sur la cicatrisation. Savoir traiter ces pathologies est donc un paramètre important de la prise en charge des plaies (23). Un taux de glycémie contrôlé influe de manière positive sur la cicatrisation ou la restauration du flux sanguin pour améliorer le traitement des ulcères de jambe (23,26). D'autre part, les patients ayant des autres maladies sous-jacentes montrent un impact négatif sur la guérison des plaies car elles augmentent leur complexité. L'immunodéficience et l'utilisation d'immunosuppresseurs (les corticostéroïdes, l'azathioprine ou le méthotrexate) montrent des effets défavorables sur la cicatrisation car elles affectent la réponse immuno-inflammatoire (23,27,28).

Au niveau des facteurs psychosociaux, l'isolement social, le stress, la dépression et surtout les situations qui affectent la fonction immunitaire influent négativement sur le processus de cicatrisation. Yang *et al.*, ont démontré au terme d'une étude clinique, que le stress et la dépression ont un rôle très important dans la modulation des métalloprotéinases matricielles et dans l'expression des inhibiteurs tissulaires de ces dernières (29). Néanmoins, il manque d'autres travaux de recherche pour mieux comprendre l'influence que représente l'aptitude des patients face à leur plaie (23).

1.1.4.1 Plaies infectées et biofilms

Le corps humain est un écosystème dynamique habité d'une grande diversité de microorganismes dénommés « microflore ». Chez l'adulte, la microflore cutanée comprend des milliards de bactéries, de champignons et de virus (dit « commensales ») qui sont en équilibre avec les défenses immunitaires de l'hôte sans causer d'infections (30). Les types de plaies chroniques déjà mentionnées peuvent présenter une infection parce que leur caractéristiques en relation avec

la température, l'humidité et la composition des exsudats sont appropriés pour une possible colonisation et contamination microbienne (31).

Les signes et symptômes dans les plaies infectées comprennent: la chaleur et le gonflement de la zone blessée, l'inflammation excessive avec une douleur intense et des exsudats purulents suivi d'une colonisation critique et de mauvaises odeurs (32). Il est important de mentionner que la charge bactérienne et sa pathogénicité sont nécessaires mais pas suffisantes pour envahir, proliférer et endommager les tissus. En effet, l'hôte et les microorganismes ont une relation dynamique et l'infection exige un déséquilibre ainsi que celle du système immunitaire (30). Il existe quatre termes pour décrire le grade d'une plaie infectée (**Figure 7**). En premier lieu, le terme « contamination » fait référence à la présence de bactéries sans prolifération active, puis le terme « colonisation » décrit la multiplication des bactéries, sans induire la réponse de l'hôte. Le terme « colonisation critique » indique le point critique où la prolifération bactérienne surmonte la réponse de l'hôte, finalement le terme « infecté » décrit la situation dans laquelle la charge bactérienne est déjà en expansion (30).

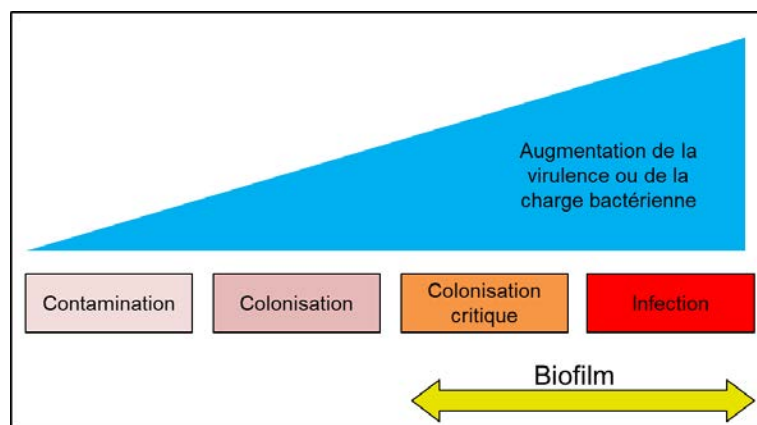


Figure 7. Evolution de la charge bactérienne dans les plaies infectées. Modifié de Swanson et al. (33).

Il est déjà admis qu'une culture bactérienne qui atteint 10^5 UFC par gramme de tissu est une infection (30,31). Les plaies sont colonisées par des microorganismes de types aérobies, anaérobies et champignons. La présence d'un seul microorganisme est suffisante pour générer un environnement approprié afin que les microorganismes pathogènes puissent le coloniser. De plus, si la charge de bactéries commensales augmente, ces dernières peuvent devenir pathogènes (31).

Il est important de savoir distinguer les infections impliquant des microorganismes planctoniques de celles impliquant la formation d'un biofilm. Les microorganismes ont été le plus souvent étudiés dans leur état planctonique, c'est-à-dire leur existence en tant qu'entités libres dans un environnement liquide. Il a pourtant été démontré que, dans la plupart des conditions naturelles et cliniques, les microorganismes vivent dans des communautés complexes connues sous le nom de biofilms, qui sont aujourd'hui considérées comme responsables de plus de 80% des infections microbiennes du corps humain (30,33).

Les biofilms sont des communautés poly- ou mono-microbiennes complexes qui ont la faculté à adhérer entre elles et aux surfaces naturelles ou synthétiques grâce à la sécrétion d'une matrice protectrice composée de protéines, d'ADN, de lipides, de substances humiques, et surtout de sucres appelés *exo-polysaccharides* (EPS). Les biofilms sont largement connus dans le domaine médical à cause de leur impact sur la santé comme par exemple l'endocardite ou l'otite d'une part ; ou à cause des problèmes d'infections sur dispositifs médicaux d'autre part comme les sondes urinaires, les implants orthopédiques et mammaires, les lentilles, les dispositifs intra-utérins et les sutures. La **Figure 8** montre le cycle de formation, de maturation et de dispersion d'un biofilm, comportant cinq étapes (33,34).

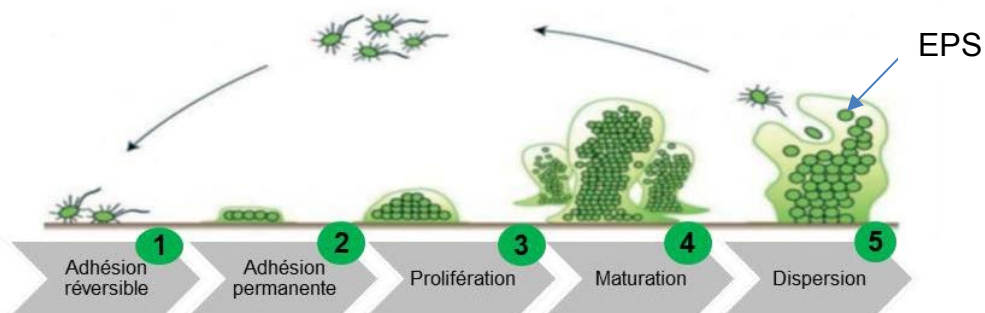


Figure 8. Représentation schématique de la formation d'un biofilm polymicrobien. Adapté de Swanson et al (33).

(1) L'adhésion réversible

Les microorganismes flottent librement dans le milieu et commencent à adhérer à la surface par des interactions hydrophobes cellules-bactéries (35), ou par les pilis et les flagelles des microorganismes. Dans cette étape, l'adhésion est faible et réversible.

(2) L'adhésion permanente

L'adhésion à la surface commence à se renforcer et à être irréversible grâce à des structures comme les pilis et les flagelles, lesquelles constituent les premiers points fixes du biofilm. L'adhésion microbienne est menée par la sécrétion de la matrice protectrice composée des EPS qui couvre les microorganismes et se comporte comme une barrière protectrice contre la réponse immunitaire de l'hôte ou des agents antibactériens.

(3) Prolifération microbienne

Après avoir adhésés de façon irréversible, les microorganismes commencent à proliférer, régulés par un mécanisme dénommé *quorum-sensing*. Il s'agit d'un mécanisme de régulation de l'expression génique en réponse à la densité de population cellulaire. Lorsque les molécules sont secrétées par *quorum-sensing*, d'autres microorganismes sont attirés et rejoignent le biofilm pour produire des micro-colonies. Pendant cette phase, les bactéries sont toutes au même stade de

croissance. Par manque de nutriments, la multiplication bactérienne est pratiquement nulle, les bactéries se débarrassent de tous les éléments inutiles consommateurs d'énergie comme les flagelles. Comme la plupart des antibiotiques agissent sur la phase de multiplication, en absence de celle-ci, leur efficacité diminue beaucoup.

(4) La maturation

L'EPS commence à s'épaissir et le biofilm devient un écosystème avec des fonctions structurelles reliant les colonies. Dans cette étape de formation du biofilm, les stratégies normales de traitement des plaies sont moins efficaces.

(5) La dispersion

Les bactéries commencent à se détacher à travers des effets de stress mécanique ou de carences nutritionnelles pour ensuite coloniser de nouvelles zones du lit de la plaie. Les biofilms développent différents mécanismes à travers les EPS pour protéger les microorganismes contre le système immunitaire, les antimicrobiens et le stress environnemental:

- **Le blocage** : Les EPS empêchent l'intrusion de grosses molécules (anticorps) et des cellules inflammatoires dans la matrice du biofilm et la diffusion d'agents antimicrobiens.
- **La protection mutuelle** : Les microorganismes présents dans les biofilms se protègent mutuellement. Les bactéries résistantes aux antibiotiques sécrètent des enzymes qui permettent aux bactéries non-résistantes de tolérer les antibiotiques. D'autre part, la cohabitation entre bactéries aérobies et anaérobies dans le biofilm génère la survie de ces dernières aux effets toxiques de l'oxygène.
- **L'hibernation** : Les bactéries entrent dans un état de quiescence, c'est-à-dire que la population bactérienne inactive leur métabolisme pour empêcher l'action des antibiotiques. Cette inactivité des antibiotiques sur les bactéries sous forme de biofilm est due à deux phénomènes: i) la présence de la couche de la matrice EPS constitue une barrière mécanique contre la diffusion des antibiotiques, ii) l'état de dormance des bactéries réduit la multiplication des bactéries, donc les antibiotiques agissant sur la multiplication (au niveau de la synthèse de la paroi ou sur le cycle de multiplication) ne sont pas efficaces (34,36).



Figure 9. Biofilm sur une plaie (30).

Les biofilms sont aussi retrouvés dans les plaies (**Figure 9**) et sont responsables du retard de cicatrisation. Les biofilms stimulent la production excessive de neutrophiles et de macrophages afin de les éliminer et produisent par conséquent, une réponse inflammatoire chronique. Les cellules inflammatoires secrètent en excès différentes substances dont les protéases (métalloprotéinases (MMP) et élastases) et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) lesquelles brisent les liaisons entre les biofilms et les tissus, mais endommagent aussi les tissus sains et altèrent les protéines et le système immunitaire. Il y a plusieurs méthodes de traitements des biofilms mais toutes ces méthodes ont pour objectif de diminuer la charge du biofilm et prévenir leur reformation (33,35).

1.1.4.2 Diagnostic des plaies infectées

Pour réaliser le diagnostic des plaies infectées, les professionnels de la santé se sont basés principalement sur des critères cliniques incluant l'évaluation du patient, les tissus qui entourent la plaie et la plaie elle-même, dans le but de détecter les signes et symptômes d'une infection ainsi que les facteurs qui pourraient augmenter son risque (33). Il a déjà été indiqué que les plaies chroniques présentent un risque plus élevé d'infection que les plaies aiguës. Cependant, il existe des systèmes de notation et des critères d'identification pour faciliter le diagnostic d'infection pour les plaies aiguës. Par contre, pour les plaies chroniques, les systèmes d'évaluation sont encore en attente. Il est important d'identifier et de différencier les signes et symptômes d'une infection locale, disséminée ou généralisée (37). Le **Tableau 2** présente les différents signes et symptômes des plaies chroniques infectées à prendre en compte pour établir un diagnostic.

Tableau 2. Description des signes et des symptômes à chaque stade de l'infection dans les plaies chroniques, adapté de Carville et al.(37).

PLAIES CHRONIQUES (ulcères de jambe, ulcères artérielles, ulcères par pression, pied diabétique)		
Colonisation (Infection localisée)	Colonisation critique (Infection disséminée)	Infection systémique
<ul style="list-style-type: none"> • Douleur. • Retard à la cicatrisation. • Œdème autour de la plaie. • Tissu de granulation saignant ou friable. • Mauvaise odeur. • Changement de la couleur du lit de la plaie. • Exsudat purulent. 	<p>Les mêmes caractéristiques d'une colonisation bactérienne plus:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Déhiscence de la plaie. • Extension de l'érythème à partir des bords de la plaie. • Lymphangite. • Malaise. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sepsis - infection confirmée : plus fièvre ou hypothermie, tachycardie, tachypnée, leucocytose ou leucopénie. • Sepsis sévère : sepsis et dysfonctionnement multi-organique. • Choc septique et septicémie. • Mort

Les professionnels de santé, spécialement les médecins et pharmaciens, doivent connaître les signes et symptômes caractéristiques des infections de plaies qu'ils voient le plus souvent, comme les ulcères de jambe, les escarres ou les ulcères du pied diabétique. Une évaluation initiale pourrait indiquer aux médecins s'il est nécessaire d'effectuer des études complémentaires comme par exemple des tests microbiologiques, des tests sanguins ou de l'imagerie pour confirmer le diagnostic et préciser la possibilité de complications afin d'établir le traitement le plus adapté (37).

1.1.5 Les pansements : Dispositifs médicaux pour traiter les plaies

Les pansements sont des dispositifs médicaux destinés aux traitements et aux soins des plaies afin de favoriser la cicatrisation. Les pansements sont constitués de différents biomatériaux et parfois contiennent des substances actives comme des sels ou nanoparticules d'argent, des molécules antiseptiques comme la chlorhexidine, des substances naturelles telles que le miel pour favoriser la cicatrisation, ou encore l'ibuprofène pour soulager la douleur.

1.1.5.1 Histoire du soin des plaies et du pansement

Le traitement des plaies fait partie des préoccupations les plus anciennes de la médecine (38). L'un des plus anciens manuscrits (2000 ans avant JC) décrit probablement pour la première fois les trois gestes de guérison : i) lavage des plaies, ii) fabrication du pansement (basé sur l'huile, l'argile ou les plantes) et iii) couverture de la plaie (39).

Les Egyptiens sont considérés comme la première civilisation à avoir utilisé des pansements adhésifs constitués principalement par du miel, de la graisse et la charpie. Cette dernière, est fabriquée à base de fibres végétales absorbantes pour le drainage des plaies. Le miel et la graisse sont utilisés afin de protéger les plaies des infections. Les Grecs soulignaient l'importance de la propreté pour le traitement des blessures et les recommandations indiquées par Hippocrate (460 avant JC) sont prises en compte encore aujourd'hui. Les Romains ont établi les « quatre signes cardinaux de l'inflammation » : la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur. Les Romains se sont inspirés des Grecs en terme de médecine et chirurgie jusqu'au moyen-âge où ils savaient déjà traiter différentes formes de plaies en utilisant du matériel chirurgical, des formulations topiques (gel, pommades ou crèmes) et plusieurs formes de pansements (38,39).

A la Renaissance, les armes à feu sont de plus en plus utilisées et provoquent des plaies plus complexes, lesquelles sont cautérisées par l'huile bouillante ou le fer rouge en générant des douleurs intenses aux soldats blessés. Ambroise Paré (1537), considéré comme l'un des pères de la chirurgie moderne remplace l'huile bouillante par un mélange de jaune d'œuf, d'huile de rose et de térébenthine (38). Au XIX^{ème} siècle, le coton et la gaze remplacent la charpie. Au même moment, Louis Pasteur découvre que les germes sont les responsables de la fermentation et de la putréfaction des plaies mettant en place des techniques antiseptiques pour contrôler des infections et réduire le taux de mortalité.

C'est à partir du XX^{ème} siècle que le traitement des plaies progresse rapidement. En 1915, le pansement « tulle gras Lumière » stérile est inventé et 47 ans après, le chercheur britannique George Winter démontre que les plaies cicatrisent plus vite en milieu humide et occlusif. Finalement, au cours des dernières années, le traitement des plaies a été révolutionné en raison d'une meilleure compréhension des phases du processus de cicatrisation. Au début des années 2000, les pansements incluant des principes actifs commencent à se développer. Aujourd'hui, il existe plus de 5000 produits destinés au soin des plaies élaborés à base de différents matériaux afin de répondre au besoin de chaque type de plaie (39).

1.1.5.2 Le rôle et classification des pansements

Les pansements sont traditionnellement utilisés pour protéger les plaies des contaminations microbiennes afin d'améliorer la cicatrisation. De la même manière, les pansements ont remplacé les crèmes, les pommades et les lotions car ces formes pharmaceutiques absorbent rapidement les fluides et par conséquent perdent leurs propriétés rhéologiques et leur efficacité (40). Comme les plaies sont variées et se présentent sous différentes formes lors de la cicatrisation, le pansement universel n'existe pas. Néanmoins, il existe des pansements adaptés en fonction du type de plaie et de ses caractéristiques, lesquels se classifient selon le **Tableau 3**.

Tableau 3. Les différents types de pansements et leurs applications. Modifié de l'HAS, 2007

Type de pansement	Composition	Effet	Application
Hydrogel	Réseau polymère hydrophile gonflé d'eau	Hydratation, et détersion autolytique	Plaie non-infectée et peu exsudative
Irrigo-absorbants	Polyacrylate	Absorption et irrigation de la plaie.	Plaies en phase détersive
Alginates	Polymère naturel d'acide alginique (algues brune) associé ou non à la CMC (carboxyméthylcellulose) et l'acide hyaluronique.	Absorption, formation d'un gel non-adhérent, hémostatique antibactérien	Plaies hémorragiques, plaies présentant une colonisation critique. Phase de détersion et phase de bourgeonnement.
Hydrofibres	100% fibres non tissés de CMC sodique	Grande capacité d'absorption, gélification au contact	Plaie très exsudative de la phase de détersion à la phase de bourgeonnement.
Hydrocellulaires	Mousse de polyuréthane	Absorbant	Phase de détersion et phase de bourgeonnement.
Hydrocolloïdes	100% fibres de CMC sodique	Imperméabilité à l'eau et aux bactéries, absorbant.	Plaie peu exsudative non-infectée en phase d'épidermisation.
Tulles	Compresse de mailles larges enduites de vaseline ou paraffine.	Pas d'adhérence	Dermabrasions et brulure de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation.
Interfaces	Mailles étroites enduites de silicone, CMC et technologie lipido-colloïdes	Evite le dessèchement	Dermabrasions et brulures de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation.
Films	Film polymère	Adhérent et semi-perméable	Escarres ou comme pansement secondaire.
Acide Hyaluronique	Compresse	Déclenche la cicatrisation des plaies présentant des tissus de granulation inflammatoires	Plaies chroniques

Il y a un ensemble de caractéristiques qui décrivent le pansement, représenté sur la **Figure 10**. Celui-ci a comme objectif principal la protection et la guérison de la plaie dans la période la plus courte, sans signe de douleur ou d'inconfort (41). Il doit répondre aux fonctions pour lesquelles il a été conçu ainsi que d'être rentable et efficace (42). Les pansements peuvent contribuer à la

cicatrisation complète des plaies grâce aux différents mécanismes. En effet, le débridement améliore la migration des leucocytes dans le lit de la plaie et favorise l'accumulation des enzymes. Le nettoyage de la plaie est encore plus important lors de l'apparition des tissus nécrotiques pouvant prolonger la phase inflammatoire et servir de milieu pour la croissance bactérienne. La conservation d'un milieu humide prévient par exemple le dessèchement et la mort cellulaire, favorise l'angiogenèse et la synthèse du tissu connectif. D'autre part, les plaies chroniques produisent une quantité excessive d'exsudats à cause de la formation d'un œdème inflammatoire. Les exsudats contiennent des enzymes qui dégradent les tissus et bloquent par conséquent la prolifération cellulaire. La production excessive des exsudats peut aussi instaurer une macération de la peau saine, laquelle se ramollit et se décompose, pouvant s'infecter. La nécessité d'avoir des pansements avec une capacité d'absorption est donc très importante (43).

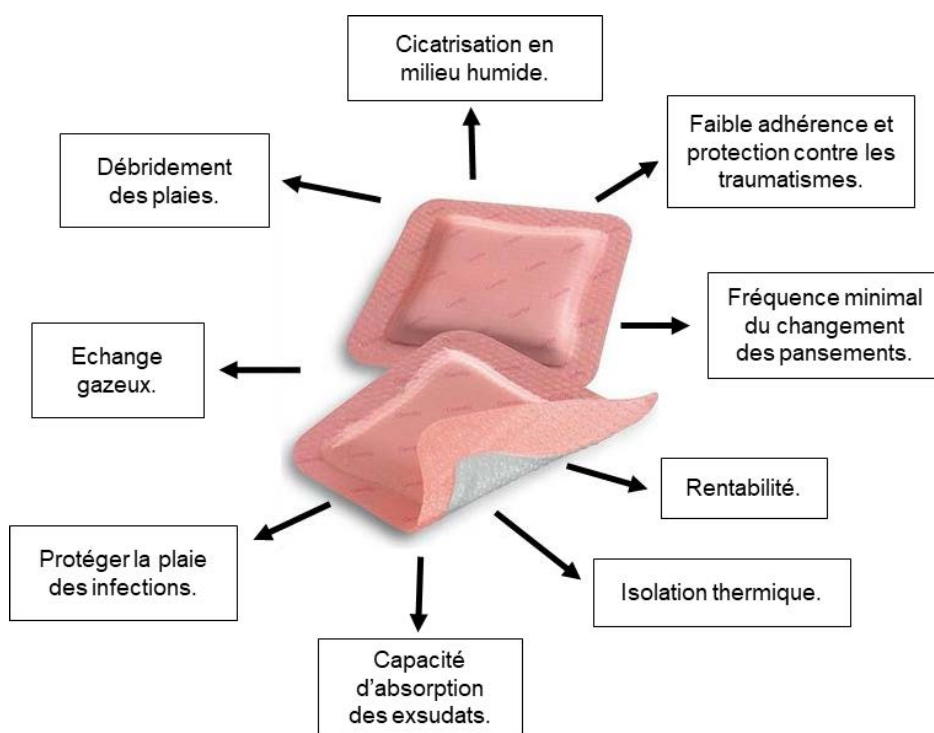


Figure 10. Description des caractéristiques pour un pansement « idéal », adapté de Mayet et al., 2014 (44).

L'échange gazeux permet de contrôler la production des exsudats grâce à la perméabilité. Un niveau bas d'oxygène stimule l'angiogenèse et un niveau élevé stimule l'épithélialisation. Si le pansement maintient une température normale dans l'organisme, le flux sanguin et la migration épidermique s'améliorent. Les matériaux utilisés pour la conception des pansements doivent présenter aussi une faible adhérence afin d'éviter la douleur et l'endommagement des tissus au moment de le changer. Les pansements doivent également être efficaces, c'est à dire, ils doivent répondre à l'objectif pour lequel ils ont été conçus. Ceci peut s'obtenir avec une évaluation correcte de la plaie qui permet de conclure un diagnostic efficace pour appliquer la meilleure option de traitement (43).

1.1.5.3 Les pansements techniques

Les pansements traditionnels comme la gaze, le coton ou les bandages synthétiques peuvent apporter une protection de la plaie. Néanmoins la protection diminue lorsque le support commence à s'humidifier soit par les exsudats de la plaie, soit par les fluides externes. Les patients qui présentent des plaies chroniques ont besoin de pansements techniques afin de traiter les différents facteurs qui retardent la cicatrisation. Ces pansements, dits « avancés », sont conçus à base de matériau spécifique dans le but d'incorporer dans leur structure des substances biologiques ou bioactives (antiodeurs, pro-cicatrisantes, ou médicamenteuses) afin d'améliorer la cicatrisation. Des substances comme les antimicrobiens, les anti-inflammatoires, les antalgiques, les protéines et les facteurs de croissance peuvent être libérés directement dans la plaie et augmenter l'efficacité du traitement (40).

1.1.5.3.1 Les pansements anti-odeurs : le charbon actif

Les pansements au charbon actif sont élaborés sous la forme de compresses ou de plaques contenant plusieurs couches de charbon dont la fonction est de neutraliser les mauvaises odeurs de la plaie notamment les ulcères carcinomateux afin d'améliorer le confort du patient et du personnel de soin. Les pansements au charbon actif peuvent être appliqués secs ou humides (imprégnés dans le sérum physiologique) directement sur la plaie, ils peuvent être utilisés comme des pansements primaires ou secondaires.

Même si les pansements au charbon actif sont plutôt conçus pour la neutralisation des mauvaises odeurs des plaies, l'étude menée par Kerihuel a montré l'efficacité du pansement *ACTISORB*[®] par rapport à un pansement hydrocolloïde (*DuoDerm*, *ConvaTec*, utilisé comme contrôle) en termes de réduction de la surface de la plaie (ulcères de jambe ou escarres), critère de jugement classique pour évaluer l'efficacité d'un pansement. Les patients ayant utilisé le pansement *ACTISORB*[®] ont présenté une réduction de la plaie de 11,7% (escarres) et de 16,4% (ulcères de jambe) après une semaine. Chez les patients ayant utilisé le comparateur, aucune réduction de la plaie n'a été observée. De plus, les patients traités avec *ACTISORB*[®] ont mieux toléré le pansement que ceux qui ont utilisé le pansement *DuoDerm* (45). Les études cliniques des pansements au charbon actif sont très rares. De ce fait, il n'y a pas d'informations spécifiques sur l'efficacité, les effets indésirables ou les possibles risques liés à son utilisation. Néanmoins, en 2018, la CNEDiMTS, composante de la Haute Autorité de Santé (HAS), a estimé un service attendu suffisant du pansement *ACTISORB*[®] en raison de son intérêt thérapeutique et de santé publique.

En 2014, le pansement *BeneHold*[™] (Laboratoire Vancive), a été introduit sur le marché. Ce pansement est une association d'un hydrocolloïde et de cyclodextrine qui fonctionnent ensemble afin d'améliorer le contrôle des odeurs. Les cyclodextrines ont besoin de l'eau pour piéger les molécules responsables des mauvaises odeurs et les hydrocolloïdes fournissent de l'eau en

absorbant les exsudats de la plaie. Ce mécanisme de synergie permet donc l'absorption des fluides et des mauvaises odeurs.

1.1.5.3.2 Les pansements pro-cicatrisants

- **L'acide hyaluronique (HA)**

Ces pansements contiennent dans leur structure l'acide hyaluronique (HA), dénommé aussi hyaluronate. C'est un polysaccharide naturel composé d'acide D-glucuronique et de N-acétyl glucosamine. L' HA est le composant central du tissu conjonctif de la peau (derme) et du cartilage (46) d'où l'intérêt de l'appliquer comme pansement. Ses propriétés hygroscopiques maintiennent un environnement humide favorable à la cicatrisation.

Dereure *et al.*, ont évalué l'efficacité d'un pansement à base d'HA sur la réduction de la surface des plaies d'ulcères de jambe de type veineux. L'étude, réalisée en double aveugle, a rapporté que la réduction de la surface de l'ulcère était significativement plus élevée dans le groupe traité par le pansement à base d'HA (39%) que dans le groupe ayant utilisé le *dextranomer* (contrôle) (5%) au jour 45 (47). De la même manière, l'étude menée par Humbert *et al.* conclut qu'au jour 45, le pourcentage de réduction de la surface de l'ulcère était également significativement plus élevé pour les patients ayant utilisé les gazes imprégnées avec l'HA (*IALUSET*[®]) (73%) par rapport aux patients ayant utilisé les gazes sans HA (46%). De plus, plus de 31% des ulcères veineux sont guéris complètement après 45 jours avec l'utilisation d'un pansement pro-cicatrisant à base d'HA (48). Malgré l'efficacité montrée sur la cicatrisation des ulcères de jambe, l'HA a rapporté aussi des effets adverses dans deux études cliniques. L'infection de l'ulcère, les eczémas, la douleur intense entre autres, représentent des obstacles pour l'utilisation des pansements à base d'HA (47,48). Cependant, l'HAS a estimé un service attendu suffisant du pansement *IALUSET*[®] en raison de son intérêt thérapeutique pour le traitement des ulcères de jambe.

- **Le facteur nano-oligosaccharide (NOSF)**

Récemment, les Laboratoires Urgo ont présenté une nouvelle gamme de pansements dénommée *UrgoStart*[®]. Ce sont des pansements non occlusifs composés d'une trame en polyester imprégnée d'une matrice lipido-colloïdale (TLC) contenant un facteur nano-oligosaccharide (NOSF). C'est un saccharose octosulfaté qui présente des propriétés antiprotéases. Plus particulièrement, il limite l'action néfaste de Métallo-Protéase Matricielles (MMP). Le TLC-NOSF interagit avec le microenvironnement de la plaie pour limiter l'excès des métalloprotéases et ainsi rétablir l'équilibre biochimique. Le TLC-NOSF crée un milieu humide, favorise la migration des fibroblastes et n'est pas adhérent à la plaie.

La gamme d'*UrgoStart*[®] a été évaluée dans plusieurs études cliniques sur des ulcères de jambe, des escarres et des ulcères du pied diabétique. Edmonds *et al.*, ont réalisé une étude internationale, randomisée, comparative en double aveugle d'*UrgoStart*[®] *Contact* (TLC-NOSF) sur

le traitement des ulcères du pied diabétique d'origine neuro-ischémiques. Les résultats ont montré que le pansement TLC-NOSF améliore considérablement la fermeture des ulcères du pied diabétique après 20 semaines de traitement. Cependant, 20% des patients ayant été traités avec *UrgoStart® Contact* et 28% des patients traités avec le comparateur (*UrgoTul®*) ont présenté une infection sans risque d'amputation (49). L'HAS a estimé un service attendu positif pour les pansements *UrgoStart®* dans le traitement des ulcères de jambe et des ulcères du pied diabétique d'origine neuro-ischémique, non infectés, en phase de bourgeonnement.

- **Le miel**

Le miel a montré une efficacité cicatrisante dans une large gamme de plaies, notamment les brûlures et les ulcères de jambe. Cette efficacité s'explique par les nombreux effets pharmacologiques du miel : activité antimicrobienne, désodorisante, débridant (faculté à dégrader les tissus nécrosés), osmotique, anti-inflammatoire et antioxydante, lesquelles sont importantes pour améliorer la cicatrisation (39).

Les propriétés antimicrobiennes du miel sont attribuées à sa forte teneur en sucre (hyperosmolarité), à son acidité (pH 3,95 – 5,03 (50)), à certains composés antibactériens comme les flavonoïdes (la pinocembrine), des enzymes (glucose oxydase) ou les médiateurs d'acides phénoliques (syringate de méthyle). Les pansements à base de miel sont disponibles dans diverses préparations commerciales telles que les tulles, les gazes (*Manuka IG®*), les alginates (*Activon®*, *Apinate™*) et les hydrogels (*Medihoney®*) (39). Le pansement *Medihoney®* a été le premier pansement à base de miel (miel de Manuka) à recevoir l'approbation de la FDA pour un usage clinique. Selon la FDA, ce pansement est indiqué pour le traitement des plaies exsudatives telles que les ulcères du pied diabétique, les ulcères de jambe, les ulcères par pression, les brûlures et les blessures traumatiques et chirurgicales (39).

Les études cliniques réalisées ces cinq dernières années sur les pansements *Medihoney®* ne sont pas suffisantes pour établir l'efficacité et la rentabilité de ces pansements à base de miel. L'étude prospective non comparative et multicentrique de Dunford et Hanano, a eu pour objectif d'évaluer l'efficacité du pansement *Medihoney®* sur le traitement des ulcères de jambe. Les résultats ont montré que la douleur et la taille de l'ulcère sont diminuées de façon significative pour 50% des patients après 12 semaines de traitement. Les patients ayant des plaies odorantes ont signalé un effet positif, généralement après la première application de ce pansement (51). L'étude randomisée de Robson et al. a également conclu que le taux de cicatrisation après 12 semaines d'évaluation était de 46,2% dans le groupe traité par les pansements *Medihoney®* contre 34,0% dans le groupe traité avec le compteur. Cependant, 3,8% des patients ont présenté une détérioration de la plaie tout au long de l'étude (52). Malgré les résultats positifs de ces études cliniques sur les pansements *Medihoney®*, l'HAS a estimé un service attendu insuffisant car les données cliniques rapportées restent insuffisantes pour démontrer l'intérêt thérapeutique de *Medihoney®*.

1.1.5.3.3 Les pansements combinés

Selon la définition de l'ANSM, les pansements combinés sont ceux qui présentent dans leur composition, une ou des substances médicamenteuses comme seconde action (53) afin d'améliorer la cicatrisation.

Dans les plaies chroniques, le processus de cicatrisation reste bloqué dans la phase d'inflammation, caractérisée par le gonflement de la zone blessée et par une douleur constante handicapante pour le patient. L'autre facteur qui provoque la douleur chez les patients est le changement fréquent de pansements, spécialement pour les plaies sèches (40). Le soulagement de la douleur est donc un des objectifs principaux des traitements des plaies chroniques présentant ou non une infection.

- **Les pansements avec ibuprofène**

L'ibuprofène (IBU), (acide alpha-méthyl-[4-(2-méthylpropyl) phényl] propanoïque) est une substance active appartenant au groupe des anti-inflammatoires non stéroïdes (AINS). L'IBU est un inhibiteur non sélectif de la cyclooxygénase (COX-2), une enzyme impliquée dans la synthèse des prostaglandines. L'inhibition de la COX-2 conduit à la diminution des prostaglandines, lesquelles sont impliquées dans la médiation de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre.

L'IBU est indiqué comme antiinflammatoire pour le traitement de l'arthrite et comme analgésique pour soulager la douleur. Le **Tableau 4** présente les doses d'IBU indiquées pour différents traitements.

Tableau 4. Doses d'ibuprofène utilisées pour différents traitements.

Traitement	Doses
Arthrose et polyarthrite rhumatoïde	1200 à 3200 mg/jour
Dysménorrhée	200 à 400 mg tous les 4 ou 6 heures
Douleur	200 à 400 mg tous les 6 heures
Fièvre	200 mg tous les 4 ou 6 heures

L'IBU présente particulièrement un effet local pour les plaies et soulage la douleur chez les patients ayant des ulcères de jambe de type veineux (40). Sur le marché, le pansement *BIATAIN®IBU* est le seul pansement présentant l'IBU dans sa formulation. Plusieurs études cliniques de ce pansement ont été réalisées. Fong *et al.* ont comparé l'efficacité et la sécurité de *BIATAIN®IBU* par rapport au pansement de base *BIATAIN®* chez des patients ayant un ulcère de jambe de type veineux. Le critère principal de jugement de cette étude était le soulagement de la douleur au cours

des 5 premiers jours. Les résultats ont montré que le soulagement de la douleur était significatif pour les patients traités avec *BIATAIN®IBU* par comparaison avec ceux traités par *BIATAIN®*. Néanmoins, la réduction de la surface de l'ulcère n'était pas statistiquement différente entre ces deux groupes (54).

De la même manière, les études de Gottrup *et al.* parviennent à la même conclusion. Cette étude a rapporté que le pourcentage de patients ayant un soulagement de la douleur au cours des 5 premiers jours était statistiquement différent entre les deux groupes, *BIATAIN®IBU* (40%) et *BIATAIN®* (30%) ($p < 0,05$). Il n'existait pas de différence significative de la réduction de la surface de l'ulcère pour les deux pansements testés (55). De plus, les deux études ont rapporté des effets adverses comme l'infection, les eczémats et les ampoules au moment de l'utilisation de ces pansements (54,55). L'HAS a estimé un service attendu insuffisant du pansement *BIATAIN®IBU* car son intérêt thérapeutique n'a pas pu être établi, et par conséquent son intérêt de santé publique n'a pas été déterminé.

- **Les pansements antimicrobiens**

Les plaies chroniques présentent un environnement idéal pour la colonisation microbienne, il est essentiel de les protéger avec des pansements contenant des agents antimicrobiens à cause du risque infectieux. Néanmoins, si la plaie est déjà infectée, le retard de cicatrisation est définitif. Dans le but d'améliorer la cicatrisation des plaies chroniques infectées, différents agents antimicrobiens ont été incorporés dans les pansements (40,56). Ces agents antimicrobiens comprennent essentiellement des antibiotiques, des métaux (ex. l'argent), des antiseptiques et des substances d'origine naturelle (ex. le miel, les huiles essentielles et le chitosan) (56). La **Figure 11** représente les fonctions d'un pansement antimicrobien avec i) la réduction de la charge microbienne et ii) la prévention de la surinfection pendant la cicatrisation (40) (56).

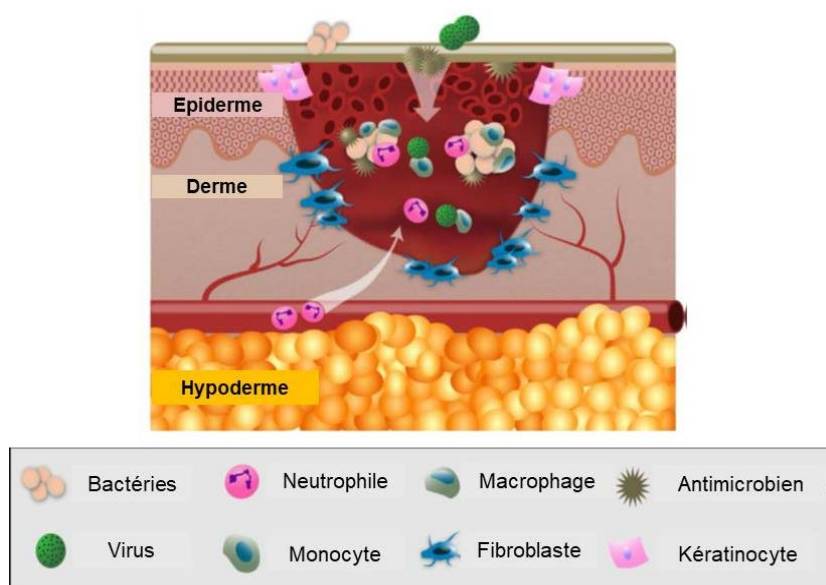


Figure 11. Représentation du processus de cicatrisation d'une plaie infectée recouverte par un pansement antimicrobien. Image adaptée de Simões *et al.* (56).

L'utilisation des antibiotiques pour l'application locale sur les plaies devient progressivement habituelle car les doses appliquées directement sur les plaies infectées sont plus faibles par rapport aux doses appliquées par voie systémique ou par voie orale (40). Simões *et al.*, résumant différents travaux de recherches dans lesquels une large gamme d'antibiotiques (β -lactames, aminoglycosides, quinolones, sulfamides, tétracyclines et glycopeptides) a été incorporée dans différents pansements (hydrogels, films, mousses, fibres). Leur efficacité antibactérienne a été évaluée sur des souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (56). Néanmoins, et ce malgré la disponibilité de plusieurs antibiotiques pour traiter les infections cutanées, leur utilisation récurrente pourrait déclencher à terme une résistance bactérienne.

1.1.5.3.1 Les pansements à la chlorhexidine

La chlorhexidine (CHX), appartenant au groupe des biguanides, est un antiseptique à large spectre d'action, largement utilisée pour l'antisepsie bucco-pharyngienne et cutanée (57). Actuellement, il existe de nombreuses spécialités pharmaceutiques à base de chlorhexidine seule ou associée à d'autres antiseptiques tels que le chlorure de benzalkonium (*Biseptine*®), utilisée notamment pour une application cutanée. La CHX peut être aussi incorporée dans différents pansements tel que les tulles gras (*Bactigras*®) ou sous la forme d'un gel, pour protéger les cathéters veineux centraux d'une infection : *3M™ Tegaderm™ CHG*® (Figure 12) (57).

Plus récemment, des travaux de recherche ont rapporté le développement de pansements à base de CHX pour traiter les plaies. Dans ces travaux, la CHX a été incorporée dans un *scaffold* (éponge) à base de chitosan et du polymère de cyclodextrines (59), dans un film composé de chitosan et d'acide hyaluronique (60) et dans des systèmes multicouches composés de chitosan et de polymère de cyclodextrines (PCD) (61). L'activité antibactérienne de ces pansements a été évaluée *in vitro* sur des bactéries à Gram positif et Gram négatif.



Figure 12. Le pansement *3M™ Tegaderm CHG*® contient un tampon en gel imprégné d'une solution aqueuse de gluconate de chlorhexidine (2%) afin de lui procurer une action antimicrobienne continue et durable. Le tampon de gel est activé dès qu'il entre en contact avec la peau ; il n'a pas besoin d'être humidifié. La chlorhexidine migre sous l'embase du cathéter pour protéger la zone de ponction et sa périphérie. Une fois ce pansement appliqué, il faut le recouvrir avec un pansement secondaire (54).

1.1.5.3.3.2 Les pansements à l'argent

L'argent est utilisé depuis de nombreuses années notamment dans le domaine médical comme agent antimicrobien (62). On sait à travers l'histoire que les cultures précolombiennes et les Incas effectuaient des trépanations et remplaçaient l'os avec des plaques d'argent ou d'or. A partir de 1830, Carl Crédé, médecin Allemand, a été le premier à administrer des gouttes d'une solution de nitrate d'argent à 1 % dans les yeux des nouveau-nés pour prévenir l'ophtalmie néonatale. Suite à cela, l'argent commence à être utilisé comme un agent antimicrobien sous plusieurs formes comme par exemple des gouttes nasales (ArgyroIND), des solutions colloïdales (CollargoIND) ou sous forme de sulfadiazine argentique, pour le traitement des brûlures. Actuellement l'argent est incorporé dans plusieurs dispositifs médicaux comprenant les prothèses vasculaires, les pansements, les cathéters veineux, les sondes urinaires, les prothèses orthopédiques ou les lentilles (63).

Les pansements sont les dispositifs médicaux à base d'argent les plus répandus sur le marché. Ces pansements ont réduit certains problèmes associés aux préparations des solutions topiques contenant de l'argent. Ils sont faciles à appliquer, leur disponibilité est prolongée et la fréquence du changement est réduite. D'autre part, l'argent présente un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques; l'argent agit sur plusieurs sites de la cellule cible en diminuant donc le risque d'une résistance bactérienne (64).

L'argent possède un large spectre d'action mais pour être actif il doit être sous sa forme ionisée Ag^+ . Les ions d'argentiques sont hautement réactifs et affectent des sites multiples dans les cellules bactériennes (**Figure 13**), causant en définitif leur destruction. Ils se lient aux membranes bactériennes, provoquant la rupture de la paroi cellulaire. Les ions argent transportés dans la cellule perturbent les fonctions de celle-ci en se liant aux protéines et en interférant sur la production d'énergie, les fonctions enzymatiques et la réplication cellulaire (64,65).

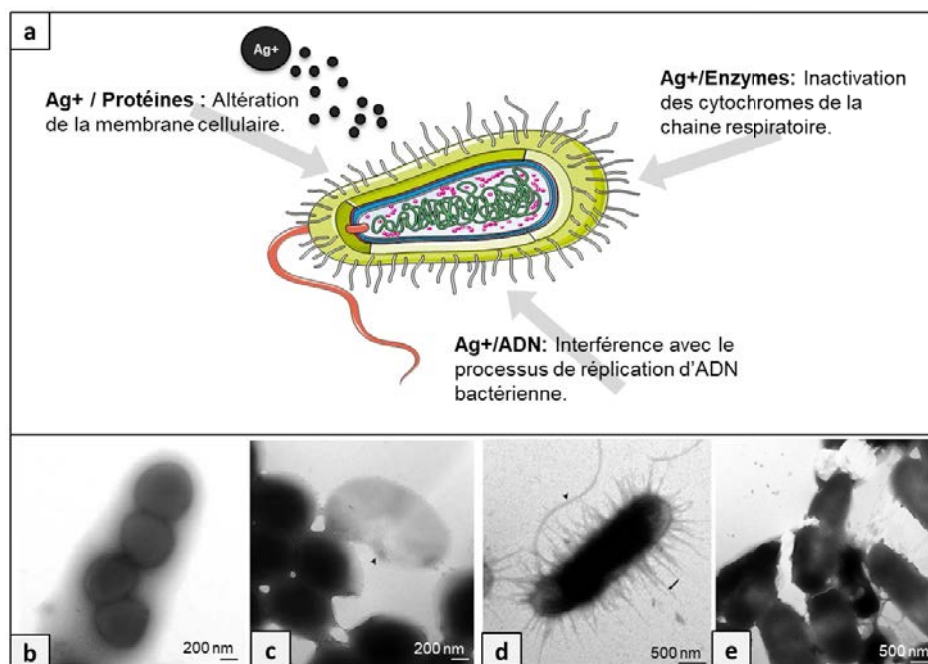


Figure 13. Mécanisme d'action de l'argent sur des bactéries (a). Images observés par microscopie électronique en transmission de la morphologie externe de *S. aureus* et d'*E. coli* avant (b – d) et après traitement par une solution en argent à 0,2 ppm (c – e). (66).

L'argent, en plus d'être efficace contre les infections, a d'autres effets bénéfiques sur la cicatrisation. Nadworny *et al.*, ont rapporté l'effet anti-inflammatoire des nanocristaux d'argent sur la dermatite induite chez les porcs (67). De leur côté, Wright *et al.*, ont démontré que l'argent favorise la néovascularisation et la suppression des métalloprotéinases sans compromettre les autres éléments essentiels à la cicatrisation (68). Néanmoins, les études cliniques n'ont pas encore été effectuées.

L'argent peut être utilisé à concentrations variables sous diverses formes dans les pansements. On retrouve l'argent élémentaire (nanocristaux ; argent métallique), en composé inorganique (sels d'argent, sulfadiazine argentique), ou en complexe organique (alginat d'argent, CMC d'argent). L'argent peut aussi être incorporé dans les pansements sous la forme d'un revêtement ou faire partie de sa structure mais aussi comme combinaison de ces deux options (64).

En ce qui concerne les soins des plaies, les pansements à l'argent sont indiqués pour traiter les plaies aiguës et chroniques qui conduisent à une infection localisée, diffusée ou générale (**Figure 14**) et ont pour rôle de réduire la charge bactérienne et d'agir comme une barrière contre les microorganismes afin d'éviter une surinfection.

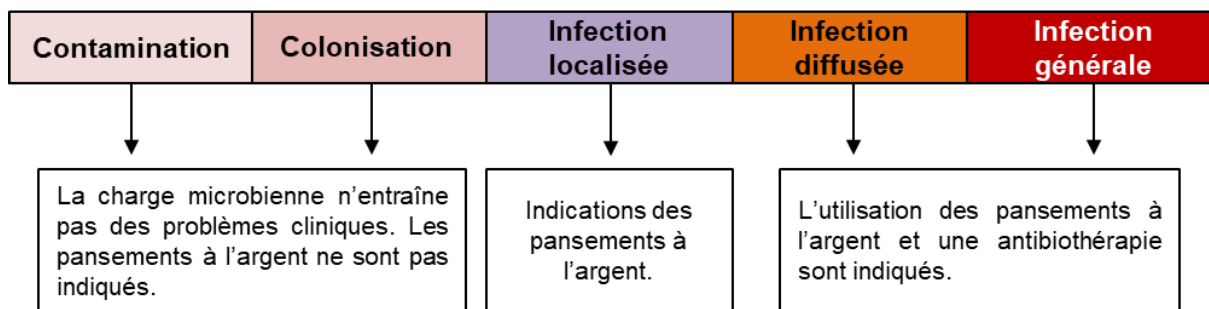


Figure 14. Utilisation des pansements à chaque stade d'une plaie infectée. Adaptée de McGregor et al., (64)

1.1.5.3.3 Les effets indésirables de l'argent

Lorsqu'un pansement à l'argent est appliqué sur une plaie, seule une faible proportion d'argent est biodisponible vis-à-vis des bactéries, tandis que l'excédent reste dans le support et sera perdu lors du renouvellement du pansement. Concernant l'argent qui a diffusé dans la plaie, il peut se lier aux protéines mais également avoir une activité toxique envers les cellules. Il est également possible qu'une quantité très faible d'argent s'absorbe par la voie systémique, laquelle est ensuite excrétée par la voie biliaire ou urinaire (64). De nombreux travaux de recherche ont évalué les possibles effets indésirables de l'argent, comme l'argyrie, les réactions allergiques et la cytotoxicité. La diffusion incontrôlée de l'argent vers les tissus sains conduit à une réaction toxique sur les cellules, d'où la nécessité de trouver des nouvelles stratégies pour limiter la diffusion de l'argent vers les tissus tout en améliorant sa disponibilité au sein du tissu et donc son efficacité antibactérienne de contact.

- **L'Argyrie**

L'ingestion excessive ou le contact prolongé avec des produits à base d'argent peut produire l'argyrie qui est une affection caractérisée par la pigmentation bleu-gris ou gris-noir de la peau ou des muqueuses se produisant par la photo-réduction de l'argent (69). L'argyrie est sous catégorisée en argyrie systémique (**Figure 15 A, B**) ou locale (**Figure 15 C**). Plusieurs études ont rapporté que les pansements à l'argent (70) ou les crèmes à base de la sulfadiazine d'argent (71) peuvent conduire à une argyrie locale qui disparaît à l'arrêt de l'administration de ces produits (64).



Figure 15. Argyrie systémique (a et b) chez un patient ayant utilisé durant plusieurs années des gouttes pour le nez contenant un sel d'argent. Argyrie locale (c) chez un patient ayant utilisé des compresses à base d'argent (69).

- **Les allergies**

L'utilisation des produits contenant l'argent peut conduire à une réaction allergique comme la dermatite de contact dont les cas signalés surviennent plutôt sur des populations déjà sensibilisées. Cependant, les tests d'allergènes ont montré de possibles réactions allergiques venant du nitrate d'argent ou de la sulfadiazine argentique qui provoquent une éruption cutanée sur les zones exposées (69).

- **La toxicité cellulaire**

L'argent, sous différentes formes, a aussi montré des effets toxiques envers les cellules et les tissus. Selon Atiyeh *et al.*, les pansements à base de nitrate d'argent produisent des effets toxiques dus à la réduction du nitrate en nitrite (65), indépendamment de l'argent. Poon et Burd ont évalué l'effet toxique *in vitro* du pansement commercial *ActicoatTM* (argent nanocristallin) et d'une solution de nitrate d'argent sur des fibroblastes et kératinocytes. Les résultats ont montré que les produits à base d'argent ne peuvent pas différencier les cellules saines et les bactéries pathogènes. Les doses en argent nécessaires pour éliminer les bactéries peuvent donc endommager de manière significative les fibroblastes et les kératinocytes, retardant la cicatrisation (72).

De la même manière, Boonkaew *et al.* ont comparé la toxicité *in vitro* de trois pansements à l'argent commercialisés : *ActicoatTM*, *PolyMemSilver[®]* et *FlamazineTM* (crème) sur des kératinocytes et des fibroblastes. Cette étude a conclu que *ActicoatTM* et *FlamazineTM* présentaient une toxicité sur toutes les lignées cellulaires testées après 24 heures. Seul *PolyMemSilver[®]* ne montre une toxicité que sur les kératinocytes uniquement après 72 heures (73).

Les pansements à l'argent rapportent aussi un manque perçu d'efficacité et de rentabilité remettant en question leur utilisation. L'ensemble de ces obstacles a conduit à la mise en place de la restriction de l'utilisation des pansements à l'argent dans les établissements de santé. De toute la large gamme de pansements à l'argent commercialisée, il n'en existe que deux qui montrent un service attendu suffisant et sont donc remboursés par la Sécurité Sociale. Ce sont *UrgoTul[®]-Ag* (Laboratoires Urgo) et *Release Ag[®]* (Johnson & Johnson). L'HAS a estimé un service attendu suffisant pour ces deux pansements en raison de leur intérêt thérapeutique dans les ulcères de jambe (*UrgoTul[®]-Ag*) et sur les escarres ou les brûlures (*Release[®] Ag*).

1.1.6 Conclusion

La peau est l'organe qui assure la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures. La structure et l'organisation cellulaire de la peau forment la première ligne de défense contre les microorganismes pathogènes, d'où l'importance de son intégrité. Lors de la formation d'une plaie, le processus de cicatrisation se déclenche immédiatement. Néanmoins, lorsque la peau présente une infection, la cicatrisation reste bloquée dans la phase d'inflammation, conduisant à un retard de cicatrisation et à des douleurs intenses. Ce phénomène est considéré comme un problème de santé publique car la prise en charge génère des dépenses élevées pour l'économie de la santé.

Le traitement des plaies chroniques présentant une infection associée à une douleur importante reste un challenge pour les professionnels de santé. Une solution pour leur traitement est l'utilisation de pansements présentant à la fois des propriétés antibactériennes et analgésiques. Parmi les pansements sur le marché, ceux à base d'argent sont les plus utilisés pour traiter l'infection, grâce au large spectre d'action de l'argent. Cependant, l'effet toxique de l'argent lors de son contact avec les tissus entraîne une mauvaise perception de son efficacité, remettant en cause son bénéfice. Il est donc important de concevoir de nouvelles stratégies afin de développer des pansements à base d'argent présentant une activité antibactérienne avec une diffusion limitée vers la plaie. De plus, l'association de l'argent avec un autre principe actif destiné à traiter la douleur serait intéressant pour fournir une bithérapie adaptée au traitement des plaies chroniques infectées. Ce type de pansement n'existe pas et pourrait être une alternative au traitement des plaies comme les ulcères et les brûlures.

1.2 Textiles fonctionnalisés pour le soin des plaies

1.2.1 Les supports textiles des pansements

Les textiles médicaux sont des produits de santé destinés à être utilisés comme des produits de soins médicaux et d'hygiène, comme des dispositifs extracorporels ou comme des matériaux implantables et non implantables. Les textiles médicaux (tissés, tricotés, non tissés) utilisés pour les pansements sont élaborés à base de fibres ou de fils d'origine naturelle ou synthétique. Ils doivent présenter plusieurs propriétés tels que l'absence de toxicité, de réaction allergique, mais aussi être stérilisables, biocompatibles et présenter de bonnes propriétés mécaniques. Comme la stérilité est une propriété essentielle pour les pansements, les polymères utilisés dans leur fabrication doivent être par conséquent capables de résister aux conditions physiques et chimiques propres au processus de stérilisation (74).

Les fibres textiles présentent une longueur d'au moins 100 fois leur diamètre. Les fibres peuvent être assemblées en fils pour former des étoffes par tissage, tricotage, tressage, ou par enchevêtrement de fibres ou de mono-filaments pour former des non tissés (75).

1.2.1.1 Fibres textiles obtenues des polymères naturels

Certains polymères d'origine naturelle sont largement utilisés dans la fabrication des pansements en raison de leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. Ces polymères induisent et stimulent le processus de cicatrisation et ne rapportent pas de réactions immunologiques (76,77). Parmi tous les polymères naturels existants, les plus utilisés dans l'élaboration des fibres sont la cellulose, l'alginate et le collagène.

1.2.1.1.1 La cellulose

La cellulose est le polysaccharide naturel le plus abondant, elle est par exemple le constituant de la membrane des cellules végétales et du bois. La cellulose est un polymère linéaire avec des unités D-glucopyranoses liées par des liaisons β - (1, 4) (**Figure 16 A**). La cellulose est insoluble dans l'eau grâce à la présence de liaisons hydrogènes entre les chaînes polymères (75,76). Néanmoins, les groupes hydroxyles de la cellulose sont hautement réactifs et peuvent être facilement fonctionnalisés pour l'obtention de dérivés de la cellulose comme la méthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose et la carboxyméthylcellulose (CMC) (75). Ces dérivés de la cellulose sont solubles dans plusieurs solvants ce qui permet de former différents composés comme des membranes, des éponges ou des fibres, notamment dans les pansements (**Figure 16 B**) afin de stimuler le processus de granulation et d'épithélialisation (77).

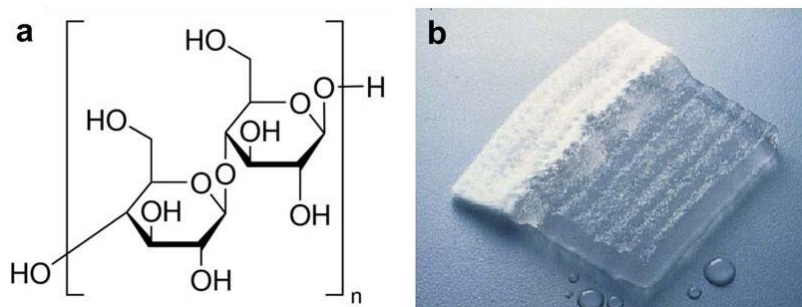


Figure 16. a) Structure chimique de la cellulose (78). b) Pansement à base de carboxyméthylcellulose (79).

1.2.1.1.2 L'alginate

L'alginate est un polysaccharide linéaire obtenu à partir d'algues brunes (*Phaeophyceae*). Il est composé d'acide D-mannuronique (M) et d'acide D-gulonique (G) (**Figure 17 A**) à proportions différentes selon le type d'algues. L'alginate se présente sous la forme de sels (sodium, magnésium et calcium) que l'on peut mettre sous la forme de fibres, de mousses, et d'hydrogels (75). L'alginate est considéré comme un excellent matériau pour la conception des pansements (**Figure 17 B**) grâce à ses propriétés élastiques, hémostatiques et surtout à sa capacité d'absorption de grandes quantités d'eau et de fluides (15 – 20 fois son poids) afin de créer un environnement propice pour favoriser la cicatrisation (75–77,80).

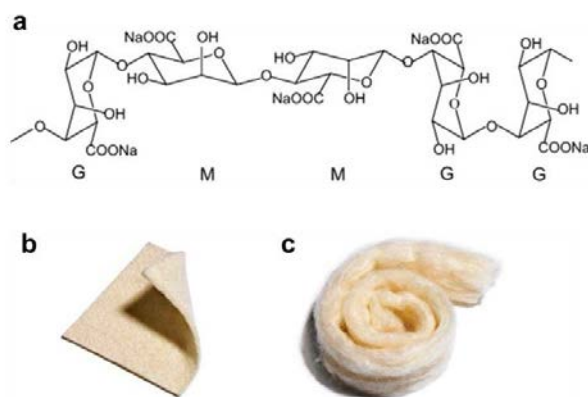


Figure 17. a) Structure de l'alginate avec des unités Mannuronique (M) et Gulonique (G) (81). b) Pansement et c) bandage à base d'alginate (82).

1.2.1.1.3 Le collagène

Les protéines sont des polymères de haut poids moléculaire formées par des unités répétitives d'acides aminés (acide aminés) liées entre elles par liaisons peptidiques (75). Le collagène (**Figure 18**) est la protéine la plus abondante chez les animaux et chez les êtres humains et constitue la composante principale du tissu conjonctif dont les os, la peau, les ligaments, le cartilage et les tendons. Il y a 29 types de collagène identifiés, dont le collagène de type I est le plus abondant. Le collagène est utilisé pour le traitement des plaies car il favorise l'attachement cellulaire, favorise la prolifération cellulaire et est parfaitement toléré par l'Homme. Il peut se présenter sous différentes

formes telles que des fibres, des films, des éponges, des hydrogels et des substituts hybrides; ces derniers, peuvent contenir des kératinocytes et des fibroblastes dans leur formulation pour stimuler la cicatrisation (75,80).

