



Cotutelle internationale



Université des Sciences et Technologies de Lille

École Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Université de Monastir / Faculté des Sciences de Monastir

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Molécules et Matière condensée

Présentée et soutenue publiquement par

Imen KACEM

Le 15 Mars 2012

**Textiles à activité biologique via le greffage par plasma et
l'immobilisation de molécules bioactives**

Membres du jury :

Dr. Vincent ROUCOULES (IS2M, Mulhouse)	Rapporteur
Dr. Saber BEN ABDESSALEM (ENIM, Monastir)	Rapporteur
Dr. Fabienne PONCIN-EPAILLARD (UMR 6120, Univ. du Maine)	Examineur
Prof. Moncef MSADDEK (FSM, Monastir)	Examineur
Prof. Bernard MARTEL (UMET, Lille 1)	Directeur
Prof. Mustapha MAJDOUB (FSM, Monastir)	Co-directeur
Dr. Maude JIMENEZ (UMET, Lille 1)	Membre Invité
Dr. Nicolas BLANCHEMAIN (U1008, Lille 2)	Membre Invité

A la mémoire de mon père,

الله يرحمك

Tu as attendu ce moment avec impatience mais malheureusement tu ne peux pas y assister, tu nous as quitté le 31 décembre 2010. Papa, tu m'as fait aimer les études et la chimie à travers ton amour pour la science. Tu m'as soutenu jusqu'aux derniers instants de ta vie et tu as tout fait pour me pousser à avancer. Me voilà, aujourd'hui je réalise ton rêve...

À mon grand amour MAMA merci pour tout !

À mon frère et à tous mes amis qui m'ont toujours soutenu

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle internationale entre l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1 et l'Université de Monastir (Faculté des Sciences de Monastir) débutée en octobre 2008.

*Je tiens, en premier lieu, à remercier le Gouvernement Français, l'Ambassade de France en Tunisie, le Service de coopération et d'action culturelle de m'avoir soutenue financièrement afin de réaliser mes travaux en France. Je remercie plus particulièrement **Madame Imen ANNABI** et également **Madame Daniel FABIS** du CROUS de Lille pour leur aide et leur gentillesse.*

Monsieur le Professeur Bernard MARTEL

- Professeur de Chimie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.*
- Unité des Matériaux et Transformations (UMET), Université des Sciences et Technologies de Lille.*

Je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre Equipe Ingénierie des Systèmes Polymères depuis mon Master 2 Recherche. Grâce à mon séjour au sein de votre équipe, j'ai pu débiter ma carrière de chercheur et ainsi acquérir de nombreuses connaissances dans le domaine des polymères, biomatériaux et textile. Je vous remercie sincèrement pour votre encadrement tout au long de cette thèse et la confiance que vous m'avez accordée pour la réalisation de ce travail. J'exprime toute ma reconnaissance pour votre soutien et votre remarquable gentillesse dans les moments difficiles.

Messieurs les Professeurs Sadok ROUDESLI et Mustapha MAJDOUB

- *Professeurs de Chimie de l'Université de Monastir - Tunisie.*
- *Directeurs successifs du Laboratoire des Polymères Biopolymères et Matériaux Organiques (LPBMO) de la Faculté des Sciences de Monastir.*

C'est grâce à vous que j'ai pu réaliser mes études de troisième cycle en France. Merci de votre confiance, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni les conditions logistiques et financières. Je vous remercie de m'avoir encadré successivement au cours de cette thèse en cotutelle. J'exprime toute ma reconnaissance pour vos conseils avisés, pour l'aide que vous m'avez apportée et surtout pour votre gentillesse.

Monsieur le Docteur Vincent ROUCOULES

- *Maître de conférences (HDR) de l'Institut des Sciences des Matériaux de Mulhouse (LRC 7228 - CNRS), Université de Haute-Alsace.*
- *Equipe "Adhésion" de l'Institut des Sciences des Matériaux de Mulhouse.*

De part vos compétences dans le domaine du traitement de surface par plasma froid, vous me faites l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail en tant que rapporteur, je vous en remercie sincèrement.

Monsieur le Docteur Saber BEN ABDESSALEM

- *Maître de conférences (HDR) de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Monastir - Tunisie.*

De part vos compétences dans le domaine du textile et vos expériences dans le domaine biomédical, vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteur. Je vous exprime mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Fabienne PONCIN-EPAILLARD

- *Directeur de Recherches CNRS de l'Université du Maine*
- *Directeur du laboratoire Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR 6120 de l'Université du Maine*

En vue de vos compétences dans le domaine des polymères, des traitements de surfaces par plasma et de votre expérience dans le domaine médical, vous me faites également l'honneur de siéger dans ce jury. Je vous en remercie sincèrement.

Monsieur le Professeur Moncef MSADDEK

- *Professeurs de Chimie de l'Université de Monastir - Tunisie.*
- *Unité de recherches 01/UR/12-01 de la Faculté des Sciences de Monastir*

En vue de vos compétences dans le domaine de la synthèse organique, c'est un honneur de vous voir siéger au sein de ce jury. C'est une occasion de vous exprimer mes sincères remerciements et mon profond respect.

A mes encadrants de thèse

Madame le Docteur Maude JIMENEZ

- *Maitre de conférences à L'Institut Universitaire de Technologie 'A' de Lille de l'Université des Sciences et Technologies de Lille*
- *Unité des Matériaux et Transformations, Laboratoire PERF, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille*

Tu m'as encadré tout au long de cette thèse surtout lors de la réalisation des manipulations en Plasma Froid et traitement de surface. Je te remercie sincèrement pour tes conseils et ton aide.

Le Docteur Nicolas BLANCHÉMAIN

- *Maitre de Conférences (HDR) de la Faculté de Pharmacie de Lille 2*
- *INSERM U1008 "Médicaments et Biomatériaux à Libération Contrôlée"*

Même si officiellement tu n'étais pas mon encadrant, tu m'as suivi tout au long de cette thèse et tu as participé grandement à l'avancée des travaux surtout pour les tests biologiques et microbiologiques. J'exprime ma reconnaissance pour ton soutien scientifique et morale.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Michel TRAISNEL de l'Unité des Matériaux et Transformations, Laboratoire PERF, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de sa gentillesse et de ses conseils avisés pour la réalisation des manipulations de plasma froid.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur Hartmut Frédéric HILDEBRAND de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire INSERM U1008 "Médicaments et Biomatériaux à Libération Contrôlée" de la faculté de Médecine de Lille 2 et de m'avoir permis la réalisation des tests biologiques au sein de son laboratoire.

Je remercie également Madame le Docteur Christelle NEUT, du laboratoire de biologie-microbiologie de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille pour m'avoir permis de réaliser les tests bactériologiques au sein de son laboratoire.

Je remercie chaleureusement le Docteur Chai FENG ingénieur de Recherche (HDR), de l'INSERM U1008, d'avoir effectué les tests de cytocompatibilité et le Médecin Elixène JEAN-BAPTISTE pour les tests d'hémocompatibilité.

Je tiens à remercier Mickäel MATON pour tous les essais de microbiologie et pour l'aide qu'il m'a fournie durant la réalisation des différentes manipulations.

Je remercie le Docteur Mathilde CASSETTA, Maître de conférences de l'ENSCL, pour son aide et sa grande gentillesse pour l'interprétation des résultats du plan d'expériences et la manipulation au logiciel ainsi que le Docteur Stéphanie DEGOUTIN, Maître de conférences de polytech'Lille, pour son aide et ses conseils.

Pour toutes les caractérisations au MEB, je tiens à remercier le Docteur Séverine BELLAYER, Ingénieur de recherche à l'UMET, ENSCL et également Monsieur Arnaud BEAURAIN, Ingénieur de recherche du Pôle Régional d'Analyse de Surface pour la réalisation des analyses en XPS et Adeline MARIN, Assistante Ingénieur de l'UMET pour son aide précieuse lors des essais de traction.

J'adresse mes plus vifs remerciement à tous le personnel des différents laboratoires pour leur aide, leur sympathie et leur humour qui ont facilité mon intégration au sein des équipes de recherche et ont permis la réalisation de ces travaux dans les meilleures conditions. Merci beaucoup à tous les thésards et surtout à mes anciens et actuels collègues de bureau à l'UMET Léna, Cédric, Guillaume, Hélène, Aurélie...

Résumé

Textiles à activité biologique via le greffage par plasma et l'immobilisation de molécules bioactives

L'intérêt des implants médicaux ne cesse de grandir et leur utilisation tend à s'étendre aux différents domaines de la chirurgie, en partie grâce à l'émergence de nouvelles techniques de modification de surface. Ainsi il est possible d'améliorer les propriétés des biomatériaux en vue d'une meilleure intégration dans les tissus vivants et prévenir les diverses complications liées à leur utilisation. Ceci permet à la fois de répondre aux attentes des chirurgiens, d'améliorer les conditions de guérison des patients suite à l'intervention, voire même d'apporter une activité thérapeutique à long terme au biomatériau en évitant la rechute, la thrombose, la restenose ou l'infection. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à fonctionnaliser la surface de textiles en polyester (polyéthylène téréphtalate), matière très largement utilisée dans le domaine médical, par des molécules bioactives connues par leurs propriétés antibactérienne ou anti-thrombotique: le lysozyme, la gentamicine et l'héparine. L'idée développée dans ce travail de thèse fut de fixer dans un premier temps des fonctions acide carboxylique (-COOH) jouant le rôle d'«ancrage» pour la fixation ultérieure des trois principes actifs. La première étape a donc consisté à greffer l'acide polyacrylique (PAA) par copolymérisation greffante assistée par traitement plasma froid, suivie dans un second temps, de la fixation des trois principes actifs, par liaisons physiques (ioniques) et/ou covalentes. L'étude a d'abord porté sur l'optimisation des paramètres de ces deux étapes du traitement via une investigation systématique et un plan d'expériences. Des techniques de caractérisations telles que la spectrophotométrie UV, l'analyse infrarouge IRTF, l'analyse thermique ATG, l'analyse par spectrométrie photoélectronique XPS, la mesure de l'angle de goutte, la microscopie électronique à balayage MEB et des essais mécaniques ont montré l'évolution de la composition de la surface et de propriétés mécaniques des textiles au fil des différentes étapes. Des études biologiques par des tests de vitalité cellulaire, d'adhésion plaquettaire et de coagulation ainsi que différentes études microbiologiques ont pu montrer selon les différentes voies de modification choisies l'obtention de supports fonctionnalisés biocompatibles à efficacité intéressante pour des applications biomédicales.*

* **Mots clés :** Biomatériaux – Textile – Plasma – Greffage –Gentamicine– Héparine – Lysozyme – acide acrylique

Abstract

Textiles with biological activity via the grafting by cold plasma and the immobilization of bioactive molecules

The interest in medical implants increases and their use spreads to different surgical domains partially thanks to the new techniques of surface modification. Therefore it is possible to improve the biomaterials properties in order to solve the problems liked with their integration in the living tissues and thereby to prevent the various complications related to their use. This approach allows to respond to the surgeons expectations, to improve the curing process of the patients and even to involve long term therapeutic activities to the biomaterial, thus preventing the release of the disease (such as thrombosis, restenosis, infection). In this context, we have attempted the functionalization of the surface of a polyester fabric (polyethylene terephthalate), widely used in medical field, by three bioactive molecules: lysozyme, gentamicin and heparin known for their antimicrobial or anti thrombotic properties. The concept was to graft polyacrylic acid (PAA) by graft polymerization induced by cold plasma technique, followed by the immobilization of the above mentioned molecules through physical and covalent links. We studied all the experimental parameters involved in the different processes and followed the properties of the obtained materials through the appropriate characterizations techniques, such as spectrophotometry UV, Infrared analysis IRTF, Thermogravimetric analysis (TGA), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), goniometry, scanning electron microscope (SEM), and mechanical tests. Finally, biological studies such as cell vitality tests, platelets adhesion test and coagulation test in addition with various microbiological essays showed the evolution of the biological properties of the materials, depending on the path of their modification resulted in the development of a novel, biocompatible functionalized supports family with very interesting and attractive efficacy for biomedical applications.*

* **Keywords** : Biomaterials - Fabric – Plasma – Grafting – Gentamicin – Heparin – Lysozyme – acrylic acid

SOMMAIRE

Principales Abréviations utilisées.....	1
Introduction Générale	4
I. Première Partie: Etude Bibliographique	8
1. Les Biomatériaux implantables : problèmes et solutions.....	8
1.1. Les biomatériaux implantables.....	8
1.2. Biocompatibilité et complications post-opératoires.....	11
1.2.1. La biocompatibilité	12
1.2.2. L'hémocompatibilité.....	12
1.2.3. La thrombose	13
1.2.4. L'infection.....	15
1.3. Les solutions proposées.....	17
1.3.1. L'imprégnation dans les solutions bioactives	18
1.3.2. Système à libération prolongée ' <i>Drug delivery system</i> ' :	19
1.3.3. Immobilisation des molécules bioactives	21
1.3.4. Rôle de l'aspect hydrophile/ hydrophobe de la surface	22
2. Les techniques d'activation de surface par irradiation.....	26
2.1. Quelques techniques de traitement de surface par irradiation.....	27
2.2. Le plasma	28
2.2.1. Définition du plasma froid.....	28
2.2.2. Les avantages du plasma froid.....	29
2.2.3. Les plasmas froids.....	30
2.2.3.1. Le plasma atmosphérique.....	30
2.2.3.2. Le plasma basse pression	31
2.2.4. Effet de la nature du gaz sur la surface	33
2.2.5. Les applications du plasma froid	37
3. La copolymérisation greffante	38
3.1. Définition de la copolymérisation greffante.....	38
3.1.1. La copolymérisation greffante « <i>grafting onto</i> »	38
3.1.2. La copolymérisation greffante « <i>grafting from</i> ».....	39
3.2. La copolymérisation greffante pour des applications biomédicales	40
3.2.1. Amélioration des propriétés des biomatériaux par greffage des polymères.....	40
3.2.2. Les procédés de greffage de l'acide polyacrylique.....	43
3.2.2.1. Le greffage en solution.....	44
3.2.2.2. Le greffage par méthode « <i>in-situ</i> »	45