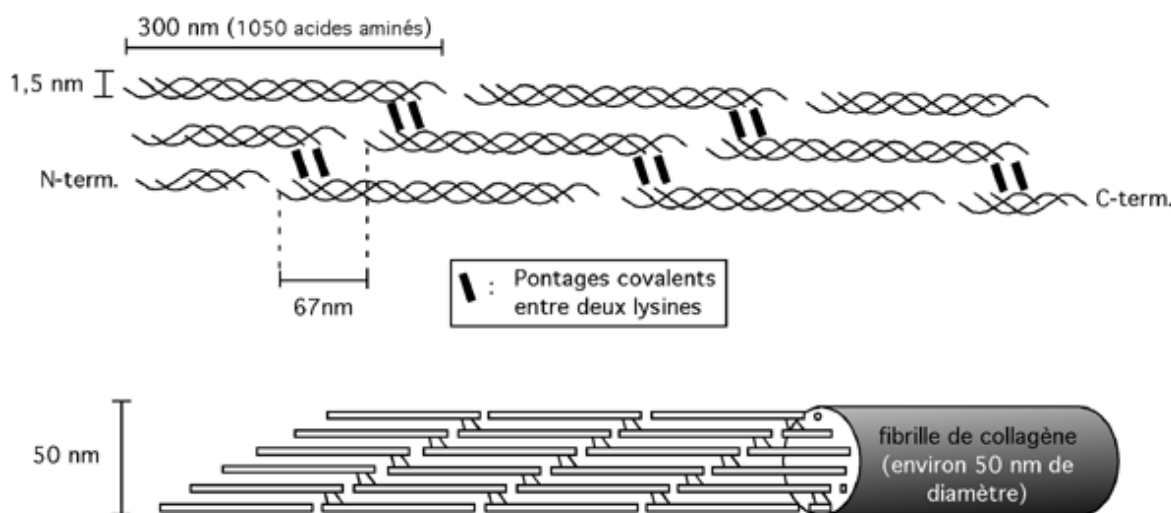


Figure 18. Structure du collagène

1.2.1.2 Fibres textiles obtenues des polymères synthétiques

Les polymères synthétiques à la différence de certains polymères naturels (ex. acide hyaluronique) n'offrent pas d'avantages thérapeutiques car ils sont biologiquement inertes. Cependant, ils peuvent être synthétisés et modifiés de manière contrôlée en fonction des besoins spécifiques pour les applications médicales (44). Les polymères synthétiques utilisés pour la conception des pansements sont nombreux et incluent le polyester (polyéthylène téréphtalate, PET), le polyamide, l'alcool polyvinylique (PVA), le polyuréthane (PU), le polyéthylenglycol (PEG), le polypropylène (PP) et l'acide poly lactique (PLA) entre autres (44).

Par exemple, le PVA présente des propriétés muco-adhésives et une bonne capacité d'absorption d'eau (83). De son côté, le PET présente de bonnes propriétés mécaniques, il est biocompatible, chimiquement et thermiquement stable, bon marché et peut être fonctionnalisé facilement pour lui conférer des propriétés thérapeutiques. Toutes ces caractéristiques font du PET un bon candidat pour les textiles médicaux, y compris les implants vasculaires, les implants de réfection de la paroi abdominale pour le traitement des hernies viscérales, les fils de sutures et plus particulièrement les pansements (84).

1.2.2 La fonctionnalisation de pansements

Les dispositifs médicaux (implantables ou non) sont largement utilisés pour le diagnostic et pour de nombreuses thérapies. Néanmoins, ils peuvent être à l'origine de complications à court ou à long terme, comme des réactions inflammatoires ou pire encore, la colonisation bactérienne. Si l'implant est infecté, la seule solution serait de le retirer et d'administrer au patient une

antibiothérapie afin d'éviter une possible septicémie. Malheureusement, ce processus implique une prolongation de la convalescence et donc des coûts supplémentaires.

Depuis quelques années, plusieurs solutions ont été développées dans le but d'améliorer l'intégration des implants dans l'organisme et de réduire la colonisation bactérienne (85). Parmi ces solutions, le traitement de surface des biomatériaux est une stratégie largement utilisée (ex : l'encapsulation, l'enrobage des fibres, le greffage etc.). Cette technique permet d'améliorer les propriétés physiques et mécaniques des matériaux ainsi que sa durabilité et sa fonctionnalité. Le traitement de surface permet l'incorporation de principes actifs et de substances bioactives dans les dispositifs médicaux dans le but de fournir une fonction thérapeutique et répondre ainsi à différentes problématiques telles que les complications post-opératoires, l'infection ou la douleur. Par exemple, le traitement de surface des stents permet la libération contrôlée de molécules anti-prolifératives en réduisant significativement le taux de resténose (86), ou le revêtement de prothèses vasculaires par des polymères spécifiques permet l'incorporation d'agents antimicrobiens et leur libération prolongée afin de réduire le risque d'infection (87).

L'utilisation des textiles comme le support des pansements peut être avantageuse pour la délivrance contrôlée de nombreux principes actifs en apportant une fonctionnalité supplémentaire pour contrôler le risque infectieux et aider à la cicatrisation. La surface de différents matériaux de type textile peut être modifiée par plusieurs techniques qui seront décrites ci-dessous.

1.2.2.1 L'enrobage des fibres

Cette méthode (**Figure 19 A**) est relativement simple, elle consiste à charger directement les molécules actives sur les textiles par des techniques de pulvérisation ou d'imprégnation. Néanmoins, l'efficacité de la charge va dépendre des caractéristiques physico-chimiques des fibres, de la molécule active et de leurs interactions. L'avantage de cette approche est qu'elle est très facile à appliquer, mais l'inconvénient est que les interactions fibre-principe actif se produisent via des liaisons de faibles énergies (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals) et que par conséquent, la délivrance des principes actifs est très rapide et sans aucun contrôle (88).

1.2.2.2 Incorporation de microcapsules dans les (nano)fibres

Cette approche consiste à réaliser la micro-encapsulation des principes actifs, pour les adsorber sur la matrice de (nano)fibres par la méthode de trempage (89) ou pour les incorporer dans la matrice en les dispersant dans la solution qui sera (électro)filée. Par exemple des nanofibres chargés de ketoprofène (90), de dexametasone (91) ou d'antinéoplasiques comme le 5-Fluorouracil pour le traitement de dermatoses précancéreuses (92) (**Figure 19 B**) peuvent être préparées. Dans le domaine de la fabrication de pansements, la technique d'électrospinning est largement étudiée. Des travaux de recherche ont permis de développer des nanofibres chargées par le triclosan (93), la doxycycline (94), ou la ciprofloxacine (95). Cependant, il est important de mentionner que pour

les deux approches décrites, l'efficacité de chargement et la libération des principes actifs dépend de la solubilité de ces composés ainsi que des propriétés de gonflement des fibres (89).

1.2.2.3 Les fibres échangeuses d'ions

Les fibres échangeuses d'ions (**Figure 19 C**) forment des complexes ioniques avec certains principes actifs (96). Le mécanisme des fibres échangeuses d'ions consiste à contrôler l'élution du principe actif par la capacité de la surface du textile à échanger avec ses contre-ions, les principes actifs sont ensuite libérés de manière prolongée dans le milieu physiologique par un mécanisme de diffusion (93). Ceci implique i) que le principe actif présente un caractère ionique et ii) que la fibre présente une charge opposée à celle du principe actif. Les fibres échangeuses d'ions ont été utilisées dans des travaux de recherche pour la délivrance ionophorétique par voie transdermique du tramadol (97) et de la leuproréline (98). Ces fibres sont déjà commercialisées comme le *Smopex*®, fibres de polyéthylène fonctionnalisées avec le PAA (anionique) (99).

1.2.2.4 Les fibres creuses et fibres cœur-peau

Les fibres creuses (**Figure 19 D**) sont considérées comme des tubes qui peuvent être remplis par des principes actifs. Deux raisons peuvent justifier l'avantage des fibres creuses : un rapport de surface / volume élevé et l'incorporation d'une grande variété de molécules bioactives. Pour la fabrication de ce type de fibre, le principe actif est mélangé avec le polymère dans le but de produire un noyau chargé par ces composés. Il est ensuite extrudé à partir d'un processus de coextrusion pour former la fibre creuse (100).

L'électrospinning permet d'élaborer de nanofibres « cœur-peau » (**Figure 19 D**) à l'aide d'une aiguille coaxiale, dont le cœur contient le principe actif dispersé dans un polymère, et la peau est formée à partir d'un second polymère à travers lequel le principe actif diffusera (101).

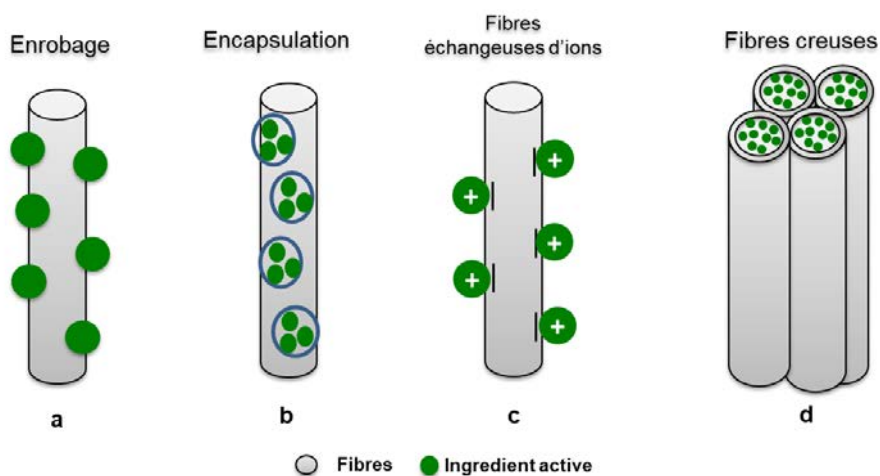


Figure 19. Différentes techniques de modification de surface de fibres textiles avec des molécules actives.

1.2.2.5 La bio-conjugaison

La bio-conjugaison consiste à coupler le principe actif à la surface du textile par des moyens chimiques (liaisons covalentes) ou physiques afin d'assurer la délivrance de ces derniers localement de manière contrôlée. Les supports textiles doivent présenter des groupes fonctionnels disponibles. Si ce n'est pas le cas, diverses techniques comprenant la voie chimique humide, le plasma et le greffage physique ou chimique (**Figure 20**) peuvent créer une grande variété de groupes fonctionnels à la surface des fibres.

1.2.2.5.1 Le traitement plasma

Le traitement plasma est couramment utilisé pour modifier la composition chimique de la surface afin d'améliorer la biocompatibilité et l'adhésion cellulaire des supports synthétiques, généralement hydrophobes. Les groupes fonctionnels créés par plasma peuvent être conjugués par exemple avec de nombreux composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine ou la fibronectine.

Dans le cas des pansements, Mangindaan *et al.*, ont modifié la surface de membranes en polycaprolactone par plasma oxydant (O₂) pour ensuite incorporer, par technique sol-gel, une couche de tétraorthosilicate (TEOS) et de chitosan dans laquelle la sulfadiazine d'argent et le kétoprofène ont été incorporés. Les résultats montrent une délivrance prolongée pendant trois jours pour la sulfadiazine d'argent et pendant 14 jours pour le kétoprofène. La cytocompatibilité envers les fibroblastes a été évaluée. Le kétoprofène libéré est resté cytocompatible les 5 premiers jours. Par contre, la sulfadiazine d'argent a montré une réduction significative de la cytocompatibilité dès le premier jour d'évaluation (102).

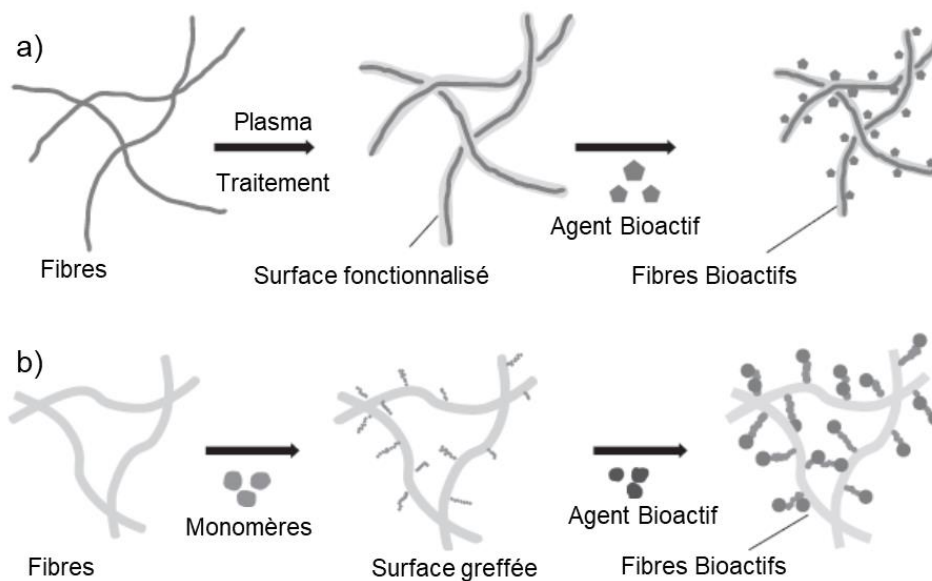


Figure 20. Schéma de différentes méthodes de bio-conjugaison pour l'obtention de surfaces textiles bioactives par a) plasma traitement et b) greffage. Adapté de Yoo *et al.*, 2009 (103).

1.2.2.5.2 Greffage physique des textiles par des polymères

1.2.2.5.2.1 Le chitosan

Le chitosan (CHT) est un polysaccharide obtenu à partir de la désacétylation de la chitine, trouvée communément chez les invertébrés, notamment dans les carapaces des crustacés mais aussi dans les levures et les algues (104). Dans les champignons, le CHT est présent sous sa forme naturelle. Le CHT est constitué d'unités D-2-déoxy-2-acétylglucosamine et D-2-déoxy-glucosamine liées par une liaison β (1-4) (**Figure 21**).

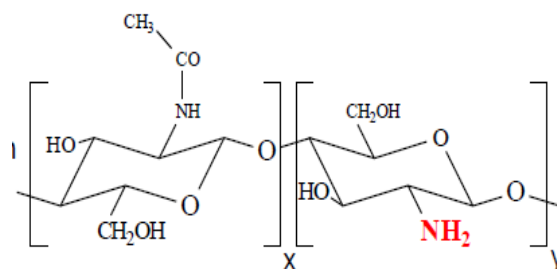


Figure 21. Structure chimique du chitosan.

L'extraction du CHT à partir de la chitine implique un mécanisme de désacétylation qui consiste à traiter la chitine avec la soude concentrée pour convertir les groupes acétamides en fonctions amines (-NH₂) (105). De manière conventionnelle, le degré de désacétylation (DD) du CHT est supérieur à 60% (104).

Le CHT a un grand intérêt dans le domaine biomédical, notamment pour la cicatrisation des plaies, en raison de sa biodégradabilité et de sa biocompatibilité (106), de son caractère non toxique (107) et surtout, grâce à ses propriétés antimicrobiennes (106,108,109), hydratantes (106), hémostatiques (110) et analgésiques (106–109). Ces propriétés sont liées directement à son caractère cationique et à la taille de la chaîne du polymère (108). Grâce à ces caractéristiques, plusieurs pansements à base de CHT (et ses dérivés) ont été développés sous la forme de fibres, d'hydrogels, de membranes, de scaffolds et d'éponges (106). De plus, deux pansements à base de CHT sont disponibles sur le marché, sous le nom de *KytoCel*[®] (Aspen Medical) et *Chitoderm*[®] (Trusetal).

- **Propriété antimicrobienne**

Le CHT a montré une activité antimicrobienne contre différentes bactéries (111), champignons (112,113) et virus (114,115). L'activité antimicrobienne du CHT est décrite à partir de deux mécanismes. La première repose sur l'interaction entre les groupes anioniques présents à la surface des cellules et les groupes cationiques (groupes amines protonées formant des groupes ammonium) présents dans la chaîne polymère du CHT conduisant à une altération de la perméabilité de la membrane bactérienne. Le deuxième mécanisme consiste à la liaison du CHT à l'ADN cellulaire (toujours via les groupes amines) provoquant l'inhibition de la synthèse de l'ARN microbien (108,109).

L'activité antimicrobienne du CHT dépend généralement de son poids moléculaire, de son DD et de sa concentration (108). Bano *et al.*, ont évalué les propriétés antibactériennes du CHT de haut poids moléculaire (220 000 g/mol) en solution à différentes concentrations (2%, 1%, 0.5%, et 0.25%). Ces solutions ont été testés sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, et *Staphylococcus aureus*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) du CHT n'a pas été détecté quelle que soit la concentration. Néanmoins, ils ont prouvé que le CHT stérilisé par rayonnements gamma (25kGy, 50kGy et 75kGy) améliore son activité antibactérienne sur ces mêmes souches en raison de la diminution du poids moléculaire du CHT après traitement (116).

En revanche, Aubert-Vial *et al.*, ont étudié les propriétés antibactériennes d'un textile en polyester greffé par le CHT en utilisant l'acide citrique comme agent réticulant (**Figure 22**). Les résultats ont rapporté une faible diminution de la charge bactérienne, c'est à dire 1 Log₁₀ sur *S. aureus* et de 2 Log₁₀ sur *E. coli* après 24 heures d'évaluation (117). Ainsi, après greffage, l'activité antibactérienne du CHT est fortement réduite de par, probablement, la consommation des fonctions amines.

D'autre part, Xu *et al.*, ont fonctionnalisé des textiles en coton avec le carboxyméthyl chitosan dans le but d'obtenir des textiles antimicrobiens. Néanmoins, ils ont constaté une faible activité antibactérienne (30% de réduction bactérienne) contre *S. aureus* et *E. coli*. En revanche, l'activité antibactérienne est améliorée après l'incorporation d'agents antimicrobiens comme l'argent (99 % de réduction bactérienne) sur ces souches (118).

Une stratégie pour améliorer les propriétés antibactériennes du CHT est de le fonctionnaliser par une réaction de quaternisation. Le N,N,N-trymethyl chitosan (TMC) est un chitosan contenant des fonctions ammoniums quaternaires le plus utilisé pour une activité antibactérienne. Le TMC a montré une excellente activité antibactérienne contre *Escherichia. coli* et *Listeria innocua* (119).

- **Activité cicatrisante**

En tant qu'agent cicatrisant, le CHT est très intéressant car lors de sa dégradation, il libère la N-acétyle-β-D-glucosamine, laquelle intervient dans le processus de cicatrisation pour initier la prolifération des fibroblastes, la formation du collagène et la stimulation de l'acide hyaluronique (106). Le CHT fourni une matrice propice pour la régénération de la peau et active les macrophages, afin d'inhiber la croissance anormale des tissus. Ce phénomène aide à traiter plus rapidement la plaie sans laisser aucune cicatrice (108). Les pansements à base de CHT présentent de bonnes propriétés d'absorption qui pourraient améliorer le drainage des exsudats de la plaie et favoriser la cicatrisation.

- **Activité hémostatique**

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes permettant d'interrompre un saignement pour éviter l'hémorragie. Ces mécanismes comprennent la vasoconstriction, l'agrégation plaquettaire (hémostase primaire) et la coagulation (hémostase secondaire). Ces mécanismes ont pour but de former le caillot sanguin qui va stimuler la prolifération des cellules fibroblastiques et musculaires lisses au sein de la paroi vasculaire, pour entamer le processus de réparation résultant en la dissolution du caillot (fibrinolyse). Les agents hémostatiques utilisant le CHT sont largement utilisés pour contrôler les hémorragies des patients dans les blocs opératoires. Par exemple, le pansement *HemCon® Bandage* (HemCon Medical Technologies Inc.) est un pansement à base de CHT qui a montré une efficacité dans plus de 76% des cas pour le contrôle des hémorragies externes dans les services médicaux d'urgence aux Etats Unis (120). L'action rapide vient de la fonction amine du CHT qui se protone en milieu physiologique et interagit avec les globules rouges chargés négativement provoquant ainsi la cascade de la coagulation.

Les facteurs de coagulation ont montré leur efficacité lors qu'ils sont chargés dans des bandages ou des pansements (Combat Gauze™) (121). Les facteurs de coagulation pourraient alors être incorporés dans des systèmes polyelectrolytes multicouches (PEM) par des liaisons hydrogène et par des interactions électrostatiques. Schwinte *et al.*, ont développé des assemblages poly(hydrochlorure d'allylamine)/polystyrène sulfonate de sodium (PHA/PSS) dans le but d'incorporer du fibrinogène. Ils ont constaté que les phénomènes d'adsorption et d'enrobage lors de la construction des assemblages n'altèrent pas la structure des molécules de fibrinogène pouvant être préservé dans les systèmes PEM (122). De plus, la thrombine, est un facteur de coagulation capable d'accélérer la formation de caillots de fibrine et accélérer l'hémostase. En tant que protéine, la thrombine a montré la possibilité de former des assemblages avec l'acide tannique sur une éponge en gélatine pour une hémostase rapide. Ce type de pansement a été évalué sur un modèle hémorragique de rate chez le cochon (123).

D'autre part, afin de mettre au point des « héparines like », la modification du CHT par des groupes sulfonates apporte aux CHT un caractère polyampholytique qui offre au CHT des propriétés anticoagulantes. Des travaux de recherche dans cet objectif sont actuellement menés au sein de nos laboratoires pour une application en chirurgie vasculaire (124).

Le CHT peut également être utilisé pour le traitement de surface des textiles en coton (118), en laine (125), en viscose (126), en polyéthylène téréphtalate ou en polypropylène (117), pour le développement de textiles antimicrobiens. Pour cela, le CHT doit être fixé sur le textile de façon covalente ou par enrobage physique en utilisant des agents réticulants comme l'acide butanetétracarboxylique (127), le glutaraldehyde, la polyéthylèneimine (128) ou la génipine (129) (130).

Néanmoins, il existe des agents réticulants qui présentent un caractère toxique pour l'application biomédicale. L'acide citrique (CTR) est une alternative comme agent réticulant de la cellulose et de ses dérivés car il est écologique et non toxique. Au sein du laboratoire, il a été développé le greffage du CHT sur des textiles en polyester (PET) en utilisant le CTR ou la génipine (Gnp) comme agents réticulants. La modification de surface des textiles par le CHT et le CTR ou la Gnp se fait par un enrobage autour des fibres (**figure 22**). Cette réaction de réticulation permet l'obtention de charges cationiques (fonctions amines (NH_2)) ou anioniques (carboxyliques (COOH)) en fonction de la concentration de CTR utilisée (117). Par contre, avec l'utilisation de la Gnp comme agent réticulant, seule une surface présentant des charges cationiques est obtenue (130).

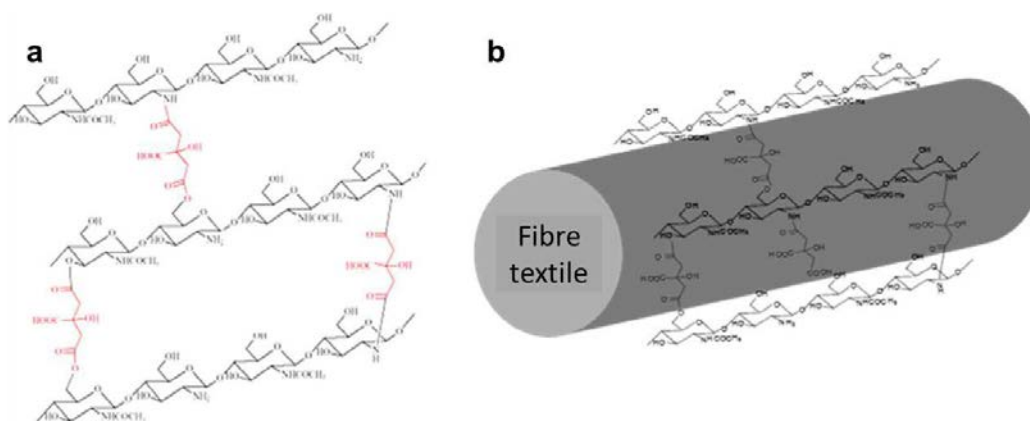


Figure 22. a) Structure chimique du CHT réticulé avec l'acide citrique. b) Modification de surface d'une fibre par enrobage avec le CHT réticulé avec l'acide citrique (117).

1.2.2.5.2.2 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques obtenus par la dégradation de l'amidon par l'enzyme Cyclodextrine GlycosylTransférase (CGTase) synthétisée par la souche bactérienne *Bacillus macerans*. Les CD sont constitués d'unités glucopyranoses, liées entre elles par des liaisons glycosidiques α -1,4. Les CD dites natives, se différencient entre elles par le nombre d'unités glucopyranoses présentes dans leur structure. Les plus communes sont α CD, β CD et γ CD avec 6, 7 et 8 unités glucopyranoses respectivement (**Figure 23 A**) (131).

Grâce à la position des unités glucopyranoses, les CD présentent une structure 3D en forme de cône tronqué ; cette structure est constituée par des groupes hydroxyles primaires du côté étroit et par des groupes hydroxyles secondaires du côté le plus large, ce qui rend les CD hydrosolubles. L'intérieur du macrocycle est cerné par les liaisons $\text{C}_3\text{-H}$, $\text{C}_5\text{-H}$ et par les liaisons $\text{C}_1\text{-O-C}_4$ reliant les unités glucosidiques, ce qui constitue une cavité de caractère hydrophobe (132). Cette cavité confère aux CD la propriété de former des complexes d'inclusion réversibles avec une grande variété de molécules lipophiles, notamment des principes actifs (**Figure 23 B**) par interactions hydrophobes et liaisons de type Van der Waals.

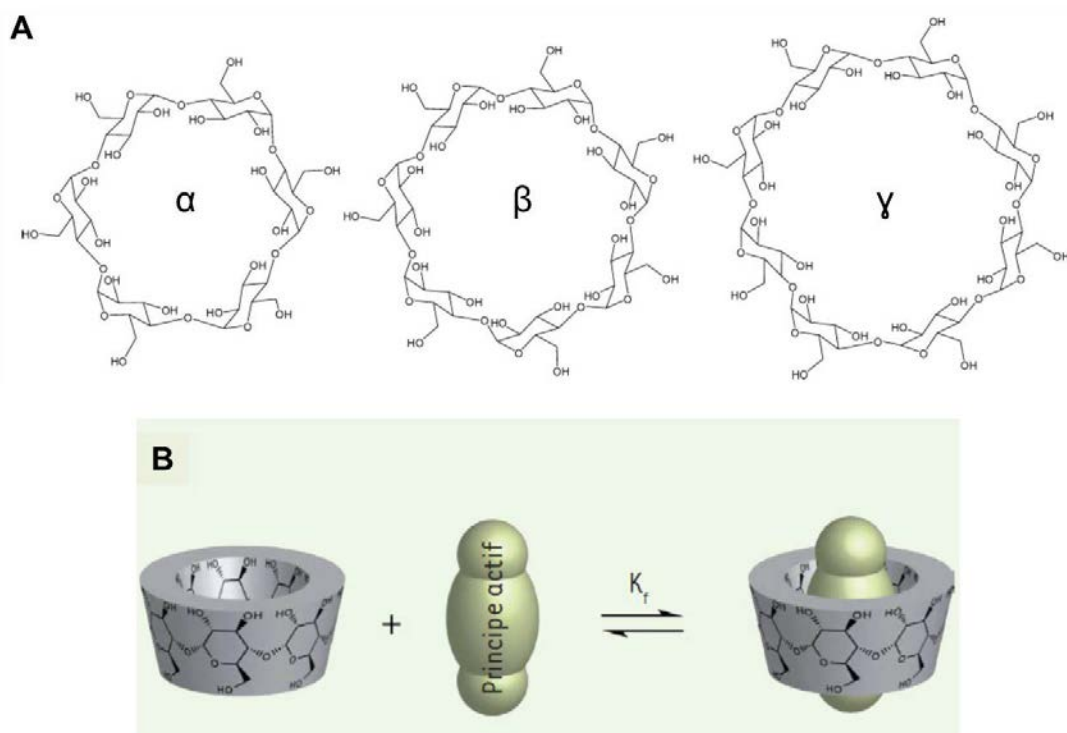


Figure 23. A) Structure chimique de αCD, βCD et γCD. (132), B) représentation de la formation d'un complexe d'inclusion (1 :1) entre une cyclodextrine et un principe actif (133).

- **Les dérivés des CDs natives**

La solubilité dans l'eau de la βCD est faible (18.5 g/L à 25°C), ce qui génère par conséquent des limitations dans certaines applications en tant qu'agent complexant et solubilisant (131). En revanche la solubilité des α et γ-CD est respectivement de 145 et 232 g/L.

Les CDs peuvent subir certaines modifications au travers diverses réactions de substitution des groupements hydroxyles afin de leur apporter de nouvelles propriétés physicochimiques et biologiques, d'améliorer leurs propriétés solubilisantes et ceci afin d'élargir leur champ d'applications. Parmi les CDs modifiées, on trouve les CDs hydroxypropylées (HPβCD et la HPγCD), les CDs méthylées (MβCD), la sulfobuthylether βCD (SBEβCD), la maltosyl- βCD (G₂ βCD) entre autres (134).

- **Applications dans le domaine pharmaceutique**

Depuis leur découverte en 1891 par le chercheur français Villiers, les CDs ont toujours été d'un grand intérêt dans de nombreux domaines (alimentaire, chimique, environnemental, textile) grâce à leur faculté de former des complexes d'inclusion. Les CDs sont largement appliquées dans le domaine pharmaceutique comme excipients, dû à leur capacité à augmenter la solubilité, l'absorption et la stabilité d'une grande variété de principes actifs. De plus, les CDs fonctionnent comme des vecteurs pour la délivrance prolongée et localisée du principe actif. Ces propriétés

permettent d'améliorer la biodisponibilité et l'activité thérapeutique mais aussi de diminuer les effets indésirables, après l'administration du médicament (132).

Le premier produit pharmaceutique commercialisé contenant des CDs a été le *Prostarmon ETM*, tablettes sublinguales (prostaglandine E2/ β CD) vendues au Japon. En Europe, apparaît *Brexin[®]* tablets (Piroxicam/ β CD) et aux USA *Sporanox[®]* (itraconazole/2-hydroxypropyl- β CD). Aujourd'hui de nombreux produits pharmaceutiques avec des principes actifs complexés avec des CDs sont vendus en formulation solide ou en solution.

L'utilisation des CDs comme agents solubilisants peut être une stratégie de remplacement des solvants organiques comme l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde d'un point de vue toxicologique dans des préparations pharmaceutiques (135). Selon Brewster et Loftsson, la formation de complexes d'inclusion permet d'augmenter la solubilité du composé directement en fonction de sa concentration. Cela signifie qu'au moment de l'administration du médicament, la concentration de CD et du principe actif se réduit linéairement sans signe de précipitation. Au contraire des solvants organiques, lorsqu'ils sont en contact avec la formulation, la solubilité est rapidement perdue et une précipitation peut se produire (134).

1.2.2.5.2.3 Les polymères de cyclodextrines (PCD)

Les PCD apportent beaucoup d'avantages, ces macromolécules présentent une capacité d'interactions améliorées grâce à la proximité spatiale des cavités dans la structure du polymère permettant une complexation coopérative des actifs.

Il est possible de synthétiser des polyélectrolytes cationiques (PE⁺) ou anioniques (PE⁻) à base de CDs. Les PCD cationiques peuvent être synthétisés à partir d'une CD, d'un agent réticulant comme l'épichlorohydrine et d'un agent substituant comme le chlorure de glycidyltriméthylammonium (cationique) (136) ou le chlorure de choline. Grâce au réseau tridimensionnel des PCD cationiques, ils peuvent être appliqués comme des agents de délivrance de principes actifs.

Le groupe de recherche UMET-ISP de l'Université de Lille a développé une méthode innovante pour la production de PCD à caractère anionique. Cette méthode repose sur une réaction de polyestérification entre les groupements hydroxyles de la CD native et les groupements carboxyliques d'un acide polycarboxylique (PCA) comme le l'acide citrique (CTR), en présence d'un catalyseur (**Figure 24**) (137,138).

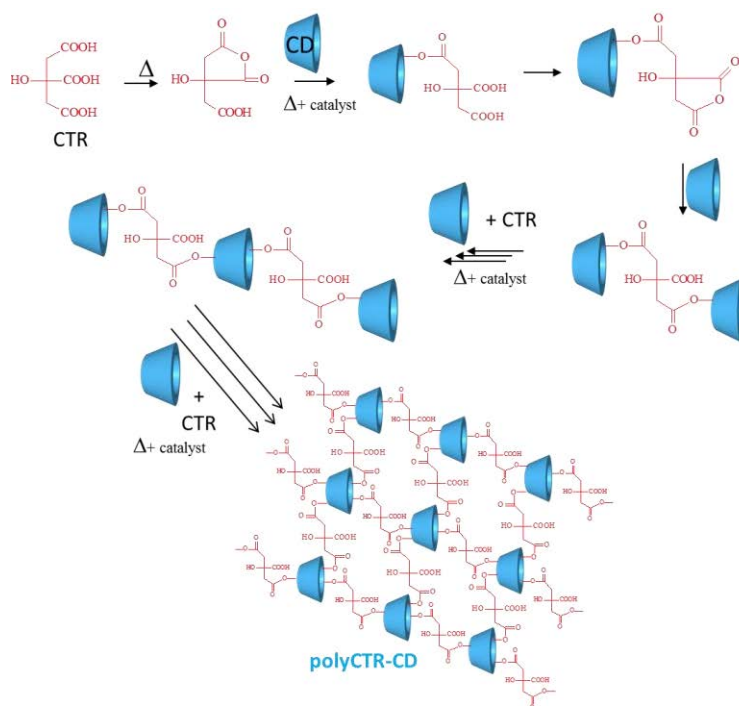


Figure 24. Réaction de polymérisation entre la β CD avec l'acide citrique par polyestérification.

Le greffage de CDs sur les textiles est d'un grand intérêt pour la conception de dispositifs médicaux implantables et non implantables, dans le but d'incorporer des principes actifs et de produire un système à libération prolongée. Le greffage physique de CDs sur des fibres synthétiques, avec un acide polycarboxylique comme agent réticulant est une méthode brevetée par l'équipe de recherche du Professeur Bernard Martel. La méthode consiste à réticuler les CDs avec un PCA en présence d'un catalyseur sous l'action de la chaleur; cette réaction de polyestérification permet l'enrobage physique des fibres par le polymère de cyclodextrine (**Figure 25**) (139). Le terme d'«enrobage physique» signifie qu'il n'y a aucune liaison chimique entre le PCD et la fibre.

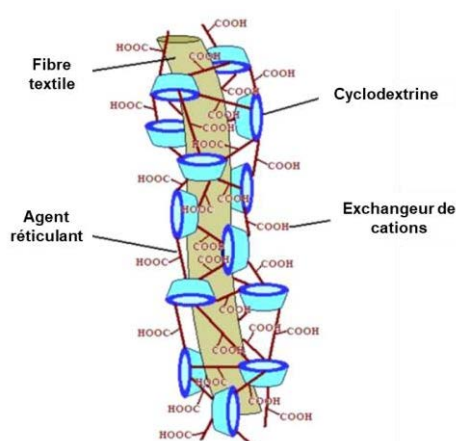


Figure 25. Fibre en PET enrobé par le polymère de cyclodextrine par la méthode de pad-dry-cure. Adapté de Martin et al., 2013 (85).

Au sein du laboratoire, cette méthode de greffage a été appliquée sur différents textiles. a) pour l'incorporation d'antibiotiques comme la ciprofloxacine, la rifampicine ou la vancomycine dans des prothèses vasculaires en PET tissées ou tricotées afin de diminuer les infections post-opératoires (87,140,141), b) pour incorporer un agent analgésique local, la ropivacaine sur des implants viscéraux, (142), c) pour la libération contrôlée de chlorhexidine pour application en parodontologie (143,144) d) comme couche primaire pour la formation de systèmes multicouches pour l'incorporation de bleu de méthylène pour produire des textiles antimicrobiens (145).

1.2.3 Les systèmes multicouches de polyélectrolytes (PEM)

Comme mentionné précédemment, le traitement de surface est une des stratégies utilisées pour améliorer l'intégration des implants aux tissus et réduire les infections. Les complexes de polyélectrolytes (CPE) peuvent être utilisés pour l'élaboration de nano/microparticules ou de billes et structures « *core-shell* », des hydrogels, des éponges, et des films multicouches en tant que revêtements de surfaces (59,146) (**Figure 26**). Les CPE sont également mis sous la forme de nanofibres grâce à la technique d'électrospinning (93).

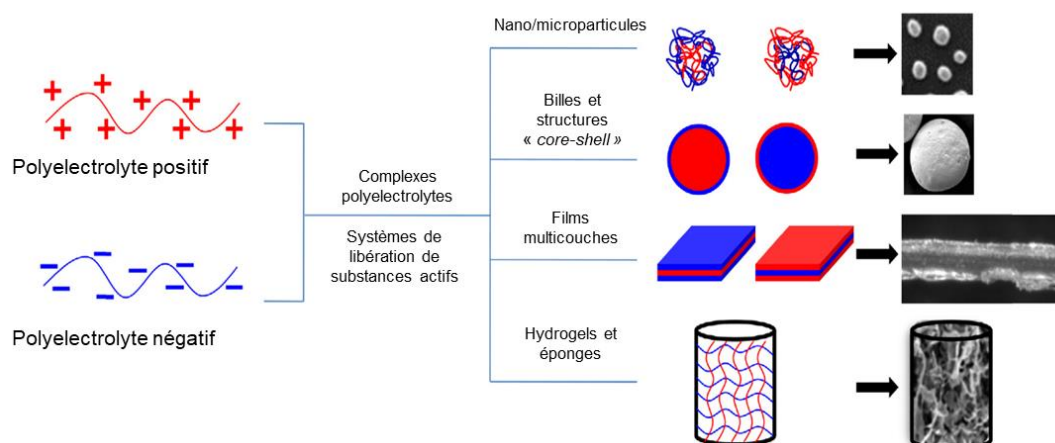


Figure 26. Utilisation de CPE pour le développement de nombreuses formes de systèmes à libération contrôlée de substances actives. Adapté de Luo et Wang, 2014 (146)

De la même manière, les systèmes multicouches polyélectrolytes (PEM) sont une autre stratégie de traitement de surface de grand intérêt dans le secteur biomédical, car c'est une technique simple qui peut être appliquée pour fabriquer des supports et développer des textiles à libération prolongée de principes actifs dont les pansements.

Les systèmes PEM reposent sur le principe d'assemblage de films minces, une méthode introduite dans les années 1930 notamment par les travaux de Blodgett et Langmuir, sur le transfert de monocouches de molécules amphiphiles à l'interface eau/air sur un substrat solide. L'inconvénient de cette méthode était l'instabilité des films formés (147). C'est à partir des années 1990 que Décher *et al.* introduisent la technique dite du *layer-by-layer* (148–150). Cette méthode

est basée sur la déposition successive d'un polycation (PE⁺) et d'un polyanion (PE⁻) sur un substrat par des interactions de type électrostatiques (**Figure 27**). L'avantage de ces assemblages est leur utilisation comme supports multifonctionnels pour l'incorporation de petites et grosses biomolécules.

Les supports utilisés dans la construction des systèmes PEM peuvent présenter une surface plane ou sphérique, comme des microcapsules ou des nanoparticules métalliques pour former des structures «*core-shells*» (151). Le support de base peut être aussi de nature variée, comme l'acier inoxydable (152), le silicone (153), le verre (154), le quartz (155), des métaux comme le lithium (156) ou encore des surfaces textiles en PET (85,117,145) ou en cellulose (157). Même si la disposition des substrats pour la construction des systèmes PEM est très variée, il est primordial qu'ils présentent des charges soit intrinsèques soit créés à partir d'un traitement de surface en utilisant des techniques comme le plasma ou par simple enrobage, offrant au support les groupes ioniques utiles à l'adsorption de la première couche de polyélectrolyte auto-assemblée (technique décrite précédemment).

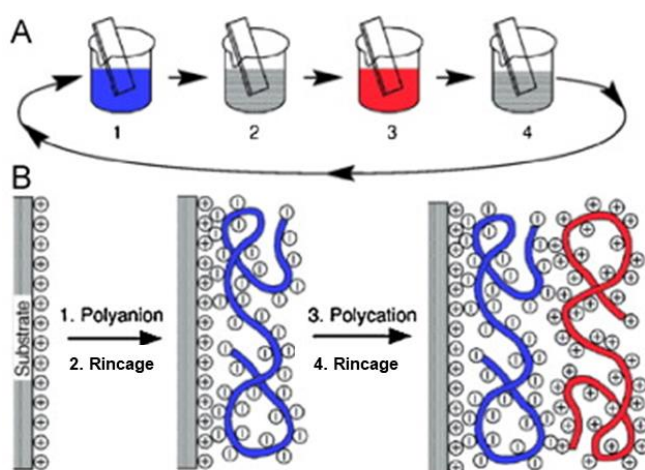


Figure 27. Procédé de construction du système PEM par adsorption consécutif de polyélectrolytes anioniques et cationiques. Répétition du cycle 1-4 « n » fois. Adapté de Décher et al., (148).

1.2.3.1 Les polyélectrolytes (PE)

Une des applications les plus intéressantes des systèmes PEM est la fabrication de dispositifs à libération prolongée de principes actifs ou de biomolécules, pour les appliquer en ingénierie tissulaire ou pour la fabrication de pansements techniques. La méthode dite du *layer-by-layer* permet d'utiliser une grande variété de polyélectrolytes (PE) d'origine naturelle, synthétique ou semi synthétique, le bon choix est indispensable si une application biomédicale est envisagée.

Les PE d'origine naturelle possèdent des charges intrinsèques qui permettent une solubilité ou une capacité d'absorption et de gonflement dans l'eau. De plus ils peuvent apporter des fonctions biomimétiques au substrat. Par exemple, les films à base de polysaccharides comme l'acide hyaluronique interagissent avec certains récepteurs tels que les CD44. Ce récepteur est une

glycoprotéine impliquée dans certains mécanismes cellulaires comme l'adhésion et migration cellulaire (158).

Les polyélectrolytes d'origine synthétique comme la polyéthylèneimine (PEI), le poly(acide acrylique) (PAA) ou le polystyrène sulfonate de sodium (NaPSS) sont plus adaptables, puisqu'ils peuvent être modifiés chimiquement pour offrir une densité de charges variable (159).

Les polyelectrolytes semi-synthétiques, comme le chitosan, les alginates de sodium et de calcium, les pectines amides, la carboxymethylcellulose, l'éthylcellulose entre autres sont aussi utilisés dans le développement des assemblages pour le domaine biomédicale ainsi comme des « *nano-carriers* » pour la libération contrôlée de principes actifs (160).

Le **Tableau 5** présente des exemples de polyélectrolytes (PE) cationiques et anioniques, utilisés pour la construction de systèmes PEM ainsi que le substrat utilisé pour le développement de pansements techniques.

Tableau 5. Exemple de polyélectrolytes cationiques et anioniques, de substrats pour le développement de pansements techniques.

PE ⁺	PE ⁻	Substrat	Principe actif	Référence
Chitosan	Alginate	Fibres de cellulose	-	(161)
Viscose	Alginate	Meshes en PET	Lidocaïne et diclofénac	(162)
Poly(β-amino ester) 2	Dextrane sulfate	Eponge en gélatine	Vancomycine/ diclofénac	(153,163)
PAH	PAA	Films en PDMS	Chlorhexidine	(61)
PAH	Dextrane sulfate	Lames en quartz	Ag et ciprofloxacine / Moxifloxacine	(164,165)
Lysozyme	Acide tanique	Nanoparticules en Fe ₃ O ₄	Ag (NP)	(166)
Chitosan	Phosvitine	Fibres de cellulose	-	(167)
Chitosan	Alginate	Gaze en coton	Peptides antimicrobiens	(168)
Chitosan	Acide hyaluronique	Textile non tissé en coton	Ag (NP)	(169)
Lysozyme	Au (NP)	Fibres de cellulose	-	(170)
Chitosan	PCD	Textile PET non tissé	Bleu de méthylène	(145)
Chitosan	PCD	Textile PET non tissé	Chlorhexidine	(130)
Chitosan	PCD	Textile PET non tissé	Argent	(130)

1.2.3.1.1 Méthodes de construction des systèmes PEM

Il existe différentes techniques pour développer un système PEM. Ces techniques sont adaptées selon les substrats utilisés et aussi selon les équipements existants dans les laboratoires. Ces techniques seront décrites ci-dessous.

- **Trempage par « dip-coating »**

Le trempage par « dip-coating » (**Figure 28**) est la technique la plus utilisée pour construire les systèmes PEM. Elle consiste à immerger le support dans les solutions de polyélectrolytes en solution aqueuse, suivi par des étapes de rinçage afin d'éliminer les PE non liés (171). Un système PEM construit par la technique de trempage se base sur la surcompensation de charges qui peut être évaluée par zétamétrie.

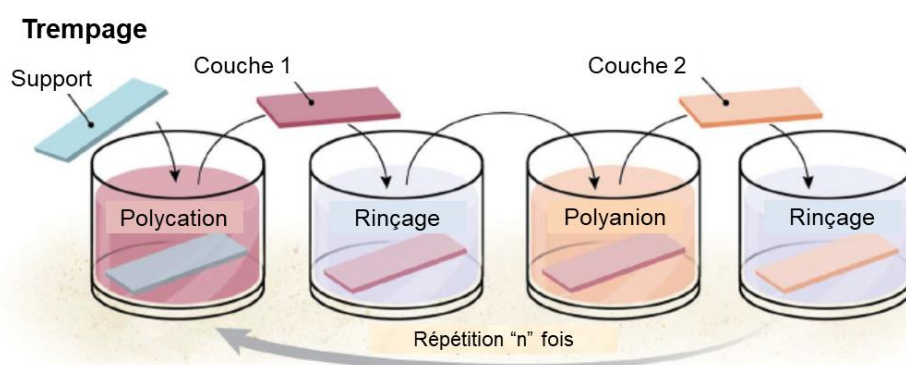


Figure 28. Construction d'un système PEM par la technique de trempage ou "dip-coating". Adapté de Richardson et al.(172)

Pour cette technique, le temps idéal d'immersion est d'environ 15 minutes (149,172) afin d'obtenir un équilibre, ce qui en fait un processus assez long. Néanmoins il existe des stratégies pour réduire le temps d'immersion, sans perdre l'efficacité du dépôt des couches sur le support. Par exemple, Shim *et al.*, ont travaillé avec le « *dewetting phenomena* » qui consiste à préparer les polyélectrolytes dans des solvants organiques comme le N,N-diméthylformamide. Ceci permet d'éliminer les étapes de rinçage et séchage du support par évaporation rapide du solvant. Cette stratégie a permis de réduire de 30 fois le temps de construction du système PEM (173).

- **Enduction centrifuge ou "spin-coating"**

La méthode du « spin-coating » consiste à déposer les polyélectrolytes sur un substrat, qui est placé et fixé sur une platine tournante (**Figure 29**). Cette méthode permet d'obtenir des films ultrafins et plus homogènes en comparaison avec la méthode de trempage. En effet, l'assemblage se forme grâce aux différentes forces comme les interactions électrostatiques et la force centrifuge qui conduit à la désorption rapide des polymères et à la déshydratation des films déposés (172). La durée du dépôt d'une couche de polyélectrolytes (PE) est très courte, elle prend environ 10 à 15

secondes. La construction totale du système PEM pourrait donc s'achever en quelques minutes, sans avoir besoin des étapes de rinçage et de séchage. Néanmoins, cette méthode est parfaite pour une approche fondamentale pour étudier la construction des assemblages sur de petites surfaces planes, mais n'est pas applicable pour le traitement de dispositifs médicaux comme les textiles. (174).

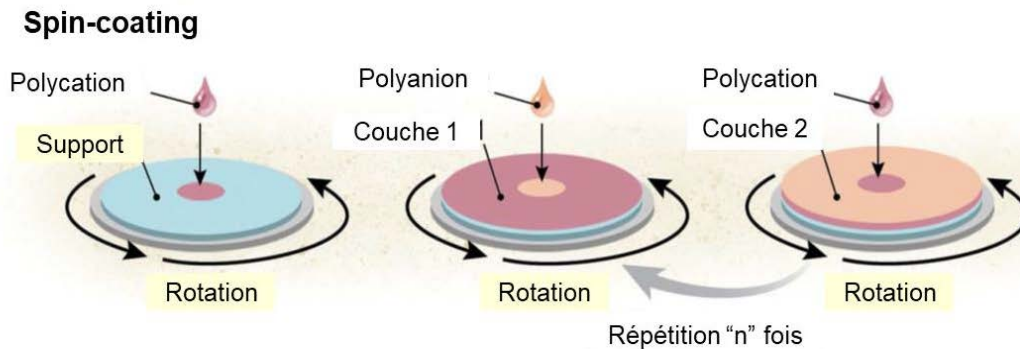


Figure 29. Construction d'un système PEM par la technique du "spin-coating". Adapté de Richardson et al.(172)

- **Pulvérisation ou « spray-coating »**

La méthode du « spray-coating » utilise des polymères qui sont placés à l'intérieur d'une bombe aérosol pour être ensuite pulvérisés sur le substrat. Il est placé verticalement pour éliminer facilement les excédents avant l'étape de rinçage (**Figure 30**). Le « spray-coating » est une technique simple et plus rapide que les techniques décrites ci-dessus. Quelques secondes sont nécessaires pour former une seule couche. La construction de systèmes PEM par pulvérisation est très appliquée en industrie car cela permet d'enrober des substrats en grande taille ainsi que des structures 3D (172).

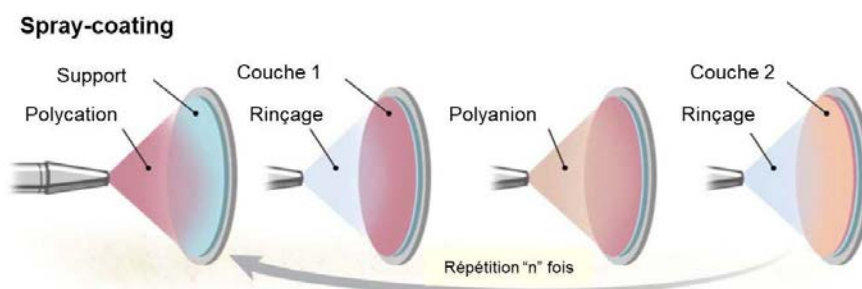


Figure 30. Construction d'un système PEM par la technique du "spray-coating". Adapté de Richardson et al.(172).

1.2.3.2 Paramètres liés à la construction des systèmes PEM

1.2.3.2.1 Mécanisme de la croissance des assemblages

Il existe deux types de mécanisme de croissance lors de la construction d'un système PEM, ces assemblages peuvent évoluer de manière linéaire ou de manière exponentielle. Cependant, il existe des systèmes PEM qui peuvent montrer une transition entre les deux types de mécanismes.

La croissance linéaire (**Figure 31 A**) est reconnue quand l'épaisseur et la masse du substrat augmentent proportionnellement au nombre des couches déposées (149). En effet, à chaque étape de la construction, les PE interagissent de manière électrostatique avec les PE de charges opposées. Ce dépôt conduit à une surcompensation de charges aux niveau de l'interface; les assemblages s'accroissent progressivement avec une inversion de charges électriques (**Figure 31 B**) au moment de l'adsorption du PE de charge opposée (175,176) que l'on peut suivre par la mesure du potentiel zéta.

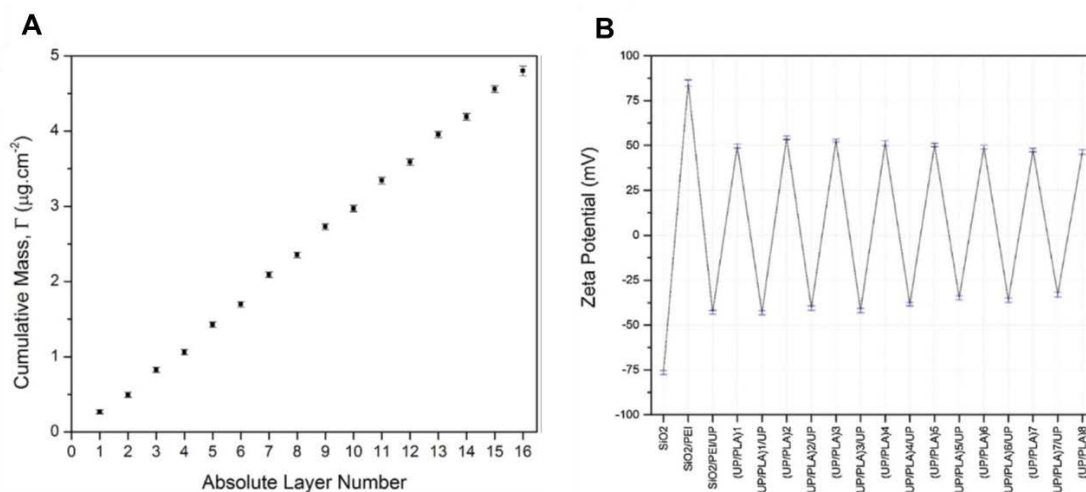


Figure 31. A) Croissance linéaire lors de la construction d'un système PEM avec le fucoïdane (PE-) et la poly-L-arginine (PE+) sur du SiO₂. B) Détermination du potentiel Zéta de chaque nouvelle couche déposée (176).

D'autre part, la croissance exponentielle est reconnue quand les assemblages multicouches présentent une augmentation de leur masse et de leur épaisseur de manière exponentielle (**Figure 32**). Les premiers exemples de ce type d'assemblages ont été rapportés avec le poly-L-lysine (PLL)/alginate (177) et poly-L-lysine (PLL)/acide hyaluronique (178,179).

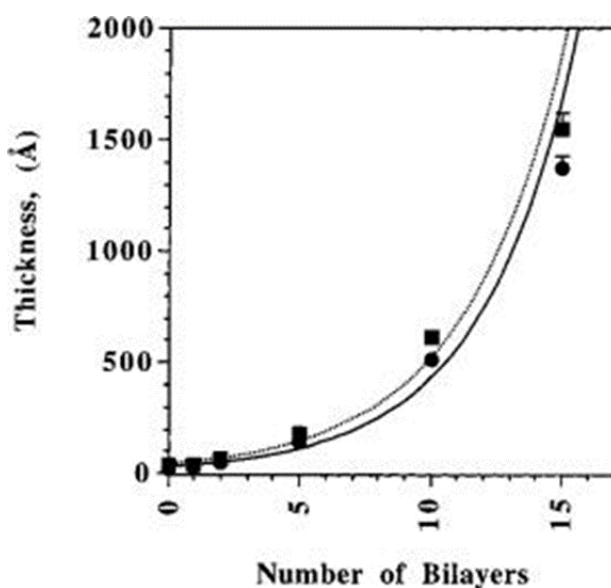


Figure 32. Croissance exponentielle des systèmes PEM avec PLL (PE⁺) et alginate(PE⁻) (177)

Ce type de croissance est dû au fait que les PE diffusent très rapidement à l'intérieur ou à l'extérieur des assemblages et à une augmentation de la rugosité de la surface du film lors de sa construction; cette dernière hypothèse est encore en discussion (175,180). Richert *et al.*, ont décrit le mécanisme de croissance exponentielle, schématisée dans la **Figure 33**. Lors du dépôt de la couche anionique (étape A), un excès de charges négatives est présent au niveau de la couche externe du film, dû à la surcompensation des charges. Ensuite, le dépôt de la couche contenant le PE⁺ (étape B) conduit à une interaction avec les charges négatives externes en formant des complexes, rendant positive la surface externe. Les chaînes du PE⁺ diffusent ensuite à travers la première couche (étape C). Lors du rinçage, ces chaînes diffusent à travers les assemblages, mais de manière inverse (étape D). Lors du dépôt du PE⁻ (troisième couche), une interaction PE⁻/PE⁺ a lieu au niveau de la surface conduisant à la diffusion du polycation à l'extérieur du film (étape E). Après, une couche plus épaisse de PE⁻ est formée et suit une croissance exponentielle (étape F) (181).

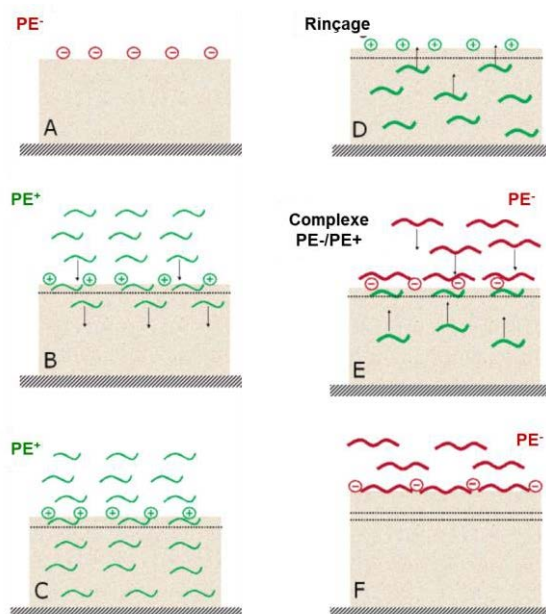


Figure 33. Schéma du mécanisme de croissance exponentielle lors de la construction d'un système PEM. Adapté de Richert *et al.*(181)

1.2.3.2.2 Impact du poids moléculaire des polyelectrolytes

Le poids moléculaire des polyelectrolytes peut influencer le régime de croissance (linéaire/exponentiel), la structure interne ou l'épaisseur des systèmes PEM. Dans le cas des assemblages construits avec des polysaccharides comme le CHT, leur haut poids moléculaire conduit à une augmentation de l'épaisseur et à une croissance exponentielle (182).

Les travaux des Nestler *et al.*, ont rapporté l'impact du poids moléculaire sur la construction de systèmes PEM avec [poly(diallyldiméthylammonium chloride) / poly(styrène sulfonate) (PDDA/PSS)] avec des tendances différentes en terme d'épaisseur. Pour un poids moléculaire du

PDDA de 80 kDa, l'épaisseur du système PEM est importante (25 nm). A l'inverse, pour un poids moléculaire plus faible de 25kDa, l'épaisseur du système PEM diminue (4,3 nm) (183). Les polymères avec de longues chaînes forment des boucles conduisant à la formation de couches épaisses. Au contraire, les polymères avec de courtes chaînes se déposent sur les supports à « plat » donc l'épaisseur des couches est plus faible. De plus, les polycations de haut poids moléculaire influent sur l'augmentation de la rugosité des assemblages tandis que les polyanions de poids moléculaire contrôlé modulent les taux de gonflement et de désintégration des assemblages en réponse au changement de pH (180).

1.2.3.2.3 Impact du pH et de la force ionique

Le pH permet de contrôler la densité de charges qui influe sur l'adsorption des polymères, couche par couche sur le substrat. Des réglages simples de pH permettent de contrôler la masse des assemblages et de modifier l'épaisseur de la couche adsorbée. Elle peut être très fine (0,4 nm) mais aussi épaisse (8 nm) comme dans le cas de systèmes PEM construits avec le système acide polyacrylique/poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAA/PAH) (**Figure 34**) (184).