3.2.2.3.	La polymérisation par plasma en phase gaz.....	46
4.	L'immobilisation des molécules bioactives : lysozyme, héparine et gentamicine ..	47
4.1.	L'héparine:	47
4.1.1.	Effet thérapeutique et activité de l'héparine	47
4.1.2.	L'immobilisation de l'héparine et son mécanisme réactionnel	48
4.2.	La gentamicine	51
4.2.1.	Effet thérapeutique et activité de la gentamicine	52
4.2.2.	L'immobilisation de la gentamicine et son mécanisme réactionnel	52
4.3.	Le lysozyme	53
4.3.1.	La bioactivité du lysozyme	53
4.3.2.	L'immobilisation du lysozyme et son mécanisme réactionnel	54
II.	Deuxieme Partie : Matériels et Méthodes	59
1.	Le greffage de l'acide polyacrylique sur surface textile	59
1.1.	Matériels : le polyéthylène téréphtalate	59
1.2.	Produits : l'acide acrylique.....	60
1.3.	Méthodes de greffage	61
1.3.1.	Activation de la surface par plasma froid	61
1.3.2.	Le procédé de greffage dit 'en solution'	64
1.3.3.	Le procédé de greffage dit 'par foulardage'	66
1.3.3.1.	Méthode de greffage	66
1.3.3.2.	Optimisation du procédé de greffage par la méthode des plans d'expériences	67
1.3.4.	Le nettoyage des échantillons	70
1.3.5.	Bilan	70
1.4.	Caractérisations des surfaces greffées	71
1.4.1.	Dosage des fonctions acide carboxyliques par le TBO.....	71
1.4.2.	L'analyse thermogravimétrique (ATG)	72
1.4.3.	La mouillabilité	72
1.4.4.	Les essais mécaniques.....	73
1.4.5.	La microscopie électronique à balayage (MEB).....	74
1.5.	Evaluation de la cytocompatibilité des textiles greffés	74
1.5.1.	Les cellules.....	74
1.5.2.	La vitalité cellulaire	76
1.6.	Test d'adhésion plaquettaire.....	77
2.	L'immobilisation des molécules bioactives	79

2.1.	Produits : les molécules bioactives.....	79
2.2.	Méthodes : les procédés d'immobilisation des molécules bioactives	79
2.2.1.	Procédé d'immobilisation des molécules bioactives par voie 1 : directe ...	79
2.2.2.	Procédé d'immobilisation des peptides voie 2 : via « <i>spacer</i> »	81
2.2.3.	Bilan	84
2.3.	Caractérisations des surfaces modifiées	85
2.3.1.	Dosage des fonctions amines primaires	85
2.3.2.	Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	86
2.3.3.	Analyse Elémentaire (AE)	86
2.3.4.	La spectrométrie photoélectronique X (XPS).....	86
2.4.	Evaluation microbiologique des surfaces.....	87
2.4.1.	Les bactéries.....	87
2.4.2.	Entretien des bactéries et préparation de l'inoculum	88
2.4.3.	La mesure de la CMI.....	88
2.4.4.	Tests d'adhésion bactérienne	89
2.4.4.1.	1 ^{ère} étape : la mise en contact avec les bactéries	89
2.4.4.2.	2 ^{ème} étape : le dénombrement des bactéries	90
III.	Troisième Partie: Resultats.....	94
1.	Greffage de l'acide polyacrylique	94
1.1.	Le traitement par plasma froid	94
1.1.1.	Composition des gaz dans le plasma.....	94
1.1.1.1.	Influence des proportions des gaz sur les propriétés mécaniques.....	95
1.1.1.2.	Influence des proportions des gaz sur le taux de greffage	97
1.1.1.3.	Caractérisation par ATG	99
1.1.2.	Durée de l'activation par traitement plasma froid	101
1.2.	Greffage de l'acide polyacrylique par procédé dit 'en solution'	103
1.2.1.	Etude préliminaire.....	103
1.2.2.	Influence temps / température.....	104
1.2.3.	Influence de la concentration d'acide acrylique sur le taux de greffage...	106
1.2.4.	Caractérisations des textiles greffés par le PAA.....	107
1.2.4.1.	Observation par MEB	107
1.2.4.2.	Caractérisation par ATG	112
1.2.5.	Evaluation biologique des textiles greffés au PAA	113
1.2.5.1.	Vitalité cellulaire	113
1.2.5.2.	Adhésion plaquettaire.....	115

1.2.6.	Evaluation microbiologique des textiles greffés au PAA.....	116
1.3.	Conclusion.....	117
2.	Immobilisation des molécules bioactives.....	120
2.1.	Immobilisation de l'héparine.....	120
2.1.1.	Caractérisation de l'immobilisation de l'héparine	120
2.1.1.1.	Caractérisation de la fixation par infrarouge.....	120
2.1.1.2.	Caractérisation de la fixation par analyse élémentaire.....	122
2.1.1.3.	Caractérisation par mesure de l'angle de contact.....	123
2.1.2.	Evaluation biologique: Test de coagulation.....	124
2.2.	Immobilisation de la gentamicine	125
2.2.1.	Caractérisations de la fixation de gentamicine	126
2.2.1.1.	Caractérisation de la fixation par analyse XPS	126
2.2.1.2.	Quantification des fonctions amines disponibles de la gentamicine fixée.	130
2.2.2.	Evaluation microbiologique de la fonctionnalisation par la gentamicine.	131
2.3.	Immobilisation du lysozyme	133
2.3.1.	Immobilisation du lysozyme par la « voie 1 ».....	133
2.3.1.1.	Caractérisations de l'immobilisation du lysozyme	133
2.3.1.2.	Evaluation microbiologique	139
2.3.2.	Immobilisation du lysozyme par la « voie 2 » : via un bras espaceur	141
2.3.2.1.	Caractérisation du greffage de l'agent espaceur	141
2.3.2.2.	Caractérisation de la fixation du lysozyme	143
2.4.	Conclusion.....	144
3.	Approche du greffage "par foulardage" selon un plan d'expériences	147
3.1.	Evaluation de l'enrobage.....	148
3.2.	Résultats obtenus grâce au plan d'expériences	151
3.3.	Exploitation du plan d'expériences	153
3.4.	Détermination des conditions optimales	155
3.5.	Validation des résultats du plan d'expériences	159
3.6.	Conclusion.....	160
	Conclusion générale et perspectives	162
	Références Bibliographiques	166

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

AA	: acide acrylique
PAA	: acide polyacrylique
PET	: polyéthylène téréphtalate
PF	: plasma froid
RF	: radiofréquence
RdB	: rapport de bain
EDAC	: chlorhydrate de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
hep	: héparine
lys	: lysozyme
genta	: gentamicine
PBS	: phosphate buffer solution
TCPS	: tissu culture polystyrene
TBO	: bleu de toluidine oxyde
AO	: acide orange 7
UV	: spectrophotométrie ultra-violette
MEB	: microscopie électronique à balayage
IRTF	: spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ATG	: analyse thermogravimétrique
AE	: analyse élémentaire
XPS	: spectrométrie photoélectronique X
CMI	: concentration minimale inhibitrice
PET	: polyéthylène téréphtalate
bNH ₂ PEG	: O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>S. epidermidis</i>	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Supports modifiés

PET-PAA	: Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique.
PET-PAA-EDAC-hep	: Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par l'héparine via Chlorhydrate de 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide.

- PET-PAA-EDAC-lys** : Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par le lysozyme via Chlorhydrate de 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide.
- PET-PAA-NPEG** : Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par le bNH₂PEG.
- PET-PAA-NPEG-lys** : Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par le lysozyme via un espaceur le bNH₂PEG.
- PET-PAA-EDAC-genta** : Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par la gentamicine via Chlorhydrate de 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide.
- PET-PAA-genta** : Polyéthylène téréphtalate greffé par l'acide polyacrylique fonctionnalisé par adsorption de la gentamicine.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les biomatériaux sont des matériaux destinés à entrer en contact avec les tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour renforcer, protéger ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps défectueux telle que par exemple corail, vaisseau, os (etc.). Leur première utilisation à des fins thérapeutiques remonte à l'antiquité¹, malheureusement ces premiers biomatériaux implantés n'étaient pas spécialement adaptés à de longs séjours dans l'organisme.

Cette première génération de biomatériaux a été ensuite remplacée par des matériaux bio-inertes caractérisés par l'absence de nocivité même après une très longue durée d'implantation. Ce n'est que dans les années 1950, grâce notamment aux nouvelles connaissances acquises dans le domaine de la chimie des matériaux, que les premiers biomatériaux bio-tolérés ont été implantés (ex : en chirurgie vasculaire première prothèse vasculaire en polymère par Voochrees en 1952², premier stent métallique introduit par Puel en 1986³, etc...).

La tendance actuelle dans la recherche internationale ne se situe plus dans le remplacement des organes par des biomatériaux inertes et biocompatibles mais dans le développement de dispositifs médicaux fonctionnalisés, capables d'interagir avec les sites d'implantation de façon à accélérer les processus de guérison et de mieux intégrer l'implant au milieu vivant. Au troisième millénaire, les biomatériaux deviennent bioactifs et on passe d'une médecine réparatrice à une médecine régénératrice.

L'intérêt des biomatériaux implantables ne cesse de grandir et l'utilisation de ceux-ci tend à se diversifier davantage avec l'arrivée des nouvelles techniques de modification de surface. Ils sont employés dans tous les domaines chirurgicaux et sont constitués de différentes matières: céramiques, métaux et polymères ou composites⁴.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux biomatériaux sous forme textile. Ces dispositifs, implantés dans le corps humain, sont associés à des complications (mauvaise intégration tissulaire, infection, thrombose...) qui mènent à l'échec de l'implantation par phénomène dit de 'rejet', voire à de très graves complications conduisant à des amputations ou au décès du patient.

Une complication très largement rencontrée dans le domaine médicale: l'infection. Les infections peuvent toucher jusqu'à 6% des opérations d'implantation dans le domaine cardiovasculaire et 9% dans le domaine de la réparation des hernies. Le taux de mortalité associé à une infection de prothèse vasculaire au niveau aortique est de 40%. Pour une infection vasculaire au niveau infrainguinal, 33% des patients subissent une amputation de la jambe.

Afin de résoudre ces différentes complications, de nombreuses solutions sont proposées comme par exemple l'imprégnation des implants dans une solution d'antibiotiques avant implantation. Néanmoins, l'efficacité de cette imprégnation disparaît en quelques minutes car la quasi totalité de l'antibiotique diffuse rapidement⁵. L'ajout de molécules bioactives limitant la prolifération cellulaire et l'adhésion des protéines et des bactéries montre des effets positifs. Dans certains cas, la molécule bioactive devra être libérée dans le corps humain afin d'être active (antibiotiques, antiseptiques, etc.) et dans d'autres cas, elle devra rester immobilisée (anti-thrombogénique, facteur de croissance cellulaire, etc...).

C'est dans cette optique que cette thèse a été mise en place avec pour objectif principal l'élaboration d'un dispositif médical en polyéthylène téréphtalate possédant des propriétés thérapeutiques lui permettant de lutter contre les différentes pathologies rencontrées.

La modification de surface des textiles biomédicaux est basée, dans cette étude, sur le concept d'immobilisation de molécules bioactives : celles-ci seront fixées non seulement par des liaisons physiques mais aussi de manière irréversible par des liaisons covalentes afin de répondre aux diverses attentes des cliniciens.

Cependant, pour un biomatériau étant le plus souvent inerte chimiquement, il est nécessaire de créer préalablement des sites actifs qui permettront de fixer une ancre fonctionnelle favorisant ainsi l'accroche de molécules bioactives à sa surface. La fixation permanente et l'efficacité prolongée de la molécule bioactive seront recherchées puisque jusqu'à nos jours, rares sont les études qui ont permis d'atteindre ces objectifs.

Notre stratégie est basée sur l'immobilisation de ces molécules bioactives par l'intermédiaire d'un agent possédant les fonctions chimiques adéquates pour réagir avec la surface du biomatériau activé, d'une part, et la molécule bioactive d'autre part.

Un polymère fonctionnel, l'acide polyacrylique, a été choisi. La première étape consiste à réaliser la copolymérisation greffante de ce polymère amorcée par prétraitement de la surface par irradiation. De nombreuses techniques d'activation de surface telles que l'irradiation UV, le bombardement électronique, rayonnement gamma, le laser excimère et le plasma sont actuellement proposées. L'idée dans cette étude est d'utiliser le traitement plasma froid basse pression comme procédé contrôlable et respectueux de l'environnement.

Afin de conférer ensuite au biomatériau des propriétés thérapeutiques requises en fonction du type d'application, des molécules bioactives à propriétés antibactériennes ou anticoagulantes telles que le lysozyme, la gentamicine et l'héparine seront immobilisés. La surface traitée devrait alors finalement posséder les propriétés intrinsèques du principe actif (PA).

Ce mémoire est donc constitué de trois grandes parties :

La première partie est consacrée à décrire l'état de l'art des différents biomatériaux implantables et des problèmes liés à leur utilisation à l'échelle chirurgicale. Les solutions appliquées à ce jour ainsi que les différentes méthodes de modification de surface utilisées sont détaillées. Le choix du plasma froid est ensuite justifié. Les différentes stratégies de copolymérisation greffante des polymères fonctionnels à intérêt biomédical et les techniques d'immobilisation des molécules bioactives (l'héparine, la gentamicine et le lysozyme) sont finalement exposées.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude. Les protocoles de greffage, d'immobilisation, de caractérisation des surfaces modifiées et leurs évaluations biologiques et microbiologiques sont présentés.

La troisième partie présente les résultats de l'optimisation du greffage de l'acide polyacrylique sur la surface des textiles par deux méthodes ('en solution' et 'par foulardage'). Les mises aux points des protocoles d'immobilisation des molécules bioactives et les résultats des évaluations biologiques et microbiologiques des textiles modifiés sont ensuite détaillés. La discussion de ces résultats et les perspectives à ce travail sont finalement présentées.

PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Biomatériaux implantables : problèmes et solutions

1.1. Les biomatériaux implantables

La définition des biomatériaux a évolué au cours du temps en fonction des connaissances acquises et de l'augmentation du choix des matériaux¹. Il ne peut sans doute pas exister une seule définition satisfaisante des biomatériaux mais la Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux, dite *Conférence du Consensus*, a retenu en 1986 la définition suivante^{6,7,8}: « Matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques ». Cette définition a été améliorée lors d'une seconde conférence à Chester, en Grande Bretagne, en 1991⁹: « Matériaux destinés à être mis en contact avec les tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps ». Au-delà de toute définition formelle, la notion de biomatériau est entièrement contenue dans la nécessité de la prise en compte du contact de ces matériaux avec des tissus ou fluides vivants.

L'utilisation des biomatériaux est répandue dans tous les domaines médicaux grâce à leurs divers avantages. Aujourd'hui, il existe peu de thérapies chirurgicales qui ne font pas appel à ces matériaux¹⁰. Nous pouvons citer par exemple le traitement chirurgical des traumatismes, des problèmes cardiovasculaires, ophtalmologiques, urologiques ou articulaires, des tumeurs, des maladies dégénératives, etc...

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégralité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes de blessures ou de brûlures. Cette amélioration augmente non seulement l'espérance de vie mais aussi la prévalence de certaines maladies. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer et/ou d'améliorer les fonctions des organes lésés du corps humain. Ils peuvent exister sous différentes formes: métalliques (titane, argent, or, alliages...), céramiques, polymères ou composites^{8,11,12,13}.

L'utilisation des polymères comme biomatériaux a considérablement fait progresser la médecine moderne¹⁴. A l'heure actuelle, peu courants sont les biomatériaux implantables¹⁵ qui ne fassent pas appel aux polymères^{16,17}. Grâce à leurs propriétés mécaniques, à leur

durabilité¹⁸, leurs fonctionnalités¹⁹ et leur facilité de fabrication¹⁰, l'emploi de ces matériaux est un des paramètres essentiels du succès d'un implant. Les polymères utilisés peuvent être d'origine naturelle (collagène, cellulose, corail, soie...) ou synthétique (polypropylène (PP), polyéthylène (PE)²⁰, polyuréthane (PU)¹⁴, polyamides (nylon)²¹, polyméthacrylate de méthyle (PMMA), polytétrafluoroéthylène (PTFE), polyester, acide polylactique (PLA)^{22,23,24} polychlorure de vinyle (PVC), polyméthyle siloxane (silicone), polyéthylène téréphtalate (PET), etc...).

Lors de cette étude nous nous limiterons aux implants polymères d'origine synthétique, leur utilisation à l'échelle chirurgicale étant possible sous différentes formes²⁵. Le *Tableau 1* montre quelques types d'implants les plus couramment utilisés et leurs compositions:

Tableau 1 : Différents types et compositions des implants les plus couramment utilisés dans le domaine médical

Type d'implant	Matrice polymère utilisée	Structure existante du textile
Implants dentaires ²⁶	Polyester, PMMA, PE	-
Implants orthopédiques	PMMA, PET, PU, PE	-
Remplacement des articulations, tendons et tissus ²⁷	PET, Silicone, PE	-
Remplacement des ligaments du genou et de l'épaule ^{28,29,30}	PET, PLA, PTFE, PP	Tressé, tissé, tricoté
Prothèses ^{31,32} , valves vasculaires ³³ , cœur artificiel	PET, PTFE, PU, Silicone, PP	Tressé, tricoté
Remplacements des cartilages	PET, PU, PTFE	-
Matériel et fils de suture ³⁴	PP, Nylon, PET, PU	Monofilament, tressé
Plaques d'événement ³⁵ et réparation des hernies ³⁶	PLA, PET, PU, PP	Tissé, Non-tissé, tricoté

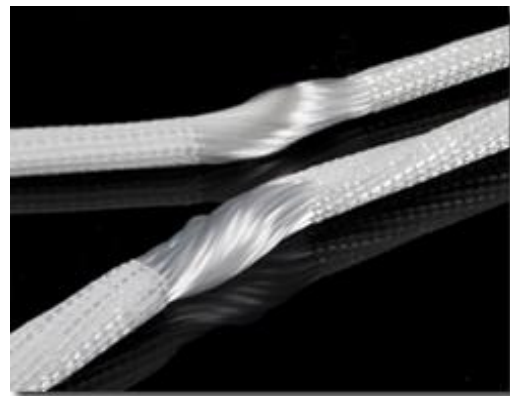
De manière plus spécifique, les implants sous forme textile sont de plus en plus utilisés dans les applications biomédicales. Les matériaux textiles sont obtenus par l'assemblage de fils ou de fibres. Il existe différentes structures de base des textiles telles que:

- a) **Le textile en tulle ou « mesh »** : Ce textile est très largement utilisé pour la fabrication des plaques d'éventration (*Figure 2 (c)*). Ce sont des fibres textiles tissées ou tricotées avec des mailles plus ou moins serrées. Nous avons utilisé ce type de textile dans cette étude.
- b) **Le textile non-tissé**: C'est un textile dont les fibres sont maintenues de façon quasi aléatoire. Il s'agit d'une feuille manufacturée, constituée de voile ou de nappe de fibres orientées directionnellement ou au hasard, liées par friction et/ou cohésion et/ou adhésion (Extrait de la définition *ISO 9092 : 1988*). Ce sont des fibres qui sont transformées en voile grâce à un nappage; la cohésion de ce voile est assurée par des liaisons inter-fibres de types chimiques (liants), physiques (chaleur) voire mécaniques. Un non-tissé est le deuxième type de textile employé dans ce projet.

Le polyéthylène téréphtalate (PET), connu pour ses propriétés physico-chimiques très intéressantes, est l'un des polymères les plus utilisés dans le domaine biomédical, commercialisé sous le nom Dacron®. Il est hydrophobe, possède une haute résistance thermique et une bonne résistance à l'hydrolyse dans les acides dilués. Il est insoluble dans la plupart des solvants organiques. Le PET est utilisé sous différentes formes textiles tricotées, tissées, non-tissées ou tressées (*Figure 1 et Figure 2*).



a) *Prothèses vasculaires en PET des Laboratoires Perouse Medical*³⁷



b) *Ligaments en PET commercialisés par LARS; Surgical Implants and Devices*³⁸

Figure 1 : Quelques exemples d'implants biomédicaux en PET sous forme textile



Figure 2 : Quelques exemples d'implants biomédicaux en PET sous forme textile commercialisés par Cousin Biotech³⁹

Nous assistons à une évolution dans la recherche des biomatériaux implantables, car ceux-ci s'avèrent posséder des potentialités bien plus grandes. Cette évolution est caractérisée par une approche qui prend en compte non seulement les propriétés mécaniques (matériel d'ostéosynthèse, prothèses articulaires ou vasculaires⁴⁰, remplacements de conduits) mais aussi biologiques (facteurs de croissance, protéines cytoconductrices, thérapie cellulaire, biotechnologies et thérapie génique).

La conception optimale de tels implants exige la connaissance et la modulation des propriétés mécaniques⁴¹, physico-chimiques et biologiques des tissus ainsi que de leurs propriétés de surface (telles que par exemple la porosité, la rugosité, l'énergie de surface, l'hydrophilie, l'hydrophobie, la nature des fonctions chimiques, etc...).

Tous les matériaux décrits précédemment sont exposés à de nombreux risques liés à l'interaction entre l'implant et le corps humain. Des complications peuvent survenir et réduire les chances de réussite de l'implantation et de survie pour le patient.

1.2. Biocompatibilité et complications post-opératoires

Tout biomatériau une fois implanté entre en interaction avec le tissu vivant et peut amener à des réponses biologiques non maîtrisées comme l'activation du système immunitaire, l'activation des plaquettes, l'adsorption de protéines, les réactions inflammatoires et l'adhésion cellulaire. La réponse biologique consiste ainsi en une série de réactions complexes impliquant divers types de cellules (densités, activités et fonctions), des protéines, des plaquettes et de nombreux médiateurs chimiques⁴². Néanmoins, les différentes

étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, à l'organe dans lequel se déroule l'implantation et au terrain physiologique de l'hôte. La réaction normale du corps sera modulée en fonction du type d'implant introduit. Elle est donc différente en intensité et en durée selon l'emplacement anatomique choisi²⁵.

De nombreuses études réalisées sur les biomatériaux implantables sous forme textile ont montré l'apparition de complications post-opératoires liées à ces réactions biologiques non maîtrisées. Elles sont principalement liées à la notion de biocompatibilité, d'hémocompatibilité et d'infection du dispositif médical.

1.2.1. La biocompatibilité

La notion de biocompatibilité est essentielle dans le domaine des biomatériaux^{43,44}. Elle est la caractéristique la plus importante d'un implant dont la surface est en contact avec l'organisme humain. C'est la capacité d'un matériau à s'intégrer dans le tissu humain sans produire d'effets indésirables. La compréhension de ce phénomène est très importante pour le devenir d'un biomatériau après implantation. La biocompatibilité a été récemment définie comme "la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique"^{4,45,46}. Cette biocompatibilité "élargie" débouche sur la notion très actuelle de "bioactivité" : on souhaite que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais qu'il fasse aussi réagir le tissu vivant et s'intègre au mieux à celui-ci. Un matériel biocompatible ne doit pas présenter à court terme des réponses thrombogéniques, toxiques, hémolytiques, ou inflammatoires et à long terme des effets cancérogènes, mutagéniques, ou tératogéniques^{12,15,47}.

1.2.2. L'hémocompatibilité

L'hémocompatibilité joue un rôle très important dans le succès d'un implant. Si la biocompatibilité peut être considérée comme la tolérance du corps à l'implant, l'hémocompatibilité est effectivement la tolérance du sang à l'implant⁴⁸.

Il est important de noter que le sang est parmi les premiers liquides corporels qui entrent en contact avec l'implant. La compatibilité avec le sang est de grande importance dans beaucoup de procédures cliniques, comme par exemple la réparation de vaisseau sanguin, les prothèses vasculaires, les valves cardiaques, etc...

L'hémocompatibilité porte en priorité sur le problème d'adhésion et d'agrégation plaquettaire en présence d'un « corps étranger » et sur les risques de déclencher la cascade de la coagulation^{49,50,51}. C'est un problème que l'on sait étudier mais que l'on ne sait pas encore traiter de façon satisfaisante. L'étude de l'hémocompatibilité est complexe et ne se limite pas à celle de la coagulation. Elle inclut également celle de la réponse du système immunitaire (anticorps, système du complément,...)⁵², celle de la réaction des cellules et tissus, et notamment des lymphocytes et leucocytes présents dans le sang^{53,54}.

En effet, le contact entre le sang et la surface de l'implant implique des réactions inflammatoires^{55,56}. C'est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression ou à la présence d'un « corps étranger » dans l'organisme humain. Le déclenchement de ce système produit l'activation des plaquettes et la formation de fibrine, qui emprisonne les cellules infusées dans le sang et mène à des réactions inflammatoires et/ou thrombotiques^{57,58,59}. Cette interaction est principalement gérée par l'adsorption des protéines du plasma et le comportement des cellules à la surface des biomatériaux^{17,60,61,62}.

Les biomatériaux, une fois implantés déclenchent parfois des réactions défavorables telles que la thrombose et ils sont potentiellement exposés au risque d'infection suite à une contamination lors de l'acte chirurgical⁶³.

1.2.3. La thrombose

La thrombose est un des problèmes majeurs associés aux biomatériaux implantables en contact direct avec le sang⁴⁵. La thrombose est considérée comme un cas particulier de l'inflammation⁶⁴. Le succès de l'implantation se rapporte principalement à la réponse thrombotique des implants biomédicaux.