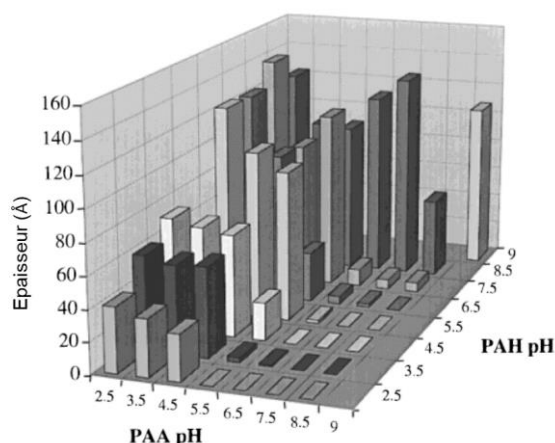


Figure 34. Epaisseur moyenne obtenue après le dépôt de 13 bicouches de PAA/PAH à pH différents sur des supports en silicone mesurée par la méthode d'ellipsométrie. Cet histogramme montre que le dépôt de ces bicouches est considérablement influencé par le pH des solutions des polyélectrolytes PAA et PAH. Modifié de Shiratori et Rubner (184)

Les polyélectrolytes forts comme le polystyrène sulfonate, le poly (α méthyle styrène sulfonate, le poly (diallyle-diméthyle ammonium) entre autres, présentent des charges ioniques indépendantes du pH. Au contraire, la charge des polyélectrolytes faibles comme le chitosan, le polymère de cyclodextrine ou le poly hydrochlorure d'allylamine va dépendre du pH. Ainsi pour ces polyélectrolytes faibles, il est important de se situer dans une certaine gamme de pH afin d'obtenir leur forme ionisée et de favoriser les interactions PE^+/PE^- . Par exemple, pour les polyélectrolytes faibles, la fonction amine sera largement protonnée à un pH < 6 tandis que la fonction acide carboxylique, sera déprotonnée à un pH > 3-5. Par conséquent la gamme de pH idéale pour l'autoassemblage des deux espèces se situera entre ces deux valeurs de pH. Cette gamme de pH

sera élargie dans le cas d'un assemblage PE fort /PE faible, et sera encore plus étendue dans le cas de deux PE forts.

La force ionique a également un impact lors de la construction du système PEM. La force ionique met en évidence la compensation des charges intrinsèques ou extrinsèques des polyélectrolytes dans les assemblages (**Figure 35**). Ladam *et al.*, ont évalué l'influence de la concentration du chlorure de sodium (NaCl) dans les solutions de polyélectrolytes (polystyrène sulfonate/ poly(hydrochlorure d'allylamine) (PSS/PAH)) au moment de la construction des assemblages. Ils ont constaté qu'une augmentation de la concentration de NaCl dans les solutions conduisait à des quantités plus importantes de polyélectrolytes déposées sur le support et à des assemblages plus épais grâce aux contre-ions « intermédiaires » (185) qui exercent une compensation de charge dite « extrinsèque ».

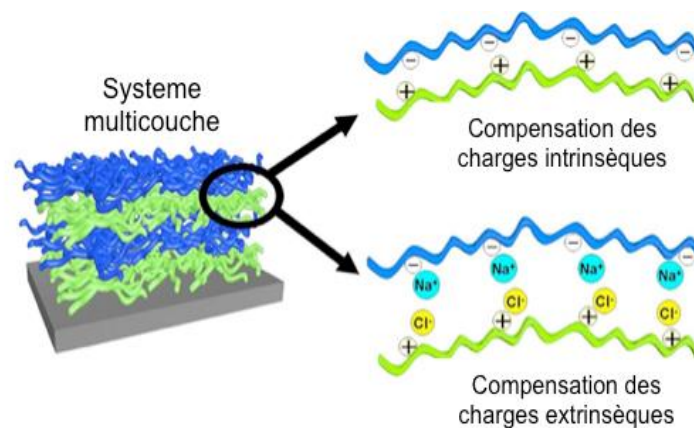


Figure 35. Compensations des charges intrinsèques et extrinsèques dans des assemblages multicouches. Adapté de Rydzek *et al.* (186)

1.2.3.2.4 Impact de la température

Un autre paramètre qui influe sur la stabilité, la rugosité, l'épaisseur, la structure interne, la morphologie et le type de croissance de systèmes PEM, est l'effet de la température. Il a été rapporté que les systèmes PEM développés à haute température présentait une épaisseur plus importante que ceux développés à température ambiante (**Figure 36**) (187). Ce comportement est dû au fait que les températures élevées conduisent au gonflement des assemblages et à une interpénétration plus importante entre les couches de polyélectrolytes qui forment une croissance de type exponentielle (188).

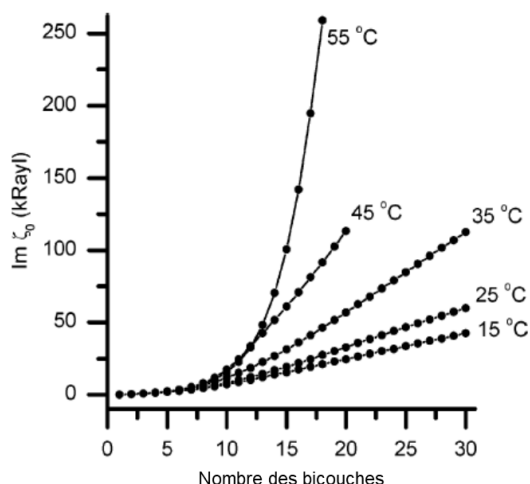


Figure 36. Construction des assemblages multicouches composés de poly(styrène sulfonate)/ poly(diallyldiméthylammonium chloride) (PSS/PDDA) à différentes températures sur des lames en quartz (188).

1.2.3.2.5 Impact du temps d'immersion

Le temps d'immersion et de rinçage jouent un rôle très important dans le type de croissance des assemblages et dans l'épaisseur des assemblages. Des assemblages développés avec des temps d'immersion différents n'entraînent pas de changements de croissance (linéaire). Cependant, il est possible que le gain de masse soit plus élevé à des temps d'immersion prolongés. Par exemple les assemblages formés par polyéthylèneimine branchée/laponite (BPEI/LAP) (**Figure 37B**) sur des films en PET montrent un gain de masse constant mais dépendant du temps d'immersion (compris entre 10 et 300 secondes); contrairement aux assemblages formés par polyéthylèneimine branché/montmorillonite (BPEI/MTM) sur le même support, où le gain de masse augmente assez rapidement à un temps d'immersion de 5 minutes (**Figure 37A**). Il est possible que la structure et la géométrie des polyélectrolytes utilisés influent sur les variations des gains de masse par rapport au temps (189).

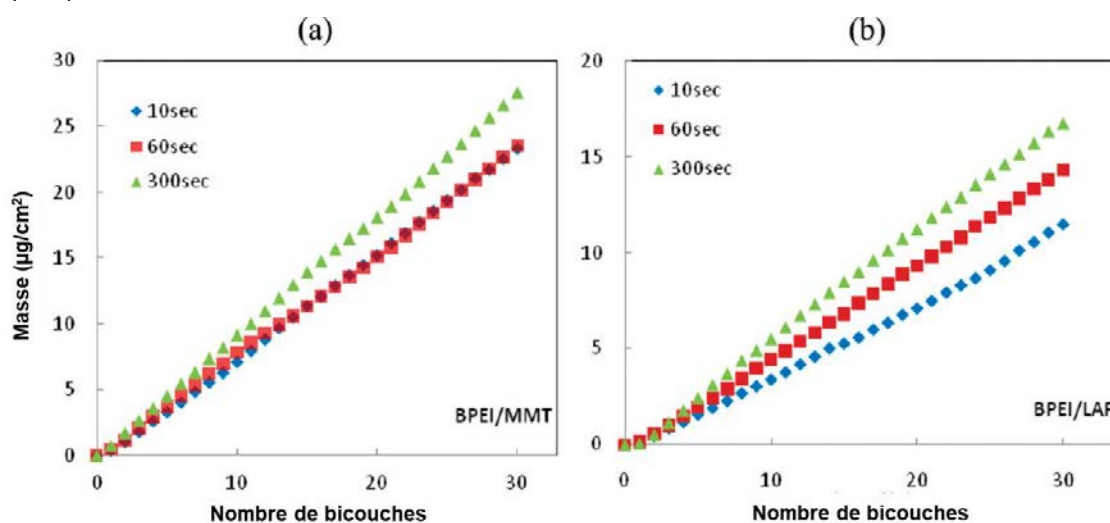


Figure 37. Evolution du gain de masse des assemblages en fonction du différents temps d'immersion ((A) BPEI/MTM ; (B) BPEI/LAP) mesurés par microbalance à quartz (189).

Bellanger *et al.*, ont évalué l'impact de la cinétique d'adsorption ainsi que le type de croissance d'un système PEM composé de Poly (chlorure de diallyldiméthylammonium) / Poly (styrène sulfonate) (PDDA/PSS) en fonction du temps d'immersion. Le support immergé dans les solutions de PE pendant 30 min et rincé durant 120 minutes, a montré une croissance linéaire des assemblages ainsi qu'un revêtement de surface plus épais et stable. Par contre, pour les assemblages développés avec des temps assez courts, une diminution de leur croissance a été démontrée (190).

1.2.3.3 Stabilisation des systèmes PEM

L'effet du pH et de la force ionique peut interférer sur la stabilité des systèmes PEM. Certains types d'assemblages ne sont pas suffisamment stables aux changements d'environnement. En effet, les milieux biologiques présentant des pH variés (ex : les exsudats de plaies) ou de force ionique importante (ex : le plasma humain) peuvent conduire à une désintégration partielle ou totale de ces assemblages. Il est donc important de développer des stratégies de traitements de réticulation pour maintenir l'intégrité des systèmes PEM lors de leur utilisation. De toutes ces stratégies, les plus courantes sont : la photo-réticulation, la réticulation chimique et la réticulation thermique.

- **Photo-réticulation des PEM**

Cette méthode consiste à incorporer un agent photo-sensible (rhodamines) dans les assemblages pour être ensuite irradiés afin de former des liaisons plus stables (liaisons covalentes). L'intensité de la radiation est fonction de la distance, de l'espace et de l'intensité de la lampe de radiation utilisée (191).

- **Réticulation chimique des PEM**

La réticulation chimique utilise des carbodiimides (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)), afin de faciliter la formation de liaisons covalentes (ester ou amides) entre les groupes réactifs des polyélectrolytes (192). Parmi les agents réticulants, il existe également l'éthylènediamine, la génipine ou le glutaraldehyde. Cependant l'ajout d'un agent réticulant n'est pas sans risque sur la cytocompatibilité du système à cause de leur réactivité chimique et leur toxicité, une élimination complète de leurs traces résiduelles est à prévoir.

- **Réticulation thermique des PEM**

Afin d'assurer la réticulation, les systèmes PEM sont exposés à des hautes températures pendant un temps déterminé. Cela permet aux polyélectrolytes de se réorganiser dans les assemblages en renforçant les liaisons hydrogènes, ou de former des liaisons covalentes entre les couches. Martin *et al.*, ont rapporté que la dégradation des assemblages formés par le CHT et le PCD était très importante dans des milieux comme le tampon phosphate (PBS pH 7,4) alors que

dans l'eau la dégradation était négligeable. Ce phénomène est dû au fait que le PBS présente une force ionique qui perturbe la stabilité des assemblages, par mécanisme de compétitions entre les ions libres en excès et les liaisons PE^+ et PE^- conduisant à la déstructuration du système PEM (145).

Dans le cadre de la thèse de Jatupol Junthip, l'impact favorable d'un traitement thermique (140 °C) dans la stabilité des assemblages a été mise en évidence. En effet, la perte de masse des supports après leur immersion dans le PBS pH 7,4 été fortement réduite (193). De la même manière, un traitement thermique après l'élaboration de nanofibres à base de CHT et du PCD a montré un effet stabilisant de celles-ci en empêchant leur dissolution immédiate, notamment en milieu acide (93).

1.2.3.4 Applications biomédicales des systèmes PEM

Grâce à la multitude des assemblages multicouches et à leur facilité de développement, la technique de *layer-by-layer* est appliquée dans le domaine biomédical, notamment pour la conception des supports antimicrobiens, de pansements combinés ou pour la délivrance contrôlée de substances actives.

1.2.3.4.1 Application antimicrobienne

Plusieurs dispositifs médicaux comme les implants, les pansements, les lentilles, les cathéters, peuvent être colonisés par divers microorganismes qui ensuite se multiplient et forment des biofilms. Pour prévenir ceci, le développement de revêtements antimicrobiens est en pleine expansion et à la recherche de nouvelles stratégies. La stratégie de modification de surfaces par dépôts de revêtements multicouches PEM est une approche qui permet de couvrir l'ensemble des besoins pour la prévention de la colonisation bactérienne de dispositifs médicaux. Trois types de systèmes PEM ont été mis au point pour limiter la colonisation microbienne sur les surfaces de dispositifs médicaux: les systèmes PEM anti-adhérence, de destruction bactérienne par contact et de délivrance d'agents antimicrobiens (**Figure 38**) (194).

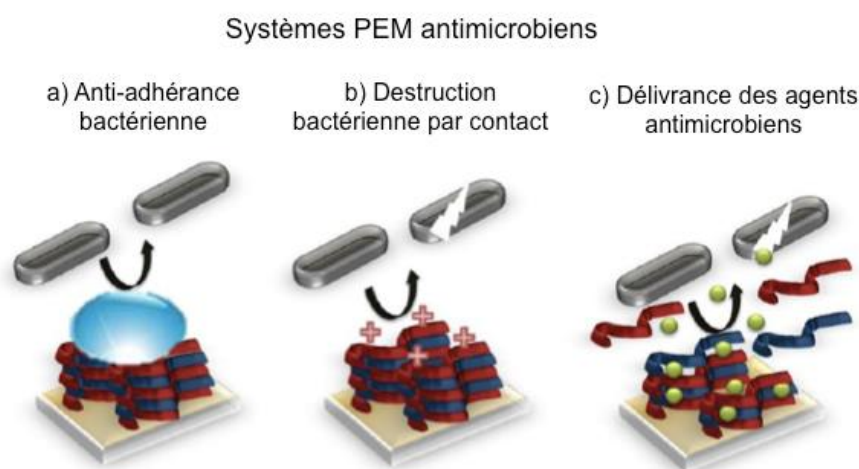


Figure 38. Représentation schématique des deux types de systèmes PEM pour éviter l'adhésion bactérienne. Adapté de Séon et al (194)

- **Les systèmes PEM anti-adhérence**

La première étape de la formation d'un biofilm sur les dispositifs médicaux est l'adhésion bactérienne. Les systèmes PEM anti-adhérence utilisent des polymères hydrophiles car ils sont capables d'empêcher l'adhésion des bactéries sur les supports, en raison de la forte affinité des polymères pour les molécules d'eau (**Figure 38A**). Les polymères hydrophiles comme l'héparine ou l'acide hyaluronique (HA), ont été utilisés dans ce but. D'autre part, Richert *et al.*, ont développé des assemblages de CHT/HA dans le NaCl à 0,15 M. Ils ont constaté que la force ionique apportée par les ions intermédiaires améliorent les propriétés d'anti-adhérence sur *E. coli* (181)

- **Destruction bactérienne par contact**

La plupart des membranes bactériennes sont chargées négativement. Cela permet à certains polymères présentant une charge positive d'interagir avec la membrane conduisant à sa destruction (**Figure 38B**). Cette stratégie a été développée pour la construction de systèmes PEM ayant un polycation comme dernière couche de l'assemblage. Par exemple, le composé phénolique comme le poly (4-vinylphénol) a été utilisé comme un pseudo-polyelectrolyte anionique pour la formation des assemblages avec le poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) ou le poly(hydrochlorure diallyldiméthylammonium) (PDADMAC). Les deux systèmes ont montré une réduction bactérienne de 75% sur *Staphylococcus epidermidis* (195). D'autre part, les composés d'ammonium quaternaire comme les dérivés quaternaires du CHT ont été incorporés dans les systèmes assemblages conduisant à l'inhibition de la croissance microbienne de bactéries Gram positifs, Gram négatifs et du virus de l'influenza (H1N1) (196).

1.2.3.4.2 Application des PEM à la libération de principes actifs

La conception de dispositifs médicaux à libération contrôlée de principes actifs est d'une grande importance pour obtenir un traitement plus efficace. Les principes actifs peuvent être incorporés dans les systèmes PEM directement pendant ou suite à leur construction.

Les peptides antimicrobiens sont de grand intérêt pour développer des systèmes PEM car à l'inverse des antibiotiques il n'y a pas de résistances connues à ce jour. Parmi eux, la défensine, la cateslytine ou la gramicidine A ont été incorporés dans des assemblages composés de poly-L-lysine/poly-L-acide glutamic (PLL/PL(acide glutamique)) (197) ; HA/CHT (198) et PLL/CMP (199) respectivement. Les effets antimicrobiens de ces systèmes PEM ont été montrés sur *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *C. albicans* respectivement.

Des principes actifs (PA) tels que les antimicrobiens comme la vancomycine (153,163), la moxifloxacine et la ciprofloxacine (165,200), la chlorhexidine (201) et l'argent (166,169), des anesthésies locales comme la lidocaïne (162) et des anti-inflammatoires comme le diclofénac (153,162), ont été incorporés dans différents types d'assemblages pour l'obtention de pansements techniques présentant une libération contrôlée (**Figure 38C**). Le système de libération dépend de la

perméabilité et la stabilité des assemblages. Les mécanismes de libération peuvent être de trois types: i) la diffusion du principe actif à travers les assemblages (**Figure 39A**), ii) la dégradation des assemblages entraînant la libération des PA (**Figure 39B**) et iii) les stimuli externes comme le changement du pH, la température ou les enzymes trouvés dans les exsudats peuvent influencer la libération des PA (**Figure 39C**) (171).

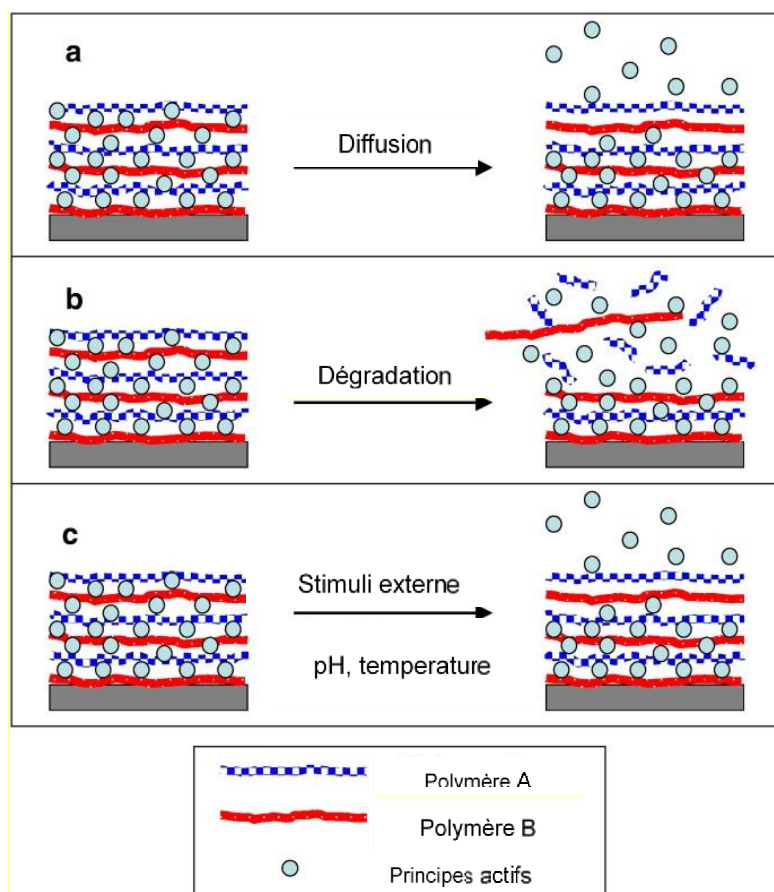


Figure 39. Mécanismes de libération de principes actifs à travers des assemblages multicouches.

L'activité antimicrobienne de l'argent a été déjà démontrée par nombreux travaux. Cela a motivé les chercheurs à développer des assemblages avec l'argent incorporé dans leur structure. Des assemblages comme poly-L-lysine/acide hyaluronique (PLL/HA) (202); polyéthylèneimine d'Ag/acide polyacrylique (PEI/PAA) (203); acide polyacrylique/poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAA/PAH) (201) ont montré une libération contrôlée de l'Ag à travers les assemblages et une réduction de la charge bactérienne d'*E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa*.

1.2.4 Conclusion

Il existe une grande diversité de pansements à base de fibres textiles. Parmi celles-ci, on trouve des fibres de polymères naturels qui ont la faculté de stimuler la cicatrisation et de fournir un bon environnement au niveau de la plaie afin de favoriser les conditions de guérison. De plus, les fibres obtenues à partir des polymères synthétiques sont les plus utilisées, en raison de leur coût faible et de leur facilité à être fonctionnalisées en fonction des besoins exigés pour des applications biomédicales. Les techniques de fonctionnalisation de surface permettent l'incorporation de principes actifs dans leur structure, afin de fournir une fonction thérapeutique.

Les pansements à base de textiles peuvent être fonctionnalisés de différentes manières. Parmi les méthodes de fonctionnalisation décrites, le greffage des textiles par des polymères comme le chitosan ou le polymère de cyclodextrine est avantageux pour la conception de nouveaux pansements, car il serait possible de bénéficier de certaines propriétés intrinsèques du chitosan et des propriétés de formation de complexes d'inclusion des cyclodextrines avec les principes actifs. D'autre part, la méthode de *layer-by-layer* est simple et polyvalente, ce qui la rend intéressante pour l'appliquer à la conception de pansements innovants à libération contrôlée des substances bioactives. De plus, le chitosan est un polyélectrolyte positif et le polymère de cyclodextrine est un polyélectrolyte négatif (204,205), l'utilisation de ces deux polymères semble donc intéressante pour développer des systèmes PEM ayant plusieurs rôles i) barrière pour limiter le diffusion de agents antimicrobiens, ii) gonflement pour assurer une hydratation de la plaie, iii) libération d'un second principe actif grâce aux cyclodextrines présentes dans le système.

Les systèmes PEM à base de CHT et PCD développés au sein de notre laboratoire, subissent une réticulation thermique dans le but de former de liaisons covalentes de type amide entre le CHT et la PCD. Le choix s'est orienté sur cette stratégie car les polymères ne sont pas sensibles à cette température et aucun additif n'est ajouté dans le système. Cela permet une stabilité améliorée, une délivrance contrôlée des antimicrobiens ainsi qu'une meilleur cytocompatibilité. (130)(206).

1.3 Evaluation « *in vivo* » des pansements

1.3.1 Evaluation clinique

1.3.1.1 *Recommandations de l'Haute Autorité de la Santé (HAS)*

La CNEDiMTS est la commission de l'HAS qui analyse et évalue le bon usage des dispositifs médicaux et des technologies de la santé, afin de justifier leur remboursement par l'Assurance Maladie. Pour l'évaluation des pansements primaires et secondaires, cette commission a établi un guide méthodologique destiné au fabricant, dans lequel des recommandations ont été établies pour mettre au point l'évaluation clinique de la qualité de leurs produits. Le **Tableau 6** décrit les recommandations signalées dans ce guide (Donnés de l'HAS, 2013).

Tableau 6. *Recommandations de l'HAS pour développer l'évaluation clinique des pansements (207).*

Les Recommandations	Caractéristiques (les plus importantes)
1) Considération générale – Type d'étude	<ul style="list-style-type: none"> • Etudes contrôlées randomisées menées par des scientifiques en intégrant un méthodologiste dans l'équipe. • Randomisation centralisée par méthode informatique.
2) Population de plaies chroniques	<ul style="list-style-type: none"> • Des patients ayant une seule étiologie de plaie chronique. • Des critères diagnostiques de l'étiologie précisés et pertinents.
3) Aveugle	<ul style="list-style-type: none"> • Respecter l'aveugle de l'investigateur et du patient.
4 et 5) Critères de jugement	<ul style="list-style-type: none"> • Cicatrisation de la plaie : cicatrisation complète de la plaie évaluée à un temps T défini en fonction de l'étiologie et du stade de la plaie. Ou délai jusqu'à cicatrisation complète : 100% d'épidémisation de la perte de substance. • Amélioration des soins : démontrer que le traitement choisi n'entrave pas la cicatrisation. Bénéfices sur la douleur, l'infection, l'odeur, la réduction des exsudats, la capacité hémostatique, la facilité du changement du pansement et la qualité de vie du patient
6) Comparateur	<ul style="list-style-type: none"> • Le pansement de référence sans le composant ou la substance bioactive ajoutée.
7) Soins standard	<ul style="list-style-type: none"> • Les plaies doivent également subir des soins standards comme le nettoyage de la plaie, la détersion mécaniques des tissus et la nutrition du patient.
8) Traitements associés	<ul style="list-style-type: none"> • Rapporter les traitements associés ou en préciser les interdits pendant tout l'étude.

1.3.1.2 *Types d'études*

En 2007, l'HAS a rédigé un document sur l'évaluation des pansements primaires et secondaires. Ce dossier décrit les analyses de données trouvées dans la littérature scientifique sur l'évaluation des différents types des pansements appliqués sur des plaies aiguës et chroniques. Le type d'études concerne : les études randomisées, les méta-analyses, les études médico-économiques, les recommandations pour la pratique médicale, les conférences de consensus, et

les synthèses d'études randomisées et méta-analyses de la littérature, c'est à dire, les revues. Les études sélectionnées doivent répondre aux objectifs décrits dans les recommandations 4 et 5 du **Tableau 6** ainsi qu'à une évaluation du coût économique.

Dans le cas des pansements à l'argent, six études de ce type ont été sélectionnées, afin d'évaluer leur efficacité sur des plaies chroniques comme les escarres et les ulcères de jambe. Malheureusement, l'étude de l'HAS a conclu que le niveau des études cliniques réalisées était insuffisant pour indiquer les pansements à l'argent comme traitement pour les plaies chroniques infectées ou présentant un risque d'infection.

Dans ce travail de thèse, l'évaluation clinique du pansement ne sera pas traitée. C'est la phase finale dans la conception d'un dispositif médical qui doit être réalisée dans plusieurs centres hospitaliers sur des dispositifs fabriqués en industrie après validation préclinique. Ainsi, dans ce travail, une étude préclinique préliminaire a été réalisée chez la souris.

1.3.2 Evaluation préclinique

L'étude préclinique consiste à évaluer *in vivo*, dans des systèmes vivants non humains, la performance d'un dispositif médical. L'expérimentation animale est une étape indispensable avant de commencer les études cliniques. Les études *in vivo* se font de manière rationnelle après l'approbation d'un protocole d'expérimentation octroyé par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche afin de garantir un traitement éthique de l'animal.

1.3.2.1 Les modèles animaux

Les études précliniques de cicatrisation des plaies impliquent des expériences *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, les études *in vitro* ne permettent pas de préciser les phases de la cicatrisation ainsi que la vascularisation du site de la plaie, l'inflammation, les réponses immunitaires et les infections (208). Plusieurs espèces ont été utilisées comme modèles animaux pour évaluer la cicatrisation dont la grande majorité est réalisée sur des rongeurs.

Les rongeurs sont fréquemment sélectionnés comme étant le premier choix dans la plupart des travaux de recherche en raison de toutes les données connues à propos de leur système corporel, leur petite taille et leur capacité à manipuler certaines variables génétiques, alimentaires et environnementales (208). Néanmoins, certains chercheurs utilisent d'autres animaux comme les cochons ou les lapins pour évaluer la cicatrisation des brûlures ou des plaies aiguës et chroniques.

1.3.2.1.1 Les modèles animaux avec des plaies saines

Les plaies saines réalisées sur les animaux, sont des excisions, c'est-à-dire que l'acte consiste à retirer le derme ou l'épiderme. Mais, si les deux couches cutanées sont retirées entièrement, le processus s'appellera donc excision chirurgicale d'épaisseur partielle ou totale (**Figure 40**)

(209,210). Ce type de plaies est généralement réalisé avec des instruments de biopsie de diamètre variable (211).



Figure 40. Photographies macroscopiques des plaies saines réalisées par excision chez le cochon (a) (208), le lapin (b)(211) et (c) le rat (210).

Les études *in vivo* des plaies saines se concentrent sur l'évolution du taux de fermeture de la plaie en un temps déterminé (14 à 21 jours environ). Des observations histologiques sont également menées afin d'évaluer le développement de tissus comme l'épiderme et le derme. Oryan *et al.*, ont développé une pommade à base de CHT contenant des AgNP pour le traitement des brûlures chez le rat. Le modèle de plaie a consisté en une brûlure de 10 mm de diamètre qui a été réalisée avec une barre d'aluminium bouillie dans l'eau à 100°C pendant 30 secondes. Ensuite, la barre a été mise en contact avec la région dorsale des rats pendant 10 secondes sans exercer de pression. Les résultats ont montré que la pommade de CHT avec AgNP a été plus efficace en comparaison avec la SSD et au groupe témoin après 14 jours de traitement (**Figure 41**). La fermeture de la plaie a été plus rapide sur les plaies qui ont été traitées avec la pommade de CHT avec AgNP. De plus, les plaies traitées avec la SSD et les témoins non-traités ont montré des signes de rougeur, d'hyperhémie et d'inflammation après 28 jours d'évaluation (212).

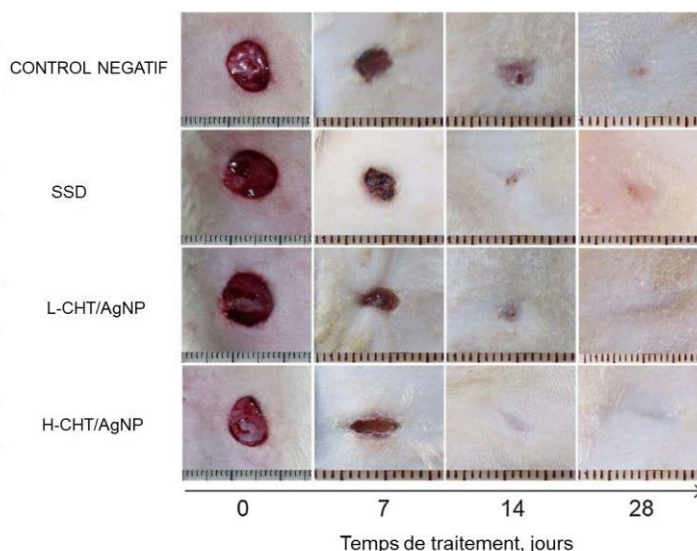


Figure 41. Observation macroscopique de plaies traitées avec les deux pommades différentes : LMW-CHT/ AgNP et HMWCHT/AgNP, la SSD et le contrôle à 0, 7, 14 et 28 jours de traitement (212)

1.3.2.1.2 Modèles animaux avec des plaies infectées

Les plaies infectées appartiennent aux types de plaies chroniques dont la cicatrisation est retardée à cause de l'inflammation générée par l'infection. Les travaux sur l'évaluation *in vivo* des pansements sur un modèle animal ayant une plaie infectée commencent à être nombreux. Par contre, il n'existe pas encore de modèle déjà établi. La méthodologie utilisée est de former la plaie, soit par excision ou soit par brûlure et puis l'inoculer avec une souche microbienne définie. Parmi les microorganismes reportés, on retrouve le *Staphylococcus aureus* (213,214), *Candida albicans* (213) et *Pseudomonas aeruginosa* (215).

Par exemple, Agarwal *et al.*, ont évalué un pansement à base d'un système PEM composé de PAH/PAA sur des films *Biobrane*. La chlorhexidine a été incorporée comme principe actif dans les assemblages afin de traiter les infections. Ces pansements ont été évalués *in vivo* chez la souris. D'abord, des anneaux en silicone ont été placés sur la région dorsale des souris. Après, les plaies ont été faites avec un poinçon chirurgical de 6 mm de diamètre et ensuite infectés avec 10 μ L d'une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus*. Les pansements PEM ont ensuite été déposés et couverts avec un pansement secondaire. Les résultats ont montré que les taux de fermeture des plaies traitées avec un substitut cutané temporaire dénommé *Biobrane*TM (Smith&Nephew) non modifié (Figure 42 A, B, C) ou *Biobrane*TM portant le système PEM et la chlorhexidine, n'étaient pas significativement différents après 14 jours de traitement. En revanche, le pansement PEM/Chlorhexidine (Figure 42D, E, F) n'a pas altéré la capacité du collagène de *Biobrane*TM sur l'intégration des bordures de la plaie ni sur le processus de cicatrisation. De plus le pansement PEM/Chlorhexidine a montré une réduction bactérienne de 3 Log₁₀ après 3 jours de traitement (Figure 42G) (61).

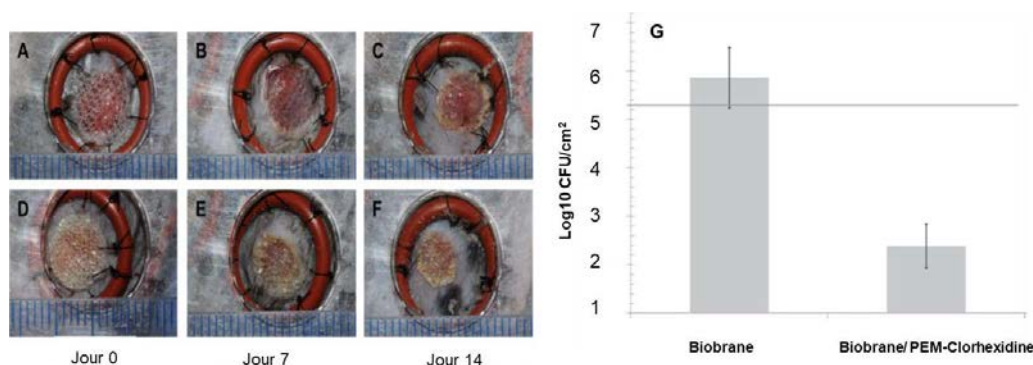


Figure 42. Plaies infectées avec *S. aureus* portant le pansement *Biobrane*TM non modifié (A, B, C) et *Biobrane*TM enrobé par le système PEM : PAH/PAA et la chlorhexidine (D, E, F) pendant différents temps de traitement. (G) Réduction bactérienne montrée par le pansement *Biobrane*TM non modifié et par le pansement *Biobrane*TM/PEM-chlorhexidine (61).

1.3.2.1.3 Modèle animal développé par notre équipe

Au sein du laboratoire, un premier modèle animal pour l'évaluation des prothèses vasculaires antibactériennes a été développé chez la souris. Le modèle consistait à réaliser une incision de 2

cm selon des techniques chirurgicales standard au niveau de la région inter scapulaire (dorsale) de la souris. Puis, la réalisation d'un tunnel sous cutané a été réalisé en effondrant le *panniculus carnosus* au long de la colonne vertébrale. Ces tunnels étaient dimensionnés pour recevoir des pastilles de 6mm de diamètre qui ont étéensemencés peu après leur implantation par 30 μ L d'un inoculum bactérien approprié de concentration connue (7-8 log₁₀ UFC/ml), réalisant ainsi un modèle de contamination prothétique intense (**Figure 43**). La plaie chirurgicale a été finalement refermée sur l'échantillon contaminé à l'aide d'une agrafeuse automatique (216).



Figure 43. Implantation d'une prothèse, en sous-cutanée, chez la souris C3H/HeN.

1.3.3 Conclusion

Les études précliniques des dispositifs médicaux implantables combinés correspondent aux évaluations *in vivo* chez l'animal. Les rongeurs, les lagomorphes et les porcins sont les animaux les plus utilisés pour l'évaluation des pansements. De plus, plusieurs chercheurs confirment que le model porcine est à 78% comparable aux humains. Cependant, des facteurs divers tels que le type d'animal, la méthode de la création des plaies, le taux d'infection et le type de traitement ne permettent pas de faire de vraies comparaisons entre les différentes études rapportées.

De toutes les façons, une évaluation préclinique chez l'animal est indispensable avant de commencer une évaluation clinique du dispositif. La plupart des études précliniques des nouveaux pansements sont réalisés chez les souris ou les rats. Cependant, il est difficile de trouver des études qui identifient vraiment l'efficacité des pansements antimicrobiens. Une étude similaire a été réalisé au sein du laboratoire, les résultats obtenus ont confirmé la faisabilité de la procédure (216). Dans ce travail de thèse, un model murin a été choisi pour l'évaluation préclinique du pansement conçu. La souche murine élue est C3H/He car selon la littérature, c'est une souche que développe facilement une infection persistante. Dans cette étude le contrôle choisi a été le pansement commercial *UrgoTul®-Ag*.

Finalement, l'évaluation clinique des pansements (non réalisée dans le cadre de cette thèse), doit être réalisée comme c'est le cas de tous les dispositifs médicaux. Les objectifs principaux sont : la vérification de la performance du dispositif, conforme à celui assigné pendant l'évaluation, et la détermination des effets secondaires indésirables aux cours de son utilisation. C'est pour cela que l'HAS, à travers la CNEDiMETS, a établi des guides méthodologiques destinés aux fabricants pour qu'ils mènent correctement les évaluations cliniques, en respectant bien sûr, les recommandations désignées. L'évaluation clinique du pansement conçu, pourrait être réalisé à long terme. Dans ce cas, les critères de jugement seraient : une cicatrisation complète de la plaie à un temps T défini en fonction de son étiologie et l'amélioration de leurs soins. Le comparateur à utiliser dans cette étude serait le pansement sans principe actif ; c'est à dire, un pansement multicouche sans argent et sans ibuprofène.

1.4 Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier de charges

L'étude bibliographique a permis de comprendre la peau et plus particulièrement la physiologie, son renouvellement et les pathologies conduisant à un retard de cicatrisation. La peau est la première barrière de protection de l'organisme contre le milieu extérieur, dont le maintien de son intégrité est vital. Dès qu'une plaie est formée, l'organisme déclenche immédiatement plusieurs voies cellulaires coordonnées qui conforment le processus de cicatrisation. La cicatrisation se déroule en quatre phases : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et finalement le remodelage. Dans le cas des plaies aiguës, la cicatrisation prendra environ 14 jours.

Cependant il existe différents facteurs (étiologie, taille et profondeur de la plaie, localisation anatomique, âge du patient) pouvant compliquer la cicatrisation, conduisant à une plaie chronique. La colonisation bactérienne est par exemple l'un des facteurs qui conduit à la chronicité de plaies. Lorsqu'une plaie présente une infection, le processus de cicatrisation reste bloqué dans la phase inflammatoire car l'organisme produit en abondance des macrophages et des neutrophiles comme mécanisme de défense, conduisant à une réponse inflammatoire chronique. Les pansements combinés (avec un principe actif) ont donc tout leur intérêt.

De nombreux pansements pour traiter les infections de plaies ont été décrits ; parmi eux, les pansements à l'argent sont les plus utilisés afin de traiter ou de prévenir l'infection. La problématique majeure reste la diffusion excessive de l'argent vers les tissus endommagés conduisant à une cytotoxicité vis-à-vis des fibroblastes et des kératinocytes (ce qui retarde la cicatrisation). En France il existe deux types de pansements à l'argent qui ont un service attendu suffisant (qui ont prouvé leur efficacité) et donc sont remboursés par la sécurité sociale : *UrgoTul[®]-Ag* (Laboratoires Urgo) pour le traitement des ulcères de jambe et *Release-Ag[®]* (Johnson and Johnson) pour le traitement des brûlures, des escarres et des ulcères. Néanmoins, la toxicité de l'argent par sa diffusion incontrôlée dans les plaies reste un problème majeur qui limite son utilisation.

Les plaies chroniques infectées, engendrent en même temps une douleur constante à cause de l'inflammation produite en réponse à l'infection. Actuellement sur le marché, il existe une vaste gamme des pansements pour traiter ou empêcher les infections (pansements au miel, pansements avec des antiseptiques comme la chlorhexidine et l'argent) ou pour traiter la douleur (pansement à l'ibuprofène, *BIATAIN[®] IBU*) avec plus ou moins d'efficacité. Cependant, des pansements ayant une double action, c'est à dire, une action antimicrobienne et antalgique n'existe pas.

Afin d'apporter la double activité thérapeutique, une nouvelle stratégie de modification de surface de textiles avec des polymères, pour le développement des pansements antimicrobiens (en prévenant la diffusion de l'argent) avec une libération prolongée de principes actifs limitant la douleur est attendue. L'étude bibliographique a permis de recenser de nombreuses stratégies pour modifier la surface d'un textile et la rendre 'fonctionnelle'. Ainsi l'apport de fonction anioniques à la surface

par des cyclodextrines ou du chitosan (tous deux réticulés avec l'acide citrique) semble être une voie intéressante. Afin de créer une barrière à la diffusion, hydrater la plaie et libérer un second principe actif, un système Polyélectrolyte Multicouche (PEM) à base de Chitosan et de Polymère de cyclodextrines semble très intéressant. L'originalité du projet de thèse réside dans l'association de ces deux stratégies pour i) Former une barrière pour ralentir la diffusion de l'argent dans la plaie et ainsi, réduire le risque de toxicité vers les cellules saines, ii) Obtenir une activité antibactérienne, iii) maintenir un environnement humide, iv) Libérer de manière contrôlée l'ibuprofène afin de traiter la douleur.

Ce projet de thèse vise donc à développer un pansement à double activité thérapeutique : antibactérien et antalgique pour le traitement de plaies chroniques. Le sulfate d'argent a été choisi comme l'agent antibactérien, tandis que l'ibuprofène a été sélectionné comme l'antalgique. Le pansement est recouvert avec un système PEM composé de chitosan comme polyelectrolyte cationique et de polymère de β -cyclodextrine comme polyelectrolyte anionique (**Figure 44**).

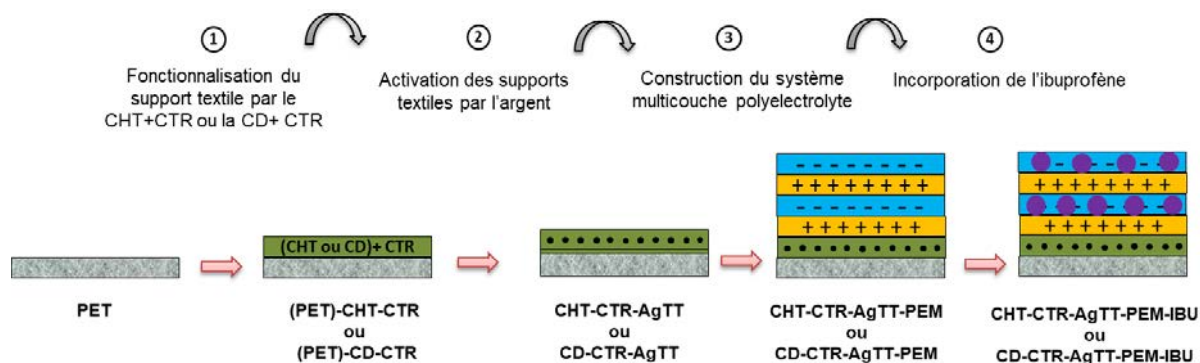


Figure 44. Représentation des étapes de conception du pansement fonctionnalisé chargé avec l'argent et recouvert du système PEM avec l'ibuprofène.

1.4.1 Objectifs de la thèse

Dans ce projet de thèse, un pansement à double libération de principes actifs a été conçu, caractérisé et évalué en conditions *in vitro* et *in vivo*. Le pansement développé dans ce travail de thèse (**Figure 43**) aura une application pour la phase de détersion de la plaie. Le système PEM permettrait l'absorption et drainage des exsudats ; l'argent exercerait son activité antibactérienne à l'interface pansement – plaie, le système PEM ralentirait sa diffusion vers les tissus sains et grâce à la présence du polymère de β -cyclodextrine permettre la formation de complexes d'inclusion avec l'ibuprofène afin de limiter la douleur.

Dans un premier temps, la surface du textile sera modifiée via un procédé de foulardage/exprimage/thermo-fixation ou « *pad-dry-cure* » à partir de solutions de chitosan ou de β CD, mélangés à l'acide citrique qui joue le rôle d'agent réticulant (systèmes nommés CHT-CTR ou CD-CTR respectivement), afin de former une couche anionique riche en groupes carboxylates pour charger ensuite le textile avec le sulfate d'argent par échange ionique (premier principe actif).

L'enrobage du pansement avec le système PEM sera ensuite effectuée selon l'approche *Layer-by-Layer* (L-b-L) sur les textiles chargés par l'argent. Les caractérisations physicochimiques, biologiques et microbiologiques seront ensuite réalisées.

Dans un second temps, les propriétés analgésiques du pansement seront apportées par l'incorporation de l'ibuprofène (IBU, second principe actif). L'ibuprofène (IBU) a été choisi comme agent actif pour son activité anti-inflammatoire et antalgique, et pour sa capacité à former des complexes d'inclusion avec la cyclodextrine présente dans le revêtement PEM. Une caractérisation plus fondamentale des complexes d'inclusion CD/IBU sera réalisée avant d'étudier les phénomènes de sorption de l'IBU sur les différents pansements. L'évaluation des profils de libération sera réalisée dans un milieu physiologique et l'activité antibactérienne du pansement a été réévaluée en présence d'IBU.

Finalement, une évaluation *in vivo* des pansements sera effectuée avec un modèle murin mis au point spécifiquement pour cette étude. Préalablement, une première étude sera réalisée pour apprécier l'impact de la stérilisation sur les propriétés du pansement tant sur le point morphologique que microbiologique.

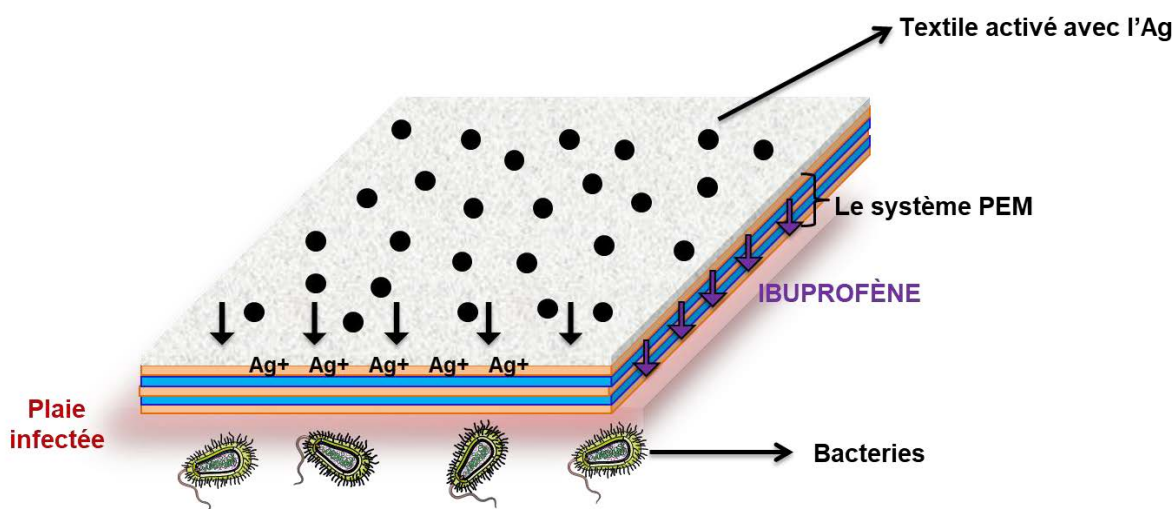


Figure 45. Schéma de la stratégie de fonctionnalisation du pansement.

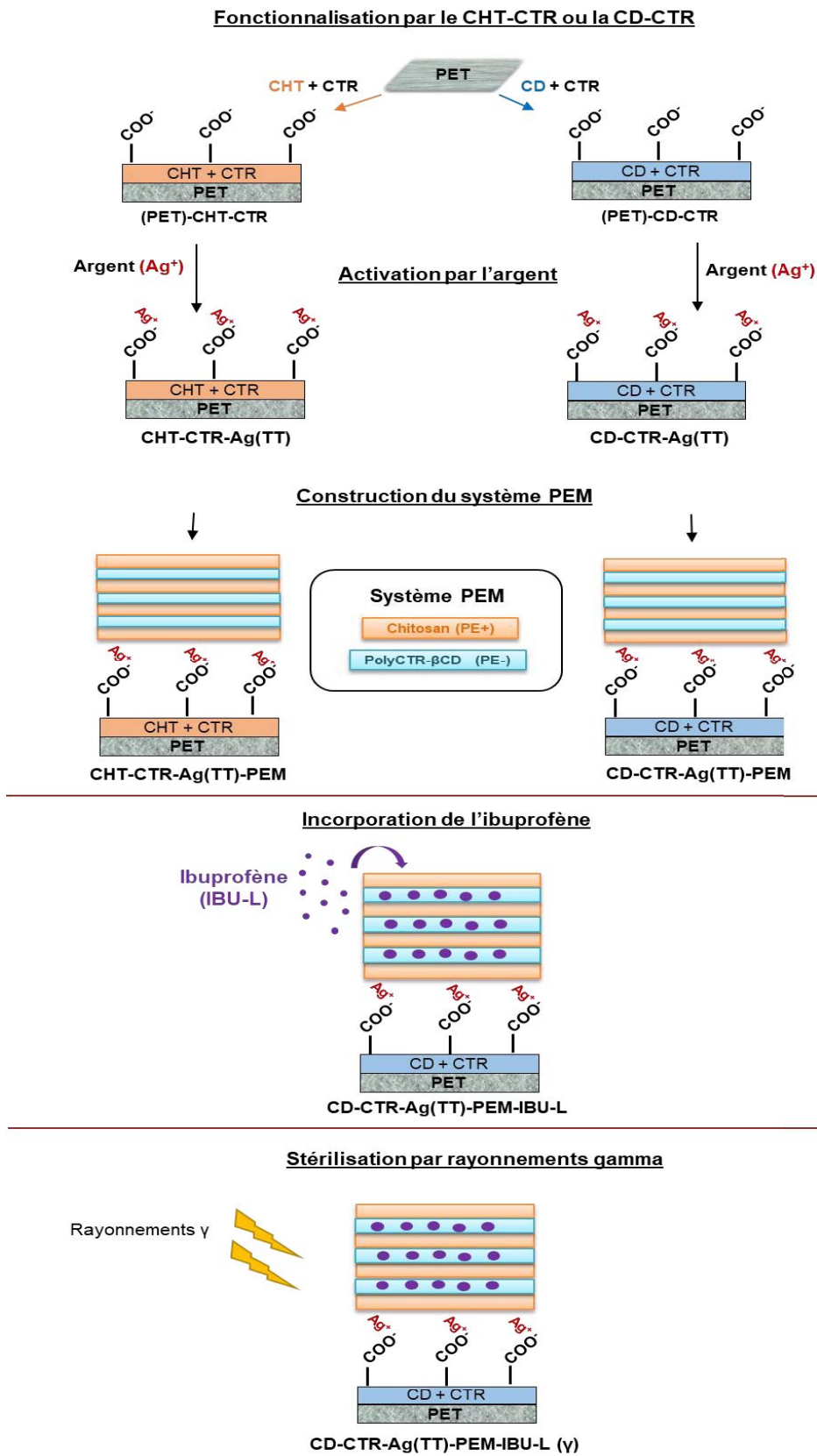
1.4.2 Cahier des charges

Le pansement sera un dispositif médical de classe 3 au regard du règlement européen (MDR2017/745) car même s'il est en contact avec la peau, il contient des molécules pharmacologiques qui utilisées seules ont une action. Un cahier des charges précis a donc été établi afin de valider l'innocuité et la performance de ce pansement.

Tableau 7. Cahier de charges du pansement.

Propriétés	Objectif	Méthode d'évaluation
<i>Etre non toxique (innocuité)</i>	Ne pas induire de toxicité cellulaire.	Etude de la cytocompatibilité Norme ISO/EN 10993-5
<i>Etre stérilisable</i>	Absence de microorganismes. Les propriétés du pansement ne doivent pas être affectées.	Stérilisation par rayons gamma Norme ISO 11137. Evaluation de la biocharge et propriétés
<i>Maintenir un environnement humide</i>	Le PEM permettrait de maintenir un environnement humide.	Mesure de l'absorption des exsudats simulés. Norme NF EN 13726-1
<i>Avoir une activité antibactérienne</i>	Incorporation de l'argent sur la couche thermo-fixée (couche #1).	Cinétique de la réduction bactérienne (<i>kill time</i>)
<i>Ralentir la diffusion de l'argent vers la plaie</i>	Le système PEM limiterait la diffusion de l'argent vers la plaie.	Test de diffusion (<i>Kirby Bauer</i>). Profil de libération de l'argent.
<i>Eviter la dégradation du système PEM</i>	Traitement thermique des assemblages PEM.	Etude de la dégradation du système dans le PBS pH 7,4 par gravimétrie
<i>Avoir une seconde activité antalgique</i>	Incorporation de l'ibuprofène dans le système PEM du pansement.	Etude de l'adsorption de l'ibuprofène. Profil de libération de l'ibuprofène.

Schéma récapitulatif de voies stratégie pour la conception des pansements



PARTIE 2 : Matériels et Méthodes

2 **Matériels et Méthodes**

2.1 Matériels

2.1.1 Support du pansement

Un textile en polyester non-tissé a été sélectionné comme support du pansement en raison de plusieurs critères tels que sa stabilité chimique, sa résistance à la température, sa biocompatibilité, ses propriétés mécaniques et son prix accessible. Dans le domaine de la santé, ce polymère est largement utilisé pour la fabrication de prothèses vasculaires (Dacron[®]), d'implants péritonéaux, mais surtout de pansements (*Urgotul[®]-Ag*, *ActicoatTM*, *Atrauman[®]*, ...) (217).

Un textile en polyéthylène téréphtalate non-tissé (PET, référence NSN 365, poids : 65g/m², épaisseur : 0,24 mm) fourni par la société PGI-Nordlys (Bailleul, France) a été utilisé. Ce textile se présente sous une forme de réseau tridimensionnel (**Figure 46**) obtenu par calandrage des fibres textiles à chaud.

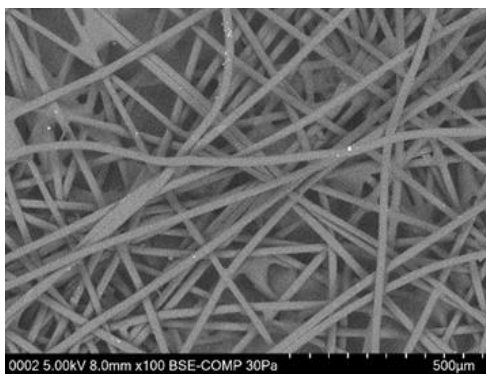


Figure 46. Image par microscopie électronique à balayage (x100) du textile PET non-tissé. Les fibres présentent un diamètre de $24 \pm 0,8 \mu\text{m}$.

2.1.2 Polymères

2.1.2.1 Le chitosan

Dans ce travail, le CHT a été utilisé comme le polyelectrolyte cationique (PE⁺) pour la construction du système Poly Electrolyte Multicouche (PEM). Le CHT (C₅₆H₁₀₃N₉O₃₉) provient de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) (N° Lot STBF 8219V). Il possède un poids moléculaire moyen de 140 Kg.mol⁻¹ (mesuré par viscosimétrie capillaire), une viscosité de 146 Cp (solution à 1%_{m/v} préparée dans l'acide acétique 1%_{v/v}) et un degré de désacétylation de 77% (donnée fabricant).

2.1.2.2 Le polymère de cyclodextrine

La β -cyclodextrine (β CD) a été fournie par Roquette (Kleptose[®], Lestrem France), elle présente un poids moléculaire de 1135 g.mol⁻¹ et une solubilité de 18.5 g/L dans l'eau à 25°C. La β CD a été utilisée pour la synthèse du polymère de cyclodextrine (PCD) avec l'acide citrique (CTR, Saint-Quentin Fallavier, France) comme agent réticulant et l'hypophosphite de sodium (NaH₂PO₄,

Saint-Quentin Fallavier, France) comme catalyseur, selon la méthode décrite par Martel et al. (218). Cette synthèse consiste en une réaction de polyestérification entre la β CD et le CTR.

Brièvement, une solution aqueuse contenant du CTR (10% m/v), de l'hypophosphite de sodium (3% m/v) et de la β CD (10% m/v) est préparée dans un ballon et transférée dans un évaporateur rotatif (Rotavapor R11[®]) sous-vide à 80°C afin d'éliminer l'eau. Une fois refroidi, le ballon est placé dans un bain d'huile à 140°C, lui aussi sous-vide, pendant 30 minutes. Le polymère formé est repris dans 200 mL d'eau distillée, sous agitation pendant 30 minutes. La solution est ensuite filtrée avec un entonnoir en verre fritté avec une porosité de 100 μ m afin de séparer la fraction insoluble (PCDi), puis elle est rincée avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un filtrat limpide. Ensuite, ce filtrat est récupéré et concentré dans l'évaporateur rotatif pour être purifié par dialyse (membrane de dialyse MWCO 6-8000, 50 mm de \varnothing de cellulose) avec de l'eau distillée pendant 3 jours. Finalement, le polymère soluble (PCDs) est lyophilisé et récupéré sous la forme d'une poudre blanche.

Dans ce travail, le PCD (**Figure 47A**) a été utilisé comme le polyelectrolyte anionique (PE^-) pour la construction du système PEM. Le PCD contient 50% de β CD (mesuré par 1H RMN, 4 mmol/g de groupes COOH (mesurée par la capacité d'échange ionique), une solubilité de 1 g/mL dans l'eau, un poids moléculaire de 20 000 $g \cdot mol^{-1}$, mesuré par chromatographie d'exclusion stérique combiné avec un détecteur par diffusion de la lumière (SEC-MALS) à l'université de Montpellier. Le PCD soluble présente une structure « hyperbranchée » et une conformation de type globulaire de 50 nm de diamètre environ (**Figure 47B**) (219).

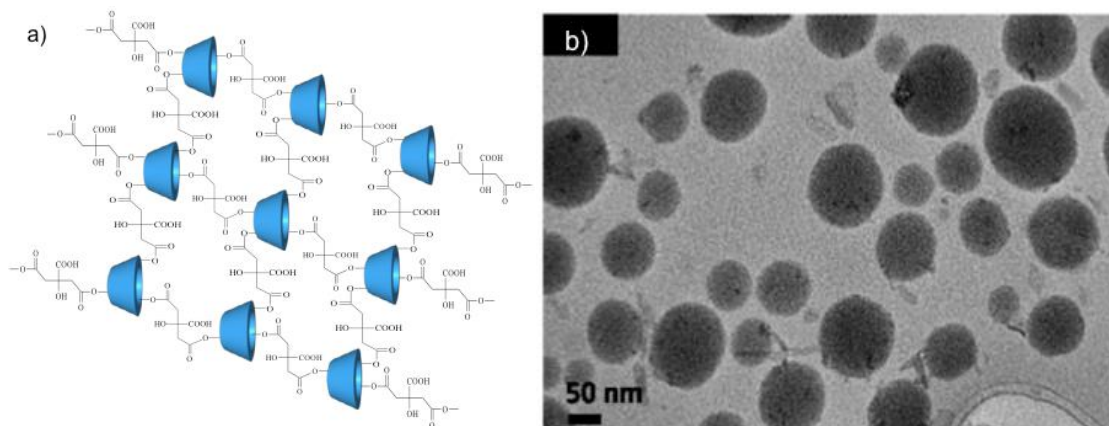


Figure 47. Structure du polymère de cyclodextrine réticulé par l'acide citrique (a). Image TEM du polyCTR- β CD soluble (PCDs) chargé de nanoparticules de ruthénium comme agent de contraste (b) (219)

2.1.3 Les principes actifs

2.1.3.1 Le sulfate d'argent

L'argent se trouve sous différentes formes dans les pansements, soit sous la forme ionique (sels d'Ag⁺), soit sous forme colloïdale (nanocristaux d'Ag⁰). Dans ce travail, le sulfate d'argent (Ag₂SO₄) a été choisi comme agent antibactérien pour le développement du pansement. Le sulfate d'argent provient de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), il présente une pureté de 99,9% et une masse molaire de 311,80 g.mol⁻¹. Le pansement commercial *UrgoTul-Ag*[®] (Laboratoires Urgo, Chevigny-Saint-Sauveur, France) a été utilisé comme le témoin positif car il utilise la même forme d'argent (Ag₂SO₄).