Habituellement, l'adsorption rapide des protéines du plasma se produit sur la surface « étrangère » qui mène à l'adhésion des plaquettes et donc déclenche la cascade de la coagulation. Le système immunitaire augmente directement la coagulation. Celle-ci, complétée par ses interactions avec d'autres médiateurs inflammatoires peut augmenter la thrombogénicité du sang et donc générer la thrombose⁶⁵ (*Figure 3*).

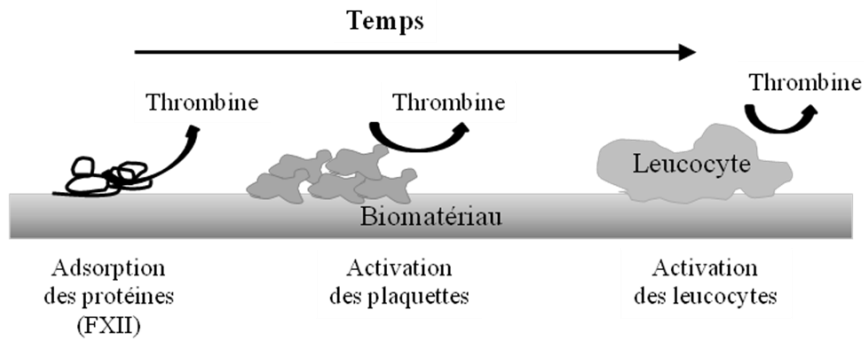


Figure 3 : Schéma présentatif de la formation de la thrombose sur un biomatériau implanté inspiré de Gorbet et al.⁶⁴

Le phénomène de thrombose est très connu dans le domaine cardiovasculaire. Un caillot de sang (thrombus) est constitué principalement de plaquettes, de fibrines et de globules rouges, le tout adhérant à la surface de l'implant. Il est provoqué par le ralentissement de la circulation sanguine (*Figure 4*). Le sang stagne et commence à s'épaissir. Le thrombus peut grossir jusqu'à obstruer totalement la lumière du vaisseau et ainsi bloquer le flux sanguin. Une artère obstruée par un thrombus peut entraîner des conséquences dramatiques. L'obstruction d'une artère des membres inférieurs, par exemple, peut conduire à l'amputation totale ou partielle de la jambe atteinte. Le plus souvent, la thrombose veineuse s'accompagne d'une phlébite, réaction inflammatoire de la veine lorsque le caillot grossit et adhère à la paroi.

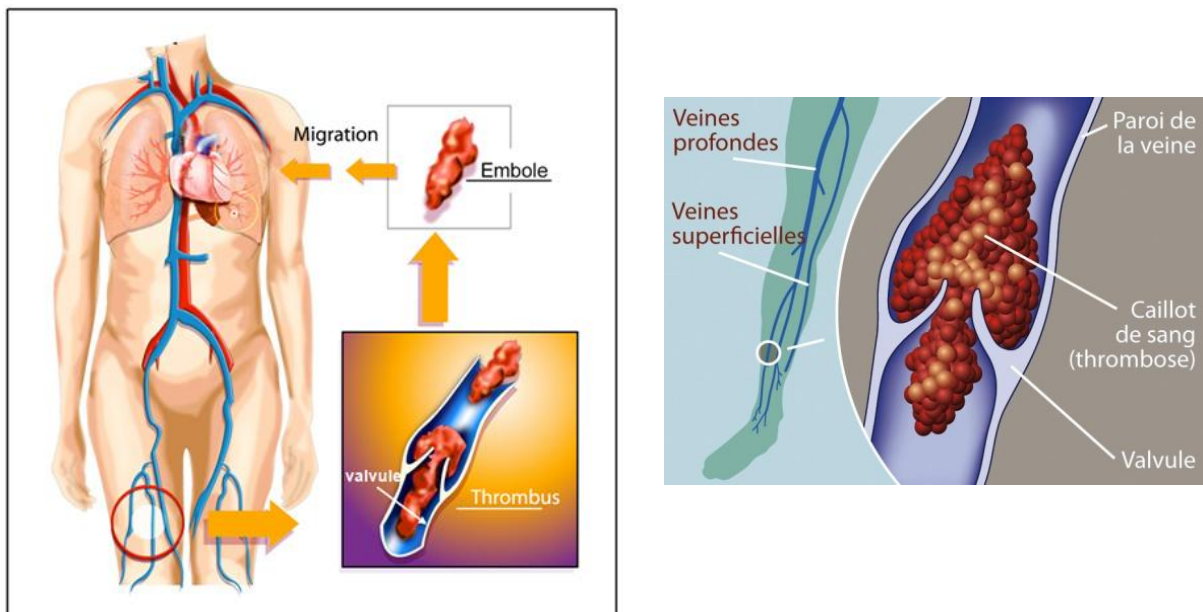


Figure 4 : Représentation de thrombose

Le phénomène de thrombose est un réel danger pour l'avenir de l'implant dans le corps humain. Il est bien évident que la formation d'un thrombus dépend du comportement des plaquettes sur ou à côté de la surface et/ou du comportement des protéines qui sont à la base de la coagulation⁶⁶. La minimisation de l'adsorption des protéines et de l'adhésion des plaquettes de protéine est donc critique pour améliorer l'hémocompatibilité des biomatériaux.

1.2.4. L'infection

L'infection bactérienne sur matériels implantés est l'un des problèmes majeurs^{67,68}. Elle se produit lors de la mise en contact du biomatériau implantable avec les systèmes biologiques^{69,70}. Elle est la principale cause de l'échec de l'implant et reste le challenge le plus intéressant pour les chercheurs.

Dans le cas de la chirurgie cardiovasculaire par exemple, l'infection des prothèses vasculaires est l'une des plus graves complications qui peut toucher jusqu'à 6% des patients et mener jusqu'à 27% de mortalité et jusqu'à 15% d'amputations⁷¹. 24 à 50% des prothèses sont colonisées par la bactérie *Staphylococcus aureus*⁷². Dans la réparation des hernies, l'infection touche jusqu'à 9% des prothèses implantées^{35,73}. Les infections sur cathéters sont une des premières causes de bactériémies nosocomiales et sont responsables d'une mortalité non négligeable⁶⁷. Pour sauver la vie du patient, il ne reste que le retrait de l'implant infecté, la désinfection du site et l'implantation d'un nouveau dispositif ce qui représente des coûts élevés pour le système de santé publique et un grand malaise pour le patient⁷⁴.

L'infection peut être pluri-microbienne⁷⁵. Les agents infectieux les plus rencontrés à la surface de l'implant sont: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*^{68,76,77,78,79,80,81}.

Comme nous l'avons déjà vu, suite au contact entre l'implant et le corps humain le système immunitaire s'active. Des réactions du « corps étranger » se déclenchent ce qui offre un support pour l'ancrage microbien et favorise l'adhésion bactérienne. La colonisation de la surface de l'implant par des bactéries contaminantes peut conduire à la formation d'un biofilm (*Figure 5*) protégeant les bactéries des défenses immunitaires et d'une antibioprofylaxie systémique^{5,85,82,83}.

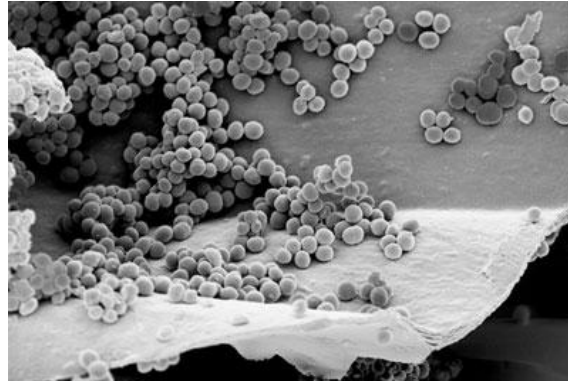


Figure 5: 2002N01268 - © CNRS Photothèque -Prise de vue au microscope électronique à balayage d'un biofilm de "Staphylococcus aureus" développé sur une prothèse vasculaire présentant une résistance exceptionnelle à l'antibiothérapie

L'adhésion bactérienne est donc souvent considérée comme l'étape critique du développement de l'infection. Il se produit, lors de l'implantation, une concurrence entre l'intégration tissulaire de l'implant et l'adhésion des bactéries. Si une réaction immunitaire suffisante ne se produit pas, l'arrangement et la cicatrisation à l'endroit de l'implantation ne peuvent pas surmonter l'invasion de micro-organismes et le développement d'une infection peut sérieusement limiter le processus de guérison ce qui mène à l'échec de l'implantation⁸⁴.

Les infections prothétiques sont influencées par la localisation du site d'implantation, les indications opératoires, les défenses immunitaires et la morbidité du patient⁷⁵. Ces infections s'avèrent difficiles à traiter. En effet, les infections associées aux implants sont très localisées et sont difficilement accessibles par les antibiotiques, à cela s'ajoute le problème des souches résistantes.

Afin de lutter contre l'infection, les efforts se sont concentrés d'une part sur le développement des meilleures méthodes au niveau de l'acte chirurgical, pour prévenir la contamination et empêcher l'infection post-opératoire^{74,85,78} et d'autre part sur l'étude des causes de ces infections, des différents facteurs bactériens et leurs comportements vis-à-vis la surface.

D'après ce que nous avons vu précédemment, la surface de l'implant joue un rôle très important sur la réponse tissulaire et en particulier sur l'adsorption et l'interaction des différentes protéines qui, à leur tour, commandent l'adhésion cellulaire et leur comportement envers le matériau^{86,87}. Cependant, la réaction globale du corps envers un implant est une propriété de chaque organisme incluant la chimie et la texture de la surface, la biodégradation

et les aspects mécaniques de l'implant⁸⁸. Selon la composition (charge, polymère, nanoparticule...) et la forme (topographique, mécanique, morphologique) de sa surface, le biomatériau favorisera des réponses spécifiques aux cellules et bactéries qui les décoderont selon leurs signaux et comportements biochimiques⁸⁹.

La biocompatibilité et l'hémocompatibilité des implants polymères forment une équation très complexe qui dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques du matériau, de chaque corps humain et de sa propriété à l'interaction^{4,49}.

A l'heure actuelle, de nombreuses recherches sont effectuées afin de rendre bioactifs certains de ces matériaux par différentes fonctionnalisations de surface^{90,91}. L'intérêt de cette évolution réside essentiellement dans la mise au point de nouveaux types de prothèses et implants fonctionnalisés par divers traitements chimiques et physiques susceptibles de prévenir les infections pré-, péri- et post-opératoires, d'améliorer leur compatibilité plasmatique, de stimuler l'intégration tissulaire et/ou d'accélérer le temps de guérison du patient.

1.3. Les solutions proposées

La recherche dans le domaine des biomatériaux s'est récemment concentrée sur la conception de matériaux techniques, matériaux qui peuvent favoriser des réponses spécifiques et réduire les interactions non spécifiques pour pouvoir contrôler la reconnaissance cellulaire, peptidique et bactérienne ainsi que les comportements cellulaires, tels que l'adhésion, la prolifération, la différenciation, (etc.). Cela permet de contrôler leur environnement biologique afin d'améliorer le processus d'intégration de l'implant.

Depuis de nombreuses années, la propriété principale recherchée des biomatériaux implantables était d'être inerte biologiquement^{45,92,93}. Le but étant de limiter et de réduire au maximum les interactions non spécifiques causées par des réactions immunitaires liées à la présence du « corps étranger ». Les implants limitant l'adhésion cellulaire et protéiques sont considérés comme avantageux⁹⁴. Ces interactions dépendent principalement de la chimie de la surface.

Actuellement, non seulement des matériaux bio-inertes sont recherchés mais aussi des modifications de surface de ces derniers qui peuvent répondre aux changements

l'environnement biologique, tel par exemple un changement d'activité enzymatique ou cellulaire⁹⁵. La tendance consiste à réaliser des biomatériaux biologiquement actifs capables de reproduire des interactions spécifiques¹. Ils permettraient de contrôler directement l'adhésion cellulaire et protéique. Le but est donc de produire une surface biocompatible et stimulant la réponse des protéines et des cellules afin de résister aux différentes complications décrites précédemment⁴⁵.

La modification de surface permet d'avoir un revêtement basé sur la libération prolongée et/ou contrôlée des agents thérapeutiques (*Drug delivery systems*) ou sur l'immobilisation des molécules bioactives à la surface du dispositif médical⁹⁰.

Nous décrivons ci-après les solutions proposées pour résoudre ces diverses complications rencontrées en clinique afin d'améliorer la biocompatibilité et l'hémocompatibilité des biomatériaux implantables.

1.3.1. L'imprégnation dans les solutions bioactives

Les efforts se sont tout d'abord dirigés vers l'optimisation de la pratique chirurgicale par la modification du flux d'air de la chambre opératoire avec des isolations spécifiques⁷⁶. Cette optimisation est l'une des solutions efficaces pour réduire l'incidence d'infections post-opératoires.

A l'heure actuelle, les approches utilisées pour la réduction des risques d'infection se sont plutôt focalisées sur le rôle de l'implant en lui-même dans le mécanisme de l'infection et donc par conséquent sur la modification de la surface afin de le protéger de la colonisation bactérienne.

L'une des solutions les plus simples est l'imprégnation des prothèses dans une solution d'agent thérapeutique (antibiotique, antiseptique...) juste avant l'acte chirurgical ce qui permet de réduire la susceptibilité de l'hôte à l'infection. Les prothèses vasculaires par exemple sont imprégnées dans la rifampicine⁵.

Cependant, l'efficacité de l'agent thérapeutique disparaît quelques heures voire quelques minutes après l'implantation d'où la nécessité d'effectuer des injections intraveineuses d'antibiotiques (vancomycine, oxacilline...) pendant 10 à 14 jours en traitement

prophylactique^{78,96}. Cette méthode est largement pratiquée dans le domaine de la chirurgie vasculaire et orthopédique^{5,76}.

D'autre part, afin d'augmenter les performances des implants pour lutter contre l'infection, les implants (essentiellement des prothèses vasculaires) ont été imprégnés dans des solutions de gélatine, d'albumine ou de collagène afin d'améliorer les interactions matériaux/principe actif^{5,11,95,97}. Ces protéines ont été réticulées à la surface via une réaction avec le formaldéhyde ou le glutaraldéhyde. Une étude sur l'implantation des prothèses imprégnées dans le collagène puis dans des solutions d'antibiotiques a montré une infection réduite des prothèses modifiées pendant 3 semaines par rapport à la prothèse de contrôle⁹⁸.

L'inconvénient est que les prothèses en PET enduites de collagène ont montré un retard de cicatrisation. De plus, l'utilisation du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde est fortement déconseillée puisque ces produits sont classés cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR).

Afin de créer des systèmes plus stables et plus efficaces, les chercheurs ont exploité l'importance de la nature de liaison entre l'antibiotique et l'implant médical.

1.3.2. Système à libération prolongée '*Drug delivery system*' :

Les chercheurs se sont donc intéressés à l'élaboration de biomatériaux qui délivrent de manière contrôlée et prolongée des principes actifs (antibiotiques, antitumoraux, anti-inflammatoires, anti-thrombogéniques, antiseptiques, biocides...) pour interagir avec leur cible (par exemple une bactérie)^{96,99}. Le but est de développer un système qui permettrait de contrôler les doses et la durée d'action des médicaments, et doterait ainsi les dispositifs implantables d'une capacité à s'opposer au développement du processus infectieux. Les antibiotiques typiquement incorporés dans les systèmes à libération contrôlée sont : vancomycine, tobramycine, cefamandole, cephalothine, carbenicilline, amoxicilline et gentamicine⁸⁴.

On peut imaginer l'inclusion de molécules bio-actives dans un revêtement de surface de l'implant pour obtenir un effet de libération de ces molécules. Celles-ci peuvent être intégrées dans les substrats mêmes et rendues bio-disponibles au cours de leur résorption, par exemple dans une matrice collagène, dans un polymère résorbable (PLA), etc...

L'électrospinning est l'une des méthodes utilisée pour la réalisation de systèmes à libération contrôlée de principes actifs^{100,101}. Elle permet à une large variété d'agents thérapeutiques hydrophobes d'être directement incorporés dans les fibres pour être ensuite libérés de manière contrôlée. Par exemple, une solution d'un polymère biodégradable contenant un médicament anticancéreux hydrophobe tel que le paclitaxel peut être déposée sur des nanofibres pour produire un système à libération prolongée¹⁰².

Des agents antimicrobiens tels que l'argent, le cuivre, le zinc, le dioxyde de titane sont actuellement incorporés dans et sur les surfaces d'une gamme de dispositifs médicaux pour former des systèmes à libération contrôlée^{103,104}. Cependant, l'efficacité de ces produits quant à la désinfection rapide, le développement et l'identification des mécanismes de résistance microbienne liés à l'ion métallique reste limitée et le coût élevé de ces produits a mené à la recherche de solutions alternatives^{105,106}.

On peut également greffer à la surface de l'implant des molécules cages comme par exemple les cyclodextrines qui complexent les molécules bioactives pour les libérer ensuite dans l'organisme de manière prolongée. A ce sujet, les laboratoires UMET et U1008, à travers leurs différents travaux, ont réussi à développer des biomatériaux à libération prolongée de molécules bioactives (antibiotiques ou antiseptiques par exemple). Les travaux ont abouti au dépôt de brevets sur les procédés de fixation des cyclodextrines ou de leurs dérivés sur les dispositifs médicaux implantables^{107,108,109}. Ce revêtement à base des cyclodextrines a été appliqué sur des textiles à applications : vasculaires sur des prothèses en PET^{110,111,112}, viscérales sur des prothèses abdominales en PP³⁵, et dentaires sur des membranes en PVDF¹¹³. Par ailleurs, ce type de fonctionnalisation de surface reste limité puisqu'il est basé uniquement sur des liaisons physiques et non covalentes entre le substrat et la molécule thérapeutique.

De nombreux critères sont exigés pour le succès d'un système à libération contrôlée. La libération de la substance thérapeutique du dispositif doit être optimisée pour réaliser la délivrance désirée au niveau de la cible.

Finalement, comme indiqué précédemment, le dispositif doit être biocompatible par rapport aux tissus présents sur le site implanté (os, viscères, artères). Ce critère est l'un des plus difficiles à évaluer puisqu'aucun matériel ne peut donner une réponse appropriée dans toutes les situations et que chaque cas particulier doit être étudié séparément¹⁷.

Les systèmes à libération contrôlée sont sans doute destinés à jouer un rôle important dans l'avenir du combat contre les infections bactériennes⁹⁹. Afin de profiter pleinement de leurs propriétés bénéfiques, il est nécessaire d'éviter une série d'effets néfastes s'étendant de la toxicité à la sélection des effets multi-résistants.

1.3.3. Immobilisation des molécules bioactives

Afin de développer une prothèse limitant les infections et la thrombose, l'idée est d'immobiliser les principes actifs par des liaisons plus fortes comme des interactions physiques (telles que des forces électrostatiques, de Van der Waals, ioniques, liaisons hydrogènes ou liées au caractère hydrophobe/hydrophile des substances thérapeutiques par rapport à la surface) mais aussi des liaisons covalentes avec la surface des prothèses^{1,25}.

Le greffage des polymères bioactifs porteurs de groupements sulfonates, groupements carboxylates, groupements amines, etc... constitue une solution prometteuse dans le but d'immobiliser des molécules bioactives (agents anticoagulants, antiprolifératifs, antimitotiques, antibiotiques, matrice de protéines extracellulaires, et facteurs de croissance...). Les molécules bioactives seront fixées de manière irréversible sur l'implant (par liaisons covalentes) en utilisant un 'spacer' possédant des fonctions chimiques adéquates pour réagir avec la surface, d'une part, et le principe actif d'autre part.

Contrairement à l'approche précédente, la surface traitée possèdera les propriétés intrinsèques du principe actif, et ceci de manière quasi permanente (dépendant de la dégradation biologique de la surface). Par ces traitements, les implants deviennent des supports hautement intéressants pour des applications dans les domaines de la thérapie cellulaire et de l'ingénierie tissulaire (par exemple la stimulation d'intégration tissulaire et la réimplantation de dispositifs médicaux hybrides). Une fonctionnalisation de ces matériaux peut considérablement accélérer la croissance cellulaire *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, assurant ainsi une guérison rapide et définitive. Les macromolécules hydrophiles et chargées telles que les protéines, les acides nucléiques et les peptides peuvent être immobilisées physiquement et/ou par liaison covalente sur la surface modifiée pour moduler des fonctions cellulaires^{1,95,102}.

Nous détaillerons dans le **paragraphe 4** quelques exemples de molécules immobilisées sur les surfaces des biomatériaux ainsi que les méthodes utilisées pour mesurer l'efficacité de ce traitement.

1.3.4. Rôle de l'aspect hydrophile/ hydrophobe de la surface

D'après ce qui a été énoncé précédemment, le taux d'adsorption des protéines et des bactéries sur le biomatériau ainsi que leurs conformations influencent énormément sa biocompatibilité. Les facteurs qui affectent ce comportement sont le caractère hydrophile de la surface, les charges en surface et leurs distributions^{4,46,68,114,115}.

F. Poncin-Epaillard explique que la nature hydrophile/ hydrophobe de la surface joue un rôle très important sur le processus d'adsorption des protéines et d'adhésion cellulaire ainsi que sur la morphologie des biofilms¹¹⁶ (*Figure 6*).

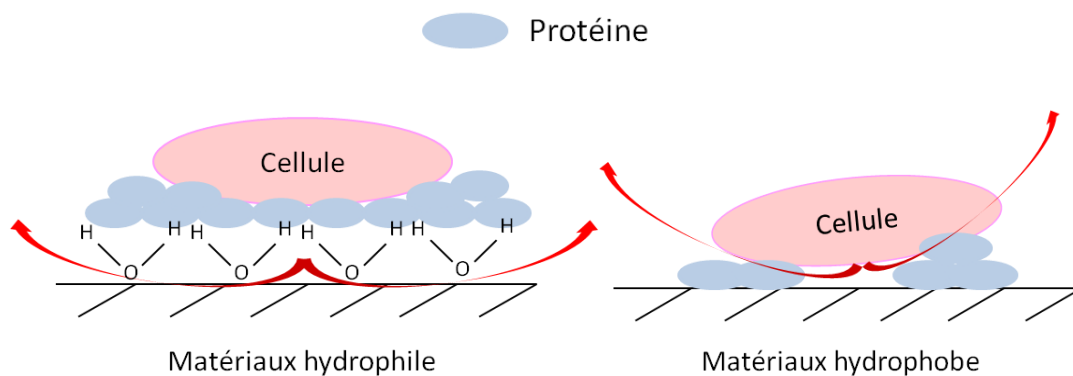


Figure 6 : Rôle de l'hydrophilie / hydrophobie de la surface sur l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire¹¹⁶

Goddard *et al.* a de son côté montré les conformations possibles de la protéine sur différents types de surfaces¹¹⁷. La *Figure 7* illustre quelques mécanismes de l'adhésion des protéines incluant l'influence de la nature, de la charge et de la polarité de la surface.

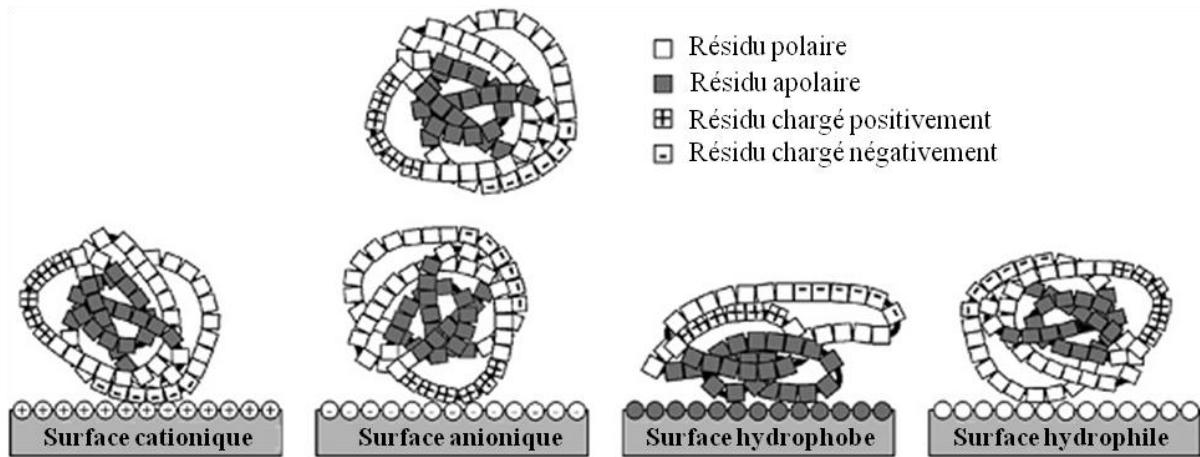


Figure 7 : Mécanisme d'adhésion des protéines selon la nature de la surface inspiré par Goddard et al.¹¹⁷

Cependant, dans des conditions *in vivo*, le contact des biomatériaux synthétiques avec le sang ou les liquides physiologiques est immédiatement suivi de l'adsorption de nombreuses protéines plasmatiques sur la surface. Les protéines s'adsorbent sur les surfaces souvent de manière irréversible⁹². Ce phénomène modifie la nature de l'interface et peut de fait altérer les propriétés du dispositif implanté⁶⁷.

Dans le but d'améliorer la biocompatibilité d'un biomatériau, il est préférable de diminuer l'adsorption des protéines¹¹⁸. En effet, des études montrent que l'adsorption des protéines est défavorisée par une surface hydrophile^{94,119} fonctionnalisée par des groupements chimiques tels que les amines, les hydroxyles ou les carboxyles ce qui influence l'activation du système immunitaire et la biocompatibilité du biomatériau¹²⁰. Une surface est ainsi considérée comme hydrophobe si son angle de contact avec l'eau est supérieur à 100°. ¹¹⁷

De même, de nombreux travaux réalisés *in vitro* montrent que l'adhésion des bactéries sur des matériaux synthétiques diminue avec la réduction de l'angle de contact et l'augmentation de l'énergie de la surface. L'adhésion bactérienne est donc plus faible sur les surfaces hydrophiles ainsi que sur les surfaces chargées négativement^{121,122}.