2.1.3.2 L'ibuprofène

L'ibuprofène (acide alpha-méthyl-[4-(2-méthylpropyl) phényl] propanoïque), est un principe actif appartenant au groupe des anti-inflammatoires non stéroïdes (AINS). L'ibuprofène est indiqué pour le traitement de l'arthrite et il est utilisé comme analgésique, notamment dans les cas d'inflammation.

L'ibuprofène a été utilisé comme second principe actif incorporé dans le pansement, afin de soulager la douleur causée par l'inflammation en réponse à l'infection. Deux formes d'ibuprofène ont été utilisées. L'ibuprofène (IBU) (**Figure 48A**) a été fourni par INRESA (Bartenheim, France) (réf 15687-100). Il présente un poids moléculaire de 206,28 g.mol⁻¹ et une solubilité de 21 mg/L dans l'eau à 25 °C. Le lysinate d'ibuprofène (IBU-L) (**Figure 48B**) est une substance formée par les formes racémiques de l'ibuprofène et de la lysine. L'IBU-L s'absorbe plus vite que l'IBU base dans le tractus intestinal, il atteint un haut niveau plasmatique et un T_{max} très rapidement. L'IBU-L a été fourni par la société BASF France (Levallois-Perret France), il présente un poids moléculaire de 352,48 g.mol⁻¹ et une solubilité de 35 g/L dans l'eau.

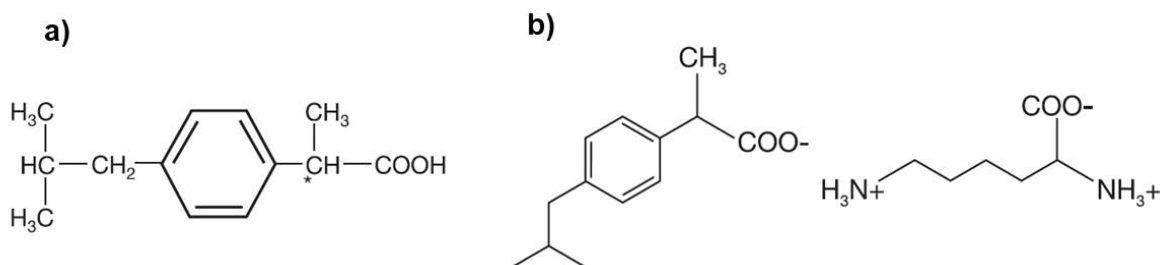


Figure 48. Structure de l'IBU (A) et de l'IBU-L (B) (source : société BASF).

2.2 Méthodes

2.2.1 Conception du pansement antibactérien

2.2.1.1 Fonctionnalisation du PET avec le CHT ou la CD

La première étape de fonctionnalisation du textile PET a pour but de lui conférer un caractère anionique via les fonctions carboxylates afin d'une part, de le charger en ions argent et d'autre part de permettre l'auto-assemblage du système PEM qui servira de couche réduisant la diffusion de l'Ag et encapsulant l'ibuprofène. La fonctionnalisation du PET a été réalisée par la technique du foulardage/exprimage/thermo-fixation ou « *pad-dry-cure* ». Cette méthode a été brevetée par l'équipe d'Ingénierie des Systèmes Polymères (ISP) de l'Unité Matériaux et Transformation (UMET) de l'Université de Lille (139,220,221) et décrit dans de nombreux travaux du laboratoire (117,142,145,205,222).

Brièvement, une solution aqueuse de CTR (10%_{m/v}) avec de l'hypophosphite de sodium (NaH_2PO_4 , 3%_{m/v}) a été préparée. Le CHT (2.5%_{m/v}) ou la β CD (10%_{m/v}) ont été dissous dans cette solution fraîchement préparée. Les textiles (25 cm x 25 cm) ont été imprégnés dans la solution de CHT-CTR ou de CD-CTR puis exprimés par passage entre les rouleaux du foulard (ROACHES, Birstall, England) (8 passages, 1 m/min, 2 bars). Les textiles ont ensuite été séchés à 90°C pendant 15 minutes puis ont subi un traitement thermique dans un four ventilé (Minithermo, ROACHES, Birstall, England) à 140°C pendant 15 minutes et 30 minutes dans le cas du CHT ou de la β CD respectivement. Ce traitement thermique permet la réaction de réticulation du CHT ou la β CD avec le CTR, ce qui conduit à l'enrobage des fibres du PET.

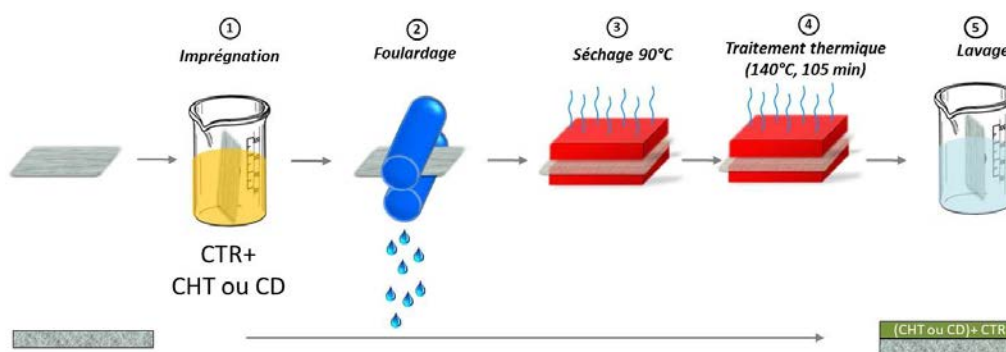


Figure 49. Technique dite du « Pad-dry-cure » pour la formation de la première couche anionique.

Finalement, les textiles fonctionnalisés avec le CHT ont été lavés dans une solution d'acide acétique 1%_{v/v} et deux fois dans l'eau ultrapure pendant 20 minutes sous ultrasons. Les textiles fonctionnalisés avec la CD ont été lavés 3 fois dans l'eau ultrapure sous ultrasons pendant 20 min (**Figure 49**). Les textiles ont finalement été séchés à 90° pendant 15 minutes et pesés afin de mesurer leur gain de masse après la fonctionnalisation, selon la formule :

$$GM, \% = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \times 100$$

Où m_i et m_f correspondent à la masse du PET avant et après la fonctionnalisation respectivement. L'étape de fonctionnalisation correspond à la première couche (#1) déposée sur le support en PET. Les textiles ont été dénommés **(PET)-CHT-CTR** et **(PET)-CD-CTR**.

2.2.1.2 Chargement du sulfate d'argent

Après l'étape de fonctionnalisation, les textiles (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR (5 cm x 5 cm) ont été traités avec une solution de carbonate de sodium (4 g/L) pendant 15 minutes. Cette étape est nécessaire pour neutraliser les fonctions carboxyliques du CTR qui seront sur la forme carboxylate (COO^-) pour ensuite charger le sulfate d'argent (10 g/L). Le sulfate d'argent a été préparé à 70°C sous agitation pendant 45 minutes pour assurer une parfaite solubilisation et filtré avec un filtre 0.22 μm en polyéthersulfone (Millex[®]GP, Millipore).

Les textiles (5 cm x 5 cm) ont été imprégnés dans une solution de sulfate d'argent (10 g/L) en respectant un rapport de bain de 2,5 mL/cm², pendant une nuit sous agitation (80 rpm) à 37°C et à l'abri de la lumière. Le lendemain, les textiles ont été rincés sous ultrasons avec l'eau ultrapure pendant 1 minute, mis sous agitation (80 rpm) à 37°C pendant 4 min à trois reprises et séchés à 90°C. Les textiles sont dénommés **CHT-CTR-Ag** et **CD-CTR-Ag**. Finalement, ces textiles ont reçu un traitement thermique (TT) à 140°C pendant 105 minutes sous étuve ventilée (Mettler UFP600) pour stabiliser l'argent sur le textile. Les textiles ayant subi le traitement thermique ont été nommés **CHT-CTR-AgTT** et **CD-CTR-AgTT**. L'étape de chargement de l'argent dans les textiles correspond à la couche #2.

2.2.1.3 Construction du système multicouche polyelectrolyte (PEM)

Le système PEM a été construit selon la méthode du « *layer-by-layer* » rapporté par Décher (148,150) en utilisant la technique de « *dip-coating* » (Figure 50A) et précédemment décrite par notre équipe (145,205). Tous les supports : (PET)-CHT-CTR, (PET)-CD-CTR, CHT-CTR-Ag, CD-CTR-Ag, CHT-CTR-AgTT et CD-CTR-AgTT ont été imprégnés pendant 1, 5 ou 15 minutes dans une solution de CHT (0.5% m/v, PE^+) préparée dans l'acide acétique (1% v/v), puis rincés dans l'acide acétique (0,3% v/v) afin d'enlever le CHT non adsorbé et finalement séchés à 90°C pendant 15 minutes. Les textiles ont été ensuite imprégnés dans une solution aqueuse de PCD (0,3% m/v, PE^-) pendant 1, 5 ou 15 minutes, puis rincés dans l'eau ultrapure et finalement séchés à 90°C pendant 15 minutes. Les couches suivantes ont été déposées selon la même méthode jusqu'à atteindre #21 couches.

En somme, la première couche (#1) et deuxième couche (#2) des assemblages correspondent à la couche thermo-fixée et au chargement des textiles par l'argent respectivement. Ensuite, le

système PEM, à proprement dit, est l'ensemble d'un total de 21 couches (soit 10,5 bicouches). La dernière couche du système PEM étant celle du CHT.

La construction du système PEM a été suivie par gravimétrie, les textiles ont été pesés avec une balance analytique (KERN ALJ 310-4N, précision de 10^{-4}) après chaque dépôt d'une bicouche CHT/PCD. Le gain de masse est calculé de la façon suivante :

$$GM, \% = \frac{(masse\ du\ textile\ après\ imprégnation - m_i)}{m_i} \times 100$$

Après la construction des 21 couches, les textiles ont reçu un traitement thermique (réticulation) à 140°C pendant 105 min sous étuve ventilée (Memmert UFP600) afin d'améliorer la stabilité du système PEM (**Figure 50B**) en formant des liaisons covalentes de type amide entre les fonctions amines du CHT et les fonctions carboxyliques du PCD. Les textiles sont nommés : **CHT-CTR-PEM**, **CD-CTR-PEM**, **CHT-CTR-Ag-PEM**, **CD-CTR-Ag-PEM**, **CHT-CTR-AgTT-PEM** et **CD-CTR-AgTT-PEM**.

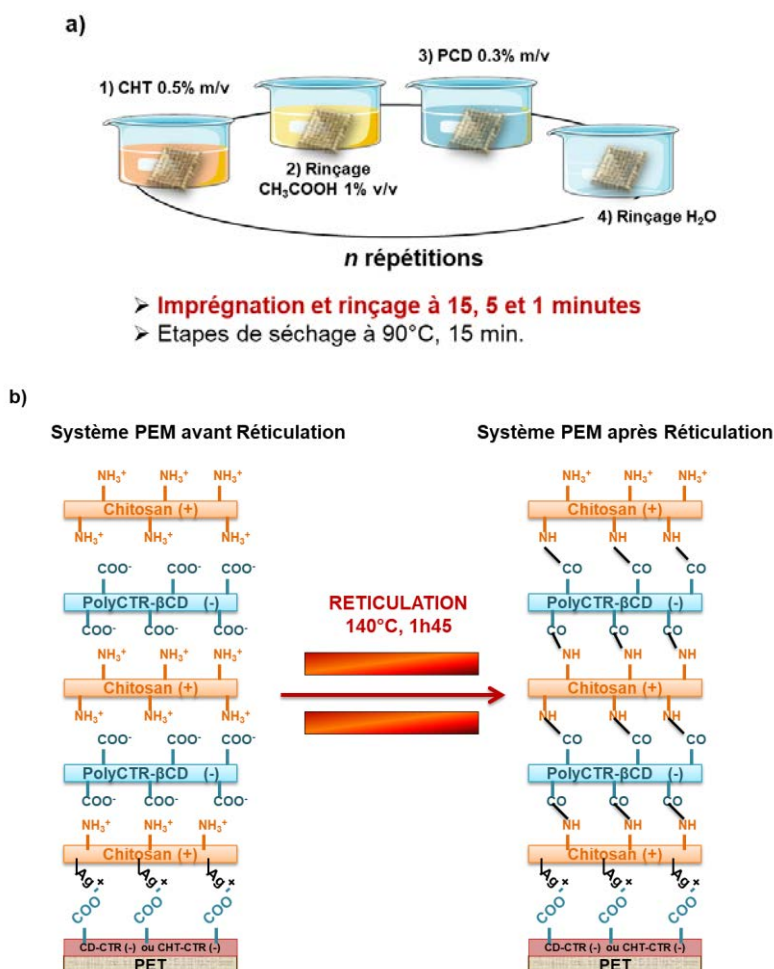


Figure 50. a) Procédé de construction du système PEM ; b) Formation des liaisons amides au moment du traitement thermique à 140°C pendant 105 minutes (130).

2.2.1.4 Evaluation de la dégradation du système PEM

L'évolution de la dégradation des supports a été réalisée afin d'évaluer la stabilité du système PEM. Pour cela, les échantillons de 11 mm de diamètre ($n=3$) sont pesés (m_i), immergés dans 10 mL de PBS pH 7,4 sous agitation (80 rpm) à 37°C. Après différents temps de dégradation, (1, 2, 3 et 7 jours) les échantillons sont rincés avec 2 mL d'eau ultrapure à deux reprises afin d'éliminer les sels absorbés sur les textiles. Les textiles sont séchés à 90°C pendant 15 minutes, pesés (m_d) et replacés à nouveau dans la solution de PBS qui est renouvelée en totalité. Les résultats ($n=3$) sont exprimés en pourcentage de la masse restante en fonction du temps selon la formule suivante :

$$\text{masse restante, \%} = \frac{(m_i - m_d)}{m_i} \times 100$$

2.2.2 Caractérisations physico-chimiques

2.2.2.1 Quantification des groupes carboxyliques

La quantification des groupes carboxyliques présent à la surface du textile PET a été réalisée par une méthode de dosage avec le bleu d'ortho-toluidine (TBO, Mw: 305, 83 g/mol) (**Figure 51A**) selon le protocole décrit par notre équipe (117,223). La méthode est basée sur l'interaction ionique entre le TBO chargé positivement et les fonctions carboxyliques, sous la forme carboxylate, chargés négativement (COO^-) à pH basique (**Figure 51B**).

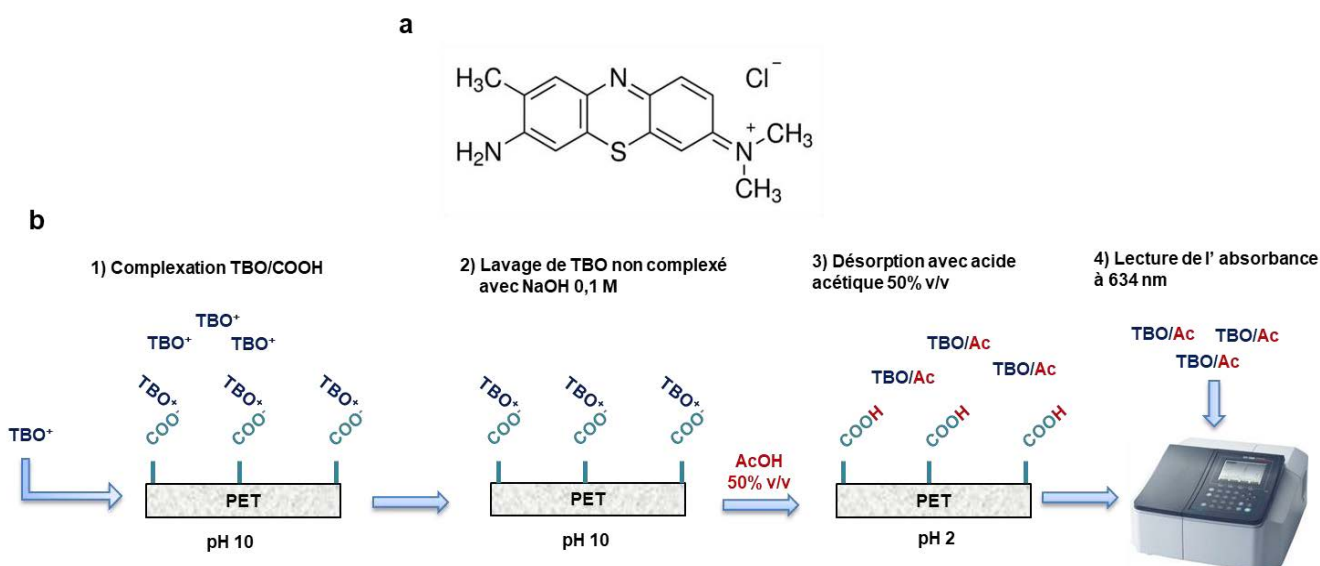


Figure 51. (a) Structure chimique de la TBO (224). (b) Procédure de la méthode de quantification des groupes $-\text{COOH}$ dans la surface des textiles (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR.

Les échantillons (11 mm de diamètre) ont été découpés dans les textiles fonctionnalisés (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR. Ils ont été ensuite immergés dans 20 mL d'une solution de TBO (5×10^4 M) à pH 10, sous agitation à 240 rpm à l'abri de la lumière, pendant 4 heures. Les

échantillons sont ensuite rincés avec 20 mL d'une solution de NaOH (0,1M) pendant 15 minutes à deux reprises afin de retirer le TBO non complexé. Le TBO complexé avec les fonctions COO⁻ des textiles fonctionnalisés est désorbé dans 10 mL d'une solution d'acide acétique (AcOH 50%_{v/v}) pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Finalement, le TBO désorbé dans l'AcOH 50%_{v/v} est dosé par spectrophotométrie visible (UV-1800, Shimadzu, λ = 634 nm) après avoir tracé la courbe d'étalonnage.

La quantité totale de fonctions COOH a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Fonctions - COOH, } \frac{\text{mmol}}{\text{g}} = \frac{\text{Absorbance} \times \text{Volume, L}}{\text{Coefficient d'extinction molaire, L.mM}^{-1}} / \text{masse, g}$$

2.2.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La surface des supports textiles a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB, HITACHI -4700 SEM Field Emission Gun) afin de connaître leur morphologie, la distribution de l'argent sur le support et l'enrobage des fibres par le système PEM. L'analyse a été réalisée avec une tension de 5kV. D'autre part, les spectres d'énergie dispersive de rayons X (EDX) ont été réalisés à différents endroits des textiles pour obtenir la composition élémentaire de leur surface.

2.2.2.3 Capacité d'absorption des exsudats simulés

La capacité d'absorption des textiles a été évaluée selon la procédure de la norme AFNOR NF EN 13726-1 (225). Les textiles (5 cm x 5 cm) ont été pesés et placés dans des boîtes de Pétri (92x16 mm). Parallèlement, une solution aqueuse de NaCl à 142 mM et de CaCl₂ à 2.5 mM a été préparée à 37°C et ajoutée aux textiles (rapport de bain de 40 fois le poids du textile). Les boîtes de Pétri ont ensuite été introduites dans un four ventilé (Memmert UFP600) à 37°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont finalement suspendus par un coin à l'aide d'une pince métallique pendant 30 secondes et pesés. Les résultats sont exprimés par la masse moyenne de solution retenue par 100 cm² (n=6).

2.2.3 Caractérisation, quantification et libération de l'argent

2.2.3.1 Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNP)

Après avoir réalisé le traitement thermique (140°C, 105 min) sur les textiles CHT-CTR-Ag et CD-CTR-Ag, une coloration brune a été observée. Ceci indique que les ions d'argent (Ag⁺) ont été réduits sous la forme de nanoparticules (Ag⁰). La caractérisation de la formation de nanoparticules d'argent (AgNP) après le traitement thermique a été réalisée par spectrophotométrie UV-Visible. Pour cela, deux méthodes ont été développées, la première consiste à étudier la réduction des ions Ag⁺ en nanoparticules (AgNP) en solution, la seconde directement sur les textiles.

- **Première méthode** : Des solutions de CHT (0,5% m/v), de PCD (0,3% m/v) et de sulfate d'argent (10 g/L) ont été préalablement préparées. 1 mL de la solution du sulfate d'argent est ajouté dans 9 ml de la solution de CHT ou de PCD. Ces solutions ont été agitées (80rpm) à 37°C pendant 24, 48, 72, 96 et 168 heures. Après chaque temps d'évaluation, toutes les solutions ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible (UV-1800, Shimadzu) sur une gamme de longueur d'onde entre 220 et 700 nm. Les AgNP absorbent à une longueur d'onde de 400 nm.
- **Deuxième méthode** : Des supports textiles (\varnothing 11 mm) chargés par le sulfate d'argent, ayant ou non subi le traitement thermique ont été immergés dans 5 mL d'une solution de NaOH 0,5 M, passés à l'ultrason pendant 45 minutes, et mises sous agitation (300 rpm) toute la nuit à température ambiante. Cette procédure a été réalisée pour extraire l'argent des supports textiles. La moitié de la solution (2,5 mL) est conservée et 10 mL de solution de polymère de β -cyclodextrine à 6 mg/mL ont été ajoutés afin de stabiliser les ions argent en solution. Finalement, toutes les solutions sont analysées par spectrophotométrie UV-visible (UV-1800, Shimadzu) sur une gamme de longueur d'onde entre 220 et 700 nm.

2.2.3.2 Quantification et cinétique de libération de l'argent

Le dosage et le profil de la cinétique de libération de l'argent ont été réalisés par spectroscopie d'absorption atomique de flamme (AAS, ThermoFisher®). En AAS, les métaux sont atomisés par une flamme d'acétylène permettant de quantifier une grande variété de métaux à l'échelle du mg/L (226).

Afin d'évaluer la quantité d'argent sur les textiles, la première étape consiste en une extraction. Pour cela, des échantillons (\varnothing 6 mm (n=6)) ont été immergés dans 10 mL d'une solution composée d'acide nitrique et d'eau ultrapure (ratio 1:1), pendant une nuit à température ambiante. Les solutions obtenues sont mesurées par AAS suivant une gamme d'étalonnage préalablement établie ($y=0,0353X - 0,0049$, $r^2= 0,9993$, [2,5 mg/l – 25 mg/L]).

Afin d'évaluer le profil de libération de l'argent, 3 milieux de libération ont été choisis: l'eau ultrapure, le PBS à pH 7,4 et une solution des exsudats simulés (solution aqueuse de NaCl à 142 mM et de CaCl₂ à 2.5 mM) selon la norme NF EN 13726-1 (225). Les échantillons (\varnothing 11 mm (n=6)) ont été placés dans des plaques de 24 puits (CytoOne®), 2 mL du milieu de libération ont été ajoutés à chaque puit et les plaques sont mises sous agitation (80 rpm) à 37°C à l'abri de la lumière. A chaque temps d'évaluation, le milieu a été prélevé, conservé dans des microtubes (Eppendorfs®) et remplacé par du milieu frais. Finalement, 2 mL d'ammoniac (28%_{v/v}, Sigma Aldrich) sont ajoutés aux prélèvements afin d'éviter la précipitation de l'Ag et ainsi permettre le dosage.

Tous les échantillons ont été analysés à l'Ecole Nationale de Chimie de Lille avec un spectrophotomètre atomique de flamme (AAS flamme, iCE 3300 ThermoFisher®) équipé avec une lampe spécifique à l'argent (ThermoFisher®) à une longueur d'onde de 328.1 nm. Une gamme

d'étalonnage de 0,5 ppm à 25 ppm a été réalisée à partir d'une solution standard d'argent (1000 ppm, ThermoFisher®). Le dosage de l'argent a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'Ag } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \frac{\text{Absorbance}}{\text{Coefficiente lineaire (ppm)}} \times \text{Volumen (mL)}$$

2.2.4 Incorporation de l'ibuprofène dans le pansement

2.2.4.1 Caractérisation du complexe IBU-CD

2.2.4.1.1 Diagramme de solubilité

Les CD sont utilisés dans plusieurs domaines notamment dans l'industrie pharmaceutique comme des agents solubilisants de nombreux principes actifs. L'étude de la solubilité permet de déterminer la valeur de la constante de dissociation ainsi que la stœchiométrie des complexes formés. La méthode d'évaluation de la solubilité a été introduite par Higuchi et Connors dans les années 1965. Lors de leurs travaux, ils ont établi 2 types de diagramme de phases de solubilité, nommés A et B tels que représentés dans la **Figure 52**. Dans les diagrammes de type A (A_P , A_L et A_{NI}), les complexes formés sont solubles, c'est-à-dire que la solubilité des principes actifs augmente en fonction de la concentration en CD. Au contraire des diagrammes de type B (B_S et B_I) qui montrent une solubilité limitée.

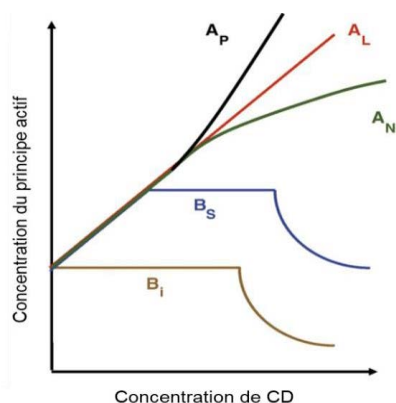


Figure 52. Représentation graphique des types de diagramme de solubilité A et B avec leurs sous-types (A_P , A_L , A_{NI} , B_S et B_I) proposés par Higuchi et Connors (135)

L'influence de la β CD et du PCD dans la solubilisation de l'IBU base a été évaluée. Pour cela, une solution tampon (KCl 0,2 M et HCl 0,1 M) à pH 2,5 a été préparée et utilisée pour la préparation des solutions de β CD et du PCD à différentes concentrations (2 mM à 10 mM et de 2 mM à 44 mM respectivement). 5 mL de ces solutions ont été ajoutés dans des flacons contenant 100 ± 5 mg d'IBU base afin d'obtenir une concentration en excès de 20 g/L. Les flacons ont ensuite été placés sous agitation à 210 rpm à température ambiante pendant 24 heures. Chaque solution a été filtrée avec un filtre en cellulose de 0,45 μm avant d'être transférée dans des vials pour analyse

par chromatographie liquide d'haute performance (HPLC-UV/Vis, Shimadzu LC-2010A-HT). La phase mobile est composée d'un mélange acetonitrile/ acide orthophosphorique pH 2.25 (65 :35) introduite à 1 mL/min dans une colonne C18 (3 * 150 mm) maintenue à 40°C. Le volume d'injection est fixé à 20 µL et les lectures sont réalisées à 225 nm avec un temps de rétention de 6,5 minutes. La quantité d'IBU base dissout dans les différentes concentrations de βCD et PCD est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ibuprofène (mM)} = \frac{\text{Aire du pic}}{\text{Pente (mg.mL}^{-1})} \times \text{Volume (mL)}$$

2.2.4.1.2 Résonance magnétique nucléaire du proton 1H (RMN 1H)

La RMN du proton 1H a été réalisée afin de mettre en évidence la complexation entre l'ibuprofène, le βCD et le PCD. Pour cela, les complexes d'IBU- βCD et d'IBU-PCD ont été préparés. Les mélanges d'IBU et de βCD ou de PCD ont été préparés dans l'eau ultrapure en quantité équimolaire (25mM : 25mM). Les complexes ont été mis sous agitation (100 tr/min) à 37°C pendant 72 heures pour l'obtention de l'équilibre. Les solutions ont été filtrées (0.45µm, Nylon®), congelées et puis lyophilisées. Finalement, un poudre blanche a été obtenue, dissoute (10 mg de produit dans 1 mL de D₂O) pour être analysée par RMN du proton sur un appareil Haute Résolution 300MHz (Bruker AC300).

2.2.4.2 Etude d'adsorption et de la libération de l'ibuprofène

Les études de cinétiques et d'isothermes d'adsorption ainsi que de la libération de l'ibuprofène sur des pansements, ont été effectuées à partir de textiles sous la forme de disques de 11 mm de diamètre. D'autre part, les solutions d'ibuprofène, IBU et IBU-L ont été préparées à différentes concentrations dans du PBS à pH 7,4. La technique analytique utilisée a été la chromatographie liquide d'haute performance (HPLC-UV/Vis) dont les paramètres ont été les mêmes décrits dans la partie de l'étude de la solubilité (paragraphe 2.2.4.1.1).

2.2.4.2.1 Cinétique d'adsorption de l'ibuprofène

Les échantillons (n=3) ont été imprégnés dans des solutions de IBU ou de IBU-L de concentration fixe pendant un temps déterminé, compris entre 5 min et 24 heures. Le rapport de bain a été de 5 mL par échantillon. Les échantillons ont ensuite été rincés dans le PBS pH 7,4 pendant 1 min et placés individuellement dans une solution d'éthanol absolu (IBU) ou dans le PBS pH 7,4 (IBU-L) afin d'extraire l'ibuprofène. Un dosage par HPLC-UV/Vis (Shimadzu LC-2010A-HT) a ensuite été réalisé pour déterminer la concentration d'ibuprofène, exprimé en µg/cm² de la façon suivante :

$$\text{Concentration d'ibuprofène (}\mu\text{g/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Aire du pic}}{\text{Pente (mg.mL}^{-1})} \times \text{Volume (mL)}$$

2.2.4.2.2 Isothermes d'adsorption

L'isotherme d'adsorption permet de comprendre les mécanismes d'adsorption des principes actifs sur les supports. Ce phénomène d'adsorption repose sur un équilibre entre les formes solubles et adsorbées, indiquant les interactions solide-molécules. Pour cela, des échantillons ($n=3$), 11 mm de diamètre soit une surface de $0,95 \text{ cm}^2$, ont été imprégnés dans des solutions d'IBU ou d'IBU-L à différentes concentrations, suivant un rapport de bain de 5 mL par échantillon pendant 24 heures sous agitation (240 rpm) à 25°C . Les échantillons ont ensuite été rincés dans le PBS pH 7,4 pendant 1 min et placés individuellement dans une solution d'éthanol absolu (IBU) (pendant 4 heures) ou dans le PBS pH 7,4 (IBU-L) pendant 24 heures afin d'extraire l'ibuprofène chargé sur les pansements. La quantité d'ibuprofène adsorbée sur les textiles a été dosée par HPLC-UV/Vis (Shimadzu LC-2010A-HT).

D'après cette théorie, deux modèles d'adsorption ont été proposés pour comprendre le mécanisme d'adsorption : l'isotherme de Langmuir et l'isotherme de Freundlich.

- a) **L'isotherme de Langmuir** : Ce modèle fait référence à l'adsorption de l'ibuprofène par des interactions spécifiques sur un seul site d'adsorption et sans interactions entre les molécules d'ibuprofène entre elles. L'adsorption de l'ibuprofène se réalise donc en monocouche (**Figure 53**).

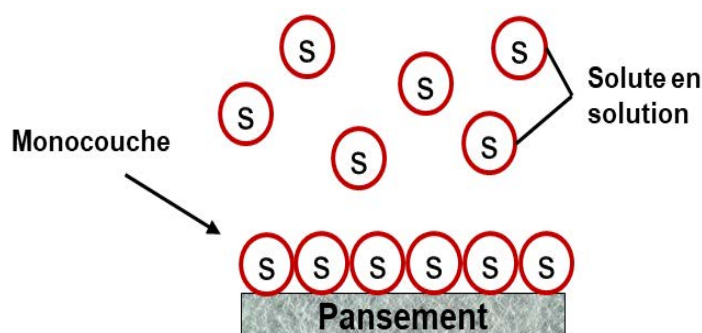


Figure 53. Représentation schématique de l'adsorption selon le modèle de Langmuir(227).

Le mécanisme est décrit par l'équation suivante :

$$q_e = \frac{q_m \cdot b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e}$$

- **q_e** : quantité d'ibuprofène adsorbée à l'équilibre par surface du pansement en cm^2 .
- **C_e** : concentration en ibuprofène à l'équilibre de la solution d'imprégnation (mg/L).
- **q_m** : capacité d'adsorption à saturation (formation d'une monocouche)
- **b** : constante d'énergie d'adsorption.
- **$K_L = q_m \cdot b$** constante d'équilibre de Langmuir, liée à l'enthalpie d'adsorption.

La linéarisation conduit à l'équation : $\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m \cdot b} + \frac{C_e}{q_m}$, et on représente graphiquement C_e/q_e en fonction du C_e (mg/L)

- b) **L'isotherme de Freundlich** : Ce modèle fait référence à l'adsorption de l'ibuprofène sur plusieurs sites d'adsorption d'énergies et la possibilité d'interactions entre les molécules d'ibuprofène adsorbées formant ainsi plusieurs couches (**Figure 54**).

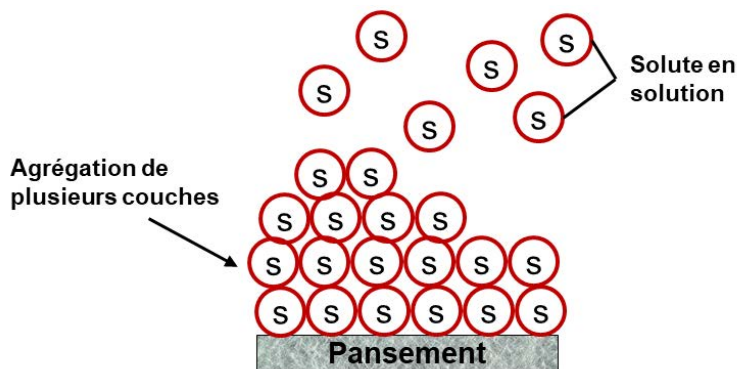


Figure 54. Représentation schématique de l'adsorption selon le modèle de Freundlich (227).

Le mécanisme est décrit par l'équation suivante :

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n}$$

- **q_e** : quantité d'ibuprofène adsorbée à l'équilibre par surface du pansement en cm^2 .
- **C_e** : concentration en ibuprofène à l'équilibre de la solution d'imprégnation (mg/L).
- **K_f** : constante de Freundlich, liée à la capacité d'adsorption relative.
- **$1/n$** : constante indiquant l'intensité de la réaction.

La linéarisation conduit à l'équation : $\text{Log } q_e = \text{log } K_f + \frac{1}{n} \text{log } C_e$ et on représente graphiquement $\text{Log } (q_e)$ en fonction de $\text{Log } (C_e)$

2.2.4.2.3 Cinétique de libération de l'ibuprofène

La cinétique de libération de l'ibuprofène a été évaluée en mode statique. Le milieu de libération utilisé a été le PBS pH 7,4. Les pansements ($n=6$), 11 mm de diamètre soit une surface de $0,95 \text{ cm}^2$, ont été préalablement imprégnés dans l'IBU (1g/L) ou dans l'IBU-L (1 à 10 g/L) solubilisé dans le PBS pH7.4, rincés et séchés à 37°C pendant une journée. Les échantillons ont ensuite été placés dans une plaque de 24 puits (CytoOne®) et 2 mL de PBS pH 7,4 ont été ajoutés à chaque puit. La plaque a été ensuite mise sous agitation (80rpm) à 37°C et les prélèvements ont été réalisés à 30 min, 2, 4, 6, 24, 48 et 72 heures puis analysées par HPLC-UV/Vis (Shimadzu LC-2010A-HT). A chaque prélèvement, le milieu de libération a été remplacé par 2 mL de PBS frais.

2.2.5 Cytotoxicité

La cytotoxicité des différents supports a été évaluée par le test de viabilité cellulaire en employant la méthode de l'extrait (**Figure 55**), selon la norme ISO/EN 10993-5. Ce test a été effectué avec des cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain : lignée L132 (ATCC-CCL5) présentant une bonne reproductibilité. Les cellules L132 ont été cultivées dans le milieu essentiel minimum modifié (MEM, Gibco®, Life Technologie) supplémenté avec 10%_{v/v} de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®, Life Technologie). Les cellules ont été préalablement repiquées dans une plaque de culture cellulaire à 96 puits (Falcon®) à une densité de 4.0×10^3 de cellules par puits et placées dans un incubateur (Binder, 37°C, 5% CO₂ et 100% d'humidité relative) afin d'établir une monocouche de cellules recouvrant 60-70% de la surface de chaque puit.

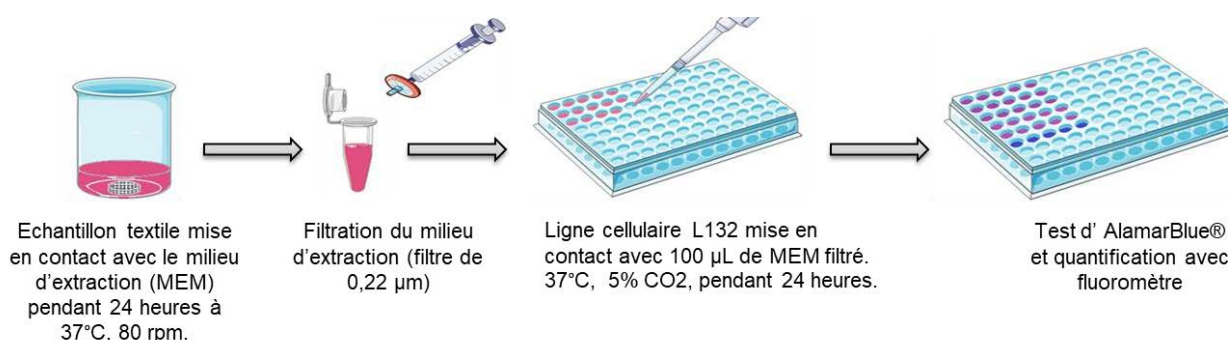


Figure 55. Procédure du test de viabilité cellulaire par la méthode d'extraction selon la norme ISO EN 10993-5

Les textiles (6 cm² / mL) ont été placés dans des flacons en polypropylène dans le milieu de culture (MEM). Les échantillons et le contrôle (milieu sans textile) ont été placés dans un agitateur thermostaté (37°C, 80 rpm) pendant 24 heures. Le lendemain, le milieu d'extraction a été collecté et filtré (0,22 µm LPB Acrodisc®, PALL, France) pour le stériliser. Le milieu de culture a été retiré de monocouche de cellules et 100 µL du milieu d'extraction correspondant a été ajouté à chaque puit.

Après 24 heures d'incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test de AlamarBlue® (ThermoFisher Scientific, France). Brièvement, le milieu d'extraction a été retiré des cellules, 200 µL de AlamarBlue® (dilué à 10% dans le milieu de culture) a été ajouté à chaque puit et la plaque a été mise sous incubation pendant 2 heures. Finalement, 150 µL du surnageant de chaque puit a été transféré dans une plaque de 96 puit noir (Fluoro-LumoNunc™, Polylabo, Strasbourg, France). L'intensité de la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluoromètre (Berthold Technology GmbH & Co, KG, Bas Wildbad, Germany) à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La viabilité cellulaire est exprimée en terme de pourcentage des cellules viables par rapport au groupe control (n=8).

2.2.6 Evaluation microbiologique in vitro

L'évaluation microbiologique des pansements a été réalisée sur deux souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* (CIP224) et *Escherichia coli* (K12). La culture bactérienne correspondante a été obtenue par ensemencement d'une gélose en pente Mueller-Hinton Agar (MHA) (ThermoScientific®, Oxoid Microbiological Products) pendant une journée sous incubation à 37°C. Un volume de 10 mL de milieu de Ringer cysteiné (MerckMillipore®) a été ensuite ajouté sur la culture bactérienne. La suspension bactérienne obtenue est de 1×10^8 UFC (unité formant une colonie).

2.2.6.1 Evaluation du sulfate d'argent sur les souches bactériennes

2.2.6.1.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a été réalisée pour évaluer l'efficacité antibactérienne du sulfate d'argent dans une plaque 96 puits (CytoOne®). Tout d'abord, 100 µL de milieu Mueller Hinton a été ajouté à chaque puit, 100 µL de sulfate d'argent à 800 mg/L a ensuite été placé dans le premier puit pour réaliser des dilutions successives jusqu'à atteindre une concentration finale en sulfate d'argent de 0,06 µg/L. Un volume de 100 µL de suspension bactérienne à 1×10^4 UFC/mL est finalement ajouté à chaque puits. La plaque a été mise en incubation à 37°C pendant 24 heures et 48 heures. La CMI est définie par la concentration la plus basse où aucune turbidité ne peut être visualisée. Ce test a été réalisé en triplicata.

2.2.6.1.2 Courbe de croissance bactérienne

L'évaluation de la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de sulfate d'argent a été réalisée. Des tubes (10 ml) contenant du milieu Muller-Hinton, du sulfate d'argent et la suspension bactérienne (10^5 UFC/mL) ont été incubés pendant 2, 4, 6, 8, 24 et 48 heures à 37°C. Différentes concentrations d'argent (13, 25, 50, 100 mg/L pour *S. aureus* et 6, 13, 25, 50 mg/L pour *E. coli*) ont ainsi été préparées.

A chaque intervalle de temps, des dilutions successives au dixième (10^{-1} à 10^{-4}) dans une solution de Ringer-cystéine ont été ensuite réalisées. Finalement, 100 µL de chaque dilution ont été ensemencés sur des géloses MHA, lesquelles ont été incubées pendant 24h à 37°C. Un dénombrement bactérien a ensuite été effectué. Les résultats sont exprimés en Log_{10} UFC/mL en fonction du temps. Ce test a été réalisé en triplicata.

2.2.6.2 Evaluation du pansement à l'argent

2.2.6.2.1 Kirby Bauer (Test de Diffusion)

Le test de diffusion (**Figure 56**) a été réalisé à différents temps pour évaluer l'activité antibactérienne des pansements et mettre en évidence la capacité du système PEM à ralentir la diffusion de l'argent. Pour cela, les supports (11 mm de diamètre) ont été décontaminés par

rayonnement UV (lampe germicide, 15 watt, 290 nm) pendant 15 minutes, placés dans une boîte 24 puits (CytoOne®) et 1 mL de PBS pH 7.4 a été ajouté à chaque puits. Les plaques ont été mises sous agitation (80 rpm) à 37°C pendant 24, 48 et 72 heures avec un changement quotidien du PBS. Les textiles ont été récupérés et déposés sur des géloses MHAensemencées par *S. aureus* ou par *E. coli* à 1×10^4 UFC/mL. Après 24h d'incubation à 37°C, les rayons d'inhibition ont été mesurés. Les résultats sont présentés sur une moyenne de 6 manipulations.

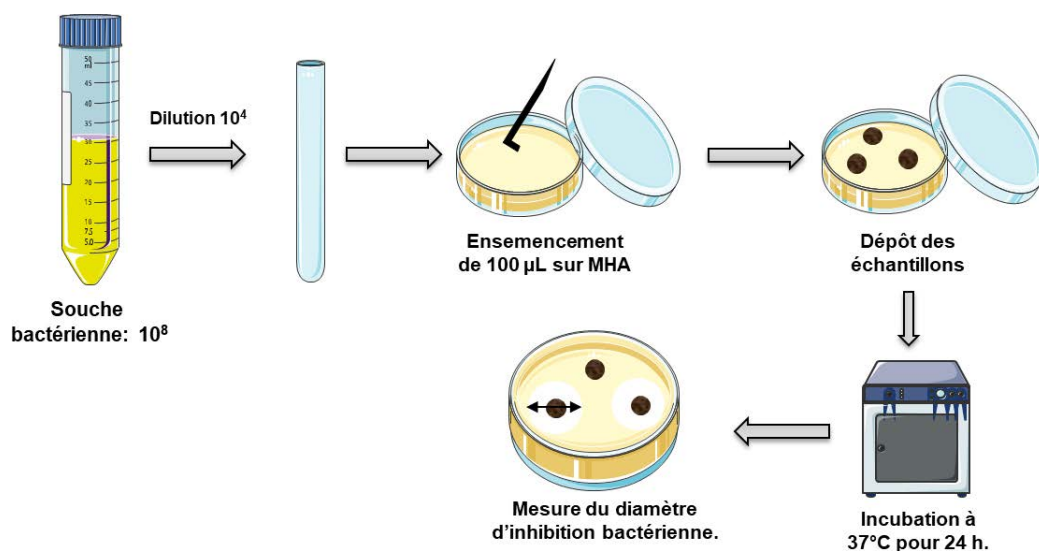


Figure 56. Procédure du test de diffusion Kirby Bauer.

2.2.6.2.2 Cinétique de la réduction bactérienne (Kill Time)

Le test de *Kill time* a été réalisé pour évaluer la cinétique de réduction bactérienne, dans le but de déterminer l'activité antibactérienne des pansements développés. Les textiles (11 mm de diamètre) ont été décontaminés par rayonnement UV (lampe germicide, 15 watt, 290 nm) pendant 15 minutes et déposés dans une boîte 24 puits (CytoOne®). Ensuite, 200 µL d'une suspension bactérienne de *S. aureus* ou *E. coli* (1×10^8 UFC) ont été ajoutées à chaque puits. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C et à chaque intervalle de temps (30 min, 2h, 4h, 6h et 24 heures), les textiles ont été récupérés et placés dans 2 mL d'une solution de PBS pH 7,4. La solution obtenue est passée aux ultrasons (60 sec) puis agitée au vortex (30 sec). Des dilutions successives au dixième (10^{-1} à 10^{-4}) dans une solution de Ringer-cystéine ont été ensuite réalisées. Finalement, 100 µL de chaque dilution ont été ensemencés sur des géloses MHA, lesquelles ont été incubées pendant 24h à 37°C. Un dénombrement bactérien a ensuite été effectué (**Figure 57**). Les résultats sont présentés sur une moyenne de 6 manipulations.

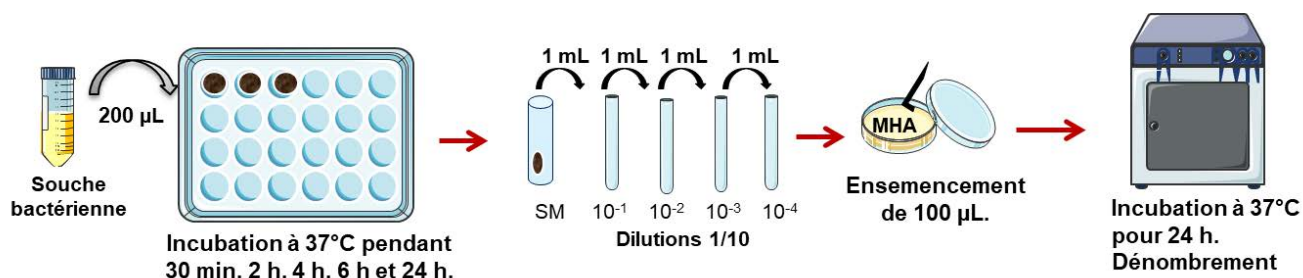


Figure 57. Procédure du test du « kill time ».

2.2.7 Etude in vivo du pansement

2.2.7.1 Stérilisation des pansements par rayons gamma

Avant d'effectuer l'évaluation *in vivo* des pansements, ceux-ci ont été préalablement stérilisés par rayonnements gamma. Ce procédé de stérilisation utilise la radiation du Cobalt 60 (radio-isotope) dans le but d'éliminer les microorganismes. L'unité de dose absorbée s'exprime en KiloGray (Kgy) et elle est déterminée par rapport à la densité du produit à stériliser. Les rayons gamma ont une capacité élevée de pénétration, ce qui permet de stériliser des produits déjà emballés. La stérilisation des pansements a été réalisée chez *Sterigenics*® (Rantigny, France) via l'entreprise Cousin Biotech (Wervicq Sud). Les pansements ont été conditionnés dans un double emballage et stérilisés par rayons gamma avec une dose entre 25 à 40 Kgy, entre 2 et 4 heures. (Norme ISO 11137).

Dans le but d'évaluer le maintien des performances des pansements après la stérilisation par rayonnements gamma ; des analyses de dégradation, d'observation par MEB, de cinétique de libération de l'ibuprofène et du *kill time* ont été réalisés et comparés avec les résultats obtenus avant la stérilisation gamma.

2.2.7.2 Evaluation in vivo des pansements sur un modèle murin infecté

Pour l'étude *in vivo* des pansements, des souris mâles C3H/HeN âgées de 8 semaines ont été achetées chez Charles River Laboratories (L'Abresle, France). Les souris ont été hébergées à l'animalerie High-Tech de la faculté de Médecine de l'Université de Lille, sous un statut sanitaire E.O.P.S. (Exempt d'organismes Pathogènes Spécifiques) dans des conditions optimales de température ($21,5 \pm 1^\circ \text{C}$) et d'humidité (45% à 65%). Avant de commencer les expériences, l'acclimatation des souris a été réalisée dans des cages filtrantes à usage unique pendant 7 jours. Les souris ont reçu de l'eau et de la nourriture à volonté. Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux exigences du C2EA - 75 : Comité d'Ethique en Expérimentation Animale des Hauts de France (dossier de référence 2017051910183697)

Le jour de la manipulation, les souris ($n=3$, par groupe) ont été anesthésiées sous isoflurane, un agent anesthésique volatil. Puis, la zone dorsale a été rasée à l'aide d'une tondeuse et à la crème épilatoire *Veet*®. La zone a été nettoyée avec une solution stérile de sérum physiologique et une

abrasion a été réalisée sur la zone rasée à l'aide d'un scalpel. 20 µL d'une suspension d'*E. coli* K12 (7 Log₁₀ UFC/MI) a été déposée sur la plaie. Les pansements (11 mm de diamètre) ont été humidifiés dans le sérum physiologique et déposés sur la plaie infectée. Une compresse a été ajoutée comme pansement secondaire. L'ensemble est finalement recouvert d'un film adhésif (*Tegaderm*TM), pour maintenir le pansement en place, et une injection unique de buprénorphine est administrée comme traitement analgésique. Les pansements ont été renouvelés au bout de 3 jours et 7 jours. La **Figure 58** représente la procédure de l'évaluation *in vivo* des pansements.

Les pansements récupérés ont été évalués par une analyse microbiologique afin de connaître l'évolution de la population bactérienne sur le pansement comparé à la charge bactérienne initiale. Une identification des différentes souches présentes, provenant de la flore commensale de la souris ou de la charge initial du pansement a été réalisée. Finalement, après 7 jours de traitement, les souris ont été euthanasiées.

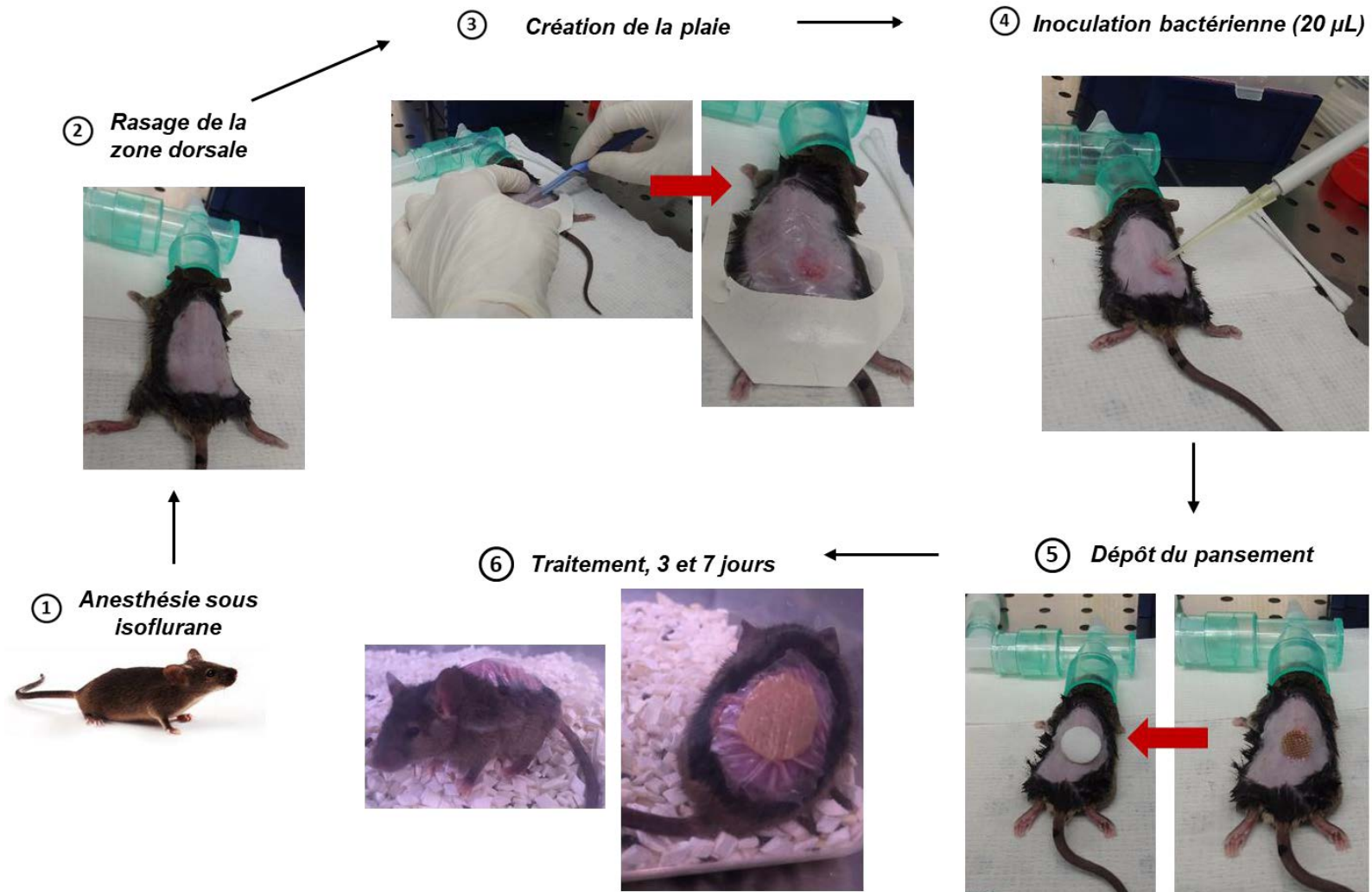


Figure 58. Procédure de l'étude *in vivo* des pansements chez les souris C3H/He

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

**CONCEPTION, CARACTERISATION ET EVALUATIONS BIOLOGIQUES ET
MICROBIOLOGIQUES *IN VITRO* DU PANSEMENT A L'ARGENT**

3 Résultats et discussion

3.1 Conception, caractérisation et évaluations biologiques et microbiologiques in vitro du pansement à l'argent

La première partie de ce travail a pour objectif la conception du pansement avec l'argent (premier principe actif) pour lui apporter des propriétés antibactériennes. Des techniques de caractérisation des supports textiles après chaque étape de conception du pansement ont été réalisées. Parmi celles-ci, la quantification des fonctions carboxyliques suite au prétraitement du support en PET par thermofixation des systèmes CHT-CTR et CD-CTR, l'étude de la réduction des ions Ag^+ en nanoparticules d'argent (AgNP), l'adsorption et le profil de libération de l'argent ont été réalisés. Suite à cela, l'évaluation du système PEM en termes de croissance, de dégradation et de capacité d'absorption a été développée. Finalement, l'évaluation de la cytotoxicité et de l'activité antibactérienne des textiles ont été réalisés afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité des supports.

3.1.1 Conception du pansement

3.1.1.1 Prétraitement par thermofixation du PET par CHT-CTR ou CD-CTR

Le CHT ou la β CD réticulés par le CTR ont été utilisés pour fonctionnaliser la surface des textiles en PET via la méthode dite de « *pad-dry-cure* » ou « *de thermofixation* ». Cette première étape a été développée pour obtenir une première couche (#1) riche en fonctions carboxyliques (caractère anionique), afin de charger les textiles par le sulfate d'argent et ensuite construire le système PEM. Le gain masse des textiles après l'étape de fonctionnalisation (**Figure 59A**) est de $33,0\% \pm 5,0$ pour les textiles fonctionnalisés par la β CD-CTR ((PET)-CD-CTR) et de $10,0\% \pm 0,7$ pour ceux fonctionnalisés par le CHT-CTR ((PET)-CHT-CTR). La densité de groupes COOH déterminée par la méthode du bleu de toluidine (117,216) est de $42,1 \pm 9,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ et $13,9 \pm 2,4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ respectivement (**Figure 59B**).

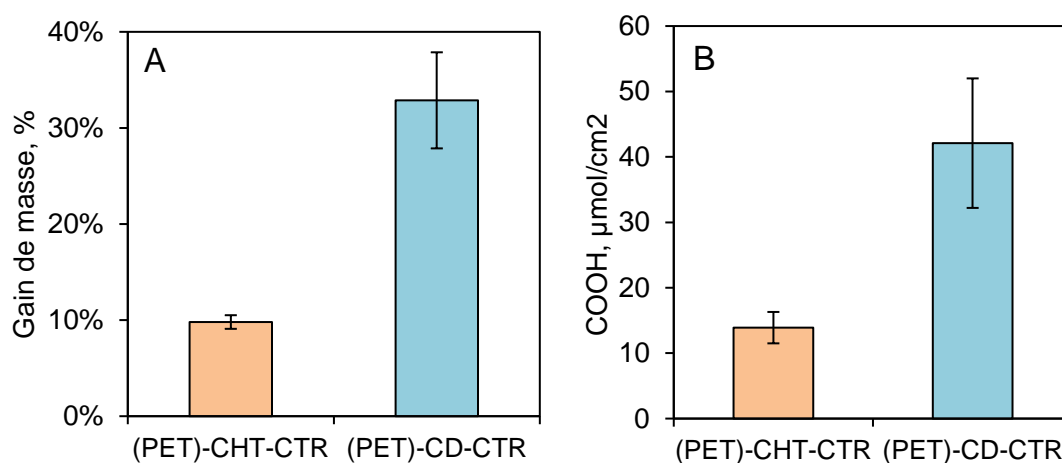


Figure 59. Gain de masse du textile PET après l'étape de fonctionnalisation par la méthode dite du « *pad-dry-cure* » par le CHT-CTR ou la β CD -CTR (a). Densité de fonctions carboxyliques (COOH) dans les supports textiles (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR (b).

Notre équipe a déjà publié plusieurs articles concernant la réaction de réticulation entre les cyclodextrines et l'acide citrique. Le CTR est un composé triacide carboxylique qui forme un réseau polymère tridimensionnel avec les CDs permettant ainsi l'enrobage des fibres. La réaction produite est une estérification impliquant deux fonctions carboxyliques du CTR (passage par un composé anhydride) avec les groupes hydroxyles des CDs. Ainsi au moins, une fonction carboxylique reste libre pour apporter des propriétés d'échange ionique au support textile, en plus de celle de former des complexes d'inclusion dans les cavités des cyclodextrines avec des principes actifs (139,221,228–230).