Par exemple, Wiencek et Fletcher ont étudié l'influence de l'équilibre hydrophobie/hydrophilie de la surface sur l'adhésion bactérienne en préparant des monocouches autoassemblées contenant des fonctions terminales de type méthyl (monocouches hydrophobes), hydroxy (monocouches hydrophiles) ou un mélange des deux

terminaisons. L'adhésion était plus forte sur les surfaces hydrophobes riches en groupements terminaux méthyl.¹²³

Par ailleurs, une des méthodes utilisées pour prévenir l'adhésion microbienne et protéique sur une surface est l'application d'un revêtement en polyéthylène glycol (PEG)¹⁰³. Les surfaces fonctionnalisées par des oligomères de PEG inhibaient très significativement l'adhésion bactérienne⁹⁰.

D'autres résultats montrés par Ploux *et al.* indiquent que la modification de la chimie de surface, en favorisant l'hydrophilie (fonction terminale de type amine primaire) ou l'hydrophobie (fonction terminale de type méthyl), avait une grande influence sur le développement et la morphologie des biofilms tel que celui d'*Escherichia coli*¹²⁴. Il montre qu'il existe ainsi différents mécanismes favorisant le détachement des bactéries en fonction de leur réponse physiologique.

Puisqu'il existe une grande diversité d'interactions entre les protéines et les surfaces, des méthodes variées ont été développées afin de produire une surface qui diminue l'adhésion des protéines. Divers polymères ont été largement utilisés pour la modification des surfaces¹²⁵. Currie *et al.* a montré que la taille des particules introduites, la densité des chaînes greffées à la surface, leur longueur, leur conformation et leur structure moléculaire jouent un rôle très important sur le comportement des protéines au contact avec la surface¹²⁶. La *Figure 8* montre que la densité et la longueur des chaînes greffées ainsi que leurs conformations ont une influence sur l'agrégation plaquettaire et sur la formation de thrombose. En effet, dans le cas où le polymère est greffé à la surface sous forme de gel de conformation aléatoire (*Figure 8* (gauche)), les protéines viennent coloniser le gel de façon aléatoire ce qui accélère le phénomène de thrombose.

Tandis que dans le cas où la densité des chaînes polymères greffés à la surface est forte avec des chaînes relativement courtes (revêtement sous forme de brosse), les protéines sont moins activées et leur adsorption s'effectue plutôt sous forme de monocouche fine. Ce qui favorise la création d'une surface passive ralentissant le phénomène de thrombose.

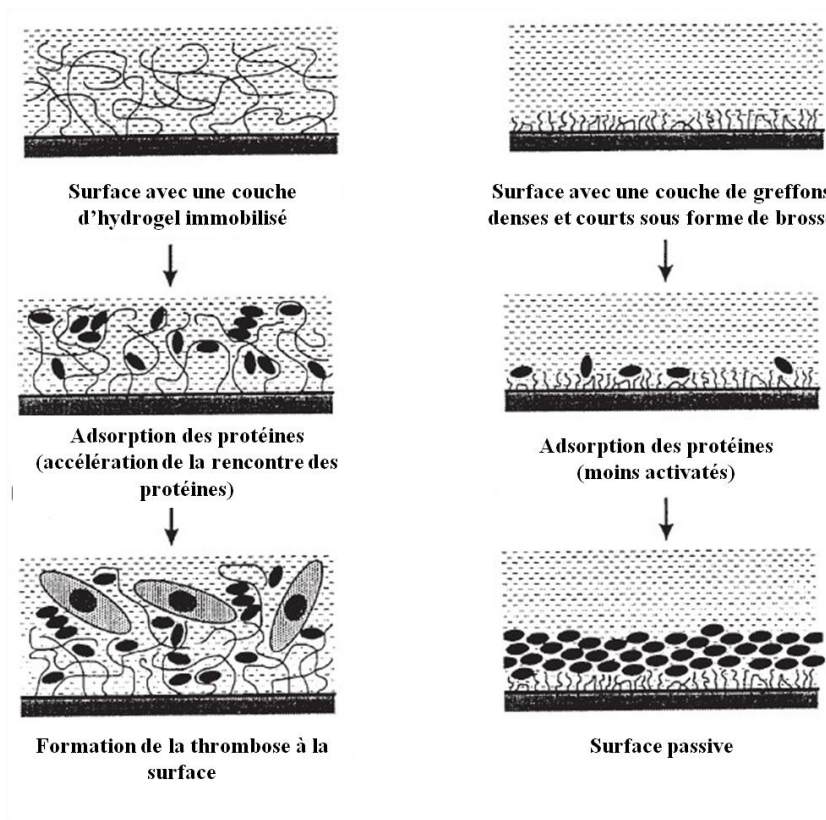


Figure 8 : Influence de la longueur et la conformation des chaînes polymères greffées à la surface sur son interaction avec le sang¹²⁵

Une grande variété de méthodes de greffage sur des surfaces polymères est référencée dans la littérature. Les polymères greffés offrent des fonctionnalités spécifiques au matériau et donc de nouvelles propriétés chimiques, physico-chimiques, mécaniques et biologiques.

Afin de réaliser ces modifications de surface, différentes techniques sont proposées. Il est cependant nécessaire d'activer la surface du biomatériau initialement inerte. Nous décrirons dans le paragraphe suivant quelques techniques d'activation de surface ainsi que leurs influences sur les propriétés des surfaces et leurs applications dans le domaine biomédical.

2. Les techniques d'activation de surface par irradiation

Comme évoqué précédemment, afin de palier aux différentes complications liées à l'utilisation des implants biomédicaux, différentes techniques de traitement de surface ont été développées comme l'introduction de groupements fonctionnels, la modification de la morphologie de surface pour augmenter ou diminuer la mouillabilité de surface. Les groupements fonctionnels peuvent être greffés par des techniques innovantes incluant des processus chimiques et physiques.

Rappelons que dans le cadre de cette thèse, l'objectif est d'immobiliser à la surface des textiles en polyester des molécules bioactives par des liaisons non seulement physiques mais aussi covalentes via un polymère acrylique greffé à la surface par copolymérisation greffante.

Un biomatériau est en général inerte chimiquement d'où la nécessité de créer des sites actifs afin d'initier la polymérisation. Différentes techniques d'activation de surface, chimiques ou par rayonnement, sont aujourd'hui proposées telles que l'oxydation, les traitements par ionisation type bombardement électronique (EB) ou rayonnement gamma, les traitements type laser, UV *curing*, plasma^{127,128} ...

Ces techniques d'irradiation sont basées essentiellement sur la modification de la surface par:

- ✓ **La création de radicaux libres**, obtenue principalement par les irradiations par rayonnement γ , EB et par les traitements plasma.
- ✓ **La fonctionnalisation chimique** qui permet de créer des fonctions spécifiques par l'intermédiaire d'un gaz. Les traitements plasma, EB, rayonnement γ , Laser à excimère facilitent cette fonctionnalisation.
- ✓ **L'ablation** qui consiste à créer une rugosité de surface par traitement laser ou plasma.
- ✓ **La réticulation** de la surface obtenue principalement par traitement UV *curing* ou plasma.

Nous décrirons dans le paragraphe suivant l'intérêt de quelques techniques d'irradiation de surface, leurs avantages ainsi que leurs inconvénients.

2.1. Quelques techniques de traitement de surface par irradiation

Le traitement laser excimère et par irradiation UV-*curing* sont largement utilisés pour améliorer les propriétés de surface polymères^{129,130,131}. Elles peuvent également être modifiées par des sources ionisantes comme le bombardement électronique (électrons accélérés ou EB) ou le rayonnement gamma (rayon γ). Tous ces traitements permettent de créer des sites radicalaires actifs qui serviront à l'amorçage de la polymérisation greffante à la surface d'un substrat. Les radicaux peuvent amorcer un certain nombre de réactions chimiques: coupures de chaînes, polyadditions, réticulation, polymérisation, greffage (etc.)^{132,133}. Le traitement laser et l'irradiation UV-*curing* permettent la modification de la surface avec une destruction négligeable de la surface^{127,134}. L'EB offre également la possibilité d'optimiser les propriétés de la surface sans modifier les propriétés générales intrinsèques du matériau. Cette technique est largement utilisée dans le domaine biomédical et surtout pour traiter les implants biomédicaux¹³⁵. Par ailleurs, les rayons γ possèdent un pouvoir de pénétration et d'ionisation de la matière bien plus important que celui des rayonnements β et UV. C'est une méthode spécifique de stérilisation, de décontamination et d'élimination des bactéries.

Les modifications induites par traitement laser peuvent augmenter les interactions avec le milieu biologique¹³⁶ en améliorant par exemple les propriétés biologiques comme la prolifération et l'adhésion cellulaire à la surface des prothèses vasculaires en PET¹³⁷. L'irradiation UV est largement utilisée pour la fabrication de membranes polymères par réaction de copolymérisation et réticulation dans le but d'obtenir un système à libération contrôlée de médicaments¹³⁸.

Malgré les avantages, il existe des polymères (essentiellement fluorés) qui sont souvent exposés au risque de scission et de dégradation des chaînes lors du traitement UV¹²⁵, ou par des radiations ionisantes telles que les rayonnements β et γ qui sont presque totalement absorbées par la matière et agissent essentiellement sur la structure électronique de l'absorbant. En conséquence, elles peuvent provoquer des modifications chimiques, mécaniques et thermiques importantes en entraînant dans certains cas la dégradation des polymères¹³².

2.2. Le plasma

Plasma vient du grec et signifie "ouvrage façonné". Il s'agit du quatrième état de la matière découvert par le physicien Américain Irving Langmuir en 1928. Il l'a nommé « plasma » en raison de sa similitude avec le plasma sanguin. Un plasma est un gaz ionisé contenant un mélange de charges négatives, positives et neutres obtenu en appliquant un champ électrique ou magnétique, ou en fournissant de la chaleur¹³⁹. Bien qu'il ne soit pas très connu, le plasma occupe 99% de l'Univers. Les plasmas peuvent être naturels (aurores boréales, étoiles, éclairs...) ou artificiels, créés par un champ électrique et/ou magnétique (plasma basse pression, réacteur de fusion nucléaire...). Dans les plasmas thermiques, la pression du gaz est relativement élevée ce qui augmente le nombre de collisions entre les particules (neutres, excitées, non excitées, ionisées) et ce qui favorise la transmission de l'énergie. Les ions, les électrons et les molécules ont des températures sensiblement identiques typiquement de l'ordre de 5000 K à 50000 K^{140,141}. On dit que ce plasma se trouve dans un état « d'équilibre thermodynamique ». A la différence des plasmas thermiques utilisés en projection à chaud, les plasmas froids sont des milieux permettant des modifications de surface (dépôts, greffage, gravure...) à basse température, sans altération des substrats. Nous nous limitons donc à ce type de plasma, le plasma froid.

2.2.1. Définition du plasma froid

Les plasmas froids gazeux, également appelés plasmas « hors équilibre » (ou glow discharge plasmas) sont générés à basse pression et à basse température. Dans de tels plasmas, les molécules et atomes ionisés ou non ont des températures relativement froides (de l'ambiante à quelques centaines de degrés Celsius) tandis que les électrons possèdent des niveaux d'énergie correspondant à de très hautes températures (1 à 10 eV). Ainsi, le système n'est pas dans un état d'équilibre thermodynamique mais dans un état stationnaire où chacune des espèces possède sa propre température.

Une des méthodes les plus simples pour générer un plasma froid consiste à appliquer une forte différence de potentiel par l'application d'un champ électrique haut voltage (dizaine de kV) entre deux électrodes où circule un gaz afin que celui-ci soit ionisé (*Figure 9*). Le gaz se décompose sous la forme d'un nuage de molécules plus ou moins dissociées, d'ions, d'électrons, de radicaux, de fragments de molécules, de neutrons, de photons. Cet état,

totallement anarchique, est caractérisé par une excitation maximale, avec des niveaux d'énergie très élevés et des vitesses de déplacement extrêmes très rapides.

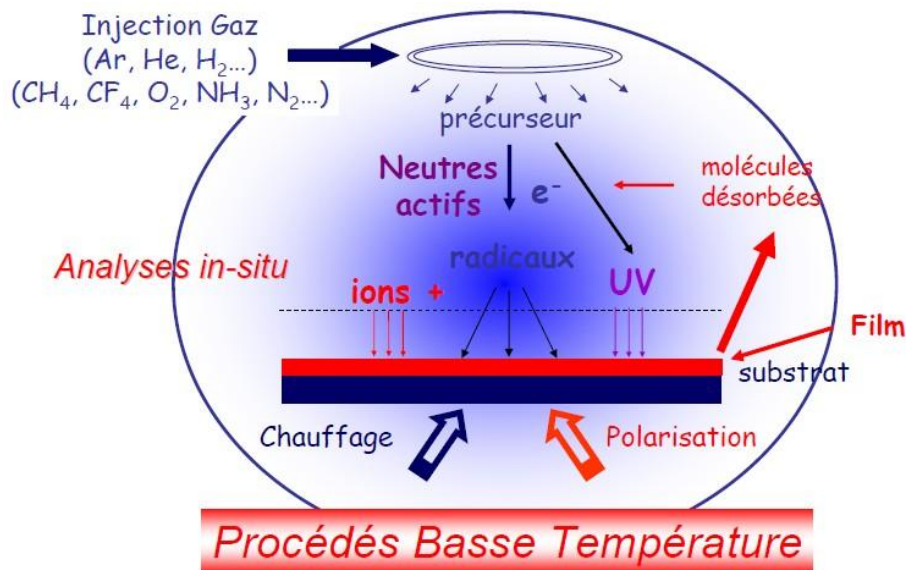


Figure 9 : Procédé plasma Froid¹⁴²

Ce mélange complexe d'espèces réactives entre en collision avec la surface du polymère ou autres matériaux placés dans la chambre plasma¹⁴³. De nouvelles fonctions chimiques spécifiques sont créées en surface (sur quelques nanomètres de profondeur) par rupture de chaînes polymères, éjection de certains types d'atomes et greffage d'atomes. Ces fonctions confèrent alors de nouvelles propriétés à la surface: oxydation, fluoration, nitruration... Ainsi l'énergie de surface se trouve totalement modifiée.

2.2.2. Les avantages du plasma froid

Le plasma froid est largement utilisé en raison des nombreux avantages qu'il présente:

- Réduction des déchets toxiques par une meilleure dissociation des composants et une moindre consommation: développement d'une chimie propre et respectueuse de l'environnement.
- Procédé sec économe en eau et en énergie¹⁴⁴.
- Meilleur contrôle des produits chimiques et des contaminations¹⁴⁵.

- Apport d'une meilleure précision: détails plus fins au niveau du traitement des surfaces que certaines méthodes alternatives.
- Réactions chimiques à faible température ce qui évite les dommages sur les substrats et plus rapide à travers les espèces hautement énergétiques créées.
- Chimiquement actif grâce à la température élevée des électrons permettant de générer de nombreux radicaux, fonctions, ...
- Plus flexible que d'autres méthodes: peut être utilisé avec des matériaux isolants ou conducteurs. Il est possible de traiter toutes sortes de substrats y compris des substrats à bas point de fusion tels que les polymères.
- Modification chimique de la surface sans dégradation thermique, sans altération des propriétés intrinsèques du matériau, ni modification de sa morphologie.
- Pouvant s'effectuer à la pression atmosphérique, le traitement peut se dérouler en continu à cadence industrielle.

Le choix d'un biomatériau à la base est souvent déterminé par ses propriétés mécaniques correspondant à l'application visée et par sa réponse biologique. Cette réponse dépend fortement des propriétés de surface¹⁴⁶. Les techniques de modification de surface par plasma semblent être idéales lorsqu'elles sont appliquées aux biomatériaux¹⁴⁷. Le plasma a en effet la capacité de modifier uniformément les propriétés de surface sans affecter les propriétés de volume du matériau.

Il existe une grande variété de méthodes de génération du plasma froid (DC, pulsé, RF, micro-onde), celles-ci peuvent être classées en deux catégories en fonction de la nature de la pression appliquée : le plasma froid à pression atmosphérique et le plasma froid basse pression.

2.2.3. Les plasmas froids

2.2.3.1. Le plasma atmosphérique

Le plasma à pression atmosphérique permet le traitement en ligne des surfaces et ouvre la voie à des applications industrielles robotisées. Il peut être facilement adapté à une ligne de production pour réaliser un traitement continu et localisé avec peu de produits chimiques et peu de rejets. Il présente en général un investissement initial limité avec une

réduction des coûts et de la durée du procédé. L'inconvénient de ce type de traitement est qu'il est généralement non homogène et difficilement contrôlée.

Selon la configuration des électrodes et le mode d'alimentation électrique utilisé, il existe diverses applications industrielles. La décharge à barrière diélectrique et le traitement corona présentent l'unes des techniques les plus connues¹⁴⁸. La décharge à barrière diélectrique (DBD) est un plasma froid généré de deux électrodes recouvertes d'un matériau diélectrique¹⁴⁹. Morent *et al.* a utilisé le plasma DBD afin d'augmenter le caractère hydrophile d'une surface d'un film en PET par l'incorporation des fonctions oxygénées^{150,151}. Un traitement Corona (ou décharge à effet couronne) est réalisé avec deux électrodes dissymétriques afin d'obtenir un champ électrique beaucoup plus important au voisinage de l'une des deux électrodes. Cette technologie est utilisée depuis plus d'une trentaine d'années pour augmenter la mouillabilité et l'adhésion des polymères¹⁵².

2.2.3.2. Le plasma basse pression

Au cours des vingt dernières années, les difficultés rencontrées pour contrôler le traitement de surface par plasma à la pression atmosphérique ont mené les chercheurs à développer des procédés fonctionnant à basse pression.

Afin de réaliser des procédés de plasma à basse pression, l'enceinte de plasma radiofréquence est composée des éléments suivants (*Figure 10*): la chambre de traitement (1) dans laquelle sont situées les électrodes (2) créant la décharge, un système de pompage (3) qui permet de générer le vide primaire nécessaire, une à plusieurs voies d'entrée de gaz (4) et un générateur radiofréquence (5). La chambre de traitement est équipée d'instruments pour mesurer et réguler le débit (débitmètres asservis par électrovannes). Le générateur est connecté à une boîte d'accord (aussi appelée adaptateur d'impédance) qui permet de minimiser les pertes de puissance.

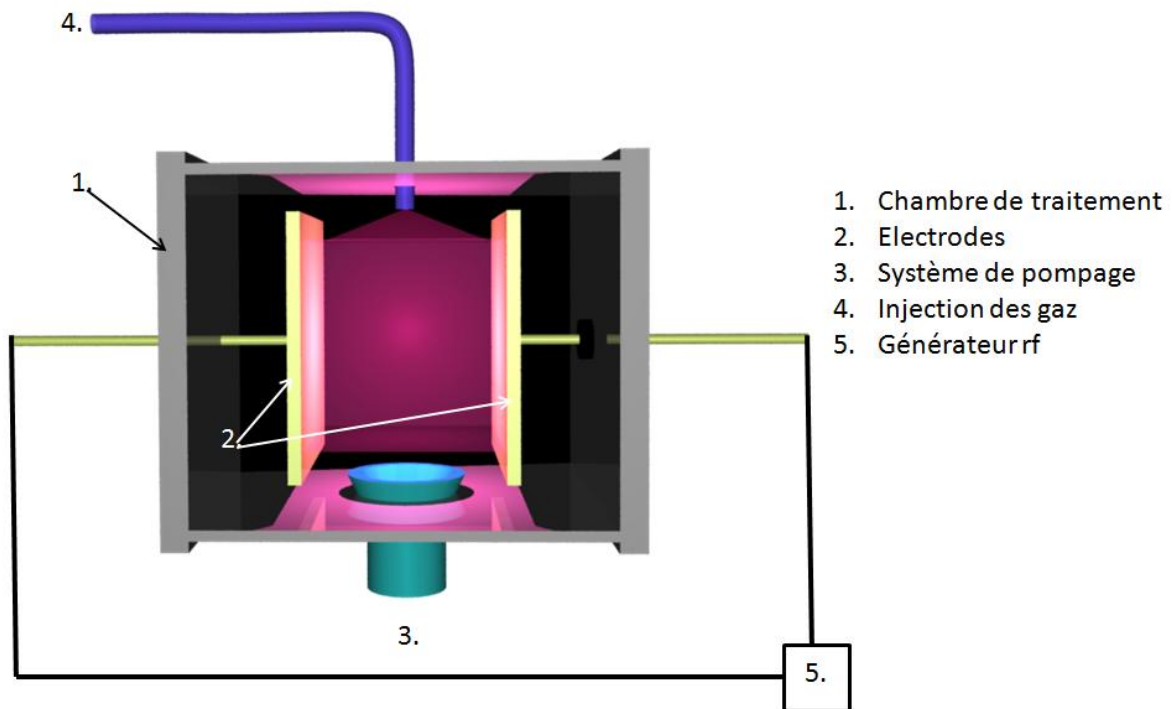


Figure 10: Schéma d'un réacteur plasma à basse pression

Le principe consiste à placer les matériaux à traiter dans une chambre à basse pression, dans laquelle on injecte un gaz à une pression comprise entre 0.01 et 1 mbar. Par l'apport d'énergie sous la forme d'un champ électrique dont la fréquence peut varier du continu jusqu'aux fréquences micro-ondes, le gaz se décompose partiellement. A basse pression, la technique du plasma se base sur des générateurs Radiofréquence "RF" (13.56 MHz à 40 MHz) ou générateurs micro-ondes (2,45 GHz). Ce champ permet d'accélérer les électrons jusqu'à atteindre une énergie suffisante permettant d'ioniser le gaz.

Pour les polymères à traiter, l'échauffement du gaz doit rester inférieur à une centaine de degrés. A basse pression, il est facile d'obtenir un plasma froid dont la température reste proche de l'ambiante¹⁵³. Cette caractéristique est plus compliquée dans le cas des plasmas à pression atmosphérique. En effet, le plasma à la pression atmosphérique a une forte propension à transiter vers l'arc électrique. Ce dernier peut induire un échauffement du gaz et la formation d'un plasma thermique où des températures de plusieurs milliers de degrés sont atteintes, impliquant la fusion et l'évaporation du matériau.

Ce traitement en enceinte fermée et avec une atmosphère contrôlée permet de traiter des pièces de formes complexes en trois dimensions et d'apporter un plus grand nombre de

fonctionnalités à la surface. L'intérêt du plasma à basse pression est que la quantité de gaz utilisée lors de ces procédés est très faible. Cela positionne cette technologie comme très écologique par rapport à d'autres techniques. C'est un traitement permettant des modifications de surface à température ambiante sans altération du substrat. Le plasma froid basse pression permet le traitement homogène à basse température de nombreux matériaux (polymères, métaux, textiles) et ceci pour diverses applications. Les décharges RF (*Figure 26*) sont très utilisées pour le traitement des polymères. L'avantage du plasma radiofréquence est qu'il s'agit d'une technologie de pointe à basse consommation d'énergie sur une large gamme de pression avec une faible capacité de pompage.

En vue de nombreuses applications de la technique du plasma froid à basse pression dans le domaine biomédical, cette technique semble très prometteuse pour notre étude. Quelques exemples de traitement plasma sont présentés dans le paragraphe qui suit.

2.2.4. Effet de la nature du gaz sur la surface

Les traitements plasmas, à basse pression ou à pression atmosphérique, utilisant des gaz réactifs polymérisables ou non sont largement utilisés dans la modification de surface des polymères¹⁰². Ils permettent par exemple l'activation de la surface, la réticulation, l'oxydation et la scission des chaînes^{154,155}. L'effet du traitement plasma sur les surfaces polymères est influencé par la chimie des gaz utilisés et la structure chimique de la surface en elle-même¹⁵⁶. Ce traitement peut être effectué par un seul ou plusieurs gaz (CO₂¹⁵⁷, O₂¹⁵⁸, N₂, H₂O₂, NH₃, air, gaz rares) et permet différentes fonctionnalisations de la surface.

Les plasmas avec les gaz (O₂, CO₂, H₂O, ...) donnent naissance à des groupements fonctionnels oxygénés (groupements hydroxyle, peroxyde, acide carbonyle, carboxyle, peroxyde, hydroperoxyde, carbonate,...)^{154,159}. L'introduction des groupements hydrophiles de ce type permet d'augmenter la mouillabilité et l'aptitude à l'adhésion de la surface. Par ailleurs, ce type de traitement permet également l'ablation et la réticulation de la surface.

Pour le polyester, par exemple, (*Figure 11*) le bombardement des espèces produites par un plasma d'oxygène produit la scission aléatoire des liaisons chimiques de sa surface et permet donc la génération de différents groupements acide carboxyliques, hydroxyles, peroxydes, hydroperoxydes, (etc...) ¹⁰².