La structure du PCD immobilisé sur le textile sous la forme d'une couche thermofixée est identique à celle du polymère soluble de cyclodextrine qui sera utilisé plus loin pour la construction du PEM (**Figure 25**)

De la même manière, des réactions d'estérification et d'amidation ont lieu pour le CHT réticulé par le CTR. Aubert-Viard *et al.*, ont montré que la concentration utilisée en CTR et en CHT influe dans l'obtention de textiles ayant un caractère cationique ou anionique (117). Dans ce projet, le CTR a été utilisé en excès (10%_{m/v}) par rapport au CHT (2,5%_{m/v}) afin d'obtenir un textile supportant un maximum de charges négatives pour interagir avec les ions argentiques par échange ionique (**Figure 22**)

3.1.1.2 Chargement de l'argent dans les textiles

Après leur fonctionnalisation, les textiles (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR ont été activés par le sulfate d'argent (couche #2). Le gain de masse des textiles après le chargement de l'argent a été de $2.5 \pm 0,26\%$ pour CHT-CTR-Ag et de $4,26 \pm 1,92\%$ pour CD-CTR-Ag. Pour les deux types des textiles, l'argent interagit avec les fonctions carboxyliques résiduelles du CTR de la couche #1, à travers des liaisons ioniques (117,230). De plus, l'argent interagit également avec les groupes N-acétyle et les fonctions amines du CHT par une réaction de chélation (117,231).

Après avoir imprégné les textiles dans la solution de sulfate d'argent (10 g/L), ceux-ci ont présenté une coloration marron qui indique la présence de l'argent à la surface des textiles. Cette coloration s'intensifie après le traitement thermique à 140°C pendant 105 min révélant la probabilité d'une réduction des ions argentiques en nano particules d'Ag⁰ (AgNP) : (**Figure 60**).

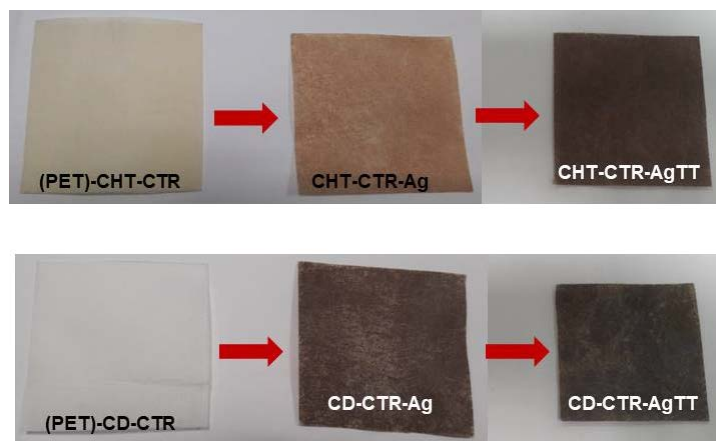


Figure 60. Echantillons textiles fonctionnalisés par la CD-CTR, activés avec le sulfate d'argent sans (CD-CTR-Ag) ou avec traitement thermique (140°C, 105 min) (CD-CTR-AgTT).

Les mécanismes qui sont impliqués ont été décrits dans la littérature, et correspondent tout d'abord à une interaction des groupes N-acétyl amines des polysaccharides avec les ions argent (Ag^+) conduisant à la réduction de Ag^+ en nanoparticules (Ag°). Une réaction de chélation avec le CHT (232), influencée par la température de traitement et par la présence de groupes carboxyliques résiduels du réseau PCD (233). Afin de mettre en évidence la formation de nanoparticules, la solution d'argent a été mise en présence de PCD ou de CHT. Les **Figure 61 A et C** montrent l'évolution des spectres UV-visibles des solutions en fonction du temps (0 à 168 heures) et révèlent la transformation de l'argent de Ag^+ en Ag° en présence de CHT ou de PCD. En effet, l'apparition d'une large bande caractéristique de AgNP entre 400 et 600 nm, particulièrement entre 24 et 168 heures (209) est mise en évidence. Notre observation est confortée par les observations de Ma *et al.* et de Carapeto *et al.* Ma *et al.*, ont montré que les ions argent en présence de cyclodextrines citratées se présentent sous la forme de AgNP après application d'un traitement thermique (233). De la même manière, Carapeto *et al.*, ont déterminé une lente formation des AgNP (à 48 heures) en présence de CHT (232), ce qui est en concordance avec les résultats obtenus en solution.

De manière intéressante, nous observons également sur les spectres UV une bande d'absorption centrée à 270 nm et une autre à 470 nm (moins intense) qui correspondraient à la formation de AgNP. Les **Figure 61 B et D** montrent les absorbances à 270 nm et 470 nm, en fonction du temps de formation des nanoparticules. Il est notable que pour les deux mélanges, l'absorbance augmente de manière linéaire à 270 nm et à 470 nm en fonction du temps jusqu'à 96h.

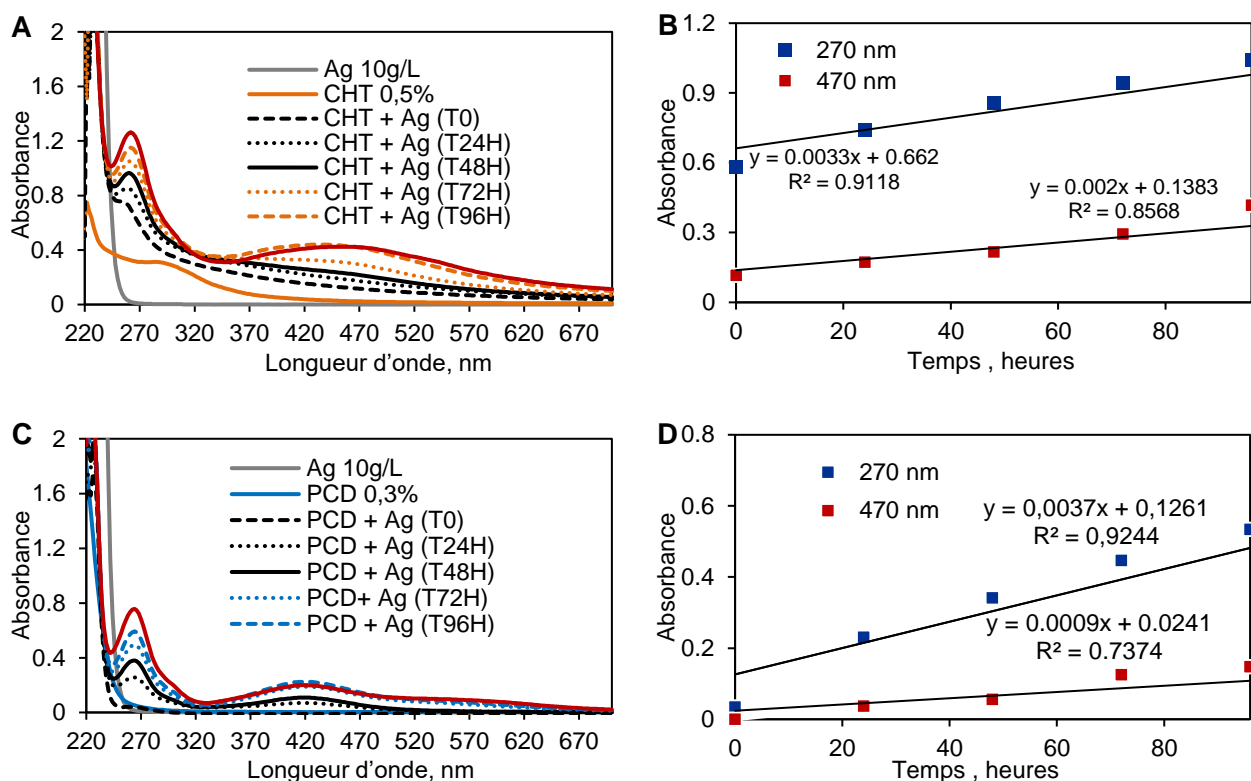


Figure 61. Spectres d'absorption UV-visible des solutions aqueuses de sulfate d'argent (10 g/L, de CHT 0,5% m/v (a), de PCD 0,3% m/v (c) et des mélanges frais pour le CHT à 0,5% ou de PCD à 0,3% avec le sulfate d'argent à 10 g/L, pendant 24h à 168 heures d'analyse à 37°C. Absorbance à 270 nm et à 470 nm en fonction du temps du CHT à 0,5% (b) ou de PCD (d) à 0,3% avec le sulfate d'argent à 10 g/L en fonction du temps (24h à 96 heures) (Déterminé par spectroscopie UV-visible).

D'autre part, l'argent chargé dans les textiles fonctionnalisés a été extrait avec une solution de NaOH à 0,5 M afin de déterminer si les AgNP se forment avant ou après le traitement thermique. La **Figure 62** rapporte les spectres UV-visible des AgNP dans le surnageant entre 220 et 670 nm. Il est clair que l'argent extrait des textiles fonctionnalisés par la CD-CTR est sous forme nano particulaire car une bande d'absorbance apparaît à 400nm. De plus ces échantillons montrent des absorbances plus intenses que ceux fonctionnalisés par le CHT-CTR, notamment après l'application du traitement thermique. Cette différence s'explique par une quantité plus importante en fonctions -COOH dans les textiles (PET)-CD-CTR ($42,1 \pm 9,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) que dans les textiles (PET)-CHT-CTR ($13,9 \pm 2,4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). De plus, une coloration ambre apparaît après avoir désorbé les textiles avec la soude, laquelle est plus foncée pour les textiles (PET)-CD-CTR.

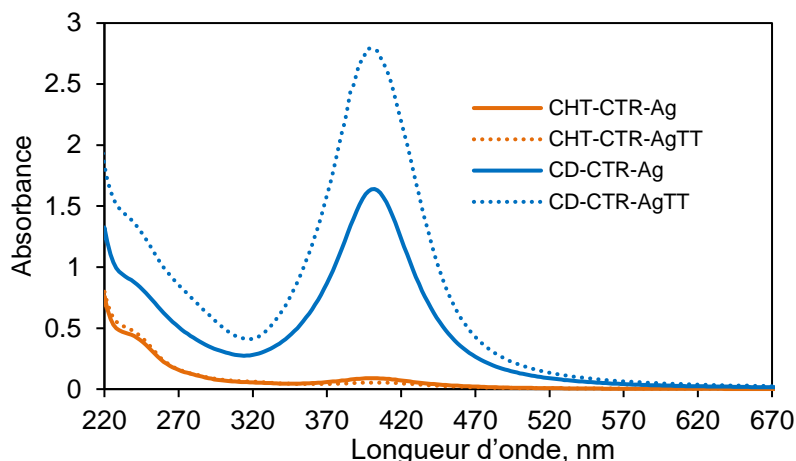


Figure 62. Spectres d'absorption UV-visible d'AgNP extraites des différents supports textiles à partir d'une solution de NaOH 0,5M.

Ceci conforte l'hypothèse basée sur les observations Ma *et al.*, (233) et de Suarez-Cerda *et al.*, (234). Au regard des conclusions rapportées par les deux auteurs et en considérant la composition de la PCD (CD et CTR) ; une analyse complémentaire a été développée. Une solution de PCD (6 g/L) a été préalablement préparée et placée dans les pots contenant les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR et la solution de soude. La solution finale a été analysée par spectroscopie UV-visible.

L'intensité des absorbances présentée dans la **Figure 63** a augmenté en présence de PCD dans la solution. Il faut mentionner qu'avant d'ajouter la solution de PCD, une coloration jaune foncé s'est formée immédiatement. La détection de AgNP après ajout de la PCD est possible dû à l'interaction entre les AgNP et le réseau polymère du PCD, grâce à la densité des fonctions COOH apporté par l'acide citrique, permettant leur stabilisation et leur agglomération, ce qui permettrait leur visualisation (233,234).

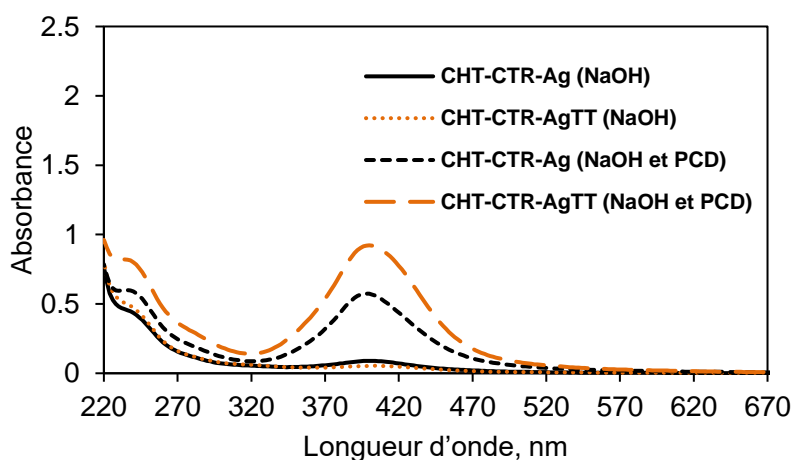


Figure 63. Spectres d'absorption UV-visible d'AgNP extraites des textiles fonctionnalisés CHT-CTR avec l'argent avec ou sans traitement thermique à partir d'une solution de NaOH 0,5M. Après la solution d'extraction a été mélangé avec une solution de PCD 6g/L.

L'intérêt d'évaluer la formation des AgNP sur les supports textiles après l'application du traitement thermique (140°C, 105 min), est d'établir si les AgNP pourraient rester stables sur les deux types de supports ((PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR) et avoir un impact favorable dans la construction du système PEM, dans le profil de libération de l'argent ou dans l'évaluation microbiologique « *in vitro* » des pansements.

3.1.1.3 Construction du système PEM

Après l'étape du chargement des textiles par l'argent (avec ou sans traitement thermique), le système PEM a ensuite été construit. La première couche de cet assemblage correspond à celle du CHT (couche #3). La construction du système PEM a été évaluée en relation du gain masse après chaque bicouche déposée sur le textile. Les courbes présentées dans les **Figure 64 A et B** montrent une perte du gain de masse certainement dû à la perte d'argent au moment de construire les assemblages. Cependant, la perte du gain de masse est aussi observée dans les assemblages construits à 15 minutes dans les supports sans argent (**Figure 64 A**).

La méthode dite du « *layer-by-layer* » a été utilisée pour appliquer le système PEM sur le pansement à l'argent. Dans ce but, un enrobage successif en immergeant les textiles dans des solutions de CHT et de poly- β cyclodextrine (PCD), avec des étapes intermédiaires de rinçage et de séchage, a été réalisé (145,205). La **Figure 64** montre une évolution linéaire du gain de masse avec le nombre de couches déposées sur les textiles fonctionnalisés ((PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR) activés ou non par l'argent (**Figure 64 A**). Plus particulièrement, la **Figure 64 A**, montre que l'argent n'interfère pas dans la construction du système PEM. De plus, la **Figure 64 B** ne rapporte pas d'influence du temps d'immersion (1, 5, 15 min) sur la construction du système PEM.

Après d'avoir déposé 21 couches sur les différents textiles, le gain de masse atteint $50 \pm 0,7\%$ et $57 \pm 3,7\%$ pour les textiles fonctionnalisés par la (PET)-CD-CTR qui ont été chargés par l'argent, traités ou non thermiquement (**Figure 64 C**). Par contre, le gain de masse des textiles fonctionnalisés par le (PET)-CHT-CTR atteint seulement $30\% \pm 0,74\%$ et $29\% \pm 0,75\%$ respectivement. L'enchaînement des bicouches CHT/PCD auto-assemblées est le même pour les systèmes PEM construits sur les textiles modifiés par le (PET)-CHT-CTR ou (PET)-CD-CTR (couche #1). Il est donc important de noter que la méthode de fonctionnalisation des textiles n'influe pas sur l'enchaînement des assemblages.

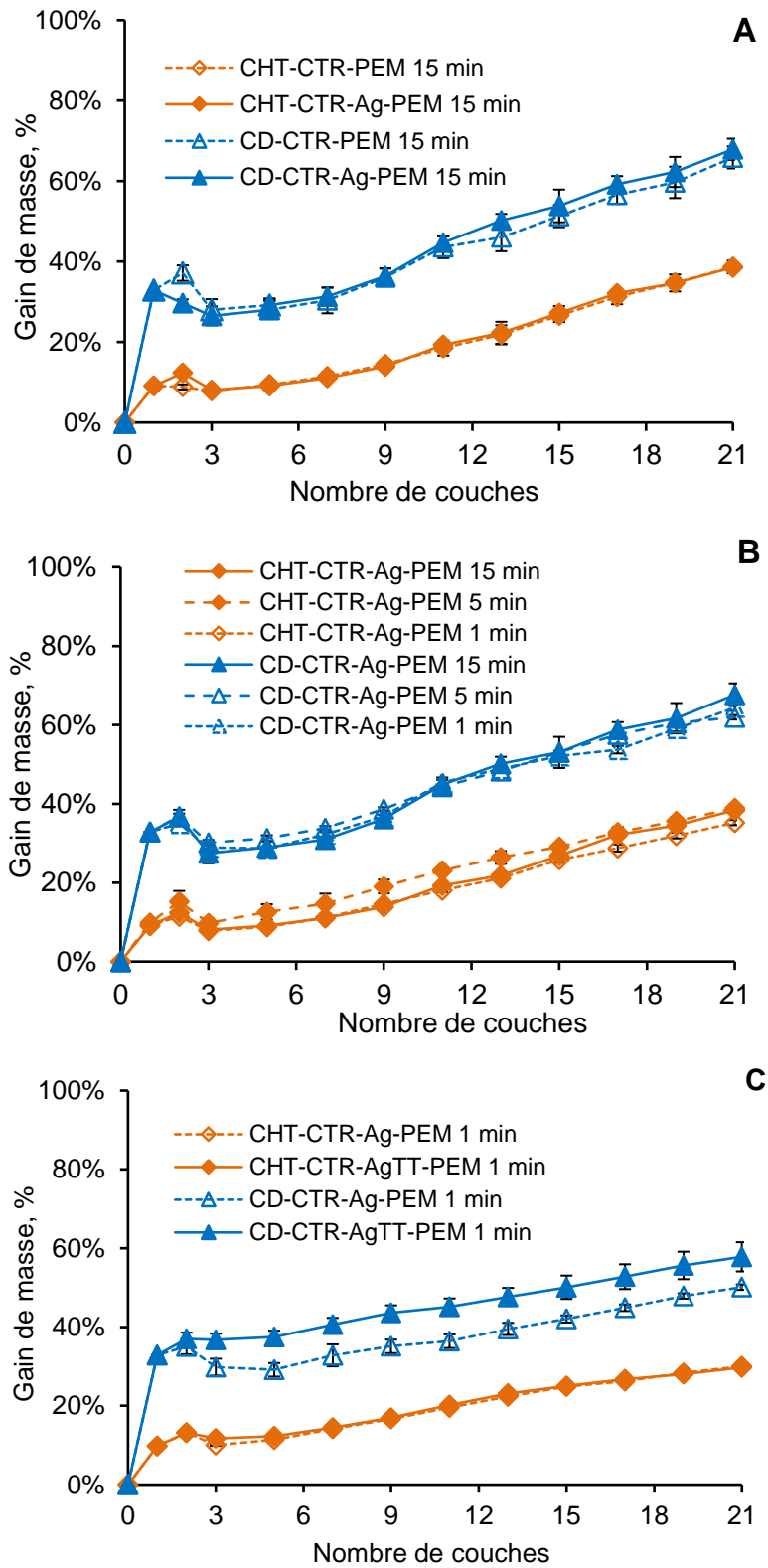


Figure 64. Gain de masse des textiles après l'étape dite du « pad-dry-cure » avec le CHT-CTR ou la CD-CTR (couche #1), le chargement avec sulfate d'argent avec ou sans le traitement thermique (couche #2) et 21 cycles de dépôts de couches par le procédé L-b-L dans une solution de CHT (0,5% m/v) et dans une solution de polyCTR-βCD (0,3% m/v) avec des temps d'immersion de 1, 5 et 15 minutes.

D'autre part, la croissance de systèmes PEM est de type linéaire (Tableau 8). Le CHT est un polymère linéaire mais le polymère de cyclodextrine est sous forme globulaire, les assemblages

CHT/PCD ne répondent pas à un empilement linéaire des polyelectrolytes mais plutôt à l'enchevêtrement de ces polymères comme cela été montré dans le cadre de la thèse de Jatupol Junthip (193).

Tableau 8. Evaluation des R^2 de l'évolution du gain de masse et pourcentage de gain de masse par bicouche déposée sur différents supports textiles présentant le système PEM (21 couches)

Textiles	R^2 calculé à partir de l'évolution de gain de masse.	Pourcentage de gain de masse par bicouche déposé
CHT-CTR-PEM 15 minutes	0,9828	3,5
CHT-CTR-Ag-PEM 15 minutes	0,9814	3,6
CHT-CTR-Ag-PEM 5 minutes	0,9973	3,3
CHT-CTR-Ag-PEM 1 minute	0,9923	2,3
CHT-CTR-AgTT-PEM 1 minute	0,9847	2,2
CD-CTR-PEM 15 minutes	0,9848	4,5
CD-CTR-Ag-PEM 15 minutes	0,9831	4,7
CD-CTR-Ag-PEM 5 minutes	0,98513	3,9
CD-Ag-PEM 1 minute	0,9848	2,4
CD-CTR-AgTT-PEM 1 minute	0,9953	2,4

Afin de mieux évaluer la perte d'argent lors de la construction du système PEM, une quantification a été réalisée. La **Figure 65** montre la quantité d'argent adsorbée sur les textiles après la construction complète du système PEM, afin de déterminer si le dépôt des assemblages influe significativement sur la perte d'argent mentionnée. La quantité d'argent est de $580 \pm 38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les textiles fonctionnalisés par la CD-CTR, et de $289 \pm 40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR. Cette différence est due à la densité des groupes carboxyliques déposés sur les textiles après l'étape de fonctionnalisation (couche #1), laquelle est plus importante sur les textiles (PET)-CD-CTR ($42,1 \pm 9,9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, **Figure 59 B**) comme cela a été mentionné dans le paragraphe précédent.

Lorsque le système PEM est construit avec 15 min d'immersion dans les solutions de polyelectrolytes, la quantité d'argent diminue de manière importante à $30 \pm 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CD-CTR-Ag-PEM et à $4 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CHT-CTR-Ag-PEM. Ces résultats sont en concordance avec la diminution de la masse du textile après le dépôt de la couche #3 montrée dans la **Figure 64 A**. D'autre part, la quantité d'argent diminue dans une moindre mesure lorsque le temps d'immersion a été réduit à 5 et 1 minute ($58 \pm 9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $60 \pm 8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CD-CTR-Ag-PEM et, $10 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $23 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CHT-CTR-Ag-PEM respectivement).

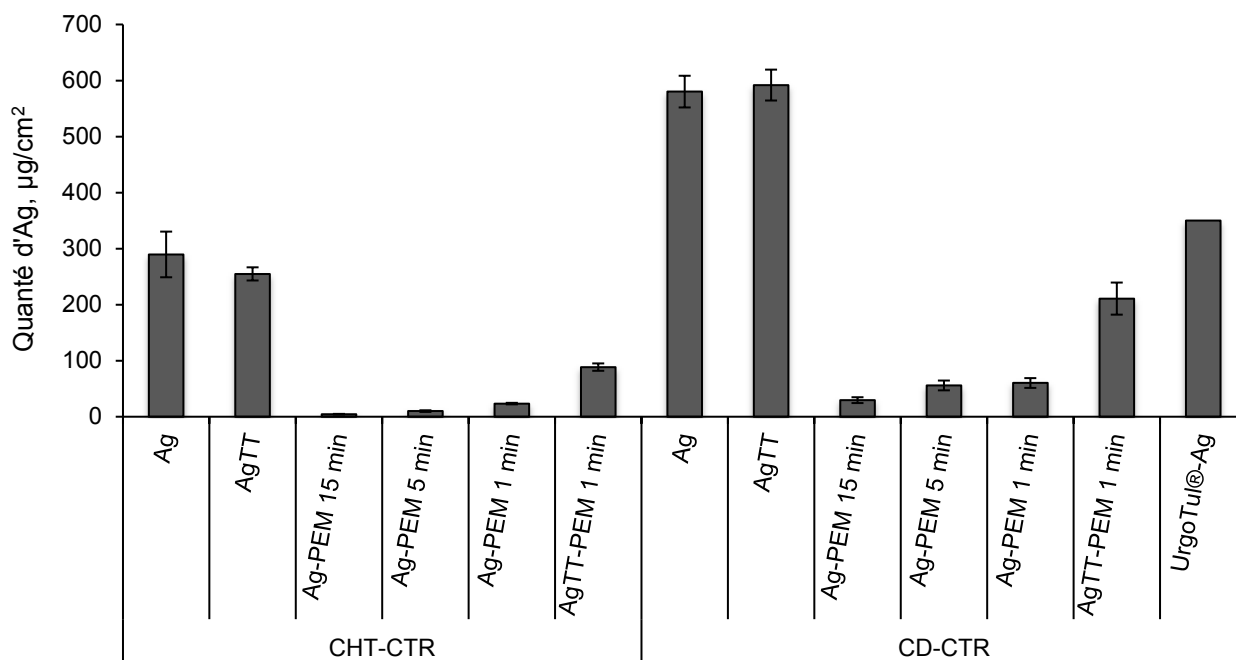


Figure 65. Quantité d'argent présente dans différents textiles. La mesure a été effectuée par spectroscopie d'absorption atomique après traitement des échantillons ($n=6$) avec une solution d'acide nitrique-eau (1 :1) pendant une nuit à température ambiante.

En revanche, quand la couche #3 est appliquée aux textiles avec l'argent traité thermiquement (AgTT), la perte d'argent semble faible (**Figure 64 C**). En effet, l'application du traitement thermique permet la formation de AgNP stables, ce qui réduit la migration de l'argent vers les solutions de polyélectrolytes lors de la construction du système PEM en utilisant la méthode de *dip-coating*.

La quantité d'argent (AgTT) est de $582 \pm 21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les textiles fonctionnalisés par la CD-CTR et de $254 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour ceux fonctionnalisés par le CHT-CTR. Ces résultats montrent la même tendance qu'avant le traitement thermique. Lorsque le système PEM est construit, une perte d'argent a tout de même été observée mais reste moins importante que lorsque la couche d'argent n'est pas traitée thermiquement. En effet, la quantité d'argent atteint à $88 \pm 6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CHT-CTR-AgTT-PEM et $210 \pm 28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour CD-CTR-AgTT-PEM. Ces résultats indiquent que la combinaison du traitement thermique des textiles chargés à l'argent et la construction du système PEM, avec un temps d'immersion de 1 minute limite les pertes d'argent.

On peut souligner que la quantité d'argent des pansements CHT-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM est 4 et 1,6 fois plus faible que celle du pansement commercial *UrgoTul*®-Ag ($350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

3.1.1.4 Suivi de la dégradation du système PEM

Comme il a été mentionné ci-dessus, après d'avoir déposé la dernière couche (#21) (CHT) du système PEM, les textiles ont subi un traitement thermique à 140°C pendant 105 min, afin

d'améliorer la stabilité du système PEM. Afin d'évaluer l'efficacité du traitement thermique sur les pansements conçus, une analyse de la dégradation du système PEM dans le PBS pH 7,4 à 37°C a été réalisée pendant 7 jours.

La **Figure 66** représente la masse restante en fonction du temps pour les textiles ayant le système PEM construit avec un temps d'immersion de 15 min et 1 minute dans les solutions de polyelectrolytes. Après 7 jours d'évaluation, les textiles CTR-CTR-PEM 15 min, CHT-CTR-PEM 1 min, CHT-CTR-Ag-PEM 1 min et CHT-CTR-AgTT-PEM 1 min ont perdu respectivement $3,78 \pm 0,49\%$, $3,26 \pm 0,29\%$, $2,21 \pm 0,33$ et $2,02 \pm 0,43\%$ de leur masse (**Figure 66 A**).

D'autre part, des textiles fonctionnalisés par le CD-CTR : CD-CTR-PEM 15 min, CD-CTR-PEM 1 min, CD-CTR- Ag-PEM 1 min et CD-CTR- AgTT-PEM 1 min ont perdu $6,7 \pm 0,48\%$, $5,45 \pm 0,78\%$, $7,69 \pm 0,59\%$ et $4,23 \pm 0,46\%$ de leur masse, après 7 jours d'évaluation respectivement (**Figure 66 B**).

Il faut noter que quelle que soit la nature de la première couche thermofixée (CD-CTR ou CHT-CTR), la couche d'argent, qu'elle ait subi un traitement thermique ou non, n'impacte pas la dégradation du système PEM.

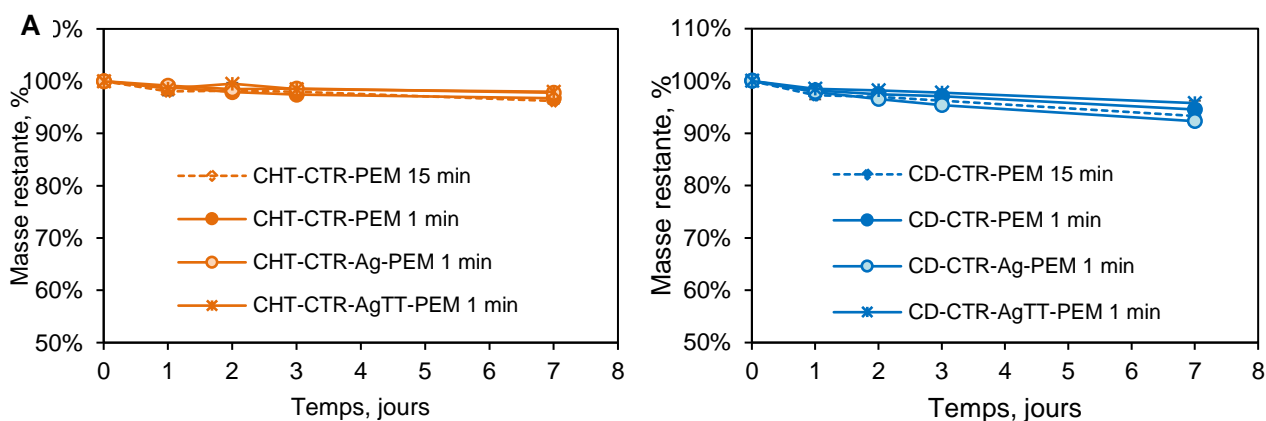


Figure 66. Perte de masse (en %) des systèmes PEM, construits avec 1 minute entre chaque imprégnation, en fonction du temps de dégradation dans le PBS pH 7,4 (37°C, 80 rpm) sur des textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR (a) et par le CD-CTR (b).

Les études de dégradation des systèmes PEM ont également été évalués sur d'autres travaux au sein de notre équipe. La différence ici, était le traitement thermique, qui n'avait pas été appliqué aux systèmes PEM. Par exemple, Martin *et al.*, ont démontré que dans le PBS pH 7,4, les systèmes PEM (#12 couches) ont été complètement dégradés après 7 jours. En effet, le PBS présente une force ionique qui induit des perturbations dans les assemblages des systèmes PEM à cause d'une compétition des ions libres présents dans le PBS, provoquant ainsi la déstructuration des assemblages (145). D'autre part, Aubert-Viard *et al.*, ont montré une perte de masse qui atteint 20% pour les systèmes PEM ayant 21 couches. Par contre, lorsque le traitement thermique (140°C, 105 min) est appliqué sur ce même textile, seulement 5% de la perte de masse a été rapporté après 5

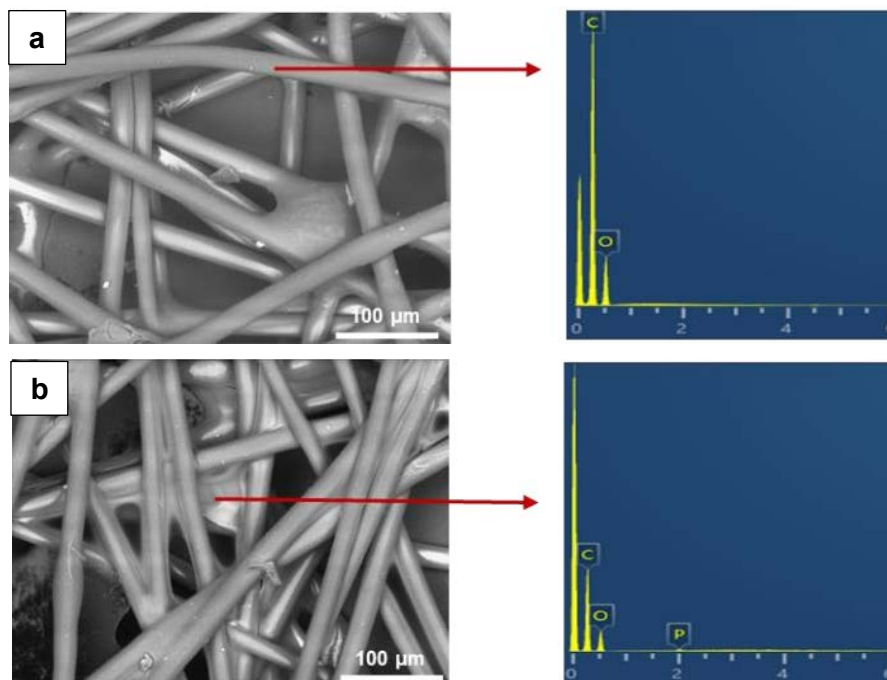
semaines (130). Ces résultats sont donc une preuve indirecte de la réticulation du système PEM lors du traitement thermique.

En conclusion, les résultats obtenus à propos la construction du système PEM sur le pansement à l'argent, ont montré qu'il n'y a pas de différence majeure de l'évolution du gain de masse par rapport au temps de construction à 15, 5 ou 1 min. De plus, le taux de dégradation n'est pas impacté par la présence d'argent (avec ou sans traitement thermique). Il a aussi été constaté que le traitement thermique limite la perte d'argent au moment de la construction du système PEM. Finalement, les supports textiles CHT-CTR-AgTT, CD-CTR-AgTT, CHT-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM (avec un temps d'imprégnation de 1 minute) ont été sélectionnés pour les évaluations suivantes.

3.1.2 Caractérisation physico-chimique

3.1.2.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La caractérisation des supports textiles par MEB a été réalisée dans le but d'observer leur morphologie après chaque étape de la conception du pansement. De la même manière, des spectres EDX ont été réalisés à des endroits particuliers (indiqués par des flèches rouges) pour obtenir l'information de la composition élémentaire des échantillons. L'observation par MEB des supports textiles et leurs spectres EDX correspondants sont présentés dans la **Figure 67**.



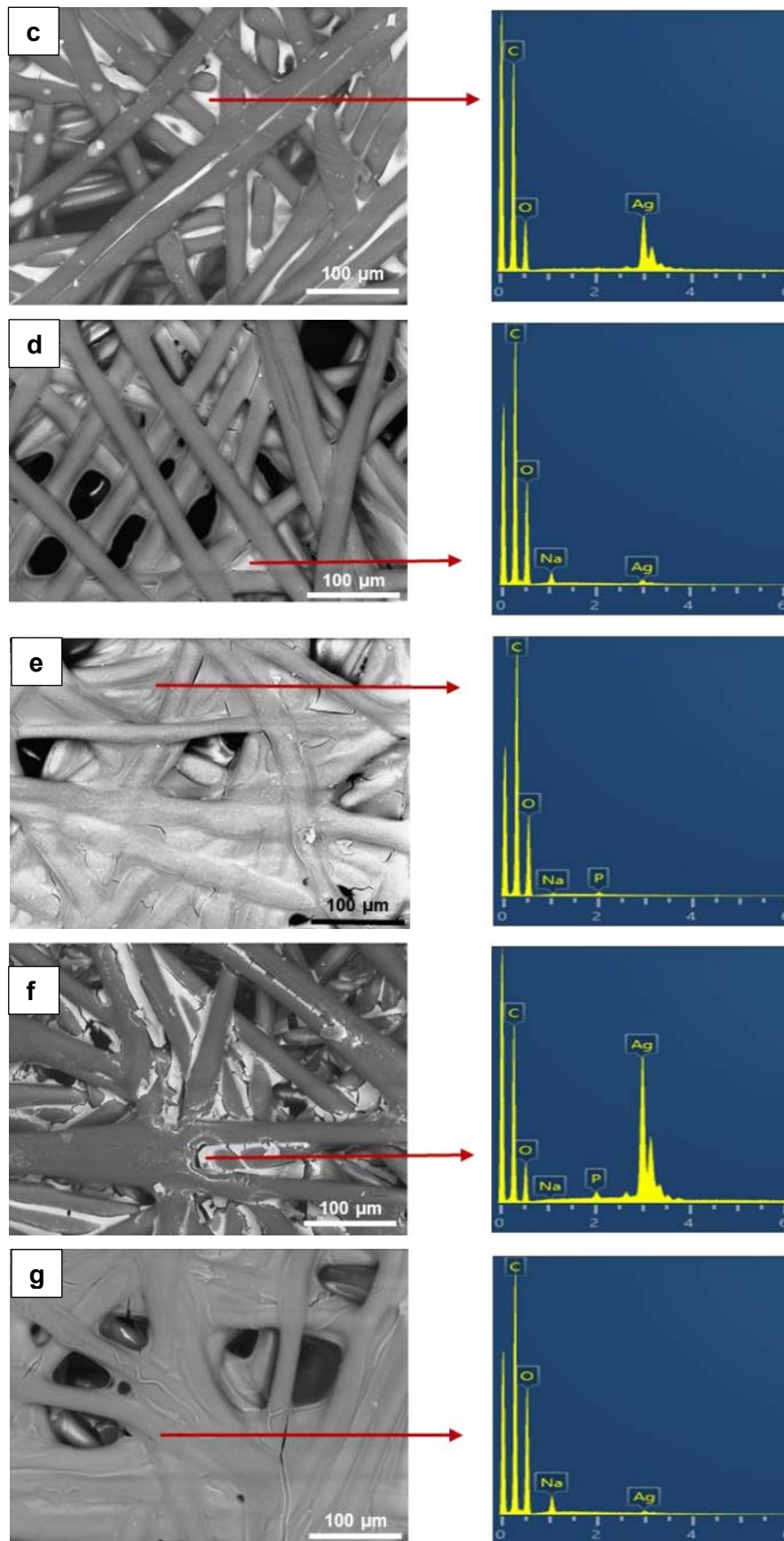


Figure 67. Images MEB (X300) et spectres EDX de (a) PET ; (b) (PET)-CHT-CTR ; (c) CHT-CTR-AgTT ; (d) CHT-CTR-AgTT-PEM ; (e) (PET)-CD-CTR ; (f) CD-CTR-AgTT ; (g) CD-CTR-AgTT-PEM. La flèche rouge indique la partie de l'échantillon analysé par EDX.

Le textile PET (**Figure 67 A**) présente des fibres lisses qui apparaissent comme une structure tridimensionnelle et poreuse. Comme prévu, le spectre EDX a montré des pics correspondants au carbone (C) et à l'oxygène (O), lesquels sont des éléments fondamentaux des chaînes polymères qui composent le polyéthylène téréphtalate (PET). L'étape de fonctionnalisation avec le CHT-CTR ((PET)-CHT-CTR, **Figure 67 B**) permet un dépôt homogène autour des fibres, les interstices entre les fibres sont en partie comblés. Au contraire, la fonctionnalisation avec le CD-CTR ((PET)-CD-CTR, **Figure 67 E**) provoque un comblement important entre les fibres, qui est en corrélation avec le gain de masse obtenu après la fonctionnalisation ($33,0\% \pm 5,0$). Les spectres EDX des textiles fonctionnalisés comportent des pics de C et O, correspondant cette fois-ci à la couche #1 déposée (CHT-CTR ou CD-CTR). Des pics correspondants aux éléments phosphore (P) et de sodium (Na) sont aussi apparus. Ils correspondent à des résidus du catalyseur employé pour la fonctionnalisation de la première couche (hypophosphite de sodium)

Les textiles chargés par l'argent : CHT-CTR-AgTT (**Figure 67 C**) et CD-CTR-AgTT (**Figure 67 F**) présentent des agglomérats apparaissant en couleur blanche qui sont situés dans les espaces vides entre les fibres. Les spectres EDX ont confirmé que ces agglomérats correspondent à l'argent. Les signaux des pics sont plus prononcés sur les textiles CD-CTR-AgTT (46,22%).

Lorsque le système PEM est appliqué : CHT-CTR-AgTT-PEM (**Figure 67 D**) et CD-CTR-AgTT-PEM (**Figure 67 G**) ; les interstices sont presque totalement comblés. Quelques nervures et des espaces craquelés sur le revêtement de polymère sont aussi observés, ce qui est dû à la déshydratation des polymères après l'application thermique (140°C, 105 min) pour la stabilisation des assemblages. Les spectres EDX rapportent la diminution du signal de l'argent après la construction du système PEM, dû certainement à la diffusion de l'argent au moment de la construction des assemblages. Le **Tableau 9** montre les pourcentages massiques de chaque élément des textiles détectés par EDX.

Tableau 9. Pourcentage massique du carbone (C), oxygène (O), argent (Ag), sodium (Na) et phosphore (P) détecté par EDX dans chaque zone analysée sur les textiles

Textiles	C	O	Ag	Na	P
Energie (KeV)	0.2842	0.5431	3.351	1.0708	2.1656
PET	65,59	34,15	-	-	
(PET)-CHT-CTR	65,02	34,50	-	-	0,48
CHT-CTR-AgTT	45,55	29,25	25,19	-	-
CHT-CTR-AgTT-PEM	54,85	42,17	1,54	1,44	-
(PET)-CD-CTR	60,34	39,07	-	0,15	0,31
CD-CTR-AgTT	29,96	35,50	46,22	-	0,59
CD-CTR-AgTT-PEM	51,02	44,46	2,78	1,74	-

3.1.2.2 Capacité d'absorption des exsudats simulés

La capacité d'absorption des textiles a été évaluée selon la norme AFNOR NF EN 13726-1 (225). Les résultats présentés sur la **Figure 68** montrent la masse moyenne de solution (g) retenue par 100 cm² de textile. La capacité d'absorption du textile vierge PET est similaire à celle du pansement commercial *UrgoTul®-Ag* ($1,0 \pm 0,2$ g/100cm² et $1,0 \pm 0,1$ g/100cm² respectivement). Les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR ou la CD-CTR présentent une capacité d'absorption de $1,47 \pm 0,14$ g/100cm² et de $1,68 \pm 0,15$ g/100cm² respectivement. Le processus de fonctionnalisation permet une meilleure absorption de la solution saline par rapport au PET vierge.

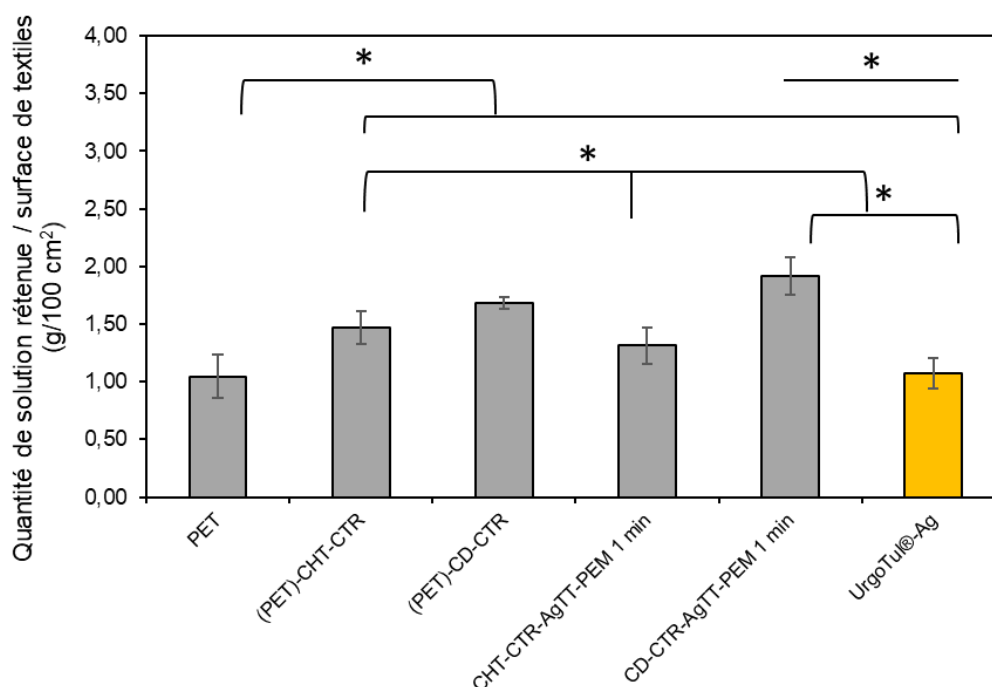


Figure 68. Quantité de solution saline retenue, exprimé par g/cm² de textile de différents types de supports après 30 minutes d'immersion dans une solution composée de NaCl 142 mM et CaCl₂ 2,5 mM à 37°C (* p<0.05).

La capacité d'absorption des textiles enrobés par le système PEM est de $1,9 \pm 0,2$ g/100 cm² pour CD-CTR-AgTT-PEM soit 1,5 fois plus élevée que celle du CHT-CTR-AgTT-PEM ($1,3 \pm 0,05$ g/100 cm²). Même si le CHT présente des propriétés d'absorption (109,235), d'autres pansements contenant des fibres naturelles ont démontré une capacité plus élevée d'absorption, comme par exemple les pansements à base d'alginate (10,0 g/100 cm²) ou à base de carboxyméthylcellulose (9,0 g/100 cm²) (236). Néanmoins, une haute capacité d'absorption peut être risquée pour les traitements des plaies non exsudatives, car cela peut produire une macération conduisant à la décomposition des tissus causant finalement une infection.

En revanche, le pansement développé dans ce projet vise plutôt les plaies en phase de détersion, c'est-à-dire des plaies présentant des infections et des tissus fibrineux ou nécrotiques, lesquels doivent être éliminés pour obtenir un milieu favorable pour la cicatrisation. Les pansements

sont fréquemment utilisés pour favoriser la déterision auto-lytique (naturelle) des plaies. En effet, ce pansement pourrait maintenir un milieu humide de la plaie pour décrocher les tissus nécrotiques et ainsi stimuler les cellules qui ont une action détersive comme les macrophages et les lymphocytes entre autres.

3.1.2.3 Cinétique de libération de l'argent

L'étude de la cinétique de libération de l'argent a été évaluée dans trois milieux : l'eau ultrapure, les exsudats simulés (norme NF EN 13726-1) et le tampon phosphate PBS à pH 7,4. La quantité totale d'argent adsorbée dans chaque textile, dosée par la technique d'absorption atomique de flamme, est présentée dans le **Tableau 10**. La **Figure 69** montre la quantité d'argent libérée par différents textiles, incluant le pansement commercial *UrgoTul®-Ag*, dans l'eau ultrapure (**Figure 69 A**), dans une solution d'exsudats simulés (**Figure 69 B**) et dans le PBS à pH 7,4 (**Figure 69 C**). Ces milieux de libération ont été utilisés dans le but de simuler les différents environnements.

Tableau 10. Quantité totale d'argent ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) adsorbée dans différents textiles et dans le pansement commercial *UrgoTul®-Ag*.

Textile	Quantité totale d'argent en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
CHT-CTR-AgTT	254,86 \pm 11,75
CHT-CTR-AgTT-PEM	88,52 \pm 6,61
CD-CTR-AgTT	591,89 \pm 27,57
CD-CTR-AgTT-PEM	210,77 \pm 28,64
<i>UrgoTul®-Ag</i>	350

La **Figure 69** montre que le pansement commercial *UrgoTul®-Ag* est celui qui libère la plus grande quantité d'argent dans le PBS ($26 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) et dans les exsudats simulés ($37 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) après 72 heures.

Les textiles CD-CTR-AgTT et le CHT-CTR-AgTT libèrent quant' à eux la plus grande quantité d'argent dans l'eau ($92 \pm 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $39 \pm 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement) comparativement au PBS ($19 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $10 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) et aux exsudats simulés ($17 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $9 \pm 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) au même temps d'évaluation.

Lorsque le système PEM est appliqué, la libération de l'argent se fait plus lentement, surtout dans le milieu aqueux au sein duquel une quantité négligeable d'argent est libérée. L'argent libéré dans le PBS atteint à $7 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les textiles fonctionnalisés par CD-CTR et le CHT-CTR respectivement. Le même schéma est observé dans les exsudats simulés, où la quantité d'argent libéré était de $10 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et de $10 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement.

Ces résultats montrent la capacité du système PEM à ralentir la diffusion de l'argent. Il a été aussi observé que dans un milieu physiologique, le pansement avec le système PEM permet de libérer une quantité moindre d'argent que le pansement *UrgoTul®-Ag*, ce qui limiteraient les effets cytotoxiques

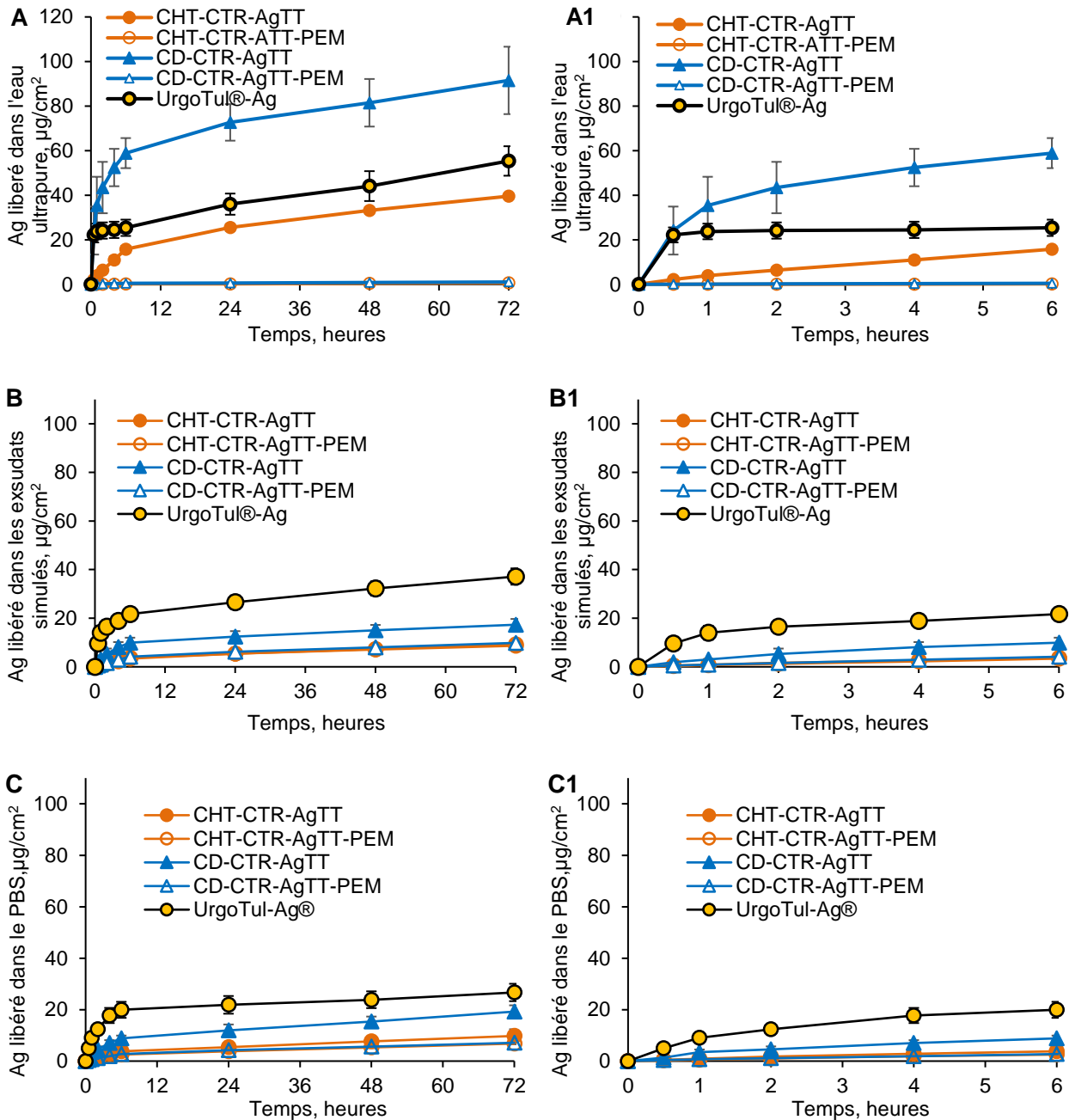


Figure 69. Cinétique de libération de l'argent dans l'eau ultrapure (A), dans une solution des exsudats simulés (B) et dans le tampon phosphate PBS pH 7,4 (C). Les figures A1, B1 et C1 représentent l'encart de la libération de l'argent dans les 6 premières heures.

Limitier la diffusion de l'argent est un critère essentiel pour éviter des effets toxiques envers les cellules impliquées dans le processus de cicatrisation. Plusieurs travaux de recherche ont évalué les effets cytotoxiques de l'argent sous la forme d'ions ou de nanoparticules. Barbasz et al., ont

rapporté que la cytotoxicité des AgNP dépend de leur taille (237). D'autre part, des concentrations en argent comprises entre 0,1 à 10 mg/L ont montré un effet cytotoxique (238), lequel diminue lorsque l'argent est associé avec un polymère, conduisant à une limitation de leur diffusion (239). Il est donc important de rester en dessous du seuil de toxicité de l'argent en maintenant bien sûr, son activité antibactérienne.

Une analyse complémentaire a été réalisée concernant la libération de l'argent dans des milieux enrichis de protéines, comme l'albumine par exemple. En effet, les protéines, peuvent se comporter comme transporteurs de nanoparticules d'argent ou d'or mais aussi de principes actifs (240–242). Ainsi, le milieu essentiel minimum modifié (MEM) (composé d'acides aminés, vitamines, sels inorganiques et dextrose) et du MEM enrichis avec du sérum de veau fœtal (MEM-SVF) utilisés pour la culture cellulaire ont été sélectionnés pour évaluer la libération de l'argent sur les pansements CD-CTR-AgTT-PEM et *UrgoTul®-Ag*. De la même manière, le tampon PBS pH 7,4 a été aussi utilisé comme comparateur.

La **Figure 70** montre la quantité d'argent libérée, après 24 heures sous agitation (80rpm) à 37°C. Les résultats rapportent que la concentration d'argent extraite du pansement *UrgoTul®-Ag* est plus importante que celle du pansement CD-CTR-AgTT-PEM quel que soit le milieu utilisé. C'est notamment dans le milieu MEM-SVF où l'argent s'extrait le plus, probablement dû la présence de l'albumine dans le SVF, laquelle se comporterait comme un transporteur de l'argent.

La composition du pansement *UrgoTul®-Ag* est basée sur une technologie lipo-colloïde (association des particules hydrocolloïdes à la vaseline dans une trame aérée non occlusive). Ce type de composition évite l'adhésion du pansement à la plaie mais il n'empêche pas la diffusion de l'argent vers les tissus sains. Dans le pansement CD-CTR-AgTT-PEM, le système PEM permet de limiter l'extraction d'argent, l'adhésion du pansement à la plaie devrait être minime car le PEM formera un hydrogel. De plus, la quantité adsorbée d'argent sur ce pansement est moins importante que celle du produit commercial, ce qui va limiter la toxicité mais il faudra toutefois valider l'efficacité antibactérienne, ce qui fera l'objet d'une étude plus tard dans ce travail.

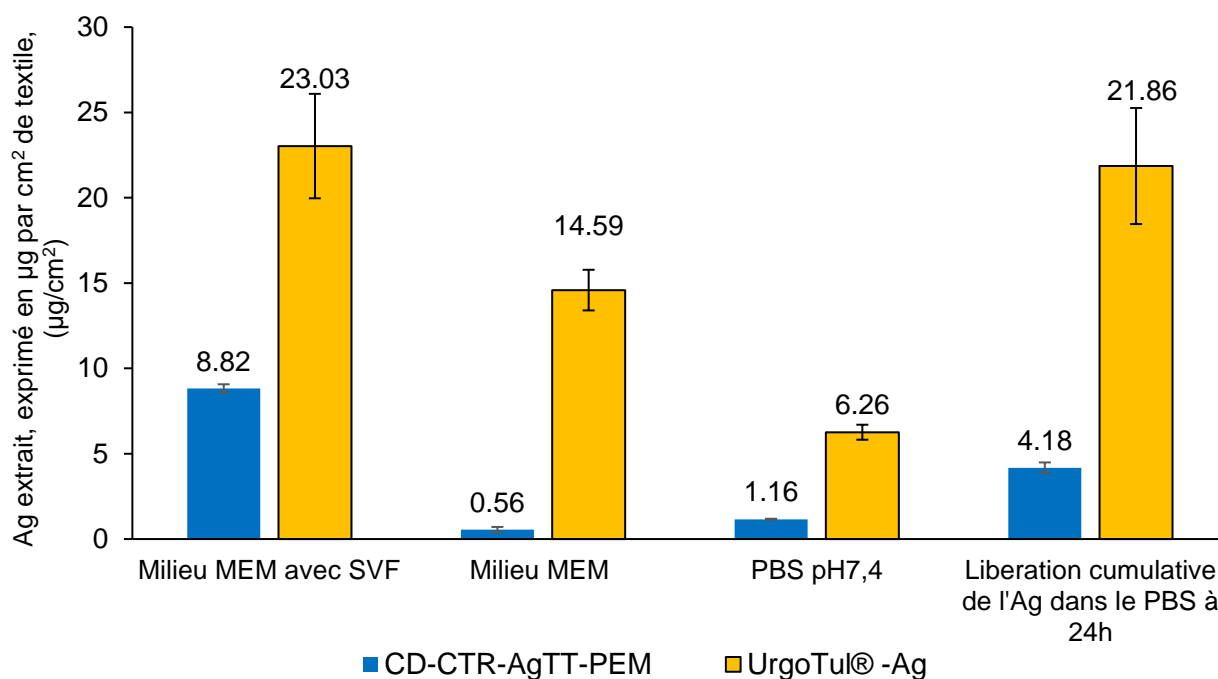


Figure 70. Comparaison de la quantité d'argent extraite sur les pansements CD-CTR-AgTT-PEM et UrgoTul®-Ag après 24 heures sous agitation (80rpm) à 37°C, dans différents milieux d'extraction.

3.1.3 Etude de la cytocompatibilité des pansements

La viabilité cellulaire a été déterminée sur différents textiles par la méthode d'extraction, après 24 heures d'incubation dans le milieu de culture (MEM). La **Figure 71** présente les taux de viabilité des cellules L132 obtenus sur les différents textiles correspondant à chaque étape du développement du pansement ; ainsi que sur le pansement commercial *UrgoTul®-Ag*. Le textile PET a présenté un taux de viabilité de 87%, ce qui montre une absence de cytotoxicité par rapport au témoin positif (le milieu sans textile). La viabilité cellulaire obtenues des milieux extraits des textiles fonctionnalisés ((PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR) est respectivement de 86% et 79%, ne montrant ainsi pas de cytotoxicité (supérieure à 70%). Mais entre eux, le textile fonctionnalisé (PET)-CD-CTR a montré un taux de viabilité cellulaire relativement plus faible, qui pourrait probablement s'expliquer par la quantité des fonctions COOH résiduelles présentes dans les textiles.

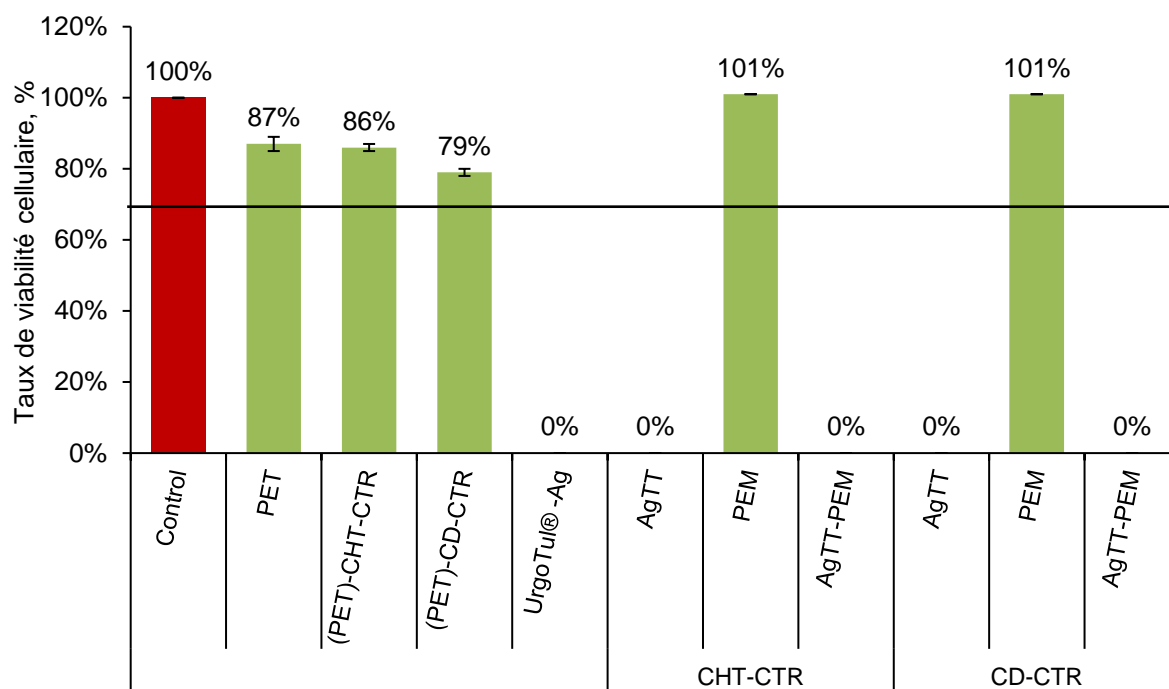


Figure 71. Viabilité cellulaire évaluée sur différents textiles par la méthode d'extraction après 24h d'incubation (n=8). Le témoin correspond au milieu dans lequel aucun textile n'a été plongé : Contrôle positif.

D'autre part, les deux pansements avec le système PEM (CHT-CTR et CD-CTR) ont montré une viabilité cellulaire de 101%, supérieure à celle mesurée sur le PET (87%) et le PET thermofixé par le CHT-CTR (86%) ou le CD-CTR (79%). De manière intéressante, le traitement thermique apporté au système multicouche permet d'obtenir une excellente viabilité comparativement à celle observée par Adeline Martin et François Aubert (204) qui avaient mesuré des viabilités cellulaires de 50 et 40% respectivement sur ces mêmes systèmes PEM sans traitement thermique.

Le traitement thermique (140°C, 105 min) diminue la dégradation des assemblages multicouches (**Figure 66**) et ainsi limite la diffusion notamment du polymère de cyclodextrine dans le milieu de culture. Ce dernier, en trop forte concentration (2.6 mg/L) contribue à une diminution du pH et donc une cytotoxicité (243). De plus, après le traitement thermique, les pansements sont rincés dans une solution de carbonate de sodium afin de neutraliser leur l'acidité résiduelle. Ceci pourrait donc influencer de manière positive la viabilité cellulaire.

Cependant, les textiles chargés d'argent et le pansement commercial UrgoTul®-Ag ont montré une cytotoxicité (taux de viabilité cellulaire, 0%). Ce phénomène est dû à la diffusion d'une partie de l'argent dans le milieu MEM enrichi avec 10% de SVF (MEM-SVF), pour atteindre des concentrations toxiques. D'après les résultats obtenus, une analyse complémentaire a été réalisée. Le milieu MEM-SVF récupéré après 24 heures d'extraction des pansements CD-CTR-AgTT-PEM et UrgoTul®-Ag, a été dilué de deux en deux jusqu'à une dilution au 8^{ème}. De la même manière que précédemment, les milieux ont été déposés sur un tapis cellulaire, incubés pendant 24 heures et la viabilité a été mesurée par la même méthode.

La **Figure 72** montre les taux de viabilité cellulaire des extraits (après dilution par 8 dans le MEM-SVF) obtenus à partir des pansements CD-CTR-AgTT-PEM et *UrgoTul*[®]-Ag immergés dans le MEM-SVF. La viabilité cellulaire obtenue sur CD-CTR-AgTT-PEM et *UrgoTul*[®]-Ag est 81% et 21% respectivement. Ainsi, après dilution (8x) de l'extrait du pansement CD-CTR-AgTT-PEM a montré une meilleure cytocompatibilité que *UrgoTul*[®]-Ag, ces résultats sont directement reliés au dosage de l'argent libéré dans le milieu enrichi MEM-SVF dans lequel l'argent libéré du pansement CD-CTR-AgTT-PEM et *UrgoTul*[®]-Ag après 24 heures, atteignait 8,82 µg/cm² et 23,03 µg/cm² respectivement.

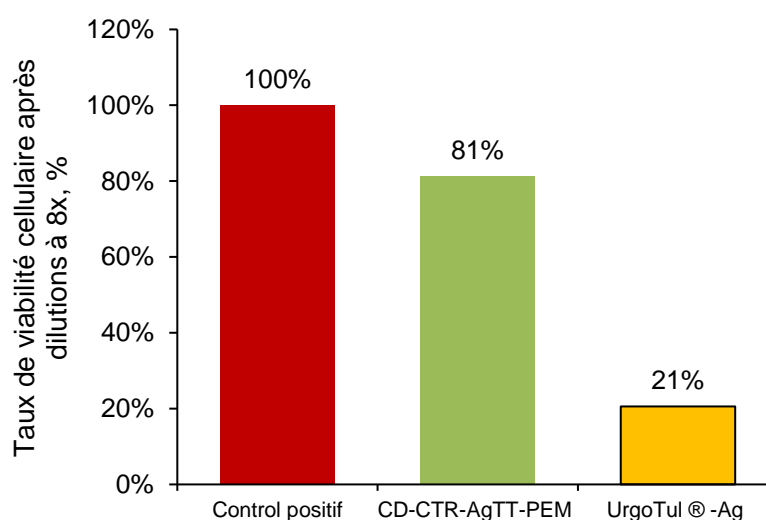


Figure 72. Viabilité cellulaire évalué sur CD-CTR-AgTT-PEM et *UrgoTul*[®]-Ag (dilué 8x) par la méthode d'extraction après 24h d'incubation (n=8). Le témoin correspond au milieu sans textile : Control positif.

3.1.4 Evaluation microbiologique *in vitro*

3.1.4.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) du sulfate d'argent

La sensibilité de *S. aureus* CIP224 et *E. coli* K12 au sulfate d'argent (Ag₂SO₄) a été évaluée par le test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB). La CMI détermine la capacité de croissance des microorganismes en présence d'agents antimicrobiens à concentrations décroissantes. Ceci permet de définir la concentration efficace pour inhiber la croissance microbienne à un temps déterminé. La CMB est réalisée après la CMI en vérifiant si l'inhibition est bactériostatique ou bactéricide par ensemencement des suspensions sur une gélose. Dans le cas du sulfate d'argent, la gamme de concentration utilisée a été de 400 mg/L à 0,06 µg/L.

Le **Tableau 11** présente les valeurs de la CMI et de la CMB du sulfate d'argent déterminées à 24 et 48 heures. Le sulfate d'argent est plus efficace sur *E. coli* K12 que *S. aureus* CIP224, les valeurs reportées pour la CMI ont été de 25 mg/L et de 50 mg/L à 48 heures respectivement. Les

valeurs de la CMB sont identiques que celles de la CMI à 24 et 48 heures. La CMI de l'argent va dépendre de sa forme (sels, AgNP) et aussi du type de souche bactérienne. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées par Krishnaraj *et al.* et (244) et Kędziora *et al.*, (245)

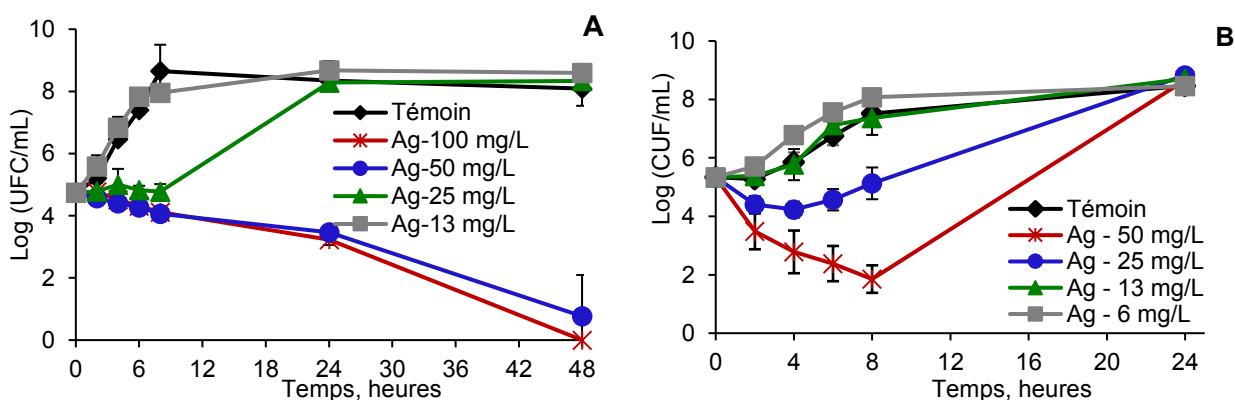
Tableau 11. CMI et CMB du sulfate d'argent (0.8 g/L) sur *S. aureus* CIP224 et *E. coli* K12 après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C. Charge bactérienne de départ : 10^4 UFC/mL.

Souche bactérienne	CMI du sulfate d'argent, mg/L		CMB du sulfate d'argent, mg/L	
	24 heures	48 heures	24 heures	48 heures
<i>S. aureus</i>	50	50	50	50
<i>E. coli</i>	25	25	25	25

Après lecture, la culture a été prélevée des puits sans croissance visible et déposée sur des géloses MHA afin de confirmer l'effet bactéricide ou bactériostatique du sulfate d'argent à 24 heures et 48 heures. L'absence de colonies bactériennes a été constatée à la même concentration que la CMI, ce qui prouve le caractère bactéricide du sulfate d'argent à ces concentrations (25 et 50 mg/L) sur *E. coli* K12 et *S. aureus* CIP224 respectivement.

3.1.4.2 Courbe de croissance

La **Figure 73** montre la croissance bactérienne de *S. aureus* CIP224 et *E. coli* K12 en présence de différentes concentrations de sulfate d'argent. La **Figure 73 A**, montre que les concentrations en argent de 50 et 100 mg/L inhibent la croissance de *S. aureus* CIP224 à 8 heures. Ce résultat est en concordance avec les valeurs de la CMI (**Tableau 11**).



Dans le cas de *E. coli* K12 (**Figure 73 B**), les concentrations inférieures à 50 mg/L ont présenté la même tendance que le témoin à 24 heures. Cependant la concentration en argent de 50 mg/L a présenté une activité bactéricide pendant 8 heures au plus, puis les bactéries prolifèrent à nouveau. Ce comportement est probablement dû à la charge bactérienne initiale utilisée pour réaliser la courbe de croissance (10^5 UFC/mL), une concentration 10 fois plus élevée que la charge bactérienne

de départ utilisé pour la détermination de la CMI et la CMB (10^4 UFC/mL). Une autre hypothèse est l'internalisation de l'argent dans *E. coli*, provoquant l'indisponibilité de ce dernier à réagir contre les autres bactéries. Feng *et al.*, ont mise en évidence par des techniques de microscopie électronique en transition (TEM) et microanalyse par rayons X, une accumulation de l'argent à l'intérieur des cellules bactériennes d'*E. coli* (246).

3.1.4.3 Test de diffusion (Kirby-Bauer)

Le test de Kirby-Bauer a été réalisé dans le but d'évaluer la capacité du système PEM à ralentir la diffusion de l'argent. La **Figure 74** montre la mesure du diamètre d'inhibition sur *S. aureus* (**Figure 74 A et B**) et sur *E. coli* (**Figure 74 C et D**) des différents pansements (\varnothing 11 mm) fraîchement préparés ou immergés dans le PBS (pH 7,4) pendant 1, 2 et 3 jours, afin de simuler le temps d'utilisation du pansement sur une plaie (avec renouvellement quotidien du PBS).

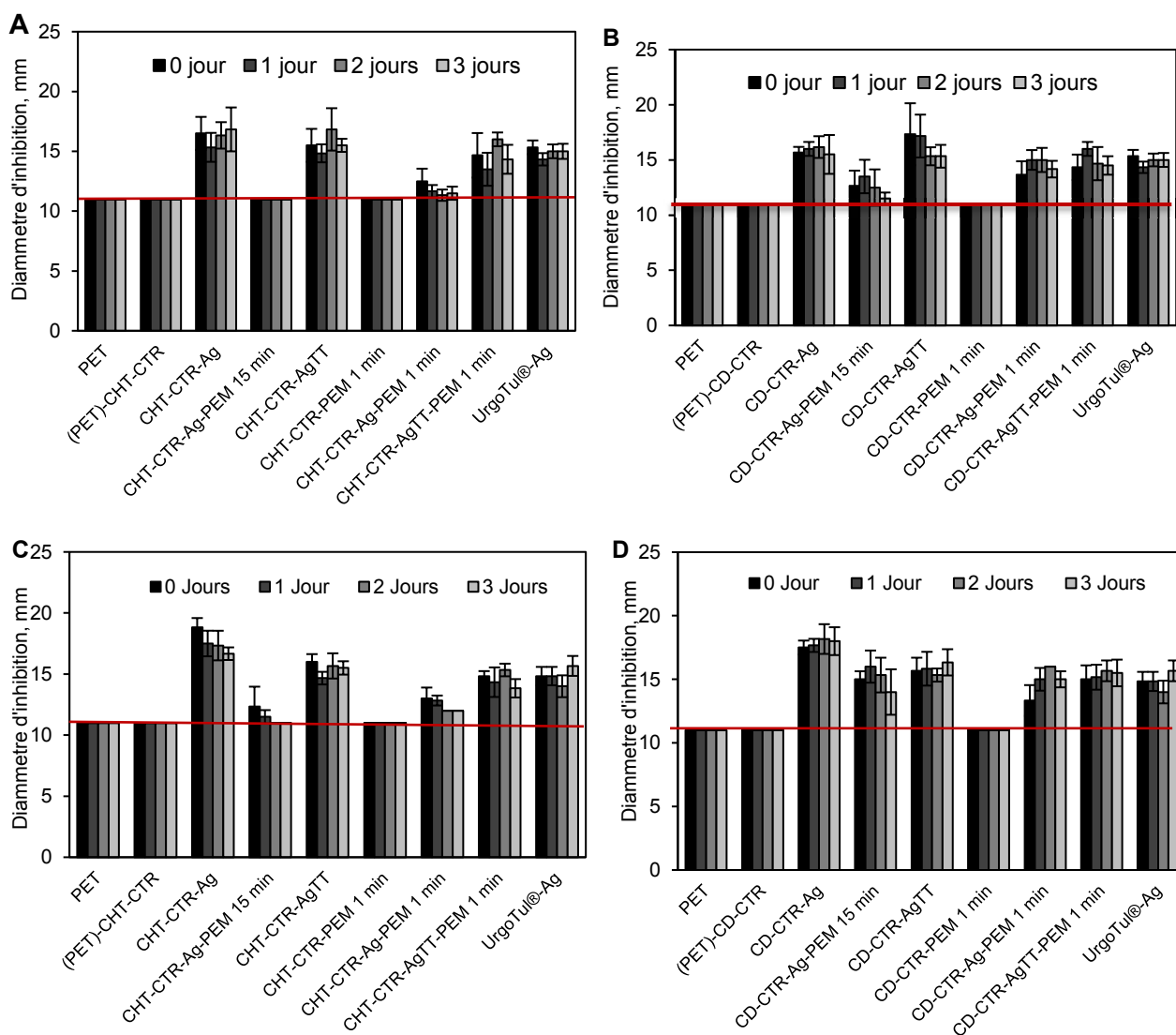


Figure 74. Mesure du diamètre d'inhibition sur *S. aureus* (a et c) et *E. coli* (b et d) pour les différents pansements, fraîchement préparés ou immergés dans le PBS (pH 7,4, 37°C, 80 rpm) pendant 1, 2 et 3 jours. La ligne rouge dans les graphiques indique le diamètre (\varnothing 11 mm) des supports textiles placés sur les géloses Muller Hinton.

Aucun diamètre d'inhibition n'a été observé autour des textiles qui n'ont pas été activés par l'argent, en revanche, les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR (CHT-CTR-Ag et CHT-CTR-AgTT) ont montré des diamètres d'inhibition de $16,8 \pm 1,8$ mm et de $15 \pm 0,5$ mm sur *S. aureus* après 3 jours respectivement. Dans les cas de *E. coli*, les diamètres d'inhibition ont atteint $17 \pm 0,5$ mm et $15,5 \pm 0,5$ mm respectivement après 3 jours d'évaluation. D'autre part, les textiles fonctionnalisés par le CD-CTR (CD-CTR-Ag) ont montré des diamètres d'inhibition de $15,5 \pm 1,76$ mm et de 18 ± 1 mm sur *S. aureus* et *E. coli* respectivement, quel que soit le temps évalué. CD-CTR-AgTT a montré des diamètres d'inhibition de $17,3 \pm 2,8$ mm au début de l'analyse qui diminue à $15 \pm 1,03$ mm après 3 jours sur *S. aureus*. Pour *E. coli* les diamètres d'inhibition atteignent $16,3 \pm 1,0$ mm après 3 jours d'immersion dans le PBS.

D'autre part, les textiles présentant le système PEM ont montré de faibles diamètres d'inhibition, due à une libération plus lente de l'argent, confirmés dans la **Figure 69**. Les textiles ayant des systèmes PEM construits à 15 min ne montrent pas de diamètres d'inhibition significatifs sur les deux souches bactériennes quel que soit le temps évalué. Ce phénomène est dû à la perte totale d'argent générée après le dépôt de la couche #3 du système PEM.

Les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR ont montré des diamètres d'inhibition de $11,5 \pm 0,5$ mm pour CHT-CTR-Ag-PEM 1 min et de $14 \pm 1,21$ mm pour CHT-CTR-AgTT-PEM 1 min sur *S. aureus* et de $12 \pm 0,75$ mm et de $14 \pm 0,84$ mm sur *E. coli* respectivement. Du côté des textiles fonctionnalisés par le CD-CTR les diamètres d'inhibition ont été de $14 \pm 0,84$ mm pour CD-CTR-Ag-PEM 1 min sur *S. aureus* au début de l'analyse et après 3 jours. Le même schéma est observé sur *E. coli*; les diamètres d'inhibition ont été de $15 \pm 1,05$ mm après 3 jours pour CD-CTR-AgTT-PEM 1 min. Les diamètres d'inhibition rapportés pour le pansement UrgoTul®-Ag après 3 jours a été de $15 \pm 0,63$ mm sur *S. aureus* et de $15,6 \pm 0,82$ mm sur *E. coli* respectivement.

Le pansement développé dans ce travail a montré des diamètres d'inhibition sur *S. aureus* et *E. coli* similaires à UrgoTul®-Ag ou d'autres pansements antibactériens avec des nanoparticules d'argent incorporées dans des textiles en viscose (247), en coton (248) et en lin (249).

3.1.4.4 Cinétique de réduction bactérienne (Kill time)

Le test de *kill time* a été réalisé afin d'évaluer l'efficacité antibactérienne des différents textiles. Ce test permet de quantifier le nombre des bactéries viables (UFC/mL) en fonction du temps ; à partir d'une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL. Le test de *kill time* permet d'évaluer également la cinétique à laquelle les échantillons inhibent la prolifération bactérienne. Les **Figure 75** et **Figure 76** montrent la réduction bactérienne (UFC/mL) de *S. aureus* et de *E. coli* mis en contact avec les différents pansements.

La **Figure 75** ne rapporte aucune réduction bactérienne sur les textiles témoins (PET, (PET)-CHT-CTR et (PET)-CD-CTR) que ce soit sur *S. aureus* ou sur *E. coli*. Même si le chitosan est connu

pour son activité antibactérienne intrinsèque (104), les textiles (PET)-CHT-CTR n'ont apporté aucun effet antibactérien sur les deux souches. Les textiles chargés avec l'argent ont montré une réduction bactérienne sur *S. aureus* de 2 Log₁₀ (CHT-CTR-Ag) et de 4 Log₁₀ (CD-CTR-Ag) après 6 heures de contact entre les bactéries et les pansements. Sur *E. coli*, la réduction bactérienne a été beaucoup plus rapide que sur *S. aureus*. En fait les textiles CHT-CTR-Ag et CD-CTR-Ag ont montré une réduction bactérienne de 6 Log₁₀ après 4 heures d'analyse. L'activité antibactérienne maximale mesurée correspond à une réduction de 6 Log₁₀ à 24 heures dans les deux types de textiles sur les deux souches bactériennes.

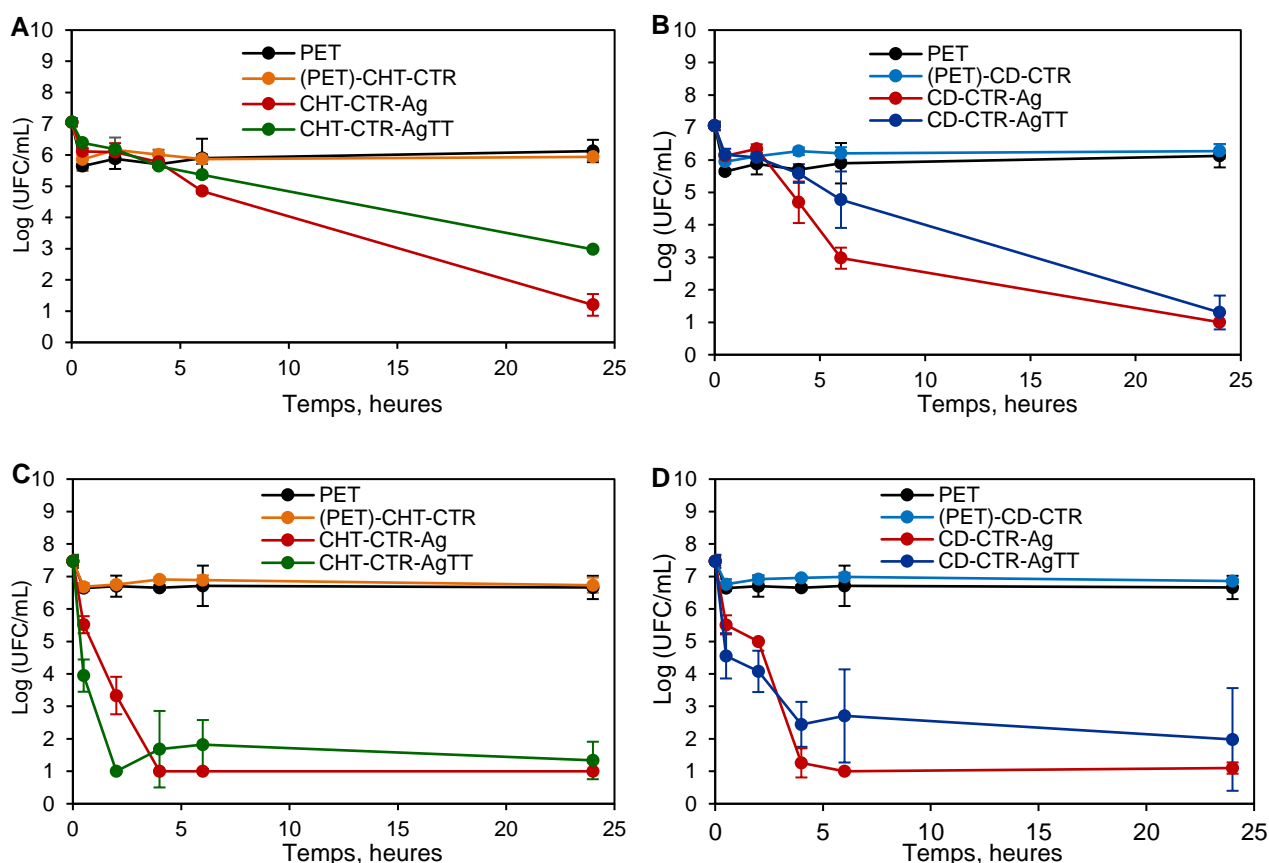


Figure 75. Cinétique de réduction bactérienne de différents pansements incubés avec une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* (a et b) ou d'*E. coli* (c et d) à différents temps (0, 5 à 24 heures) (n=6 par temps).

D'autre part, les textiles activés avec l'argent traités thermiquement (AgTT) ont montré une activité antibactérienne prolongée. La réduction bactérienne obtenue sur les textiles CHT-CTR-AgTT a été de 4 Log₁₀ sur *S. aureus* et de 5 Log₁₀ sur *E. coli* à 24 heures. Les textiles CD-CTR-AgTT ont montré une réduction bactérienne à 24 heures de 5 Log₁₀ sur les deux souches bactériennes.

La **Figure 76** montre l'activité antibactérienne des pansements modifiés par le système PEM. Aucune réduction bactérienne n'a été observée sur les témoins sans argent (CHT-CTR-PEM et CD-CTR-PEM). Par contre, le pansement commercial *UrgoTul*[®]-Ag (témoin positif) a montré une réduction bactérienne de 3 Log₁₀ sur *S. aureus* et de 5 Log₁₀ sur *E. coli* après 24 heures.

Un impact sur l'activité antibactérienne a été montré lorsque le système PEM a été appliqué sur les pansements activés par l'argent. En effet, les pansements CHT-CTR-Ag-PEM 15 min a rapporté une réduction bactérienne de seulement 1 Log₁₀ sur *E. coli* à 24 heures et aucune réduction n'est observée sur *S. aureus*. De la même manière l'activité antibactérienne des pansements CD-CTR-Ag-PEM 15 min n'est plus que de 3 Log₁₀ à 24 heures sur les deux souches bactériennes. Ce phénomène est dû à la perte de l'argent au moment de la construction du système PEM avec 15 minutes d'immersion dans les solutions de polyelectrolytes comme cela a été mesuré par absorption atomique.

Lorsque le temps de construction du système PEM est écourté à 1 minute, l'activité antibactérienne semble s'améliorer. Pour les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR ou la CD-CTR, la réduction bactérienne est plus soutenue et atteint respectivement à 4 Log₁₀ (CHT-CTR-Ag-PEM 1 min) et de 6 Log₁₀ (CD-CTR-Ag-PEM 1 min) sur *S. aureus* après 24 heures. Dans le cas de *E. coli*, une réduction bactérienne de 6 Log₁₀ après 4 heures a été rapportée. Néanmoins, une prolifération bactérienne est observée au-delà de 4 heures et une réduction bactérienne finale de 2 Log₁₀ pour les pansements CHT-CTR-Ag-PEM 1 min et de 4 Log₁₀ pour les pansements CD-CTR-Ag-PEM 1 min est mesurée à 24 heures, par rapport à la charge bactérienne initiale.

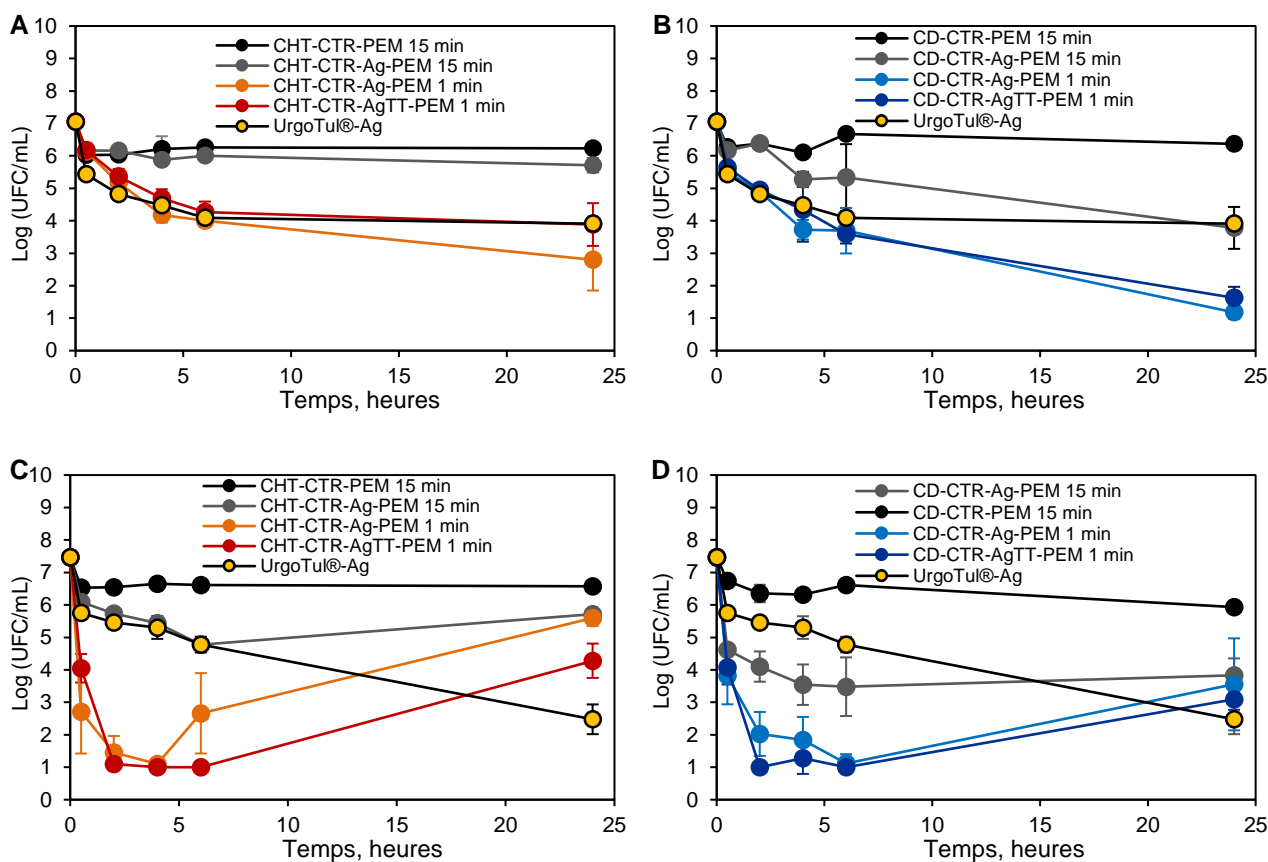


Figure 76. Cinétique de réduction bactérienne de différents supports textiles ayant le système PEM incubés avec une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* (a et b) ou d'*E. coli* (c et d) à différents temps (0,5 à 24 heures).

Dans le cas des pansements CHT-CTR-AgTT-PEM 1 min et CD-CTR-AgTT-PEM 1 min, l'activité antibactérienne a présenté un profil similaire au cas précédent. Sur *S. aureus*, les textiles fonctionnalisés par le CHT-CTR ont montré le même profil que le pansement commercial UrgoTul®-Ag. Pour ceux fonctionnalisés par la CD-CTR, l'activité antibactérienne est similaire à celle des textiles traités à l'argent sans traitement thermique (CD-CTR-Ag-PEM 1 min). Cependant sur *E. coli*, l'activité antibactérienne est observée jusqu'à 6 heures sur les deux types des pansements, CHT-CTR et CD-CTR, une prolifération bactérienne au-delà de 6 heures et une réduction bactérienne finale de 3 Log10 a été observée sur les deux souches bactériennes.

Il faut tenir en compte que les textiles fonctionnalisés par la CD-CTR et chargés avec l'argent, ont présenté une activité antibactérienne plus importante que ceux fonctionnalisés par CHT-CTR, en raison de leur meilleure capacité de sorption de l'argent (**Figure 65**). D'ailleurs, l'activité antibactérienne est plus rapide sur *E. coli* que sur *S. aureus*, quel que soit le textile analysé. Les pansements chargés avec de l'argent et ayant le système PEM ont montré une activité antibactérienne meilleure à *UrgoTul®-Ag* sur *S. aureus*. Dans le cas de *E. coli*, l'activité antibactérienne des pansements CD-CTR-Ag-PEM 1 min et CD-CTR-AgTT-PEM 1 min est similaire à celle montré par *UrgoTul®-Ag* à 24 heures.

En effet, le test de *kill time* a montré une réduction bactérienne maximale (6 Log10) dans les 6 premières heures de contact avec *E. coli* et une réduction progressive jusqu'à 24 heures sur *S. aureus*. Cette différence entre la vitesse d'action est due à la nature de la membrane bactérienne des bactéries à Gram positifs comme *S. aureus* qui est constituée d'une couche plus épaisse de peptidoglycane pouvant empêcher l'action des ions d'argent à travers la paroi cellulaire des bactéries à Gram positifs. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Jung *et al.*, (250) et Feng *et al.* (246)

La réduction bactérienne maximale des textiles sur *E. coli* est plus importante que la recroissance rapporté après 6 heures d'évaluation. Cela pourrait justifier dans l'aspect clinique, le changement du pansement toutes les 24 heures ou deux fois par jour jusqu'à éradiquer l'infection de la plaie.

3.1.5 Conclusion

La fonctionnalisation du textile PET avec le CHT-CTR ou la CD-CTR a permis l'obtention d'un support riche en fonctions carboxyliques (COOH). La densité de fonctions COOH est trois fois plus élevée avec **(PET)-CD-CTR** qu'avec (PET)-CHT-CTR ; par conséquent la quantité d'argent fixée a été plus importante sur ce support (**582 ± 21 µg/cm²**). L'argent est adsorbé sous sa forme ionique, réduite ensuite en nanoparticules (Ag⁰) induite à la fois par un traitement thermique et par les polysaccharides (polyols).

La construction du système PEM a montré une évolution linéaire du gain de masse des textiles en fonction du nombre de bicouches déposées, quel que soit le support utilisé et le temps de construction des assemblages. Un temps de construction **d'une minute par couche** a été retenu. Le traitement thermique apporté sur les supports activés par l'argent (CHT-CTR-AgTT et CD-CTR-AgTT) a permis de limiter la perte d'argent lors de l'assemblage. Le système PEM a notamment permis de **limiter la diffusion de l'argent** hors du dispositif notamment dans les exsudats simulés comparativement au pansement commercial *UrgoTul®-Ag*. De plus, l'application du système PEM a permis **d'améliorer la capacité d'absorption** des exsudats simulés de manière appropriée pour exercer un traitement détersif des plaies infectées.

Les supports chargés par l'argent avec ou sans le système multicouche ont montré une **activité antibactérienne importante sur *S. aureus* et *E. coli***. L'activité antibactérienne de nos supports était plus rapide sur *E. coli* (6 log de réduction en 2 heures) que sur *S. aureus* (3 log de réduction en 24 heures). Les deux supports (CHT-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM) ont montré une activité antibactérienne au moins aussi importante que *UrgoTul®-Ag* voire meilleure notamment sur *E. coli*.

Parmi les deux types de supports obtenus, c'est le textile fonctionnalisé par la CD-CTR qui a montré une meilleure capacité d'adsorption d'argent, une libération d'argent limitée et surtout une activité antibactérienne plus importante contre *S. aureus* et *E. coli* que ceux fonctionnalisés avec CHT-CTR. Ainsi, le textile **CD-CTR-AgTT-PEM** a été choisi pour la suite du travail. Ce support sera chargé par l'ibuprofène afin de lui conférer une propriété complémentaire (antidouleur) pour le traitement des plaies infectées et douloureuse.

ACTIVATION DU PANSEMENT AVEC L'IBUPROFENE

3.2 Activation du pansement avec l'ibuprofène

L'objectif de cette partie est de charger le pansement à l'argent avec un second principe actif pour lui donner des propriétés antalgiques. L'ibuprofène a été sélectionné comme principe actif, il est disponible sous sa forme carboxylique (IBU, lipophile) et sa forme lysinate (IBU-L, hydrophile). Dans un premier temps, une étude fondamentale a été menée pour étudier le complexe d'inclusion entre la β CD et l'ibuprofène. Ensuite les études d'adsorption de l'IBU sur le pansement ont été menées pour optimiser le chargement et évaluer le profil de libération de l'argent et de l'IBU. Finalement l'activité antibactérienne a été réalisée pour évaluer l'impact de l'ajout d'IBU dans le pansement à l'argent.

3.2.1 Etude de la complexation entre l'ibuprofène et la CD

3.2.1.1 Diagramme de solubilité

Les CDs sont connues pour augmenter la solubilité de nombreux principes actifs dans l'eau grâce à la formation de complexes d'inclusion (135). L'ibuprofène est un principe actif peu soluble dans l'eau (Classe II ; 21 mg/L à 25°C), et sa structure moléculaire en fait un bon candidat pour une inclusion dans les cyclodextrines. Une étude de sa solubilité en présence de la β CD et du polymère (PCD), tous les deux préparés dans un tampon (KCl 0,2 M et HCl 0,1 M) à pH 2,5, a été réalisée selon la méthode de Higuchi et Connors (251). Le diagramme de solubilité permet également de déterminer la constante de formation (K_f) (ou constante d'association (K_{ass})) et l'efficacité de complexation (CE) de la β -CD et du PCD testés.

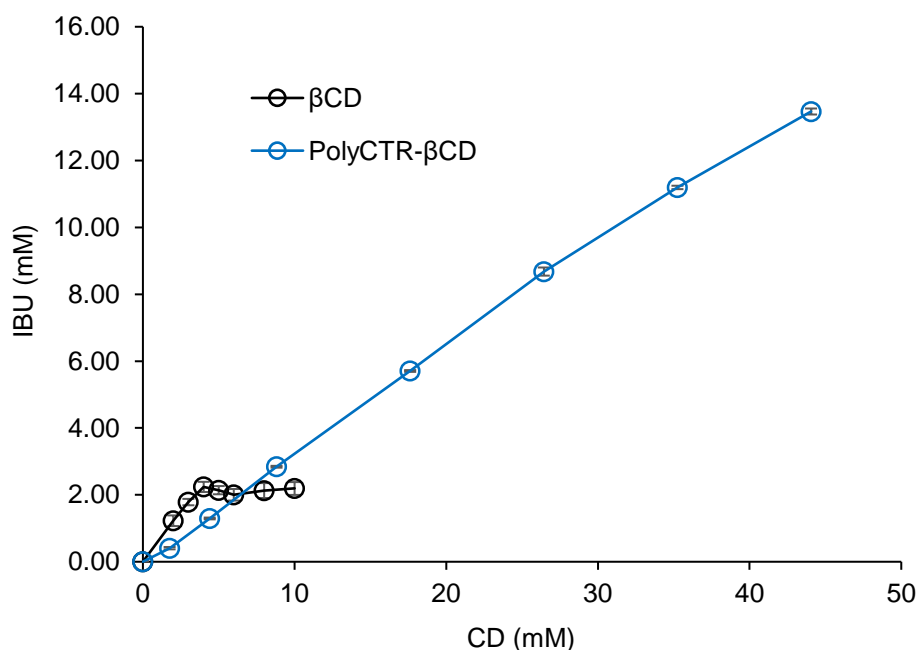


Figure 77. Solubilité de l'IBU base en présence de β CD ou du polymère de β CD (PCD contenant 50% en masse en équivalent β CD déterminé par RMN 1H)

La **Figure 77** présente le diagramme de solubilité de l'IBU base en présence de solutions de concentration croissante de β CD et de PCD (50% en équivalent β CD déterminé par RMN 1H).

En présence de PCD, le diagramme de solubilité de l'IBU présente un profil de type A_L, ce qui indique une augmentation linéaire de la solubilité de l'IBU base en fonction de la concentration de PCD. En revanche, en présence de β CD le profil est de type B_S, qui fait référence à l'augmentation linéaire de la solubilité de l'IBU et puis l'obtention d'un plateau indiquant une solubilité limitée suivi d'une précipitation.

La solubilité intrinsèque expérimentale de l'IBU dans l'eau est très faible, 2,8 μ M (3 mg/L) à température ambiante. Cependant, lorsque l'IBU est solubilisée dans une solution de PCD à 44 mM (50 g/L) en équivalent β CD, sa solubilité est multipliée par 4000 pour atteindre une concentration de 13 mM (2,78 g/L). Le diagramme de solubilité montre que la faible solubilité de la β CD (limité environ 10 mM) est un facteur limitant de cette dernière, par comparaison avec celle du PCD sensiblement plus élevée (> 1g/L) Ainsi comme observé sur le diagramme de solubilité (**Figure 77**) on peut augmenter sensiblement la solubilité de l'ibuprofène jusqu'à 13 mM pour une concentration de 44 mM en équivalente à β CD.

La constante de formation (K_f) du complexe d'inclusion et l'efficacité de complexation (CE) de la β CD et du PCD sont présentées dans le **Tableau 12**, ces deux constantes sont calculées à partir de la pente de chaque droite et de la solubilité intrinsèque de l'IBU (S_0) avec les formules suivantes (251) :

$$K_f = \frac{\text{pente}}{S_0 (1 - \text{pente})}$$

$$CE = \frac{\text{pente}}{1 - \text{pente}}$$

Tableau 12. Valeurs de la constante de formation (K_f) et l'efficacité de complexation (CE) de la β CD et du PCD

	$K_f(M^{-1})$	CE	Pente
β CD	460	1,30	0,56478
PCD	172	0,42	0.32767

Les valeurs de la constante de formation (K_f) et de l'efficacité de complexation (CE) de PCD sont plus faibles que celles mesurées pour la β CD native. Cela traduit d'un meilleur effet solubilisant de la β CD par rapport au PCD à des faibles concentrations (0 à 5 mM) comme le montre la **Figure 77**. Dans la majeure partie des cas (93,252), le réseau polymère permet d'augmenter la solubilité

des principes actifs par un effet associatif avec les cavités des CDs. Dans le cas présent, l'ibuprofène est sous sa forme carboxylique (tampon KCl 0,2 M et HCl 0,1 M, pH 2,5) et n'a donc pas d'autres interactions possibles avec le PCD que l'inclusion. Ainsi, pour les faibles concentrations, l'encombrement stérique du réseau hyper-branché du polymère de cyclodextrine gêne la formation des complexes d'inclusion et ne permet pas de capter plus d'IBU que la forme monomère. En revanche, la très grande solubilité du PCD permet d'atteindre des concentrations beaucoup plus élevées en unités CD que la CD native, (44mM (50 g/L) au lieu de 5 mM (6 g/L) pour la β CD) et une solubilité apparente de l'IBU de 13 mM (2,78 g/L) (contre seulement 2mM pour la β CD (450 mg/L)). Enfin, les valeurs des pentes à l'origine de deux courbes obtenues sont respectivement de 0,56478 et 0.32767 pour la β CD et le PCD. Ces valeurs sont inférieures à l'unité ce qui indique que les complexes d'inclusion sont de type 1 :1 (253).

3.2.1.2 Résonance magnétique nucléaire du proton H1 (RMN 1H)

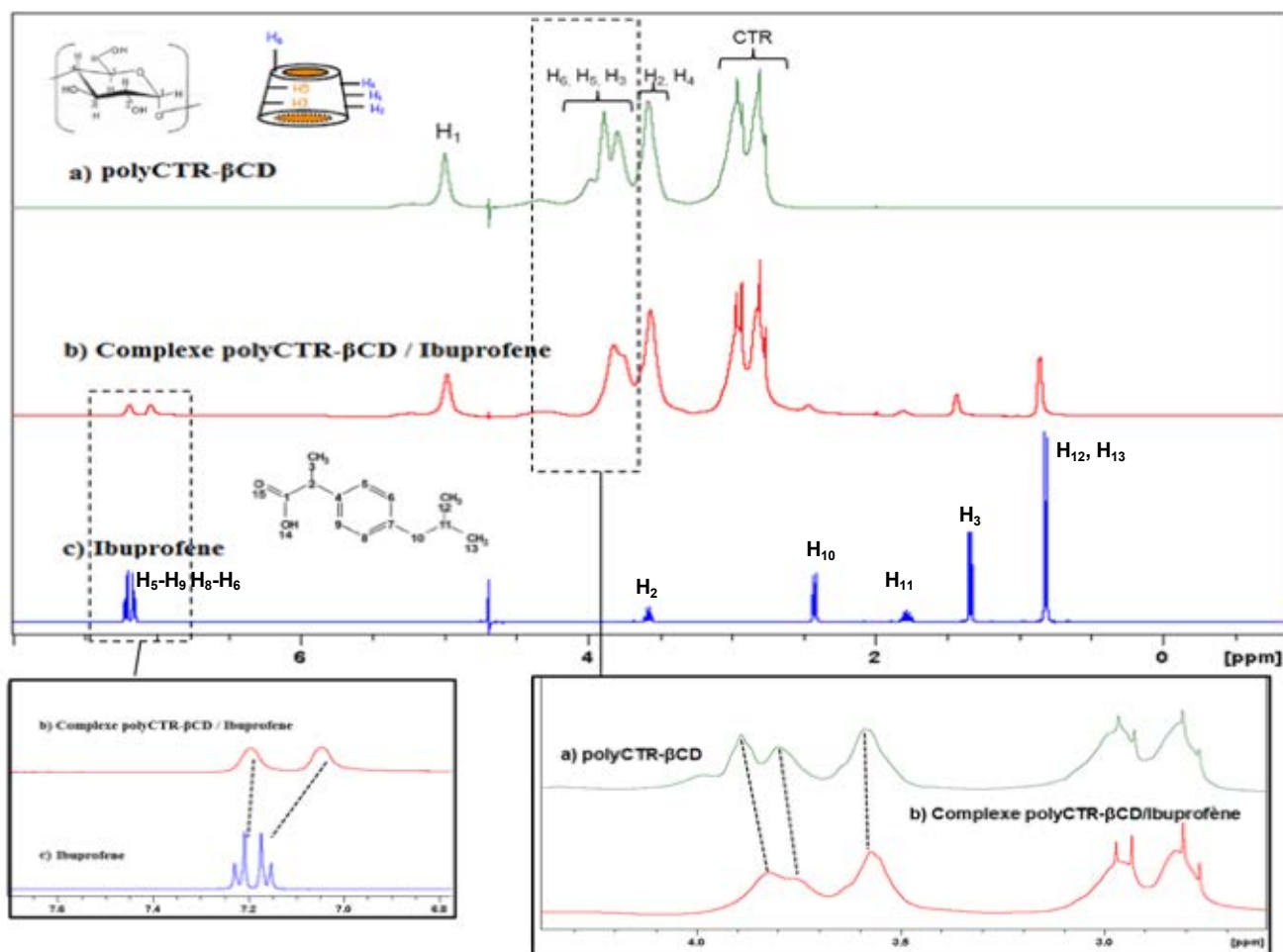


Figure 78. ^1H NMR dans le D_2O du polyCTR- β CD (a), du complexe polyCTR- β CD/Ibuprofène (b) et de l'ibuprofène

Une étude de RMN ^1H a été réalisée afin de mettre en évidence la complexation entre l'ibuprofène (IBU) et le PCD. Pour cela, un mélange équimolaire de 25 mM d'IBU et de PCD a été

préparé. La **Figure 78** montre les spectres du PCD, du complexe PCD/IBU et de l'IBU. Le spectre correspondant à la PCD (**Figure 78 A**), montre le signal des unités glucopyranoses des cyclodextrines H₁ à 5 ppm ; les signaux des protons H₃, H₅, H₆, H₄ et H₂ sont situés entre 3,58 et 3,99 ppm. Les groupes méthylènes de l'agent réticulant (CTR) apparaissent entre 2,76 et 2,96 ppm. Le spectre de l'IBU (**Figure 78 C**) montre le signal des groupes aromatiques (doublets) H₅, H₆, H₈ et H₉ entre 7,05 et 7,24 ppm.

Concernant le complexe PCD/Ibuprofène, le spectre présenté dans la **Figure 78 B** montre un déplacement chimique des signaux des protons aromatiques de l'IBU mettant en évidence une complexation avec le PCD. D'autre part, un déplacement chimique des protons H₅ et H₃ correspondant aux protons internes des cavités de cyclodextrines est également mis en évidence.

Le complexe PCD-ibuprofène a été analysé par RMN ¹H en appliquant une séquence ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) à partir d'un mélange équimolaire de ces deux composés. La **Figure 79** montre une tâche de corrélation qui apparait entre H₃ et H₅ des cavités des cyclodextrines et les protons aromatiques de l'ibuprofène mettant en évidence l'interaction de ces composés révélant que l'IBU est inclus dans les cavités des βCD du PCD.

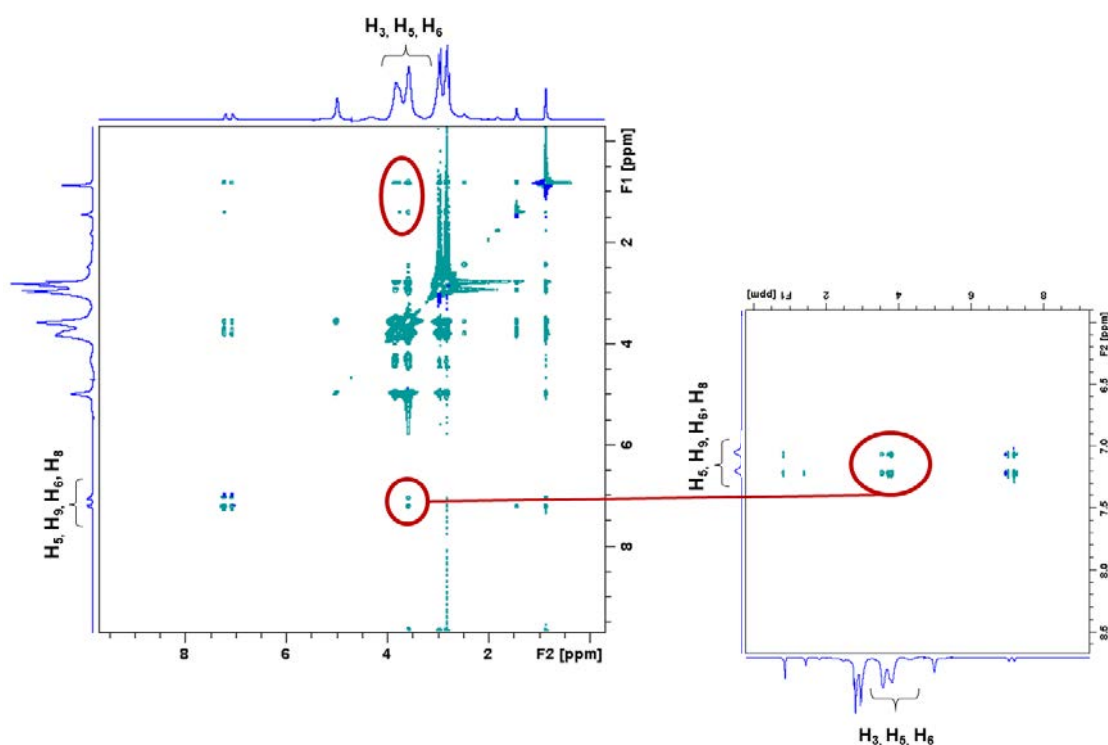


Figure 79. Spectre 2D ROESY du mélange équimolaire du PCD (25 mM) et de l'IBU base (25 mM). (b) Agrandissement Spectre 2D ROESY du mélange équimolaire du PCD (25 mM) et de l'IBU base (25 mM). Le cercle rouge indique la tâche de corrélation correspondant à l'inclusion de l'IBU base dans les cavités de βCD du PCD

3.2.2 Etude d'adsorption et libération de l'ibuprofène

3.2.2.1 Cinétique d'adsorption

Le temps d'imprégnation d'un support dans un principe actif est un paramètre important afin d'atteindre un taux de chargement optimal. Ici, la cinétique d'adsorption de l'ibuprofène dans les pansements CD-CTR-AgTT-PEM a été évaluée. Pour cela, les textiles (\varnothing 11 mm) ont été imprégnés dans une solution d'ibuprofène de concentration définie pendant différents temps.

Dans le cas de l'IBU, la concentration de la solution d'imprégnation utilisée a été de 1g/L soit légèrement en dessous de sa solubilité maximale dans le PBS pH 7,4 qui est de 1,3 g/L. Pour le IBU-L, la concentration utilisée a été de 10 g/L. Après l'étape d'imprégnation, un rinçage dans le PBS pH 7,4 a été réalisé pour éliminer l'excès d'ibuprofène (non adsorbé par les pansements) et ainsi obtenir une quantification précise.

La **Figure 80 A** présente la quantité d'IBU et d'IBU-L adsorbée sur les pansements CD-CTR-AgTT-PEM à différents temps (0,08 ; 0,25 ; 0,5 ; 1, 4 et 24 heures). Pour plus de lisibilité, les courbes ont été tracées jusqu'à 4 heures, la **Figure 80 B** représentant la quantité d'IBU adsorbée en pourcentage a été calculée par rapport à la quantité d'ibuprofène adsorbée à 24 heures ($56 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour l'IBU base est de $187 \pm 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour l'IBU-L).

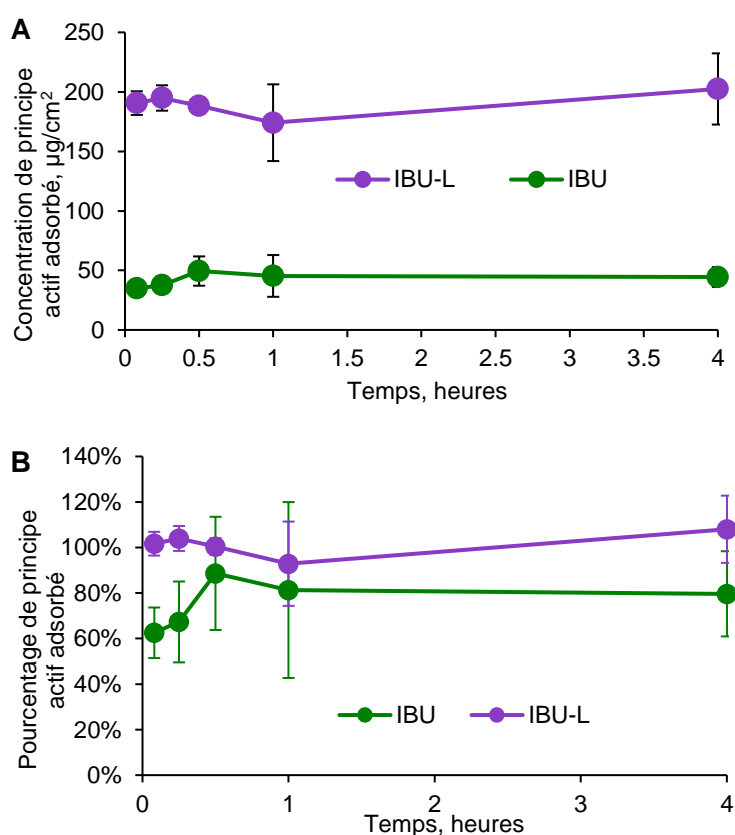


Figure 80. Quantité d'ibuprofène adsorbée par le pansement CD-CTR-AgTT-PEM en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (a) et en pourcentage (b) en fonction du temps d'imprégnation dans des solutions d'IBU base (1g/L) ou d'IBU-L (10g/L) préparées dans le PBS pH 7,4, avec un rapport de bain de 5 mL

Concernant l'IBU base, une augmentation progressive de l'adsorption sur le pansement est observée jusqu'à 30 minutes pour atteindre un plateau. La cinétique d'adsorption dans ce cas, est très rapide dès les 5 premières minutes représentant un taux de chargement de plus de 60% ($35 \pm 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La quantité maximale (compte tenu des écarts types) d'IBU adsorbée par les pansements, est atteinte à 30 minutes, représentant un taux de chargement de 89% ($49 \pm 12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Un temps d'imprégnation de 30 minutes dans une solution à 1 g/L, est donc suffisant pour réaliser un chargement optimal de l'IBU dans les pansements.

Dans le cas de l'IBU-L, la cinétique d'adsorption est très rapide comparativement à l'IBU. En effet, 5 minutes d'imprégnation sont suffisantes pour avoir un taux de chargement de 94% ($190 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Le phénomène d'adsorption serait différent entre les deux formes de l'ibuprofène et le pansement. Dans les deux cas, l'ibuprofène, lipophile est sous sa forme carboxylate car le milieu est tamponné à pH 7,4, donc au-delà du pKa du groupe COOH de l'ibuprofène (4.4 à 5,2 selon la littérature). La différence des solubilités des deux formes d'ibuprofène s'explique par la nature de leurs contre ions. Le lysinate est un sel amphotère qui confère à l'IBU-L sa plus grande solubilité.

Ainsi la différence entre les concentrations de l'IBU-base (1 g/L) et IBU-L (10 g/L) utilisées pour cette étude de cinétique d'adsorption explique le chargement plus rapide de l'IBU-L et son taux de chargement 4 fois plus élevé par rapport à l'IBU-base.

3.2.2.2 Isothermes d'adsorption

Dans le but de mieux connaître les phénomènes d'adsorption entre l'IBU-L et le pansement CD-CTR-AgTT-PEM, l'isotherme d'adsorption a été réalisé. Pour cela, des échantillons (\emptyset 11 mm) ont été imprégnés pendant 24 heures dans une solution d'IBU-L (5 mL par disque) à concentrations variables entre 0,01 g/L et 10 g/L. L'adsorption est considérée en tant qu'une réaction d'équilibre.

La **Figure 81** montre la quantité d'IBU-L adsorbée à l'équilibre (q_e), en fonction de la concentration d'ibuprofène à l'équilibre (C_e). Tout d'abord, la quantité d'IBU-L adsorbée sur le pansement augmente en fonction de la concentration d'IBU-L utilisée pour l'imprégnation avec toutefois deux parties dans la courbe. Une augmentation de la quantité d'IBU-L adsorbée est observée lorsque la concentration de la solution d'imprégnation passe de 0.1g/L ($3,26 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) à 1 g/L ($93 \pm 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Soit environ 30 fois plus d'IBU-L adsorbée quand la concentration de la solution d'imprégnation est multipliée par 10. Par contre, la quantité d'IBU-L adsorbée est seulement multipliée par 1,7 lorsque la concentration d'imprégnation passe de 1g/L ($93 \pm 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) à 10 g/L ($163 \pm 33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). L'IBU suit la même tendance que l'IBU-L, toutefois la courbe s'arrête à 990 mg/L d'ibuprofène dû à la limite de solubilité de cette forme dans l'eau.

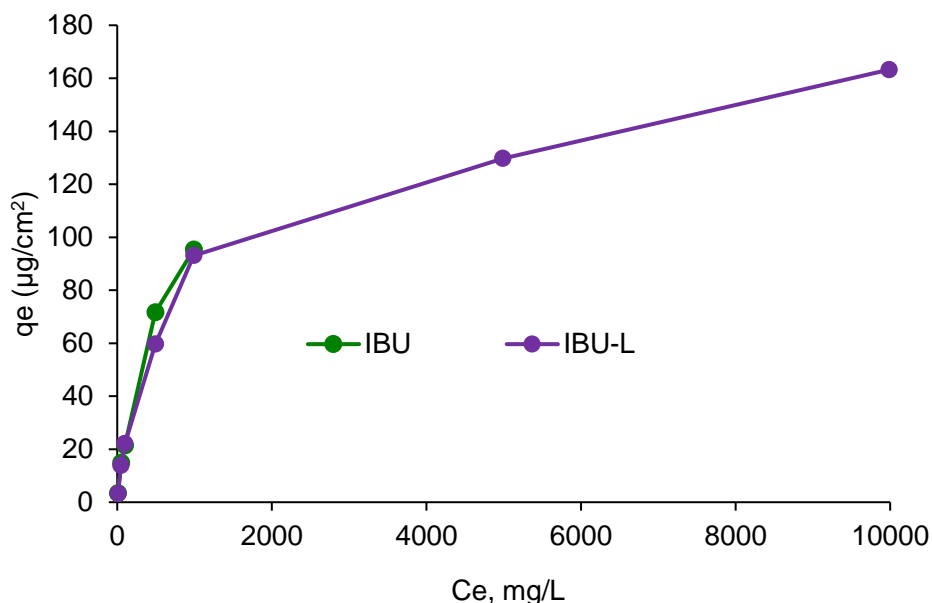


Figure 81. Isotherme d'adsorption de l'IBU et de l'IBU-L sur les pansements CD-CTR-AgTT-PEM imprégnés pendant 24 heures à température ambiante.

La linéarisation des données obtenues à partir de l'isotherme d'adsorption rapporte un modèle d'adsorption qui se rapproche de celui du modèle de Langmuir (**Figure 82 A**). En effet, la linéarisation de C_e/q_e en fonction de C_e représente une droite ($R^2 = 0,9898$). En revanche, la linéarisation des données en relation au modèle de Freundlich (**Figure 82 B**) est inférieure (R^2 étant de 0,9477) à celle de Langmuir, donc le modèle le plus proche dans ce cas est celui de Langmuir.

Cela permet de conclure que l'adsorption de l'IBU-L se fait par interaction entre un site actif du support et une molécule de IBU-L, contrairement au modèle de Freundlich dans lequel l'adsorption molécule/support est non spécifique, c'est-à-dire qu'il y a des interactions entre les molécules adsorbées en plus des interactions site actif-molécule.

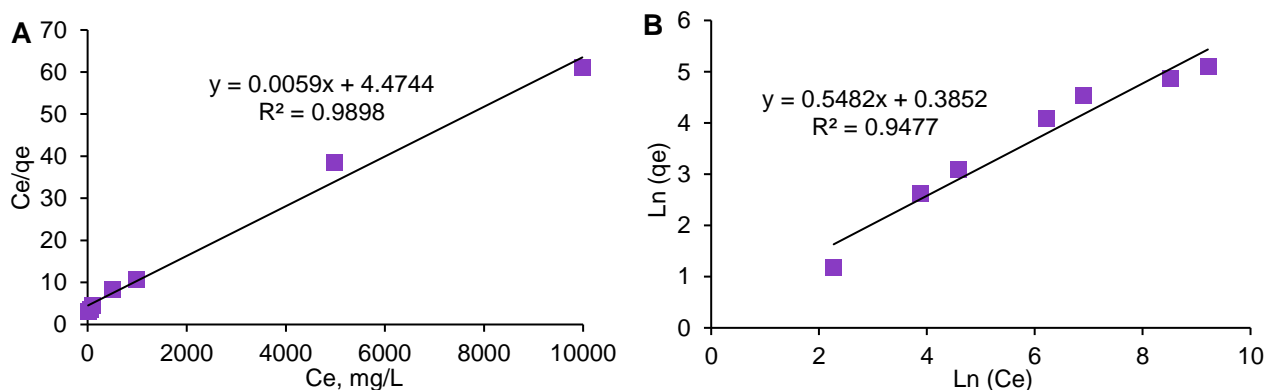


Figure 82. Représentation graphique du modèle de Langmuir (a) à travers la linéarisation de C_e/q_e en fonction du C_e ($R^2 = 0,9898$) et représentation graphique du modèle de Freundlich (b) à travers la linéarisation de $\ln(q_e)$ en fonction du $\ln(C_e)$ ($R^2 = 0,9477$) des supports CD-CTR-AgTT-PEM.

L'ensemble des résultats obtenus sur la constante d'équilibre de Langmuir, la capacité d'adsorption à saturation et la constante d'énergie d'adsorption sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. Récapitulatif des résultats de l'isotherme d'adsorption de l'IBU-L sur le pansement CD-CTR-AgTT-PEM selon le modèle de Langmuir.

Modèle	Constante d'équilibre de Langmuir, K_L	Capacité d'adsorption à saturation, « q_m » ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Constante d'énergie d'adsorption (b)
Langmuir	163	4,47	36,48

Concernant l'IBU-base, la solubilité n'est pas assez importante pour pouvoir faire la linéarisation. En effet, la saturation est atteinte dès 1g/L, nous pouvons simplement conclure que plus la concentration du bain d'imprégnation augmente et plus la quantité d'IBU adsorbée augmente (q_e maximale atteint : $95 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Les pansements seront donc chargés avec l'IBU-L dans la suite de ce travail.

3.2.3 Adsorption et libération de l'IBU-L sur les différents supports

3.2.3.1 Adsorption

Les échantillons textiles (\varnothing 11 mm) correspondant à (PET)-CD-CTR, CD-CTR-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM ont été imprégnés dans des solutions d'IBU-L à 3 concentrations différentes : 1, 5 et 10 g/L pendant 24 heures à température ambiante. Cette analyse d'adsorption a été réalisée afin de déterminer dans un premier temps la concentration de la solution d'imprégnation d'IBU-L pour laquelle le pansement adsorberait une dose appropriée pour soulager la douleur (en comparaison avec le pansement commercial *BIATAIN® IBU*, $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Dans un second temps, l'objectif a été d'évaluer la performance du système PEM dans le chargement du principe actif notamment en présence d'argent.

La **Figure 83** présente la quantité d'IBU-L adsorbée dans les différents textiles après imprégnation dans des solutions d'IBU-L à différentes concentrations (1, 5 et 10 g/L). Les résultats rapportent que si la concentration d'imprégnation augmente, l'adsorption d'IBU-L augmente. Cette tendance a été déjà montrée dans le cas des isothermes d'adsorption. Le textile (PET)-CD-CTR montre une quantité relativement faible d'IBU-L adsorbée en comparaison du groupe CD-CTR-PEM. En effet, la quantité d'IBU-L adsorbée sur le (PET)-CD-CTR est de 51, 65 et $105 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ lorsque les textiles sont imprégnés dans des solutions d'IBU-L de 1, 5 et 10g/L respectivement. Dans le même temps, la quantité d'IBU-L adsorbée sur le CD-CTR-PEM est de 109, 173 et $214 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ soit plus du double. Toutefois, le PCD permet d'adsorber de l'ibuprofène ce qui est impossible pour un textile en PET non fonctionnalisé. En effet, le textile PET vierge a été également imprégné dans l'IBU-L avec les mêmes concentrations mais la quantité adsorbée n'a pas été détectable. Ceci met en évidence l'importance de l'utilisation du PCD dans le chargement des principes actifs sur un textile.

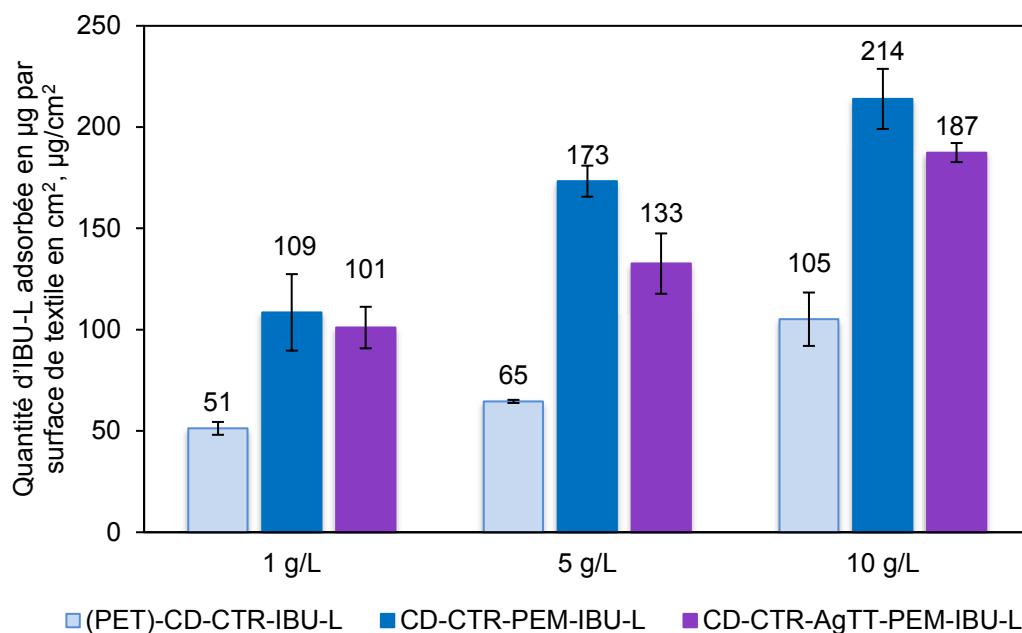


Figure 83. Quantité d'IBU-L adsorbée par (PET)-CD-CTR, CD-CTR-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM. Les concentrations d'imprégnations ont été de 1, 5 et 10 g/L. Le dosage a été réalisé par HPLC-UV à 225 nm.

D'autre part, le pansement CD-CTR-AgTT-PEM a montré une quantité d'IBU-L adsorbée plus faible que les textiles sans argent, quelle que soit la concentration d'imprégnation utilisée. Ce phénomène est probablement dû au fait que les nanoparticules d'argent interagissent avec les fonctions amines et carboxyliques des couches thermo-fixées et auto-assemblés du système PEM, ceci affecte donc la capacité d'adsorption du revêtement vis-à-vis de l'IBU-L.

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que la concentration d'IBU-L à 10 g/L permet une adsorption maximale du principe actif dans les textiles sans toutefois parvenir aux dosages obtenus sur le pansement commercial (*Biatain® IBU*, 500 µg/cm²). Cette concentration a tout de même été sélectionnée pour charger l'ibuprofène les pansements CD-CTR-AgTT-PEM et évaluer le pansement final nommé **CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L**.

3.2.3.2 Cinétique de libération

La cinétique de libération de l'IBU-L dans le PBS pH 7,4 a été évaluée en conditions statiques, afin de connaître la performance du système PEM pour former un système à libération contrôlée. Le **Figure 84** montre la quantité d'IBU-L libérée exprimée en µg/cm² en fonction du temps. Le textile (PET)-CD-CTR-IBU-L libère 80 ± 8 µg/cm² après 30 minutes, représentant un taux de 76% par rapport au dosage initial, un effet *burst* est donc observé. Ensuite, la totalité de l'IBU-L a été libérée en 1 heure. Ces résultats montrent que l'application d'une seule couche (étape de fonctionnalisation, couche #1) n'est pas suffisante pour obtenir une libération prolongée. En revanche, les textiles fonctionnalisés avec le système PEM ont montré un profil de libération plus prolongé. Le pansement sans argent CD-CTR-PEM-IBU-L atteint une concentration de 116 ± 5 µg/cm² après 30 minutes, ce

qui représente un taux de 54%. Puis, la totalité de l'IBU-L ($200 \pm 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) chargé est libéré pendant 6 heures. La même tendance est observée pour le pansement final CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L. En effet, la quantité d'IBU-L libérée après 30 minutes atteint $104 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, soit un taux de 56% et finalement, la totalité de l'IBU-L ($187 \pm 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) se libère après 6 heures également.

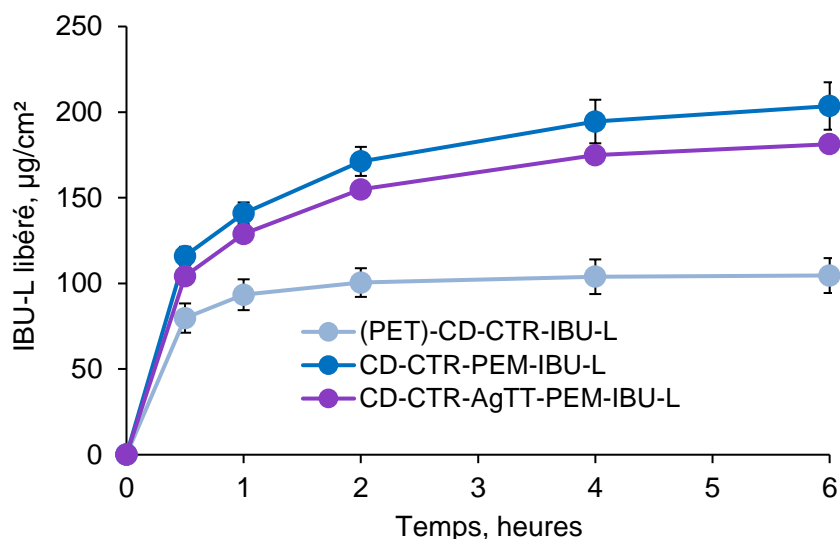


Figure 84. Quantité d'IBU-L libéré dans le PBS pH 7,4 (37°C, 80 rpm) à partir des textiles (PET)-CD-CTR, CD-CTR-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM en fonction du temps.

L'apport du système PEM aux supports textiles, permet une libération plus lente de l'IBU-L par rapport aux textiles fonctionnalisés avec la seule couche (PET)-CD-CTR. Des travaux de recherche développés au sein du laboratoire confirment que la libération de principes actifs est plus lente pour des supports modifiés par ces assemblages multicouches. Dans une thèse précédente, il a été aussi constaté que le profil de libération de chlorhexidine dépendait également du nombre de couches apportées ainsi que de l'application d'un traitement thermique (130,145,254).

Ces tests de libération ont été réalisés en batch, et la libération sur 6h observée peut apparaître comme rapide ; en revanche, ces conditions sont différentes de celles de l'application visée où le pansement est appliqué sur une plaie soumise à un flux d'exsudats très limité. Des modèles plus proches sont donc à étudier. Par exemple, Steffansen et Herping ont développé un modèle de libération *in vitro* du pansement commercial *Biatain® Ibu* dans des cellules de diffusion de Franz (255). L'étude conclut que la libération complète de l'ibuprofène (dose de 500µg) a lieu dans les 7 jours avec une cinétique de libération d'ordre zéro. Les résultats obtenus avec ce modèle *in vitro* ont été bien corrélés avec les données collectées du modèle de libération *in vivo* des pansements proposés par Jorgensen *et al* (256). Le modèle de libération *in vitro* proposé par Steffansen et Herping pourrait être donc appliqué à nos pansements.

3.2.4 Evaluation microbiologique du pansement optimisé

L'évaluation microbiologique du pansement optimisé a été réalisée afin de déterminer si l'ibuprofène influe de manière positive ou négative sur les propriétés antibactériennes de l'argent. Pour cela, le test de *Kirby-Bauer* et le test de *Kill time* ont été développés.

3.2.4.1 Test de diffusion (Kirby – Bauer)

La **Figure 85** montre la mesure du diamètre d'inhibition sur *E. coli* de différents pansements (\varnothing 11 mm) fraîchement préparés ou immergés dans le PBS (pH 7,4) jusqu'à 3 jours, afin de simuler la durée du traitement. Le diamètre d'inhibition présenté par le pansement commercial *UrgoTul®-Ag* (15 ± 0 mm) est similaire au textile CD-CTR-AgTT (16 ± 1 mm) après 3 jours. Lorsque le système PEM est appliqué, le diamètre d'inhibition du pansement CD-CTR-AgTT-PEM est de 16 ± 1 mm au début de l'analyse et se réduit à $14,6 \pm 0,6$ mm après 3 jours. D'autre part, le pansement final contenant l'IBU-L n'a pas montré de différences significatives sauf à T0 probablement dû à une perte d'argent lors de la phase d'imprégnation du pansement dans l'IBU-L pendant une nuit. En effet, le diamètre d'inhibition à T0 est de $14,67 \pm 0,58$ mm contre $16,33 \pm 0,58$ mm pour le pansement sans l'IBU-L pour finalement atteindre une inhibition de 15 ± 1 mm après 3 jours sans différences significatives entre les deux pansements. Ces résultats montrent que les diamètres d'inhibition sont similaires entre tous les groupes évalués quel que soit le temps d'analyse, ce qui met en évidence que l'ibuprofène n'interfère pas sur la diffusion de l'argent à travers les assemblages multicouches.

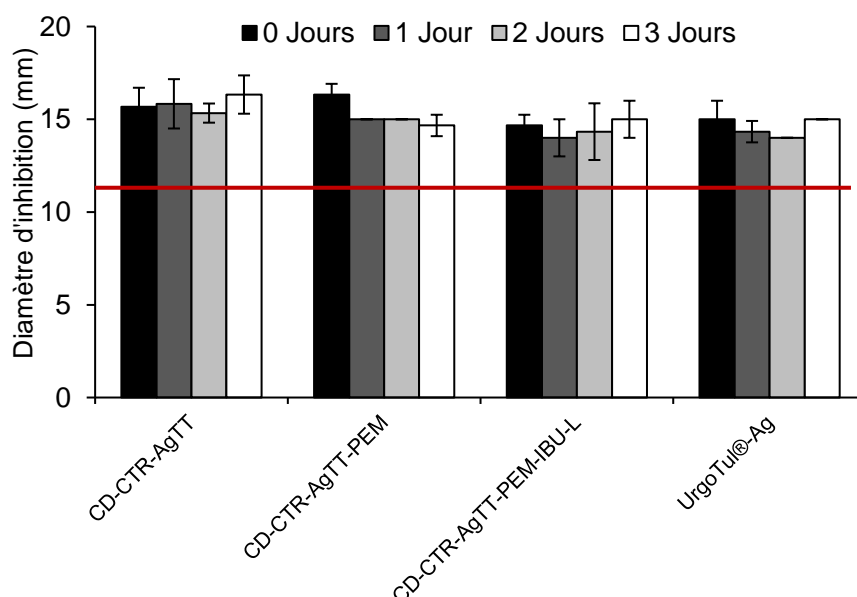


Figure 85. Mesures du diamètre d'inhibition sur *E. coli* pour les différents pansements fraîchement préparés ou immergés dans le PBS (pH 7,4 ; 37°C ; 80 rpm) pendant 1, 2 et 3 jours. La ligne rouge dans l'histogramme indique le diamètre (\varnothing 11 mm) des supports textiles placés sur les géloses Muller Hinton

3.2.4.2 Cinétique de réduction bactérienne

La **Figure 86** montre la cinétique de réduction de la population bactérienne (UFC/mL) de *S. aureus* et d'*E. coli* respectivement, lorsqu'ils ont été mis en contact avec les différents pansements. Sur *S. aureus*, (**Figure 86 A**) les différents pansements y compris *UrgoTul®-Ag* présentent un profil de réduction bactérienne similaire jusqu'à 6 heures d'évaluation avec une réduction de 2,95 log. Après 24 heures, *UrgoTul®-Ag* atteint une réduction bactérienne de 3,18 Log₁₀ alors que le CD-CTR-AgTT-PEM atteint 5 Log₁₀. D'autre part, l'activité antibactérienne du pansement final avec l'IBU-L présente une réduction bactérienne légèrement inférieure au pansement sans IBU-L avec 4 Log₁₀ après 24 heures.

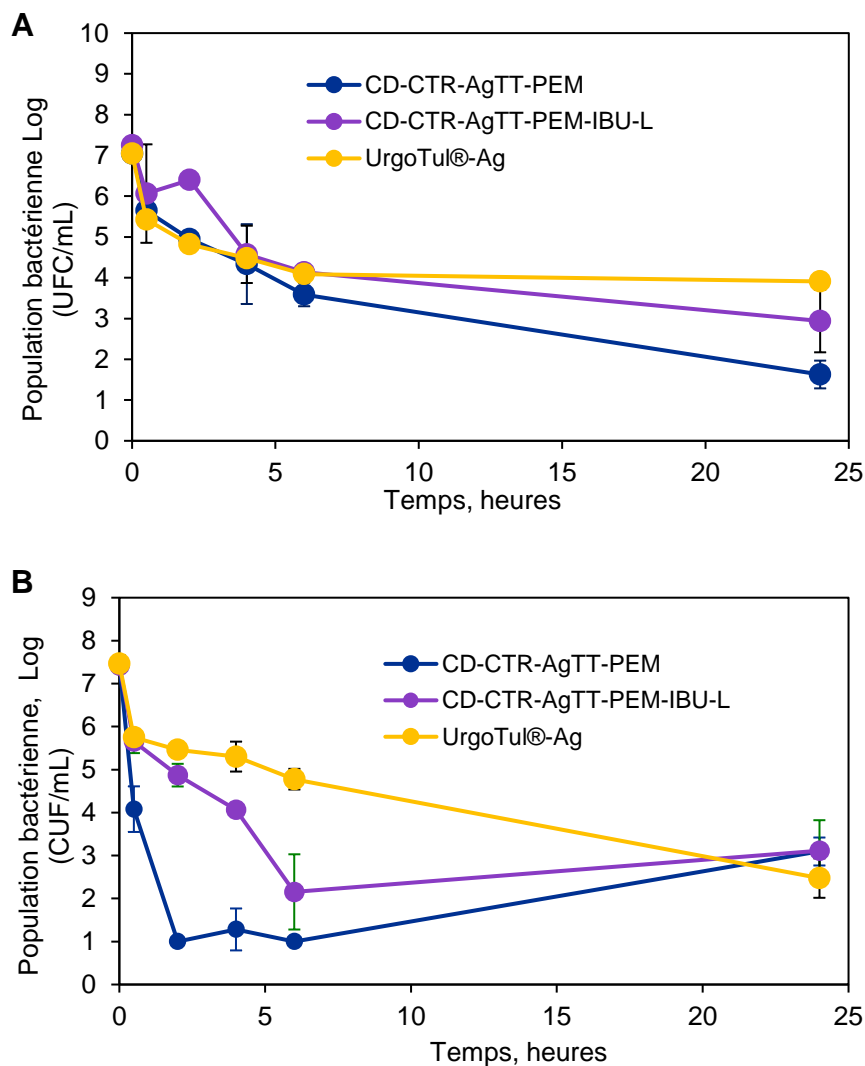


Figure 86. Cinétique de réduction bactérienne de différents pansements incubés avec une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* (a) et de *E. coli* (b) à différents temps (0,5 à 24 heures).

Concernant à *E. coli* (**Figure 86 B**), le pansement *UrgoTul®-Ag* a montré une réduction de 2 Log₁₀ à 30 minutes et puis suit une cinétique de réduction progressive jusqu'à 24h pour atteindre 4 Log₁₀ de réduction. D'autre part, la cinétique de réduction du pansement CD-CTR-AgTT-PEM est

très rapide. Une réduction bactérienne de 4 Log₁₀ après 30 minutes a été observée. Puis, une réduction de 6 Log₁₀ est atteinte après 6 heures de contact. Cependant, après ce temps, la population bactérienne augmente et atteint une réduction de 4 Log₁₀ après 24 heures, similaire à celle de *UrgoTul®-Ag*. Du côté du pansement final avec l'IBU-L, la cinétique de réduction est plus lente que celle du pansement sans l'IBU-L avec une réduction progressive de la population bactérienne jusqu'à 6 heures de contact, la réduction atteignant 5 Log₁₀, et puis suit la même tendance que CD-CTR-AgTT-PEM. Finalement, la réduction bactérienne après 24 heures atteint aussi 4 Log₁₀.

Ces résultats ont montré que le pansement final avec l'IBU-L présente une activité antibactérienne plus lente que le pansement libre d'ibuprofène sur *E. coli* mais reste plus performant que *UrgoTul®-Ag* notamment en terme de vitesse de réduction bactérienne. Le pansement final a rapporté une activité antibactérienne au moins équivalente à celle présentée par *UrgoTul®-Ag* sur les deux souches bactériennes après 24 heures d'évaluation. Cela met en évidence que l'ibuprofène n'interfère que très peu avec les propriétés antibactériennes des pansements à l'argent.

3.2.5 Conclusion

L'ibuprofène a été choisi comme second principe actif pour le pansement CD-CTR-AgTT-PEM de par son activité thérapeutique. Le diagramme de solubilité a permis de mettre en évidence une amélioration de la solubilité de l'IBU en présence de β CD et surtout avec le polymère de cyclodextrine PCD (**13 mM d'IBU pour une concentration de PCD de 44 mM**). La complexation entre l'IBU et le PCD a été validée par RMN 1H puis par une séquence ROESY qui a clairement mis en évidence l'inclusion de l'IBU dans les cavités des β CD du PCD.

La cinétique d'adsorption de l'ibuprofène sous ses deux formes (IBU-L et IBU) a montré une adsorption très rapide (moins de 30 minutes) de l'IBU sur les supports CD-CTR-AgTT-PEM notamment lorsque la concentration du bain d'imprégnation était importante (10 g/L). Dans le cas de l'IBU-L, les isothermes d'adsorption ont révélé un modèle de Langmuir donnant comme hypothèse une interaction de l'IBU sur un site du support textile sans interactions entre les molécules d'IBU-L entre-elles.

D'un point de vue libération, l'application d'un système PEM a permis une libération plus prolongée de l'IBU-L jusqu'à 48 heures comparativement au même support qui ne contient pas le système PEM ((PET)-CD-CTR). Ceci a mis en évidence l'apport non seulement de la couche thermofixée mais surtout du système PEM pour prolonger la libération de l'IBU. Toutefois, comparativement au *Biatain-IBU* (500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), nous n'avons pas adsorbé une quantité aussi importante d'IBU-L sur notre support (214 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

L'évaluation microbiologique du pansement optimisé CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L a permis de montrer que l'ibuprofène n'interférait pas sur les propriétés antibactériennes globales du pansement. La présence d'IBU-L a contribué à ralentir la vitesse d'activité antibactérienne sur *E. coli* qui reste toutefois meilleure que *UrgoTul®-Ag*. Aucun impact majeur de l'IBU sur l'activité antibactérienne du pansement n'a été observé sur *S. aureus*.

Pour conclure, le support CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L a été optimisé en vue d'une évaluation préclinique *in vivo*.

EVALUATION IN VIVO DES PANSEMENTS SUR UN MODELE MURIN

3.3 Evaluation in vivo des pansements sur un modèle murin

L'objectif de cette partie est l'étude *in vivo* des pansements sur un modèle murin. Dans un premier temps, les pansements ont été stérilisés par rayonnements gamma (γ). L'impact de ce traitement a été évalué sur la dégradation du système PEM, la morphologie des supports, la libération simultanée d'argent et d'IBU-L et sur l'évaluation microbiologique *in vitro* du pansement final (CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L). Finalement l'étude *in vivo* des pansements a été réalisée chez les souris C3H/He présentant une plaie infectée par *E. coli* K12 afin d'évaluer leur performance dans le traitement des plaies infectées.

3.3.1 Stérilisation des pansements par rayonnements gamma (γ)

Dans le domaine des dispositifs médicaux implantables (DMI), la stérilisation est une étape essentielle. Les matériaux choisis pour la conception des DMI doivent être résistants aux méthodes de stérilisation tels que les rayonnements X, β , γ , l'oxyde d'éthylène (EtO) ou la chaleur humide. Malheureusement, certaines méthodes peuvent altérer les propriétés mécaniques, la stabilité ou la cytocompatibilité des DMI.

La stérilisation par rayonnements gamma (γ) est largement utilisée dans la stérilisation de produits médicaux à usage unique. Les rayonnements gamma présentent une grande capacité de pénétration et une faible réactivité chimique. D'ailleurs, la température n'augmente pas pendant la procédure et il n'y a pas de résidus chimiques toxiques. Cependant, les rayonnements ionisants peuvent être nuisibles sur les propriétés des biomatériaux utilisés dans la conception de dispositifs médicaux. Il est donc important de connaître la compatibilité des matériaux avec les rayonnements et surtout la dose d'irradiation correcte avant de réaliser la procédure. Le fabricant doit donc analyser les propriétés des dispositifs médicaux avant et après stérilisation, notamment dans le cas de DMI contenant des PA ou de substances biologiques car ils peuvent se dégrader ou perdre de leur activité après stérilisation.

3.3.1.1 Impact des rayonnements gamma (γ)

3.3.1.1.1 Suivi de la dégradation du système PEM

La **Figure 87** représente la perte de masse des pansements avant et après stérilisation gamma (γ) en fonction du temps de dégradation dans le PBS pH 7,4. Après 1 jour, la perte de masse des pansements avant ($1,52 \pm 0,2\%_{wt}$) et après ($2,04 \pm 0,09\%_{wt}$) stérilisation est relativement faible et ne montre pas de différence. Dès le deuxième jour, une différence est mise en évidence. En effet, la perte de masse du pansement avant stérilisation est $1,81 \pm 0,16\%$ contre $3,00 \pm 0,10\%$ après stérilisation. Cette différence s'accroît au cours du temps et la perte de masse des pansements après 7 jours est de $4,23 \pm 0,46\%$ et $7,81 \pm 0,29\%$ avant et après stérilisation, respectivement. Les résultats ont montré que la stérilisation gamma (γ) pourrait interférer dans la stabilité des

assemblages car après 7 jours d'évaluation, la perte de masse de CD-CTR-AgTT-PEM (γ) a été 1,8 fois plus importante qu'avant la stérilisation.

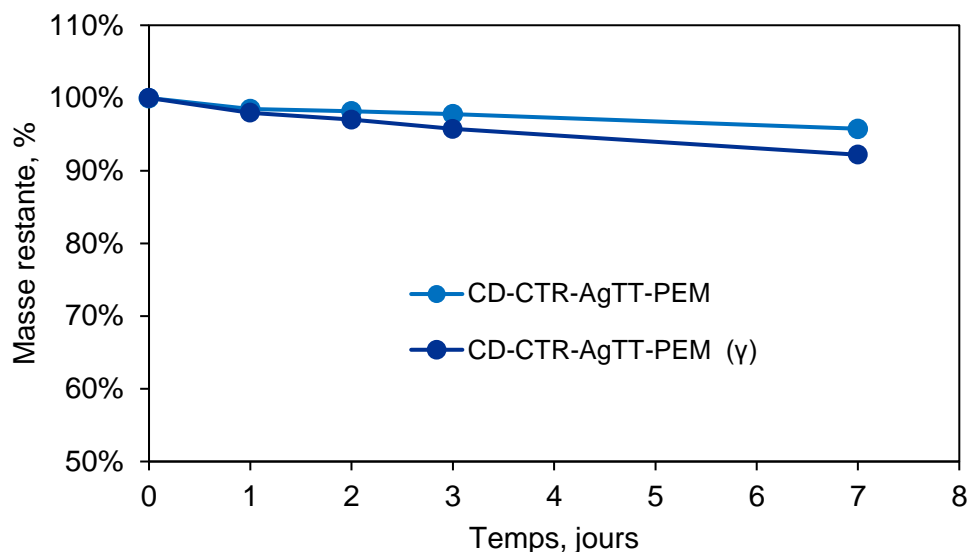


Figure 87. Perte de masse (en %) des pansements CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation gamma (γ) en fonction du temps de dégradation dans le PBS pH 7,4 (37°C, 80 rpm) (n=3, écart type négligeable).

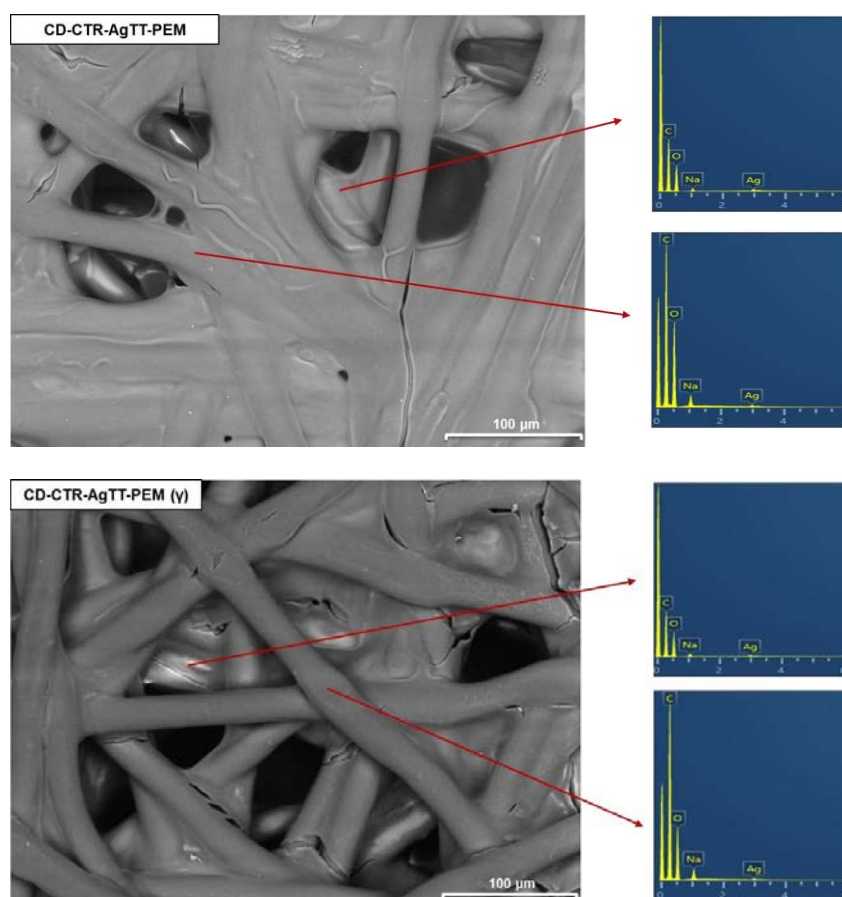
3.3.1.1.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'évaluation de la morphologie des pansements CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation (γ) a été réalisée par MEB. De la même manière, des spectres EDX ont été réalisés à des endroits spécifiques (indiqués par des flèches rouges) dans le but de déterminer s'il existe un changement dans le pourcentage massique du carbone, de l'oxygène et de l'argent.

La **Figure 88** présente les images MEB et les spectres EDX des pansement CD-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM(γ). Quelques nervures et des espaces craquelés sur les revêtements ont été observés sur les deux types des supports, ce qui montre une déshydratation des polymères en réponse au traitement thermique (140°C, 105 min), effectué après la construction des assemblages. Aucune différence significative n'a pu être observée sur le revêtement entre les échantillons stérilisés ou non. Les spectres EDX rapportent la composition élémentaire des pansements ainsi que le pourcentage massique du carbone (C), oxygène (O) et argent (Ag) qui sont présente dans le **Tableau 14**. On peut noter une augmentation significative de la quantité d'oxygène. Les traitements de surfaces comme le plasma froid, le laser ou les rayonnements ont tendance à créer des groupes hydroxydes, peroxydes et hydroperoxydes en surface comme nous avons déjà pu le montrer (257).

Tableau 14. Pourcentage massique du carbone (C), oxygène (O) et argent (Ag), détecté par EDX dans chaque zone analysée sur le pansement CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation (γ).

Textiles	C	O	Ag
CD-CTR-AgTT-PEM	52,15	20,48	0,91
CD-CTR-AgTT-PEM(γ)	51,09	45,17	1,73

Figure 88. Images MEB (X300) et spectres EDX de CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation gamma (γ).

3.3.1.1.3 Libération simultanée de l'argent et de l'IBU-L

La cinétique de libération de l'argent et de l'IBU-L dans le PBS pH 7,4 a été évaluée en condition statique, afin de connaître la performance du pansement final (CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L) dans la libération de ces deux principes actifs. Dans un premier temps, un dosage de l'argent et l'IBU-L a été réalisé afin de déterminer si la stérilisation a eu un impact sur la quantité d'argent ou sur la capacité d'adsorption de l'IBU-L sur les supports.

L'histogramme présenté dans la **Figure 89** montre la quantité d'argent et d'IBU-L adsorbée dans le pansement avant et après stérilisation. Les résultats ne montrent pas de différences entre la quantité d'argent chargée dans les pansements traités ou non par rayonnement (γ). Le même comportement a été observé pour l'IBU-L où l'adsorption de l'antalgique est similaire dans les

pansements ayant ou non subi une stérilisation. La stérilisation par rayonnement gamma n'impacte donc pas la capacité d'adsorption des pansements.

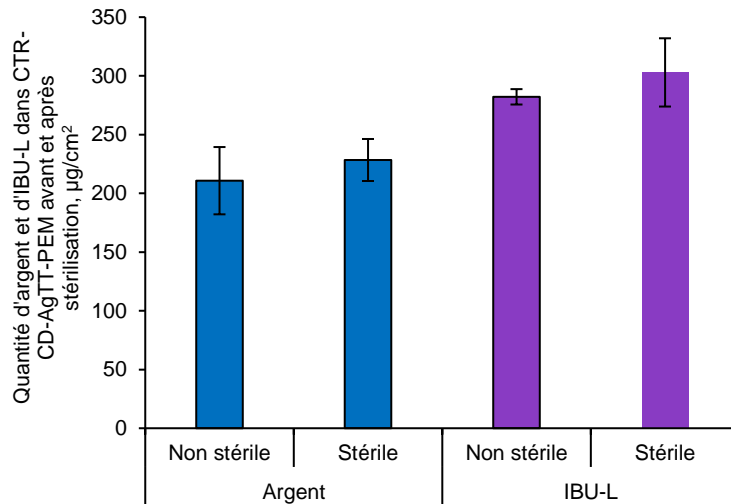


Figure 89. Quantité d'argent et d'IBU-L dans le pansement CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation par rayonnements gamma (n=3). Dosage d'argent effectué par spectroscopie d'absorption atomique et dosage d'IBU-L réalisé par HPLC UV-visible.

La **Figure 90** montre la quantité d'argent et d'IBU-L libérée dans le PBS pH 7,4, exprimée en µg/cm². L'argent se libère de manière prolongée ; il atteint une concentration de $1,86 \pm 0,09$ µg/cm² après 6 heures, ce qui représente un taux de libération de 0,6% par rapport au dosage initial. Néanmoins, l'IBU-L a montré une libération de $130,15 \pm 9,4$ µg/cm², soit un taux de 64 % après 30 minutes, un effet *burst* est donc observé. Après 72 heures, la quantité d'argent libéré est de $4 \pm 0,15$ µg/cm² ce qui représente un taux de 1,4% seulement. L'IBU-L par contre, libère la totalité de la charge initiale après 48 heures.

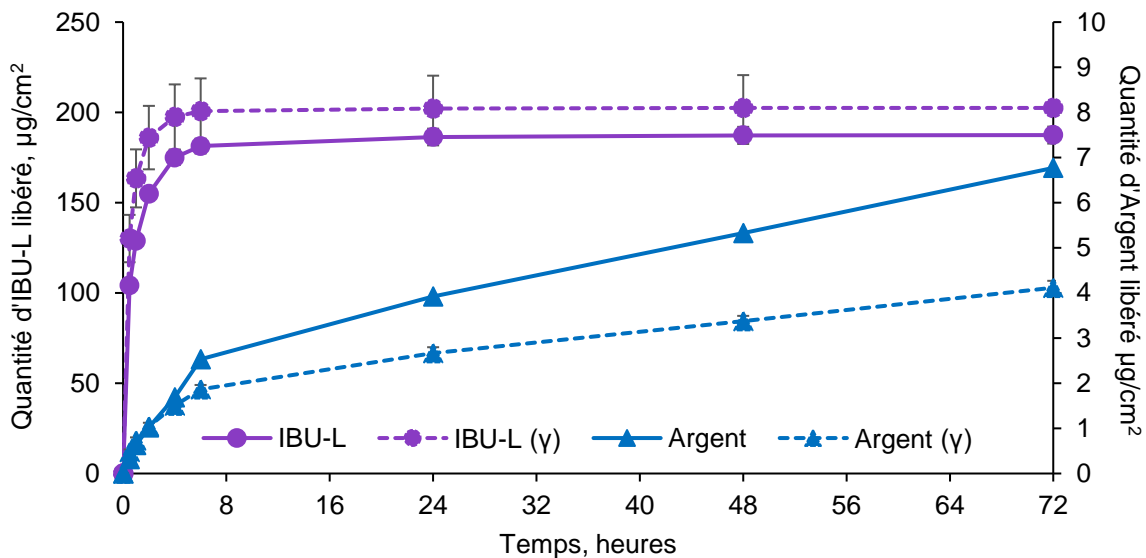


Figure 90. Quantité d'Ag (axe droite) et d'IBU-L (axe gauche) libéré dans le PBS pH 7,4 (37°C, 80 rpm), à partir du pansement CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation gamma.

La stérilisation par rayons gamma impacte favorablement le profil de libération de l'argent. On observe un relargage plus lent, à partir de 6 heures. En revanche, la stérilisation n'a pas d'effet sur la libération de l'ibuprofène.

3.3.1.1.4 *Evaluation microbiologique in vitro*

L'évaluation microbiologique *in vitro* a été réalisée afin de déterminer l'impact de la stérilisation sur les propriétés antibactériennes du pansement. Pour cela, un test de *kill time* a été effectué. Dans un premier temps, l'analyse a été réalisée à 6 et 24 heures à T0 et puis à 1 et 2 jours après libération dans le PBS pH 7,4.

L'histogramme exposé dans la **Figure 91** représente l'activité antibactérienne du CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation gamma (γ) et *UrgoTul®-Ag* sur *S. aureus* (**Figure 91 A**) et *E. coli* (**Figure 91 B**) respectivement. La charge bactérienne initiale a été de 7 Log10 UFC/mL pour les deux souches bactériennes. Sur *S. aureus*, les textiles CD-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM (γ) ont montré une réduction bactérienne de 3 Log10 et de 2 Log10 après 6 heures d'évaluation, respectivement. A 24 heures d'analyse, une réduction bactérienne de 5 Log10 a été obtenue pour CTR-CD-AgTT-PEM avant et après stérilisation respectivement. Cependant, l'activité antibactérienne d'*UrgoTul®-Ag* est de 4 Log10 à 6 et 24 heures d'analyse.

Dans le cas d'*E. coli*, le pansement conçu a montré une meilleure activité antibactérienne que sur *S. aureus* à 6 heures, avant et après stérilisation respectivement. La réduction bactérienne a été de 6 log10 et 5 Log10 pour CD-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM (γ). Néanmoins, à 24 heures d'analyse, la réduction bactérienne des mêmes échantillons a été de 5 Log10. D'autre part, le pansement *UrgoTul®-Ag* a montré une faible activité antibactérienne (2,6 Log10) à 6 heures. Néanmoins, la réduction bactérienne reste similaire (5 Log10) que celles obtenues par CD-CTR-AgTT-PEM et CD-CTR-AgTT-PEM (γ) après 24 heures respectivement.

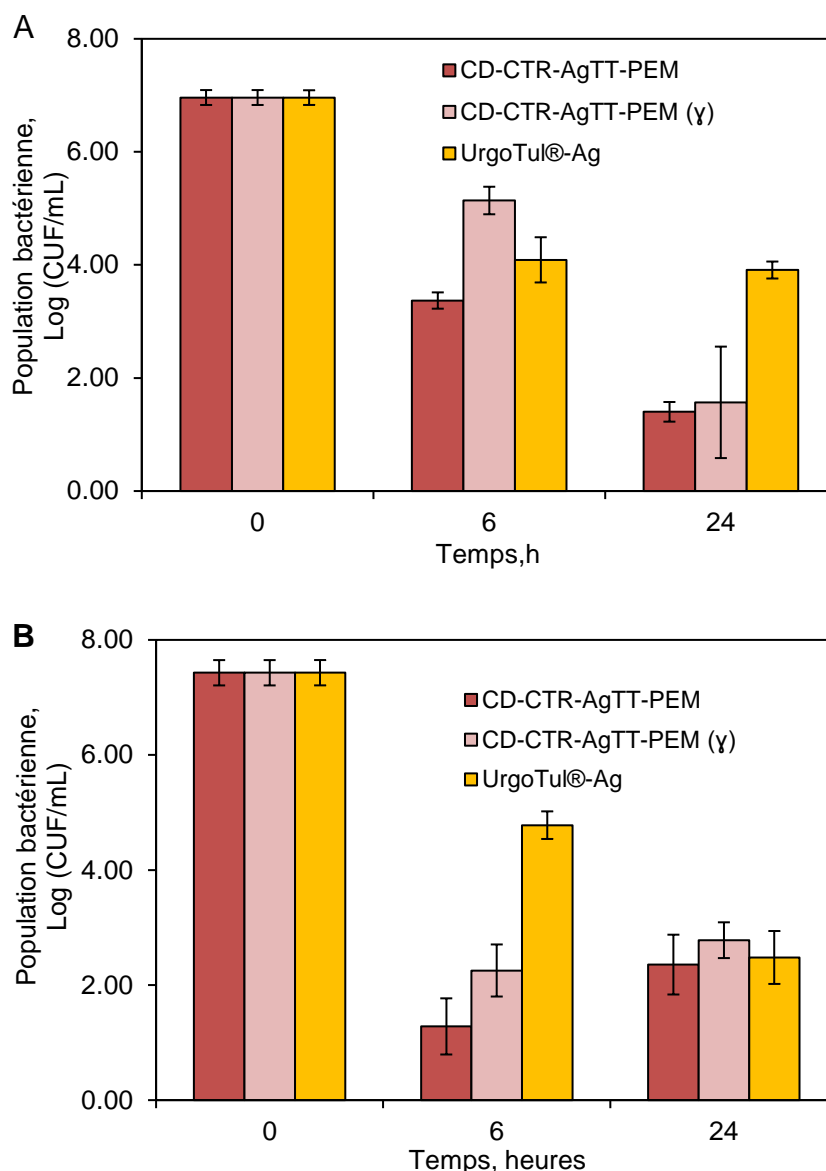


Figure 91. Cinétique de réduction bactérienne de CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation gamma et UrgoTul®-Ag qu'ont été incubés avec une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus* (a) ou d'*E. coli* (b) pendant 6 et 24 heures.

Après l'évaluation de l'activité antibactérienne à T0 des pansements avant et après stérilisation, une autre analyse a été effectuée. En effet, les échantillons ont été immergés dans le PBS à pH 7,4 (37°C, 80 rpm) pendant 1 (T1) et 2 (T2) jours, afin de simuler le temps d'utilisation du pansement sur une plaie. Après, un test de *kill time* (temps d'évaluation 30 min, 2, 4, 6 et 24 heures) a été réalisé sur *E. coli* dans le but de connaître le comportement antibactérien des textiles après 1 et 2 jours de libération. La **Figure 92** montre la cinétique de réduction bactériennes du textile CD-CTR-AgTT-PEM (**γ**) à T1 et T2 de libération dans le PBS à pH 7,4 sur *E. coli*.

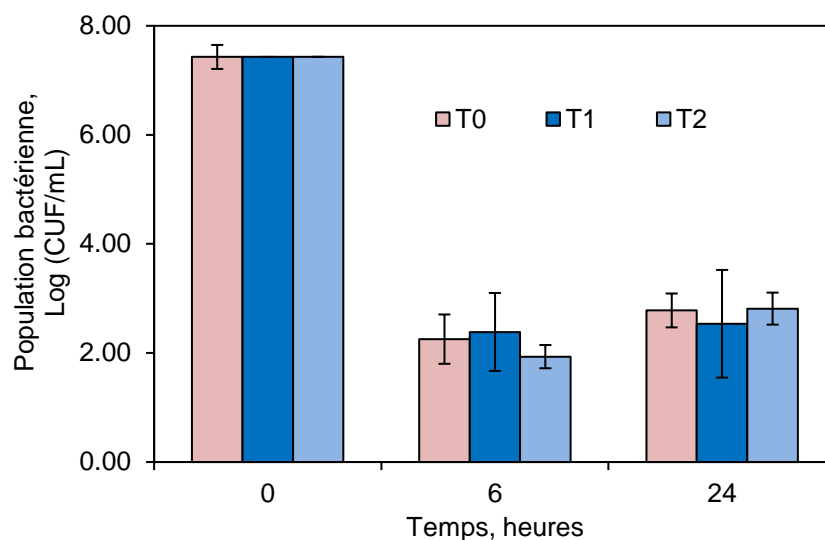


Figure 92. Cinétique de réduction bactérienne du CD-CTR-AgTT-PEM (γ) à T0 et immergé dans une solution de PBS à pH 7,4 pendant 1 (T1) et 2 (T2) jours et puis incubés avec une charge bactérienne initiale de 7 Log₁₀ UFC/mL d'*E. coli* à 6 et 24 heures.

A T1, le textile a montré une réduction bactérienne plus rapide (6 Log₁₀) qu'à T2 (5 Log₁₀). Ensuite, la réduction bactérienne continue jusqu'à 4 heures et puis une re-croissance bactérienne est observé à partir de 6 heures à T1 et T2. Finalement, la réduction bactérienne atteint à 5 Log₁₀ après 24 heures d'évaluation.

La stérilisation par rayonnements gamma ne semble pas interférer dans les propriétés antimicrobiennes du textile CD-CTR-AgTT-PEM (γ). Cela a été mis en évidence dans le test de *kill time* effectué à T0, T1 et T2. D'autre part, aucune différence d'activité antibactérienne n'a été observé entre CD-CTR-AgTT-PEM avant et après stérilisation à T0. D'ailleurs, le pansement conçu dans ce travail montre une meilleure activité antibactérienne que *UrgoTul®-Ag* sur *E. coli*.

Finalement, il faudrait évaluer l'activité antibactérienne de CD-CTR-AgTT-PEM avant stérilisation gamma (avec ou sans IBU-L) et de *UrgoTul®-Ag* à T1 et T2, sur *Escherichia coli* ainsi que d'autres souches bactériennes comme *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, afin de déterminer s'il existe une différence de l'activité antibactérienne de ces pansements et avoir également, une étude plus complète.

3.3.2 Evaluation in vivo des pansements :

L'évaluation *in vivo* des pansements **PET**, **CD-CTR-AgTT**, **CD-CTR-AgTT-PEM**, **CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L** et **UrgoTul®-Ag** (11 mm de diamètre) a été effectuée sur des souris C3H/He ayant une plaie infectée par *E. coli* (7,6 Log₁₀ UFC/mL). Au but de 3 et 7 jours, les pansements ont été renouvelés. Après 3 jours de traitement, les pansements ont été récupérés et déplacés dans

une solution de PBS pH 7,4 stérile pour les rincer. Après, une analyse microbiologique a été réalisée afin de connaître l'évolution de la population bactérienne sur le pansement comparé à la charge bactérienne initialement déposée sur la plaie. Dans un premier temps, une analyse de la charge globale bactérienne (flore cutanée) trouvée dans les pansements a été évalué et puis la charge bactérienne de *E. coli* a été également analysé.

La **Figure 93** révèle la population bactérienne globale (flore cutanée) décroché des différents pansements testés. Le textile PET vierge a montré une réduction bactérienne de 4 Log10 et 2 Log10 au but de 3 et 7 jours respectivement. Le reste des pansements testés ont montré une réduction bactérienne de 6 Log10 après 3 jours de traitement et puis au bout de 7 jours les pansements CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L et *UrgoTul®-Ag* ont montré une meilleure activité antibactérienne (6 Log10).

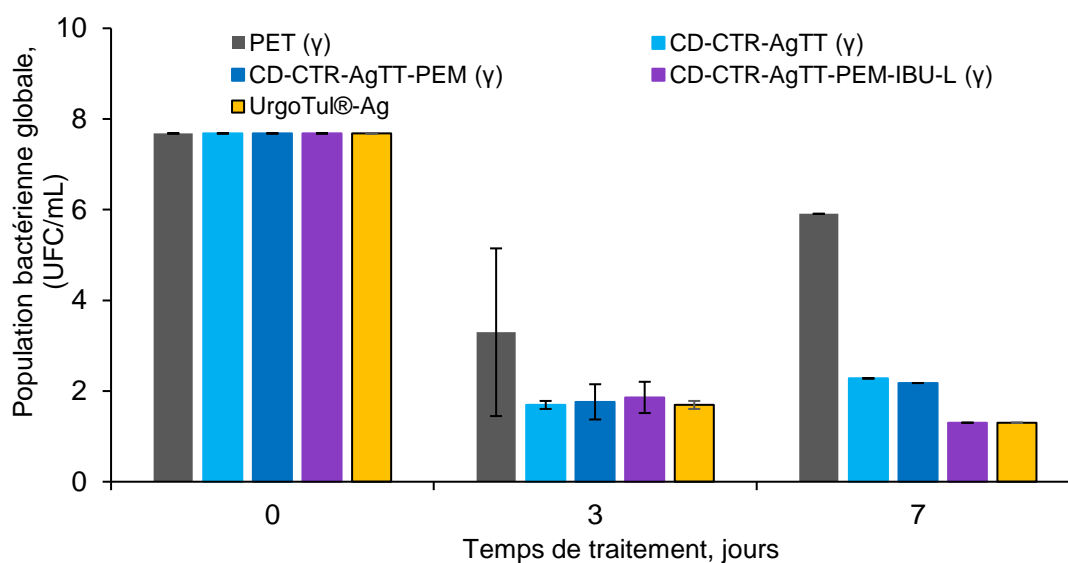


Figure 93. Population bactérienne globale (flore cutanée) présente dans les pansements PET, CD-CTR-AgTT, CD-CTR-AgTT-PEM, CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L et *UrgoTul®-Ag* (11 mm de diamètre) à 3 et 7 jours après inoculation bactérienne. (Charge initiale, 7,6 Log10 UFC/mL).

D'autre part, la charge bactérienne de *E. coli* présente dans les pansements est représentée dans la **Figure 94**. Seuls les textiles PET et CD-CTR-AgTT-PEM ont montré une population bactérienne de 1 Log10 après 3 jours d'évaluation. Néanmoins, pour les autres pansements, les colonies bactériennes n'ont pas été détectées. Le même phénomène a été rapporté à 7 jours sur tous les groupes de pansements testés (résultats non montrés).

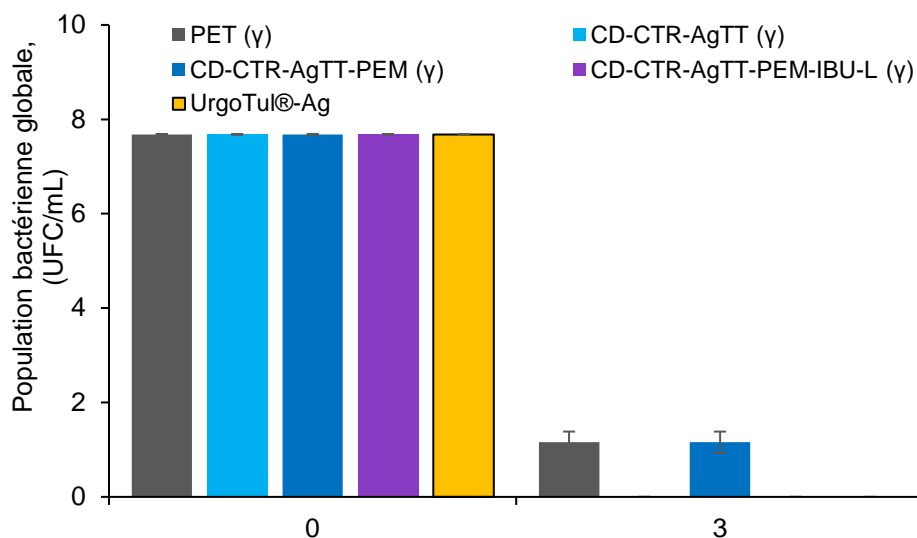


Figure 94. Population bactérienne d'*E. coli* présente dans les pansements PET, CD-CTR-AgTT, CD-CTR-AgTT-PEM, CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L et UrgoTul®-Ag (11 mm de diamètre) à 3 après inoculation bactérienne. (Charge initial, 7,6 Log₁₀ UFC/mL).

En ce qui concerne à l'évaluation macroscopique de la plaie, une cicatrisation complète de la plaie a été observée au bout de 3 jours. D'ailleurs, aucun signe d'infection n'a été mis en évidence, même si la charge bactérienne déposée est élevée. En effet, l'abrasion effectuée comme modèle de plaie n'est pas l'idéale pour réussir une infection. Il est nécessaire donc, de mettre au point un autre type de plaie plus profonde qui permettrait d'endommager le derme et l'épiderme, comme par exemple les brûlures de deuxième ou troisième degré.

3.3.3 Conclusion

L'impact de la stérilisation par rayonnement gamma sur le pansement CD-CTR-AgTT-PEM a été évalué par rapport à la dégradation des assemblages, la morphologie des supports, la libération simultanée des deux principes actifs, argent et IBU-L et l'activité antibactérienne in vitro.

Les rayonnements gamma interfèrent dans la stabilité des assemblages et dans la morphologie des pansements. Concernant la libération simultanée de l'argent et l'IBU-L, les pansements stériles ont montré un profil de libération prolongé pour l'argent à partir de 6 heures. Néanmoins, pour l'IBU-L le pansement présente la même cinétique avant ou après stérilisation.

En ce qui concerne l'évaluation microbiologique, les rayonnements gamma n'interfèrent pas dans les propriétés antibactériennes de l'argent sur *S. aureus* et *E. coli* à T0. D'ailleurs, l'activité antibactérienne du pansement CD-CTR-AgTT-PEM est meilleure que *UrgoTul®-Ag*. L'évaluation microbiologique à T1 et T2 sur *E. coli* ne rapporte pas des différences entre l'activité antibactérienne des pansements avec ou sans traitement de stérilisation.

Dans l'évaluation in vivo de pansements, CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L et *UrgoTul®-Ag* ont montré une meilleure activité antibactérienne contre la charge globale au bout de 7 jours de traitement. Néanmoins sur *E. coli*, les colonies bactériennes n'ont pas été détectées ni à 3 ni à 7 jours. Les plaies effectuées sur les souris C3H/He n'ont montré aucun signe d'infection. En revanche la cicatrisation complète des plaies a eu lieu au bout de 3 jours quel que soit le pansement utilisé dans le traitement.

CONCLUSION GENERALE

Les plaies chroniques sont un problème de santé publique majeur en raison des coûts élevés qui engendrent leur prise en charge. Les plaies chroniques décrites dans ce manuscrit sont les brûlures, les ulcères par pression et les ulcères de jambe. Ces types de plaies présentent un risque d'infection important, en retardant leur guérison. L'infection des plaies entraîne une production d'exsudats purulents, des mauvaises odeurs et une douleur intense à cause de la réponse inflammatoire provoquée par l'infection.

L'utilisation de dispositifs médicaux comme les pansements est une alternative pour le traitement des plaies notamment pour les plaies infectées ou présentant un risque d'infection. Il existe une vaste gamme de pansement à base de substances actives pour traiter les plaies infectées. Le principe actif le plus utilisé est l'argent, en raison de son large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif et les champignons. De plus, aucune résistance des bactéries envers l'argent n'a été mise en évidence. Cependant, la large diffusion de l'argent vers les tissus sains peut engendrer des effets toxiques envers les cellules impliquées dans la cicatrisation comme les kératinocytes et les fibroblastes retardant ainsi la cicatrisation. A cause de ces problématiques, plusieurs chercheurs travaillent sur de nouvelles stratégies pour ralentir la diffusion de l'argent et obtenir en même temps une activité antibactérienne qui permet d'éradiquer l'infection des plaies.

Le but de ce projet a été de développer un pansement à double libération de principes actifs pour le traitement des plaies chroniques. L'innovation de ce projet se base sur l'incorporation de deux principes actifs, l'argent comme agent antibactérien et l'ibuprofène comme l'agent antalgique. L'objectif principal a été d'incorporer les deux principes actifs dans le même support textile, en employant une stratégie de modification de surface.

Dans un premier temps, le textile a été fonctionnalisé par la technique dite du « *pad-dry-cure* » avec le CHT ou la CD, tous deux réticulés par le CTR afin de former une surface riche en fonctions carboxyliques pour fixer l'argent. Le textile (PET)-CD-CTR présente une plus grande densité des fonctions COOH que le textile (PET)-CHT-CTR. Cela a permis une meilleure adsorption de l'argent (sous la forme de nanoparticules) sur le support (PET)-CD-CTR.

Les textiles activés par l'argent (CHT-CTR-AgTT et CD-CTR-AgTT) ont été recouvert avec un système PEM afin de fournir un environnement humide à la plaie et former une barrière pour ralentir la diffusion de l'argent vers les tissus sains. La capacité d'absorption des exsudats simulés par les textiles (Norme NF EN 13726-1) était plus importante pour ceux présentant le système PEM. Cela est dû à la capacité de gonflement du CHT, polyélectrolyte positif, paramètre important pour le

traitement des plaies en phase détersive. Le traitement thermique (140°C, 105 min) des assemblages permet de maintenir leur stabilité sur une période d'au moins 7 jours quel que soit le type de support fonctionnalisé.

Le profil de libération de l'argent a été limité pour les textiles ayant le système PEM dans les 3 milieux de libération testés en comparaison au pansement *UrgoTul®-Ag*, lequel a montré des taux de libération assez élevés notamment dans les exsudats simulés. Cependant, les résultats obtenus avec le test de *Kirby-Bauer* rapportent des diamètres de diffusion similaires pour tous les textiles activés avec l'argent avec ou sans le système PEM y compris le pansement *UrgoTul®-Ag*.

L'activité antibactérienne, évaluée par le test du *kill time*, a montré une réduction bactérienne entre 3 et 6 Log₁₀ sur *S. aureus* et *E. coli*, respectivement. Cependant l'activité antibactérienne des textiles avec le système PEM est plus rapide sur *E. coli* que sur *S. aureus* quel que soit le type de support. Le pansement *UrgoTul®-Ag* a montré une activité antibactérienne plus lente sur les deux souches bactériennes, même s'il contient une dose 1,5 plus élevée que les pansements que nous avons développés.

Dans un deuxième temps, l'ibuprofène a été chargé sur les supports CD-CTR-AgTT-PEM. La particularité de ce polymère est sa capacité à former des complexes d'inclusion avec différents principes actifs y compris l'ibuprofène. Les études de cinétique d'adsorption ont rapporté un chargement plus rapide dans l'IBU-L que dans l'IBU car la concentration du bain d'imprégnation de l'IBU-L été plus concentrée. Il faudrait alors, de développer une analyse sur les deux formes d'ibuprofène, mais cette fois-ci à une même concentration.

Les isothermes d'adsorption de l'ibuprofène ont rapporté un modèle d'adsorption proposé par Langmuir. Concernant la quantité d'IBU-L adsorbée dans le pansement, le système PEM permet de charger une quantité plus importante que la couche thermofixée seule ((PET)-CD-CTR). La concentration d'imprégnation IBU-L à 10 g/L permet l'adsorption maximale sur le support. Néanmoins, cette concentration n'est pas suffisante pour arriver à charger autant que dans le pansement commercial *Biatain® IBU* (500 µg/cm²). En ce qui concerne le profil de libération de l'antalgique, l'apport du système PEM permet un libération plus lente (6 heures) que la couche thermofixée seule où la totalité de l'IBU-L est libérée en moins d'une heure.

L'évaluation microbiologique du pansement final CD-CTR-AgTT-PEM-IBU-L a rapporté une activité antibactérienne plus rapide sur *E. coli* que sur *S. aureus* comme précédemment. Ces résultats mettent en évidence que l'ibuprofène n'interfère pas dans les propriétés antibactériennes de l'argent.

Finalement, une étude in vivo préliminaire chez la souris a été mise en place. Dans un premier temps, les pansements ont été stérilisés par rayonnement gamma selon la Norme ISO 11137. La cinétique de libération de l'argent est plus lente après le traitement de stérilisation mais la cinétique

de libération de l'IBU-L reste inchangée. Concernant l'activité antibactérienne, le traitement de stérilisation n'influe pas dans l'efficacité antibactérienne des textiles à T0, T1 et T2.

Dans l'étude in vivo, une abrasion a été effectuée comme modèle de plaie infectée par *E. coli*. Les résultats ont rapporté une réduction bactérienne de 6 Log10 pour tous les pansements testés au bout de 3 jours. Cependant, aucun signe d'infection n'a été visualisé et une cicatrisation complète de la plaie a été observée au bout de 3 jours pour tous les pansements analysés. Il faudrait développer un autre modèle de plaie car une abrasion n'est pas assez profonde pour bien visualiser les signes d'infection après l'inoculation bactérienne de la plaie.

Ce travail de thèse aura permis l'élaboration d'un pansement chargé par deux principes actifs ayant des propriétés antibactériennes et antalgiques. La première couche aura permis de fixer l'argent, tandis que le système PEM aura permis de limiter la diffusion de l'argent dans la plaie, apporter un environnement humide et permettre la libération d'un second principe actif, l'ibuprofène. L'activité antibactérienne du pansement a été validé in vitro et in vivo. Concernant l'évaluation in vivo, un nouveau modèle de plaie, plus profond, doit être mis au point dans le but d'évaluer la performance réelle des pansements dans l'éradication de l'infection. Cela permettrait une évaluation macroscopique générale comme la réduction de la surface de la plaie et les signes d'infection. D'autre part, une évaluation au niveau tissulaire sera mise en place, afin de mettre en évidence les propriétés de ré-épithélialisation. Des modèles de plaies comme les brûlures ou les excisions pourraient être réalisés pour une meilleure visualisation de l'efficacité des pansements développés en termes d'anti-infectieuse. Dans ce cas, les souches bactériennes *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* seront choisies pour inoculer la plaie afin d'évaluer la performance des pansements vis-à-vis de la souche bactérienne utilisée.

Dans ce travail de thèse, seule l'évaluation antibactérienne in vitro a été réalisée. Il est important d'avoir un étude complète des propriétés des pansements (antibactérienne et antalgique). Pour cela, une étude de l'activité anti-inflammatoire in vitro sera développée à travers un dosage de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines, les cytokines et les leucotriènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surg Oxf.* 2010 Oct;28(10):469–72.
2. Dréno B. [Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes]. *Ann Dermatol Venerol.* 2009 Oct;136 Suppl 6:S247-251.
3. Qin Y. *Medical textile materials.* Amsterdam Boston Cambridge: Elsevier/WP, Woodhead Publishing; 2016. 263 p. (Woodhead Publishing series in textiles).
4. Miller KJ, Brown DA, Ibrahim MM, Ramchal TD, Levinson H. MicroRNAs in skin tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jul;88:16–36.
5. Battu V, Brischoux S. Les plaies : définitions et étiologie. *Actual Pharm.* 2012 Sep;51(518):14–9.
6. Akbik D, Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* 2014 Oct;116(1):1–7.
7. Harper D, Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surg Oxf.* 2014 Sep;32(9):445–50.
8. Tejiram S, Kavalukas SL, Shupp JW, Barbul A. Wound healing. In: *Wound Healing Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2018 Feb 7]. p. 3–39. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978178242455000001X>
9. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Feb 1;58(2):185–206.
10. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care.* 2015 Sep 1;4(9):560–82.
11. Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Jan 1;123:33–64.
12. Martin NA, Falder S. A review of the evidence for threshold of burn injury. *Burns.* 2017 Dec 1;43(8):1624–39.
13. Mathias E, Srinivas Murthy M. Pediatric Thermal Burns and Treatment: A Review of Progress and Future Prospects. *Medicines* [Internet]. 2017 Dec 11;4(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5750615/>
14. Battu V, Brischoux S. Les plaies : définitions et étiologie. *Actual Pharm.* 2012 Sep 1;51(518):14–9.

15. Distinguishing a Burn: Minor to Serious [Internet]. [cited 2018 Nov 4]. Available from: <http://nydoctorsurgentcare.blogspot.com/2013/09/distinguishing-burn-minor-to-serious.html>
16. Khampieng T, Wongkittithavorn S, Chairwut S, Ekabutr P, Pavasant P, Supaphol P. Silver nanoparticles-based hydrogel: Characterization of material parameters for pressure ulcer dressing applications. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018 Apr 1;44:91–100.
17. Ciliberti M, De Lara F, Serra G, Tafuro F, Iazzetta FM, De Martino V, et al. Effective management of pressure ulcers using Hydrofibre technology with silver ions. *Wound Med*. 2014 Jun 1;5:40–4.
18. Morton LM, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Apr 1;74(4):589–605.
19. Crane JS, Cheshire NJW. Chronic ulceration of the leg. *Surg Oxf*. 2008 Jan 1;26(1):13–6.
20. Poskitt KR, Gohel MS. Chronic ulceration of the leg. *Surg Oxf*. 2016 Apr 1;34(4):178–82.
21. Kelechi TJ, Johnson JJ, Yates S. Chronic venous disease and venous leg ulcers: An evidence-based update. *J Vasc Nurs*. 2015 Jun 1;33(2):36–46.
22. Catanzano O, Docking R, Schofield P, Boateng J. Advanced multi-targeted composite biomaterial dressing for pain and infection control in chronic leg ulcers. *Carbohydr Polym*. 2017 Sep 15;172:40–8.
23. Moffatt C, Vowden P, Téot L. Hard-to-heal wounds: a holistic approach - Wounds International [Internet]. 2008 [cited 2018 Feb 14]. Available from: <http://www.woundsinternational.com/best-practices/view/hard-to-heal-wounds-a-holistic-approach>
24. Henderson E a. The potential effect of fibroblast senescence on wound healing and the chronic wound environment. *J Wound Care*. 2006 Jul 1;15(7):315–8.
25. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, Berlin JA. Diabetic neuropathic foot ulcers and amputation. *Wound Repair Regen*. 2005 May 1;13(3):230–6.
26. Marston WA, Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. Risk factors associated with healing chronic diabetic foot ulcers: the importance of hyperglycemia. *Ostomy Wound Manage*. 2006 Mar;52(3):26–8, 30, 32 passim.
27. Troppmann C, Pierce JL, Gandhi MM, Gallay BJ, McVicar JP, Perez RV. Higher surgical wound complication rates with sirolimus immunosuppression after kidney transplantation: a matched-pair pilot study. *Transplantation*. 2003 Jul 27;76(2):426–9.
28. Burns J, Pieper B. HIV/AIDS: impact on healing. *Ostomy Wound Manage*. 2000 Mar;46(3):30–40, 42, 44 passim; quiz 48–9.

29. Yang EV, Bane CM, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Glaser R. Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Neuroimmunol*. 2002 Dec 1;133(1):144–50.
30. Scalise A, Bianchi A, Tartaglione C, Bolletta E, Pierangeli M, Torresetti M, et al. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. *Semin Vasc Surg*. 2015 Sep 1;28(3):151–9.
31. Bertesteanu S, Triaridis S, Stankovic M, Lazar V, Chifiriuc MC, Vlad M, et al. Polymicrobial wound infections: Pathophysiology and current therapeutic approaches. *Int J Pharm*. 2014 Mar 25;463(2):119–26.
32. Swanson T, Schultz G, Grothier L. Wound Infection Made Easy - Wounds International [Internet]. 2016 [cited 2018 Mar 4]. Available from: <http://www.woundsinternational.com/made-easys/view/wound-infection-made-easy>
33. Swanson T, Angel D, Sussman G, Cooper R. Wound infection in clinical practice update:2016 [Internet]. Wound Infection Institute (WII). 2016 [cited 2018 Feb 16]. Available from: http://www.woundinfection-institute.com/2016/11/httpwww-woundinfection-institute-comwp-contentuploads201707iwii-consensus_final-2017-pdf/
34. Diane ST-CYR. Les biofilms : Que sont-ils ? Où sont-ils ? Quels impacts ont-ils sur les soins des plaies ? *Perspect Infirm*. 2011 May 1;Vol. 8 N° 3:36–8.
35. Safe, long-term management of bioburden that helps promote healing Evidence review of DACC technology [Internet]. [cited 2018 Oct 2]. Available from: https://www.bsnmedical.com/fileadmin/z-countries/0-USA_NEW/PDF_FILES/62265_RN_DACC_Clinical_Review.pdf
36. Phillips P, Wolcott R, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms Made Easy - Wounds International [Internet]. 2010 [cited 2018 Feb 16]. Available from: <http://www.woundsinternational.com/made-easys/view/biofilms-made-easy>
37. Carville K, Cuddigan J, Fletcher J, Fuchs P, Harding K, Ishikawa, O, et al. Wound infection in clinical practice. An international consensus. *Int Wound J*. 2008 Jun;5 Suppl 3:iii–11.
38. Le Guyadec T. Le pansement dans l’histoire de la médecine du néolithique à nos jours [Internet]. 2006 [cited 2018 Apr 12]. Available from: <http://www.cicatrisation.info/fr/methodes-therapeutiques/le-pansement/historique.html>
39. Shah JB. The History of Wound Care. *J Am Coll Certif Wound Spec*. 2012 Apr 19;3(3):65–6.
40. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. *J Pharm Sci*. 2015 Nov;104(11):3653–80.
41. Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. *J Pharm Sci*. 2014 Aug 1;103(8):2211–30.

42. Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. *Surg Oxf.* 2014 Sep;32(9):462–7.
43. Boateng J.S., Matthews Kerr H., Stevens Howard N.E., Eccleston Gillian M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci.* 2007 Oct 26;97(8):2892–923.
44. Mayet N, Choonara YE, Kumar P, Tomar LK, Tyagi C, Du Toit LC, et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. *J Pharm Sci.* 2014 Aug;103(8):2211–30.
45. Kerihuel JC. Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds. *J Wound Care.* 2010 May;19(5):208, 210–2, 214–5.
46. Abdel-Mohsen AM, Jancar J, Abdel-Rahman RM, Vojtek L, Hyršl P, Dušková M, et al. A novel in situ silver/hyaluronan bio-nanocomposite fabrics for wound and chronic ulcer dressing: In vitro and in vivo evaluations. *Int J Pharm.* 2017 Mar 30;520(1):241–53.
47. Dereure O, Czubek M, Combemale P. Efficacy and safety of hyaluronic acid in treatment of leg ulcers: a double-blind RCT. *J Wound Care.* 2012 Mar;21(3):131–2, 134–6, 138–9.
48. Humbert P, Mikosinki J, Benchikhi H, Allaert F-A. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. *Int Wound J.* 2013 Apr;10(2):159–66.
49. Edmonds M, Lázaro-Martínez JL, Alfayate-García JM, Martini J, Petit J-M, Rayman G, et al. Sucrose octasulfate dressing versus control dressing in patients with neuroischaemic diabetic foot ulcers (Explorer): an international, multicentre, double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(3):186–96.
50. Torley PJ, Rutgers RPG, D'Arcy B, Bhandari BR. Effect of honey types and concentration on starch gelatinization. *LWT - Food Sci Technol.* 2004 Mar 1;37(2):161–70.
51. Dunford CE, Hanano R. Acceptability to patients of a honey dressing for non-healing venous leg ulcers. *J Wound Care.* 2004 May;13(5):193–7.
52. Robson V, Dodd S, Thomas S. Standardized antibacterial honey (Medihoney™) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *J Adv Nurs.* 2009 Mar;65(3):565–75.
53. Dispositifs médicaux combinés - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cited 2018 Apr 23]. Available from: [http://ansm.sante.fr/Activites/Syntheses-des-campagnes-d-inspection/Dispositifs-medicaux-combines/\(offset\)/2](http://ansm.sante.fr/Activites/Syntheses-des-campagnes-d-inspection/Dispositifs-medicaux-combines/(offset)/2)
54. Fogh K, Andersen MB, Bischoff-Mikkelsen M, Bause R, Zutt M, Schilling S, et al. Clinically relevant pain relief with an ibuprofen-releasing foam dressing: results from a randomized, controlled, double-blind clinical trial in exuding, painful venous leg ulcers.

- Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. 2012 Dec;20(6):815–21.
55. Gottrup F, Jørgensen B, Karlsmark T, Sibbald RG, Rimdeika R, Harding K, et al. Reducing wound pain in venous leg ulcers with Biatain Ibu: a randomized, controlled double-blind clinical investigation on the performance and safety. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2008 Oct;16(5):615–25.
 56. Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018 Jun 1;127:130–41.
 57. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Jan;12(1):147–79.
 58. 3M™ Tegaderm™ CHG - Santé - 3M France [Internet]. [cited 2018 Apr 25]. Available from: http://solutions.3mfrance.fr/wps/portal/3M/fr_FR/Healthcare-Europe/EU-Home/Products/SkinWoundCare/IVTherapy/TegadermCHG/
 59. Flores C, Lopez M, Tabary N, Neut C, Chai F, Betbeder D, et al. Preparation and characterization of novel chitosan and β -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2017 Oct;173:535–46.
 60. Rossi S, Marciello M, Sandri G, Ferrari F, Bonferoni MC, Papetti A, et al. Wound Dressings Based on Chitosans and Hyaluronic Acid for the Release of Chlorhexidine Diacetate in Skin Ulcer Therapy. *Pharm Dev Technol.* 2007 Jan;12(4):415–22.
 61. Agarwal A, Nelson TB, Kierski PR, Schurr MJ, Murphy CJ, Czuprynski CJ, et al. Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings. *Biomaterials.* 2012 Oct;33(28):6783–92.
 62. Barillo DJ, Marx DE. Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns.* 2014 Dec 1;40:S3–8.
 63. Fontenoy C, Sellal K-O. L'argent dans les dispositifs médicaux : marketing ou réel intérêt clinique ? *Pharm Hosp.* 2010 Sep;45(3):131–41.
 64. MacGregor L. DU BON USAGE DES PANSEMENTS L'ARGENT DANS LES SOINS DES PLAIES. :24.
 65. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns.* 2007 Mar;33(2):139–48.
 66. Jung W-K, Cheong Koo H, Kim K, Shin S, Hyun Kim S, Ho Park Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 May 1;74:2171–8.
 67. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2008 Sep 1;4(3):241–51.

68. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2002 Jun;10(3):141–51.
69. Sterling JP. Silver-resistance, allergy, and blue skin: Truth or urban legend? *Burns.* 2014 Dec;40:S19–23.
70. Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. Silver-coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient. *J Trauma Inj Infect Crit Care.* 2006 Mar 1;60(3):648–52.
71. Flohr C, Heague J, Leach I, English J. Topical silver sulfadiazine-induced systemic argyria in a patient with severe generalized dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol.* 2008 Sep 1;159(3):740–1.
72. Poon VKM, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns.* 2004 Mar;30(2):140–7.
73. Boonkaew B, Kempf M, Kimble R, Cuttle L. Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns.* 2014 Dec;40(8):1562–9.
74. Qin Y. 2 - An overview of medical textile products. In: *Medical Textile Materials* [Internet]. Woodhead Publishing; 2016 [cited 2018 May 3]. p. 13–22. (Woodhead Publishing Series in Textiles). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081006184000029>
75. Qin Y. 3 - A brief description of textile fibers. In: *Medical Textile Materials* [Internet]. Woodhead Publishing; 2016 [cited 2018 May 7]. p. 23–42. (Woodhead Publishing Series in Textiles). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081006184000030>
76. Naseri-Nosar M, Ziora ZM. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr Polym.* 2018 Jun 1;189:379–98.
77. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm.* 2014 Mar 25;463(2):127–36.
78. Sigma Aldrich, Cellulose [Internet]. Sigma-Aldrich. [cited 2018 May 7]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6288>
79. AQUACEL® Ag pansement Hydrofiber® stérile contenant de l'argent 10x12cm [Internet]. [cited 2018 May 7]. Available from: <https://www.pharma7.fr/fr/pansements-hydrofibres/7776850-aquacel-ag-pansement-hydrofiber-sterile-contenant-de-l-argent-10x12cm--768455087389.html>
80. Smith AM, Moxon S, Morris GA. 13 - Biopolymers as wound healing materials. In: Ågren MS, editor. *Wound Healing Biomaterials* [Internet]. Woodhead Publishing; 2016 [cited 2018 May 7]. p. 261–87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782424567000131>

81. Shang S, Zhu L, Fan J. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein. *Carbohydr Polym.* 2013 Apr 2;93(2):561–73.
82. Zhejiang Top-Medical Medical Dressing Co., Ltd. [Internet]. [cited 2018 May 7]. Available from: http://www.lthk.cn/cgi/search-en.cgi?f=introduction_en7_1_+company_en_1_&t=introduction_en7_1_&cate1=Alginate%20Dressings&cate2=2
83. Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010 Oct;2(5):510–25.
84. Gupta BS, Edwards JV. 3 - Textile materials and structures for wound care products. In: Rajendran S, editor. *Advanced Textiles for Wound Care* [Internet]. Woodhead Publishing; 2009 [cited 2018 May 11]. p. 48–96. (Woodhead Publishing Series in Textiles). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845692711500030>
85. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, et al. Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydr Polym.* 2013 Apr;93(2):718–30.
86. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A Polymer-Based, Paclitaxel-Eluting Stent in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2004 Jan 15;350(3):221–31.
87. Blanchemain N, Karrouy Y, Tabary N, Bria M, Neut C, Hildebrand HF, et al. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr Polym.* 2012 Nov;90(4):1695–703.
88. Toti US, Kumbar SG, Laurencin CT, Mathew R, Balasubramaniam D. Drug-releasing textiles. In: *Handbook of Medical Textiles* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2018 Aug 3]. p. 173–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845696917500078>
89. Shah T, Halacheva S. Drug-releasing textiles. In: *Advances in Smart Medical Textiles* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2018 Aug 20]. p. 119–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782423799000062>
90. Wang Z, Wu H, Liao C, Zhou N, Cheng W, Wan Y. Sustained release of ketoprofen from fibrous chitosan-poly(ϵ -caprolactone) membranes. *Carbohydr Polym.* 2011 Feb;84(1):624–30.
91. Lavin DM, Stefani RM, Zhang L, Furtado S, Hopkins RA, Mathiowitz E. Multifunctional polymeric microfibers with prolonged drug delivery and structural support capabilities. *Acta Biomater.* 2012 May;8(5):1891–900.
92. Denkbas E. Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning. *J Membr Sci.* 2000 Jul 1;172(1–2):33–8.

93. Ouerghemmi S, Degoutin S, Tabary N, Cazaux F, Maton M, Gaucher V, et al. Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *Int J Pharm.* 2016 Nov;513(1–2):483–95.
94. Tort S, Acartürk F, Beşikci A. Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing. *Int J Pharm.* 2017 Aug;529(1–2):642–53.
95. Li H, Williams GR, Wu J, Lv Y, Sun X, Wu H, et al. Thermosensitive nanofibers loaded with ciprofloxacin as antibacterial wound dressing materials. *Int J Pharm.* 2017 Jan;517(1–2):135–47.
96. Jaskari T, Vuorio M, Kontturi K, Manzanares JA, Hirvonen J. Ion-exchange fibers and drugs: an equilibrium study. *J Controlled Release.* 2001 Jan;70(1–2):219–29.
97. Gao Y, Yuan J, Liu H, Yang Y, Hou Y, Li S. Tramadol loading, release and iontophoretic characteristics of ion-exchange fiber. *Int J Pharm.* 2014 Apr;465(1–2):102–11.
98. Malinovskaja K, Laaksonen T, Hirvonen J. Controlled transdermal delivery of leuprorelin by pulsed iontophoresis and ion-exchange fiber. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Nov 1;88(3):594–601.
99. Karppi J, Penttilä I, Akerman S. Suitability of Smopex(R)-102 cation-exchange fiber for analytical purposes and drug monitoring. 2009 Jan;(1):14–18.
100. Qin Y. Medical textile materials with drug-releasing properties. In: *Medical Textile Materials* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2018 Aug 23]. p. 175–89. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081006184000133>
101. Jiang Y-N, Mo H-Y, Yu D-G. Electrospun drug-loaded core–sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *Int J Pharm.* 2012 Nov 15;438(1):232–9.
102. Mangindaan D, Chen C-T, Wang M-J. Integrating sol–gel with cold plasmas modified porous polycaprolactone membranes for the drug-release of silver-sulfadiazine and ketoprofen. *Appl Surf Sci.* 2012 Dec;262:114–9.
103. Yoo HS, Kim TG, Park TG. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Oct 5;61(12):1033–42.
104. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J.* 2013 Apr;49(4):780–92.
105. Ahmed S, Annu, Ali A, Sheikh J. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2018 Sep 1;116:849–62.
106. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011 May 1;29(3):322–37.
107. Patrúlea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Nov;97:417–26.

108. Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int J Biol Macromol*. 2017 Sep;102:380–3.
109. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J*. 2013 Apr 1;49(4):780–92.
110. Balan V, Verestiuc L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *Eur Polym J*. 2014 Apr;53:171–88.
111. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym*. 2017 May;164:268–83.
112. MubarakAli D, LewisOscar F, Gopinath V, Alharbi NS, Alharbi SA, Thajuddin N. An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants. *Microb Pathog*. 2018 Jan;114:323–7.
113. Xing K, Xing Y, Liu Y, Zhang Y, Shen X, Li X, et al. Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*. *Carbohydr Polym*. 2018 Jul;192:95–103.
114. Umemura M, Makimura Y, Itoh M, Yamamoto T, Mine T, Mitani S, et al. One-step synthesis of efficient binding-inhibitor for influenza virus through multiple addition of sialyloligosaccharides on chitosan. *Carbohydr Polym*. 2010 Jun;81(2):330–4.
115. Mohamed SH, Arafa AS, Mady WH, Fahmy HA, Omer LM, Morsi RE. Preparation and immunological evaluation of inactivated avian influenza virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Biologicals*. 2018 Jan;51:46–53.
116. Bano I, Ghauri MA, Arshad M, Yasin T, Younus M. Bioactivity of Variant Molecular Weight Chitosan Against Drug-Resistant Bacteria Isolated from Human Wounds. *Microb Drug Resist*. 2017 Dec;23(8):958–65.
117. Aubert-Viard F, Martin A, Chai F, Neut C, Tabary N, Martel B, et al. Chitosan finishing nonwoven textiles loaded with silver and iodide for antibacterial wound dressing applications. *Biomed Mater*. 2015;10(1):015023.
118. Xu Q, Ke X, Shen L, Ge N, Zhang Y, Fu F, et al. Surface modification by carboxymethyl chitosan via pad-dry-cure method for binding Ag NPs onto cotton fabric. *Int J Biol Macromol*. 2018 May;111:796–803.
119. Tachaboonyakiat W. 9 - Antimicrobial applications of chitosan. In: Jennings JA, Bumgardner JD, editors. *Chitosan Based Biomaterials Volume 2* [Internet]. Woodhead Publishing; 2017 [cited 2018 Oct 31]. p. 245–74. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081002285000092>
120. Brown MA, Daya MR, Worley JA. Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System. *J Emerg Med*. 2009 Jul 1;37(1):1–7.
121. Gordy SD, Rhee P, Schreiber MA. Military applications of novel hemostatic devices. *Expert Rev Med Devices*. 2011 Jan;8(1):41–7.

122. Schwinté P, Voegel J-C, Picart C, Haikel Y, Schaaf P, Szalontai B. Stabilizing Effects of Various Polyelectrolyte Multilayer Films on the Structure of Adsorbed/Embedded Fibrinogen Molecules: An ATR-FTIR Study†. *J Phys Chem B - J PHYS CHEM B*. 2001 Sep 25;105.
123. Shukla A, Fang JC, Puranam S, Jensen FR, Hammond PT. Hemostatic multilayer coatings. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 2012 Jan 24;24(4):492–6.
124. Ouerghemmi S, Dimassi S, Tabary N, Leclercq L, Degoutin S, Chai F, et al. Synthesis and characterization of polyampholytic aryl-sulfonated chitosans and their in vitro anticoagulant activity. *Carbohydr Polym*. 2018 Sep 15;196:8–17.
125. Ranjbar-Mohammadi M, Arami M, Bahrami H, Mazaheri F, Mahmoodi NM. Grafting of chitosan as a biopolymer onto wool fabric using anhydride bridge and its antibacterial property. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010 Apr;76(2):397–403.
126. Abou-Okeil A, Sheta AM, Amr A, Ali MA. Wound dressing based on nonwoven viscose fabrics. *Carbohydr Polym*. 2012 Sep;90(1):658–66.
127. Fouda MMG, Wittke R, Knittel D, Schollmeyer E. Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *Int J Diabetes Mellit*. 2009 Apr;1(1):61–4.
128. Lv J, Zhou Q, Liu G, Gao D, Wang C. Preparation and properties of polyester fabrics grafted with O-carboxymethyl chitosan. *Carbohydr Polym*. 2014 Nov;113:344–52.
129. Glampedaki P, Jovic D, Warmoeskerken MMCG. Moisture absorption capacity of polyamide 6,6 fabrics surface functionalised by chitosan-based hydrogel finishes. *Prog Org Coat*. 2011 Nov;72(3):562–71.
130. Aubert-Viard F. Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques. 2014.
131. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2018 Jan;535(1–2):272–84.
132. van de Manakker F, Vermonden T, van Nostrum CF, Hennink WE. Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009 Dec 14;10(12):3157–75.
133. Martel B, Campagne C, Massika NB. Quand les textiles vous soignent. *médecine/sciences*. 2017 Jan 1;33(1):73–80.
134. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Jul;59(7):645–66.
135. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Jul;59(7):645–66.

136. Junthip J, Tabary N, Leclercq L, Martel B. Cationic β -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system. *Carbohydr Polym.* 2015 Aug 1;126:156–67.
137. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *J Appl Polym Sci.* 2005 Jul 15;97(2):433–42.
138. Martel B, Morcellet M, Weltrowski M. Cyclodextrin polymers and/or cyclodextrin derivatives with complexing properties and ion-exchange properties and method for the production thereof [Internet]. EP1165621B1, 2002 [cited 2018 Aug 30]. Available from: <https://patents.google.com/patent/EP1165621B1/en>
139. Martel B, Morcellet M, Ruffin D, Ducoroy L, Weltrowski M. Finishing of Polyester Fabrics with Cyclodextrins and Polycarboxylic Acids as Crosslinking Agents. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2002 Dec 1;44(1):443–6.
140. Blanchemain N, Karrout Y, Tabary N, Neut C, Bria M, Siepmann J, et al. Methyl- β -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomater.* 2011 Jan;7(1):304–14.
141. Blanchemain N, Laurent T, Chai F, Neut C, Haulon S, Krump-konvalinkova V, et al. Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: Cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomater.* 2008 Nov;4(6):1725–33.
142. Vermet G, Degoutin S, Chai F, Maton M, Bria M, Danel C, et al. Visceral mesh modified with cyclodextrin for the local sustained delivery of ropivacaine. *Int J Pharm.* 2014 Dec;476(1–2):149–59.
143. Tabary N, Chai F, Blanchemain N, Neut C, Pauchet L, Bertini S, et al. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta Biomater.* 2014 Jan 1;10(1):318–29.
144. Lavoine N, Tabary N, Desloges I, Martel B, Bras J. Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Sep 1;121:196–205.
145. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, Aubert-Viard F, et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue–poly(cyclodextrin) complex. *Biomed Mater.* 2013 Nov 26;8(6):065006.
146. Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2014 Mar 1;64:353–67.
147. Zasadzinski JA, Viswanathan R, Madsen L, Garnaes J, Schwartz DK. Langmuir-Blodgett films. *Science.* 1994 Mar 25;263(5154):1726–33.
148. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science.* 1997 Aug 29;277(5330):1232–7.

149. Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*. 1992 Apr 30;210(Part 2):831–5.
150. Decher G, Eckle M, Schmitt J, Struth B. Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 1998 Feb;3(1):32–9.
151. Ariga K, Lvov YM, Kawakami K, Ji Q, Hill JP. Layer-by-layer self-assembled shells for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Aug;63(9):762–71.
152. Dwivedi A, Mazumder A, Nasongkla N. Layer-by-layer nanocoating of antibacterial niosome on orthopedic implant. *Int J Pharm*. 2018 Aug 25;547(1):235–43.
153. Shukla A, Fuller RC, Hammond PT. Design of multi-drug release coatings targeting infection and inflammation. *J Controlled Release*. 2011 Oct;155(2):159–66.
154. Enoch S, Simon J-J, Escoubas L, Elalmy Z, Lemarquis F, Torchio P, et al. Simple layer-by-layer photonic crystal for the control of thermal emission. *Appl Phys Lett*. 2005 Jun 20;86(26):261101.
155. Wang L, Wang N, Li J, Li J, Bian W, Ji S. Layer-by-layer self-assembly of polycation/GO nanofiltration membrane with enhanced stability and fouling resistance. *Sep Purif Technol*. 2016 Feb 29;160:123–31.
156. Dou Y, Xu J, Ruan B, Liu Q, Pan Y, Sun Z, et al. Atomic Layer-by-Layer Co₃O₄/Graphene Composite for High Performance Lithium-Ion Batteries. *Adv Energy Mater*. 2016 Apr 1;6(8):1501835.
157. Zhou B, Hu Y, Li J, Li B. Chitosan/phosvitin antibacterial films fabricated via layer-by-layer deposition. *Int J Biol Macromol*. 2014 Mar;64:402–8.
158. Silva JM, Reis RL, Mano JF. Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers. *Small*. 2016 Aug 1;12(32):4308–42.
159. Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog Polym Sci*. 2012 Feb 1;37(2):237–80.
160. Dmour I, Taha MO. Natural and semisynthetic polymers in pharmaceutical nanotechnology. In: *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2018 Nov 12]. p. 35–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128136638000026>
161. Gomes AP, Mano JF, Queiroz JA, Gouveia IC. Layer-by-layer deposition of antimicrobial polymers on cellulosic fibers: a new strategy to develop bioactive textiles: LAYER-BY-LAYER ANTIMICROBIAL TEXTILES. *Polym Adv Technol*. 2013 Nov;24(11):1005–10.
162. Maver T, Gradišnik L, Kurečič M, Hribernik S, Smrke DM, Maver U, et al. Layering of different materials to achieve optimal conditions for treatment of painful wounds. *Int J Pharm*. 2017 Aug;529(1–2):576–88.

163. Shukla A, Fang JC, Puranam S, Hammond PT. Release of vancomycin from multilayer coated absorbent gelatin sponges. *J Controlled Release*. 2012 Jan;157(1):64–71.
164. Anandhakumar S, Raichur AM. Polyelectrolyte/silver nanocomposite multilayer films as multifunctional thin film platforms for remote activated protein and drug delivery. *Acta Biomater*. 2013 Nov;9(11):8864–74.
165. Sripriya J, Anandhakumar S, Achiraman S, Antony JJ, Siva D, Raichur AM. Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications. *Int J Pharm*. 2013 Nov;457(1):206–13.
166. Wang X, Cao W, Xiang Q, Jin F, Peng X, Li Q, et al. Silver nanoparticle and lysozyme/tannic acid layer-by-layer assembly antimicrobial multilayer on magnetic nanoparticle by an eco-friendly route. *Mater Sci Eng C*. 2017 Jul;76:886–96.
167. Zhou B, Hu Y, Li J, Li B. Chitosan/phosvitin antibacterial films fabricated via layer-by-layer deposition. *Int J Biol Macromol*. 2014 Mar;64:402–8.
168. Gomes AP, Mano JF, Queiroz JA, Gouveia IC. Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications. *Carbohydr Polym*. 2015 Aug;127:451–61.
169. Fahmy HM, Aly AA, Abou-Okeil A. A non-woven fabric wound dressing containing layer – by – layer deposited hyaluronic acid and chitosan. *Int J Biol Macromol*. 2018 Jul 15;114:929–34.
170. Zhou B, Li Y, Deng H, Hu Y, Li B. Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Apr;116:432–8.
171. Guzmán E, Mateos-Maroto A, Ruano M, Ortega F, Rubio RG. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017 Nov;249:290–307.
172. Richardson JJ, Bjornmalm M, Caruso F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science*. 2015 Apr 24;348(6233):aaa2491–aaa2491.
173. Shim BS, Podsiadlo P, Lilly DG, Agarwal A, Lee J, Tang Z, et al. Nanostructured Thin Films Made by Dewetting Method of Layer-By-Layer Assembly. *Nano Lett*. 2007 Nov;7(11):3266–73.
174. Song S, Liu H, Guo X, Hu N. Comparative electrochemical study of myoglobin loaded in different polyelectrolyte layer-by-layer films assembled by spin-coating. *Electrochimica Acta*. 2009 Oct 1;54(24):5851–7.
175. Porcel C, Lavallo P, Ball V, Decher G, Senger B, Voegel J-C, et al. From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2006 Apr;22(9):4376–83.

176. Webber JL, Benbow NL, Krasowska M, Beattie DA. Formation and enzymatic degradation of poly-L-arginine/fucoidan multilayer films. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Nov;159:468–76.
177. Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA. Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces. *Langmuir*. 1999 Aug 1;15(16):5355–62.
178. Picart C, Lavallo P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, et al. Buildup Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir*. 2001 Nov 1;17(23):7414–24.
179. Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich GD, Schaaf P, et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Oct 1;99(20):12531–5.
180. Borges J, Mano JF. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chem Rev*. 2014 Sep 24;114(18):8883–942.
181. Richert L, Lavallo P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz J-F, et al. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir*. 2004 Jan 1;20(2):448–58.
182. Kujawa P, Moraille P, Sanchez J, Badia A, Winnik FM. Effect of Molecular Weight on the Exponential Growth and Morphology of Hyaluronan/Chitosan Multilayers: A Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Atomic Force Microscopy Investigation. *J Am Chem Soc*. 2005 Jun 1;127(25):9224–34.
183. Nestler P, Paßvogel M, Helm CA. Influence of Polymer Molecular Weight on the Parabolic and Linear Growth Regime of PDADMAC/PSS Multilayers. *Macromolecules*. 2013 Jul 23;46(14):5622–9.
184. Shiratori SS, Rubner MF. pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules*. 2000 May;33(11):4213–9.
185. Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2000 Feb 1;16(3):1249–55.
186. Rydzek G, Ji Q, Li M, Schaaf P, Hill JP, Boulmedais F, et al. Electrochemical nanoarchitectonics and layer-by-layer assembly: From basics to future. *Nano Today*. 2015 Apr;10(2):138–67.
187. Tan HL, McMurdo MJ, Pan G, Van Patten PG. Temperature Dependence of Polyelectrolyte Multilayer Assembly. *Langmuir*. 2003 Oct;19(22):9311–4.
188. Salomäki M, Vinokurov IA, Kankare J. Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2005 Nov;21(24):11232–40.
189. Yang Y-H, Malek FA, Grunlan JC. Influence of Deposition Time on Layer-by-Layer Growth of Clay-Based Thin Films. *Ind Eng Chem Res*. 2010 Sep 15;49(18):8501–9.

190. Bellanger H, Casdorff K, Muff LF, Ammann R, Burgert I, Michen B. Layer-by-layer deposition on a heterogeneous surface: Effect of sorption kinetics on the growth of polyelectrolyte multilayers. *J Colloid Interface Sci.* 2017 Aug;500:133–41.
191. Park M-K, Deng S, Advincula RC. Sustained Release Control via Photo-Cross-Linking of Polyelectrolyte Layer-by-Layer Hollow Capsules. *Langmuir.* 2005 Jun 1;21(12):5272–7.
192. Richert L, Boulmedais F, Lavallo P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, et al. Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules.* 2004 Mar;5(2):284–94.
193. Junthip J. Revêtements multicouches de polyélectrolytes de cyclodextrines sur textile pour la libération de principes actifs [Internet] [thesis]. Lille 1; 2015 [cited 2018 Nov 10]. Available from: <http://www.theses.fr/2015LIL10153>
194. Séon L, Lavallo P, Schaaf P, Boulmedais F. Polyelectrolyte Multilayers: A Versatile Tool for Preparing Antimicrobial Coatings. *Langmuir.* 2015 Dec;31(47):12856–72.
195. Pinto MS, McGahan ME, Steiner WW, Priefer R. The use of the pseudo-polyelectrolyte, poly(4-vinylphenol), in multilayered films as an antimicrobial surface coating. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2011 Mar 5;377(1):182–6.
196. Wong SY, Li Q, Veselinovic J, Kim B-S, Klibanov AM, Hammond PT. Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions. *Biomaterials.* 2010 May;31(14):4079–87.
197. Etienne O, Picart C, Taddei C, Haikel Y, Dimarcq JL, Schaaf P, et al. Multilayer Polyelectrolyte Films Functionalized by Insertion of Defensin: a New Approach to Protection of Implants from Bacterial Colonization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Oct;48(10):3662–9.
198. Cado G, Aslam R, Séon L, Garnier T, Fabre R, Parat A, et al. Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Adv Funct Mater.* 2013 Oct 11;23(38):4801–9.
199. Guyomard A, Dé E, Jouenne T, Malandain J-J, Muller G, Glinel K. Incorporation of a Hydrophobic Antibacterial Peptide into Amphiphilic Polyelectrolyte Multilayers: A Bioinspired Approach to Prepare Biocidal Thin Coatings. *Adv Funct Mater.* 2008 Mar 11;18(5):758–65.
200. Anandhakumar S, Raichur AM. Polyelectrolyte/silver nanocomposite multilayer films as multifunctional thin film platforms for remote activated protein and drug delivery. *Acta Biomater.* 2013 Nov;9(11):8864–74.
201. Agarwal A, Guthrie KM, Czuprynski CJ, Schurr MJ, McAnulty JF, Murphy CJ, et al. Polymeric Multilayers that contain Silver Nanoparticles can be Stamped onto Biological Tissues to Provide Antibacterial Activity. *Adv Funct Mater.* 2011 May 24;21(10):1863–73.

202. Malcher M, Volodkin D, Heurtault B, André P, Schaaf P, Möhwald H, et al. Embedded Silver Ions-Containing Liposomes in Polyelectrolyte Multilayers: Cargos Films for Antibacterial Agents. *Langmuir*. 2008 Sep 16;24(18):10209–15.
203. Dai J, Bruening ML. Catalytic Nanoparticles Formed by Reduction of Metal Ions in Multilayered Polyelectrolyte Films. *Nano Lett*. 2002 May 1;2(5):497–501.
204. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, Aubert-Viard F, et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue-poly(cyclodextrin) complex. *Biomed Mater Bristol Engl*. 2013 Dec;8(6):065006.
205. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, et al. Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydr Polym*. 2013 Apr;93(2):718–30.
206. Junthip J, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Maton M, Cazaux F, et al. Layer-by-layer coating of textile with two oppositely charged cyclodextrin polyelectrolytes for extended drug delivery. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(6):1408–24.
207. Haute Autorité de Santé - Choix méthodologiques pour le développement clinique des pansements [Internet]. [cited 2018 Nov 12]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1713137/fr/choix-methodologiques-pour-le-developpement-clinique-des-pansements
208. Ignacio G, El-Amin I, Mendenhall V. Animal Models for Wound Healing. In: *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2018 Oct 1]. p. 387–400. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012801654100019X>
209. Abdel-Mohsen AM, Jancar J, Abdel-Rahman RM, Vojtek L, Hyršl P, Dušková M, et al. A novel in situ silver/hyaluronan bio-nanocomposite fabrics for wound and chronic ulcer dressing: In vitro and in vivo evaluations. *Int J Pharm*. 2017 Mar;520(1–2):241–53.
210. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta PK. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Biol Macromol*. 2015 Feb;73:49–57.
211. Han F, Dong Y, Song A, Yin R, Li S. Alginate/chitosan based bi-layer composite membrane as potential sustained-release wound dressing containing ciprofloxacin hydrochloride. *Appl Surf Sci*. 2014 Aug;311:626–34.
212. Oryan A, Alemzadeh E, Tashkhourian J, Nami Ana SF. Topical delivery of chitosan-capped silver nanoparticles speeds up healing in burn wounds: A preclinical study. *Carbohydr Polym*. 2018 Nov 15;200:82–92.
213. Singer AJ, Toussaint J, Chung WT, McClain SA, Clark RAF, Asculai E, et al. Development of a contaminated ischemic porcine wound model and the evaluation of bromelain based enzymatic debridement. *Burns*. 2018 Jun;44(4):896–904.
214. Sawyer AJ, Wesolowski D, Gandotra N, Stojadinovic A, Izadjoo M, Altman S, et al. A peptide-morpholino oligomer conjugate targeting *Staphylococcus aureus* gyrA

- mRNA improves healing in an infected mouse cutaneous wound model. *Int J Pharm.* 2013 Sep;453(2):651–5.
215. Brandenburg KS, Calderon DF, Kierski PR, Czuprynski CJ, McAnulty JF. Novel murine model for delayed wound healing using a biological wound dressing with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog.* 2018 Sep 1;122:30–8.
216. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Neut C, Chai F, Maton M, Martel B, et al. Evaluation of the anti-infectious properties of polyester vascular prostheses functionalised with cyclodextrin. *J Infect.* 2014 Feb 1;68(2):116–24.
217. Ning C (Coco), Logsetty S, Ghughare S, Liu S. Effect of hydrogel grafting, water and surfactant wetting on the adherence of PET wound dressings. *Burns.* 2014 Sep;40(6):1164–71.
218. Weltrowski M, Morcellet M, Martel B, Lille UDSETD. Polymeres de cyclodextrine(s) et/ou derives de cyclodextrine(s) presentant des proprietes complexantes et echangeuses d'ions et leur procede de fabrication [Internet]. 2000 [cited 2017 Jul 31]. Available from: <https://www.google.com/patents/WO2000047630A1?cl=zh>
219. Herbois R, Noël S, Léger B, Tilloy S, Manuel S, Addad A, et al. Ruthenium-containing β -cyclodextrin polymer globules for the catalytic hydrogenation of biomass-derived furanic compounds. *Green Chem.* 2015 Apr 7;17(4):2444–54.
220. Fibre presentant des proprietes de complexation ameliores et des proprietes echangeuses de cations [Internet]. [cited 2017 Jul 21]. Available from: <http://www.google.com/patents/EP1157156B1>
221. Martel B, Weltrowski M, Ruffin D, Morcellet M. Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *J Appl Polym Sci.* 2002 Feb 14;83(7):1449–56.
222. Blanchemain N, Karrouy Y, Tabary N, Bria M, Neut C, Hildebrand HF, et al. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr Polym.* 2012 Nov;90(4):1695–703.
223. Blanchemain N, Aguilar MR, Chai F, Jimenez M, Jean-Baptiste E, El-Achari A, et al. Selective biological response of human pulmonary microvascular endothelial cells and human pulmonary artery smooth muscle cells on cold-plasma-modified polyester vascular prostheses. *Biomed Mater.* 2011;6(6):065003.
224. Sigma Aldrich, Toluidine Blue O [Internet]. Sigma-Aldrich. [cited 2018 May 17]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/198161>
225. NF EN 13726-1 - Méthodes d'essai pour les pansements primaires en contact avec la plaie - Partie 1 : absorption [Internet]. [cited 2017 Jul 28]. Available from: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-13726-1/methodes-d-essai-pour-les-pansements-primaires-en-contact-avec-la-plaie-partie-1-absorption/article/649894/fa101809>
226. Courtemanche RJM, Taylor NS, Courtemanche DJ. Initiating silver recycling efforts: Quantifying Ag from used burn dressings. *Environ Technol Innov.* 2015 Oct;4:29–35.

227. Vermet G. Apport de nouvelles propriétés antibactériennes et analgésiques sur un implant de réfection pariétale [Internet]. Université de Lille; 2012 [cited 2018 Nov 6]. Available from: <http://www.theses.fr/166817872>
228. Crini G, Martel B, Torri G. Adsorption of C.I. Basic Blue 9 on chitosan-based materials. *Int J Environ Pollut*. 2008;34(1/2/3/4):451.
229. Euvrard É, Morin-Crini N, Druart C, Bugnet J, Martel B, Cosentino C, et al. Cross-linked cyclodextrin-based material for treatment of metals and organic substances present in industrial discharge waters. *Beilstein J Org Chem*. 2016 Aug 12;12:1826–38.
230. Ducoroy L, Bacquet M, Martel B, Morcellet M. Removal of heavy metals from aqueous media by cation exchange nonwoven PET coated with β -cyclodextrin-polycarboxylic moieties. *React Funct Polym*. 2008 Feb 1;68(2):594–600.
231. Wijesena RN, Tissera ND, Abeyratne C, Bangamuwa OM, Ludowyke N, Dahanayake D, et al. In-situ formation of supramolecular aggregates between chitin nanofibers and silver nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2017 Oct;173:295–304.
232. Carapeto AP, Ferraria AM, do Rego AMB. Unraveling the reaction mechanism of silver ions reduction by chitosan from so far neglected spectroscopic features. *Carbohydr Polym*. 2017 Oct;174:601–9.
233. Ma Q, Song J, Zhang S, Wang M, Guo Y, Dong C. Colorimetric detection of riboflavin by silver nanoparticles capped with β -cyclodextrin-grafted citrate. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Dec;148:66–72.
234. Suárez-Cerda J, Nuñez GA, Espinoza-Gómez H, Flores-López LZ. A comparative study of the effect of α -, β -, and γ -cyclodextrins as stabilizing agents in the synthesis of silver nanoparticles using a green chemistry method. *Mater Sci Eng C*. 2014 Oct 1;43:21–6.
235. Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2014 Sep;39(9):1644–67.
236. Rapport d'évaluation des pansements primaires et secondaires, HAS 2007 [Internet]. [cited 2018 Jun 6]. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_evaluation_pansements_.pdf
237. Barbasz A, Oćwieja M, Roman M. Toxicity of silver nanoparticles towards tumoral human cell lines U-937 and HL-60. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Aug;156:397–404.
238. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res*. 2018 Jan;9:1–16.
239. Lu W, Senapati D, Wang S, Tovmachenko O, Singh AK, Yu H, et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chem Phys Lett*. 2010 Feb;487(1–3):92–6.

240. Karthiga D, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin in presence of silver nanorods. *J Mol Liq.* 2017 Apr;232:251–7.
241. Murawala P, Tirmale A, Shiras A, Prasad BLV. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: Effective carrier of anticancer drug Methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. *Mater Sci Eng C.* 2014 Jan 1;34:158–67.
242. Ali MS, Al-Lohedan HA, Atta AM, Ezzat AO, Al-Hussain SAA. Interaction of human serum albumin with silver nanoparticles functionalized with polyvinylthiol. *J Mol Liq.* 2015 Apr 1;204:248–54.
243. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Traisnel M, Morcellet M, Martel B, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomol Eng.* 2007 Feb;24(1):143–8.
244. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Mar 1;76(1):50–6.
245. Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, Rybka J, Łukowiak A, Bugla-Płoskońska G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 2;19(2):444.
246. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res.* 2000 Dec 15;52(4):662–8.
247. Montaser AS, Abdel-Mohsen AM, Ramadan MA, Sleem AA, Sahffie NM, Jancar J, et al. Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. *Int J Biol Macromol.* 2016 Nov;92:739–47.
248. Hebeish A, El-Rafie MH, EL-Sheikh MA, Seleem AA, El-Naggar ME. Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2014 Apr;65:509–15.
249. Paladini F, Picca RA, Sportelli MC, Cioffi N, Sannino A, Pollini M. Surface chemical and biological characterization of flax fabrics modified with silver nanoparticles for biomedical applications. *Mater Sci Eng C.* 2015 Jul;52:1–10.
250. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Apr 1;74(7):2171–8.
251. Higuchi T, Connors K. Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation. *Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation.* 1965;117–212.
252. García-Fernández MJ, Tabary N, Martel B, Cazaux F, Oliva A, Taboada P, et al. Poly-(cyclo)dextrins as ethoxzolamide carriers in ophthalmic solutions and in contact lenses. *Carbohydr Polym.* 2013 Nov;98(2):1343–52.

253. Kfoury M, Landy D, Auezova L, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. *Beilstein J Org Chem*. 2014 Oct 6;10(1):2322–31.
254. Sobocinski J. Fonctionnalisation de stents vasculaires par des matrices polymères contenant des molécules bioactives [Internet]. Université de Lille; [cited 2018 Nov 6]. Available from: <http://www.theses.fr/146291123>
255. Steffansen B, Herping SPK. Novel wound models for characterizing ibuprofen release from foam dressings. *Int J Pharm*. 2008 Nov;364(1):150–5.
256. Jørgensen B, Friis GJ, Gottrup F. Pain and quality of life for patients with venous leg ulcers: proof of concept of the efficacy of Biatain-Ibu, a new pain reducing wound dressing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2006 Jun;14(3):233–9.
257. Mayer G, Blanchemain N, Dupas-Bruzek C, Miri V, Traisnel M, Gengembre L, et al. Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (pet) surfaces. *Biomaterials*. 2006 Feb 1;27(4):553–66.

ANNEXES

Présentation orale

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Nicolas Tabary, Mickaël Maton, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain, “Layer-by-layer coating of a polyester non woven with chitosan and poly-cyclodextrin as antibacterial and anti-inflammatory wound dressing”, *SINAPSIS : Segundo encuentro de científicos peruanos en Europa*, Berlin, Allemagne, **2017**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Nicolas Tabary, Mickaël Maton, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. “Development of an anti-inflammatory and anti-bacterial textile based on a multilayer system to treated infected wounds”, *28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Athènes, Grèce, **2017**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Nicolas Tabary, Mickaël Maton, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. “Multilayered bioactive textile based on chitosan and β -cyclodextrine polyelectrolytes with antimicrobial and anti-inflammatory properties”, *2nd BIOMAT Congress & Materials for Health*, Ambleuteuse, France, **2017**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Nicolas Tabary, Mickaël Maton, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. “ Development and evaluation of a wound dressing with antibacterial activity ”, *SINAPSIS : Primer encuentro de científicos peruanos en Europa*, Paris, France, **2016**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Nicolas Tabary, Mickaël Maton, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. « Pansement antibactérien a l’argent : développement d’un système multicouche pour limiter la diffusion », *Matériaux pour la Santé*, Limoges, France, **2016**.

Présentation de poster

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Oumaïra Rahmouni, Feng Chai, Mickaël Maton, Christel Neut, Nicolas Tabary, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. “Development and evaluation of a wound dressing with a dual antibacterial / anti-inflammatory activity”, *10th World Biomaterials Congress*, Montréal, Canada, **2016**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Mickaël Maton, Nicolas Tabary, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. “Layer-by-Layer coating of a polyester non woven with chitosan and poly-cyclodextrin as antibacterial and anti-inflammatory wound dressing”. *International Conference on processing & manufacturing of advanced materials*, Paris, France, **2018**.

Alejandra Mogrovejo-Valdivia, Mickaël Maton, Nicolas Tabary, Feng Chai, Christel Neut, Bernard Martel and Nicolas Blanchemain. Development of a multilayer-based chitosan and cyclodextrin-polymer wound dressing with dual therapy to treat infected wounds, *29th Annual Conference of the European Society for Biomaterials*, Maastricht, Pays Bas, **2018**.

Résumé

Les plaies chroniques présentent un risque d'infection entraînant un retard de la cicatrisation et des douleurs intenses. Ils restent un problème de santé publique car leur prise en charge génère un coût élevé. Les pansements à base d'argent sont largement utilisés pour traiter les plaies déjà infectées ou présentant un risque infectieux. Néanmoins, les effets toxiques de l'argent envers les fibroblastes et les kératinocytes entraînent une perception limitée de l'efficacité remettant en cause leur bénéfice. Dans ce contexte, le projet de thèse a consisté en la conception d'un pansement à libération de deux principes actifs : un sel d'argent pour traiter l'infection et de l'ibuprofène pour soulager la douleur. Le pansement est enrobé par un système multicouches (PEM) afin de ralentir la diffusion de l'argent vers la plaie et au même temps fournir un environnement humide. Dans un premier temps, un textile en polyester a d'abord été fonctionnalisé soit par le chitosan, soit par la β -cyclodextrine tous les deux réticulés par l'acide citrique afin de former des charges négatives en surface du polyester, pour ensuite charger l'argent dans le textile. Puis le système PEM a été construit par la technique de « *dip-coating* » en utilisant le chitosan comme polyelectrolyte positif et la poly-cyclodextrine comme polyelectrolyte négatif. Après, un traitement thermique a été réalisé pour stabiliser les assemblages. Le système PEM a présenté une évolution linéaire en terme de gain de masse en fonction du nombre de couches déposées. La quantité d'argent et d'ibuprofène chargé sur les supports a été de 240 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et de 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivement. D'autre part, le profil de libération de l'argent atteint 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ à 72 heures tandis que la libération de l'ibuprofène est prolongée jusqu'à 6 heures dans le PBS, sous conditions statiques. Les études biologiques ont montré la cytocompatibilité du pansement vers les cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain (lignée L132) et une excellente activité antibactérienne contre les souches *S. aureus* et *E. coli*. Finalement, une étude préliminaire a été réalisée *in vivo* chez la souris C3H/HE présentant une plaie infectée par *E. coli*. Les pansements testés ont été appliqués sur les plaies et maintenus pendant 3 jours. Seul le pansement ne contenant pas d'argent (contrôle négatif) présentait encore une colonisation par *E. coli*.

Abstract

Chronic wounds present a risk of infection, delaying the healing process and leading to severe pain. Chronic wounds represent a public health problem that generates high costs. Silver dressings are widely used to treat wounds already infected or with a risk of infection. Nevertheless, the toxic effect of silver toward fibroblasts and keratinocytes generates a perception lack of efficacy and cost effectiveness, and question their effectiveness as well as its safety. The goal of this work was to design a wound dressing releasing two active ingredients: a silver salt to treat the infection and ibuprofen to relieve the pain. The dressing was coated by a layer-by-layer (*L-b-L*) system to slow down silver diffusion into the wound and at the same time provide a moist environment to the wound. First, a nonwoven polyester textile was functionalized by chitosan or by β -cyclodextrin polymer, both crosslinked with citric acid under curing conditions to form a thermofixed negatively charged layer at the surface textile to then loaded silver onto the textile. Next, a *L-b-L* system was built on the support by alternating self-deposition of CHT as cationic polyelectrolyte and cyclodextrin polymer as anionic polyelectrolyte. A curing process was applied to stabilize the *L-b-L* system. *L-b-L* system showed a linear evolution of the weight gain in relation to number of layers formed. Loaded silver and ibuprofen reached up to 240 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectively. Silver was released up to 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ after 3 days in PBS under static conditions, and ibuprofen was released up to 6 hours under the same parameters. Biological studies proved the dressing cytocompatibility using human lung normal cell lines (L132). *In vitro* microbiological evaluation showed greater antibacterial activity of the dressing against *S. aureus* and *E. coli*. Finally, a preliminary *in vivo* study was performed in C3H/HE mice with a wound infected by *E. coli*. The dressings tested were applied to the wounds and were maintained for 3 days. Only the free silver-dressing (negative control) showed a colonization by *E. coli*.