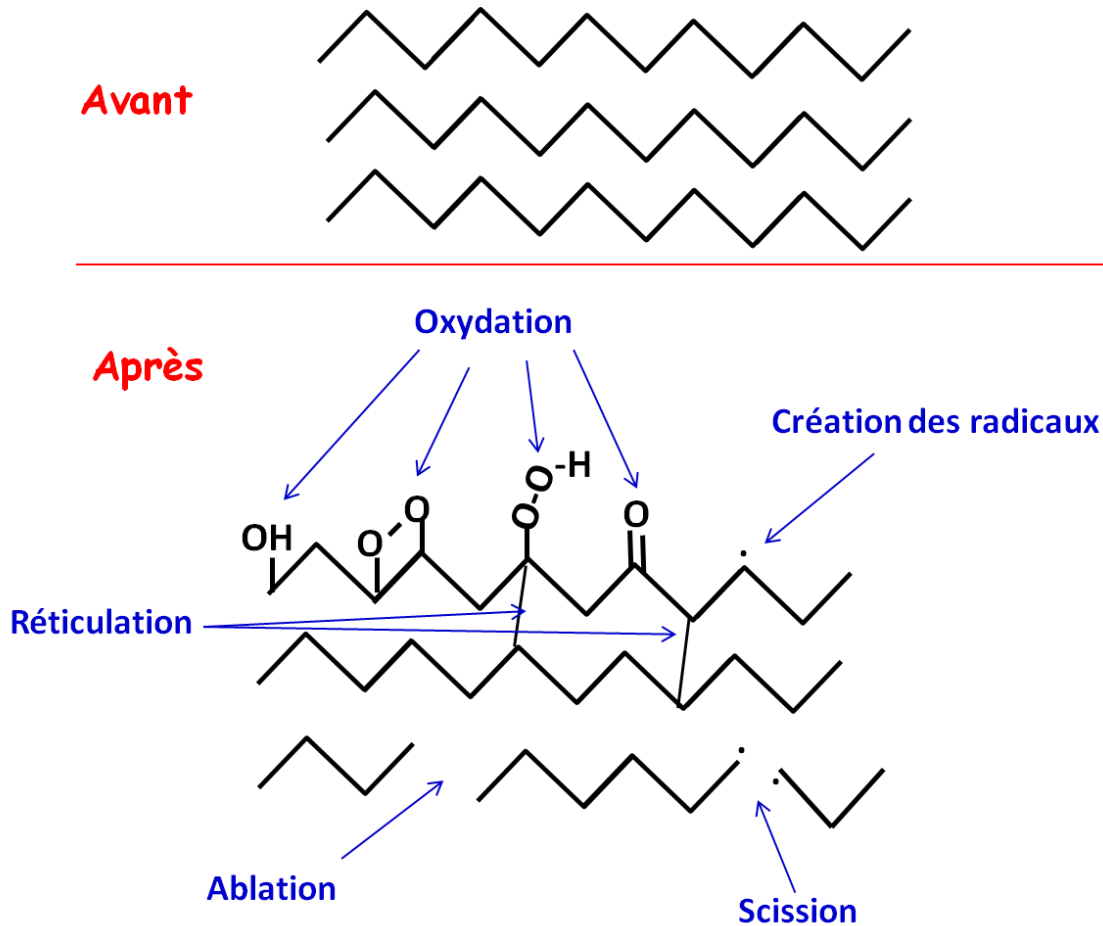


Figure 11: Effets du traitement plasma en oxygène sur une surface de PET

L'ablation résulte principalement d'un phénomène d'érosion ionique lié au bombardement de la surface par les ions et les neutrons énergétiques également créés dans le plasma. Il est à noter que les fragments organiques issus de l'ablation peuvent être activés dans le plasma et redéposés à la surface des substrats polymères. Par ailleurs, les radicaux libres créés peuvent réagir *in-situ* ou *ex-situ* avec d'autres molécules (O_2 , N_2 , vapeur d'eau, monomères organiques ...). En fonction de la nature de celles-ci, une activation ou une copolymérisation greffante des surfaces sera effectuée.

Les plasmas de gaz rares (He, Ne, Ar...) sont utilisés pour réaliser l'ablation de la surface des polymères et y créer des radicaux libres. Par ailleurs, les gaz rares comme l'argon et l'hélium permettent d'obtenir des fonctions oxygénées très significatives. Ceci est dû à l'exposition de ces surfaces activées à l'oxygène de l'atmosphère¹⁷⁰. L'augmentation de l'hydrophilie des films en PET traités par plasma atmosphérique (helium/air) a été démontrée

par De Geyter *et al.*¹⁵¹. L'observation de la diminution de l'angle de contact est due à l'incorporation des fonctions oxygénées comme C–O et O–C=O¹⁶⁰.

Les plasmas de gaz rares sont aussi utilisés pour réaliser la réticulation (cross-linking) des couches superficielles des matériaux ou de films polymères préalablement déposés sur un substrat. Cette réticulation en atmosphère « inerte » résulte de la combinaison de radicaux libres formés sur des chaînes polymères adjacentes. Ce procédé de réticulation des surfaces polymères est connu sous l'acronyme « Casing » (Cross-linking by Activated Species of Inert Gases). L'état d'équilibre entre l'ablation et la réticulation dépend des conditions expérimentales utilisées et évidemment de la nature du substrat polymère.

Les plasmas azotés (N₂, NH₃...) donnent lieu à la formation de groupements hydrophiles, en particulier de groupements amine (-NH, -NH₂) voire de groupements amide (-N-C=O). Il est à noter que des groupements oxygénés sont toujours présents à la surface des matériaux polymères traités dans un plasma azoté. En effet, les radicaux libres créés à la surface de ces matériaux réagissent avec les espèces oxygénées résiduelles présentes dans le réacteur durant le traitement plasma. De même, les radicaux libres des échantillons post-traités réagissent avec l'oxygène atmosphérique. Des films en PET ont été traités par plasma N₂ en faisant varier la pression. Ding *et al.* a prouvé que l'effet du traitement n'excède pas la profondeur de 5 nm à cause de la faible énergie des ions ce qui montre que ce type de traitement n'altère pas les propriétés intrinsèques du substrat¹⁶¹. Les traitements plasmas en atmosphère NO ou NO₂ donnent également lieu à la formation de groupements à la fois azotés et oxygénés.

A l'inverse des plasmas oxygénés ou azotés, les plasmas fluorés (type F₂, CF₄¹⁶², SF₆, CHF₃, NF₃, SiF₄...) sont utilisés pour convertir des surfaces hydrophiles en surfaces hydrophobes¹⁶³. Dans ce cas, des groupements type F, CF, CF₂ et CF₃ résultant de la décomposition du monomère fluoré dans le plasma sont fixés à la surface des polymères suite à la rupture en particulier de liaisons C-H et C-C.

Une autre possibilité pour obtenir les groupements fonctionnels désirés est la polymérisation par plasma des monomères contenant des groupements vinyliques, comme par exemple l'acide acrylique ou l'alcool allylique. Il a été prouvé que la polymérisation par plasma pulsé est souhaitable puisqu'elle évite la grande fragmentation des monomères. De

plus, cela permet à la polymérisation induite par plasma d'être le mécanisme dominant dans la formation du polymère.

L'utilisation du traitement plasma froid est largement répandue dans le domaine biomédical notamment dans l'ingénierie tissulaire, pour la modification de surface des biomatériaux ou encore pour la stérilisation des instruments médicaux réutilisables¹⁶⁷.

La sélection appropriée de la source de plasma et des gaz permet d'introduire divers groupements fonctionnels à la surface du substrat qui vont conduire à l'amélioration de la biocompatibilité ou/et à l'immobilisation par liaison covalente des molécules bioactives¹⁰².

D'après de nombreuses études, le traitement plasma est un nouveau champ de recherche très bénéfique pour l'adhésion cellulaire. Un grand choix d'éléments protéiques de matrices extracellulaires telles que la gélatine, le collagène, le laminine et la fibronectine ont pu être immobilisés sur la surface traitée par plasma afin d'augmenter l'adhésion et la prolifération cellulaire¹⁰².

D'après Rhodes et *al.*, le traitement plasma sur différents biomatériaux polymères en polytétrafluoroéthylène (PTFE), polydiméthylsiloxane, polyétheruréthane ou polyéthylène a permis quels que soient les gaz utilisés (O₂, Ar, N₂ et NH₃) la diminution de l'adhésion plaquettaire et l'activation des cellules induisant la réduction du phénomène de thrombose¹⁶⁴.

Le traitement par un mélange de gaz (ammoniaque, oxygène et vapeur d'eau) sur un film en polypropylène permet d'augmenter l'hydrophilie de la surface et mène par conséquence à l'augmentation de la densité de cellules endothéliales adhérees au bout de 3 à 7 jours d'incubation¹⁶⁵.

Par ailleurs, le traitement des films en PET par un traitement plasma He/O₂ semble être efficace pour la réduction de l'adhésion bactérienne (*S. epidermidis*)¹⁶⁶. La relation entre la morphologie et la rugosité de la surface produite et le comportement des bactéries reste encore complexe et difficile à établir.

L'avantage du plasma est donc sa flexibilité concernant la densité et le type des fonctions introduites à la surface ainsi que l'homogénéité et la maîtrise des surfaces créées.

2.2.5. Les applications du plasma froid

Le traitement plasma froid est largement employé pour améliorer la biocompatibilité des matériaux polymères. En général, l'intérêt du traitement plasma réside dans la variété de ses applications:

- La stérilisation du matériel biomédical : surtout avec le traitement plasma basse pression utilisant des mélanges de gaz comme (H_2O_2 et aldéhydes), (Helium/O_2) et (N_2/O_2)^{167,168,169}.
- Le nettoyage et la réticulation (cross-linking) des couches superficielles de polymère
- L'amélioration de la mouillabilité (énergie de surface) et donc augmentation du caractère hydrophile.
- L'amélioration des propriétés adhésives par création de groupements acide carboxyliques, amines, hydroxyle, etc¹⁷⁰.
- L'amélioration de la susceptibilité à l'impression.
- La fonctionnalisation de la surface et l'obtention de propriétés de surfaces très spécifiques.
- L'amélioration de la biocompatibilité¹⁷¹.
- La création d'un film fin de monomères volatils par réticulation à la surface.
- La création de radicaux et fonctions capables d'initialiser une copolymérisation greffante à la surface.

Dans le cadre de cette thèse, le plasma froid basse fréquence est utilisé pour activer des textiles en polyester afin d'amorcer la copolymérisation greffante de l'acide acrylique. Le plasma froid est également utilisé dans un protocole simplifié en effectuant une polymérisation et une réticulation *in-situ* de ce monomère à la surface du textile.

3. La copolymérisation greffante

Le greffage des surfaces permet l'introduction de molécules spécifiques à la surface avec une haute densité et une localisation déterminée des chaînes greffées. D'autre part, les liaisons covalentes entre le polymère greffé et la surface assurent leur stabilité chimique à long terme contrairement aux revêtements de surfaces par liaisons physiques. Ce type de greffage de polymère sur une surface est très fréquemment appelé dans la littérature « la copolymérisation greffante ».

3.1. Définition de la copolymérisation greffante

De nombreuses techniques ont été proposées pour la réalisation de modifications de surface par greffage. Le greffage des polymères à la surface est donc une technique très efficace et très industrialisée. La copolymérisation greffante apparaît comme une approche simple, utile et souple pour améliorer les propriétés superficielles des polymères pour diverses applications.

La copolymérisation greffante désigne la fixation des polymères sur une surface de nature chimique différente. Les chaînes polymères greffées sont en général assez courtes et variables en nombre. Dans la pratique, la méthode d'initiation par rayonnement est souvent plus aisée par rapport aux méthodes chimiques classiques¹³⁸. Elle permet de se libérer des contraintes de compatibilité entre les polymères.

Il existe principalement deux types de greffage sur un substrat: la méthode de couplage dite directe à l'aide d'un polymère existant, également nommée méthode « *grafting onto* » et une seconde méthode nommée « *grafting from* », qui consiste à amorcer la polymérisation d'un ou de monomère(s) à partir de la surface activée¹⁷². Nous allons détailler ces deux types de greffage dans les paragraphes qui suivent.

3.1.1. La copolymérisation greffante « *grafting onto* »

Le principe de la méthode « *grafting onto* » consiste à réaliser un couplage entre des chaînes de polymères et le support à l'aide de fonctions antagonistes (*Figure 12*). Dans ce cas, le support doit porter des fonctions susceptibles de réagir avec d'autres chaînes. Cette

technique est particulièrement intéressante dans le cas d'un polymère vivant doté d'un site actif anionique ou cationique à l'extrémité de sa chaîne.

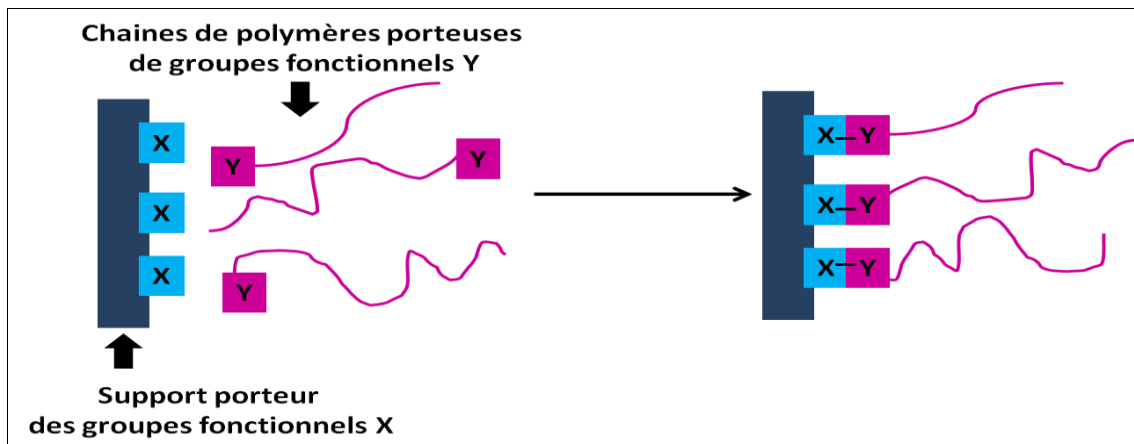


Figure 12 : Principe du greffage « grafting onto »

3.1.2. La copolymérisation greffante « grafting from »

Dans le cas de la méthode « grafting from », des sites actifs ioniques et radicalaires sont tout d'abord créés à la surface du substrat polymère et utilisés ensuite pour l'amorçage de la polymérisation d'un monomère fonctionnel de nature différente (Figure 13). Avec cette méthode il est difficile de contrôler de façon efficace l'architecture, c'est-à-dire le nombre et la longueur des greffons formés. Si certains sites sont plus accessibles que d'autres, cela peut entraîner une distribution assez large de la taille des greffons.

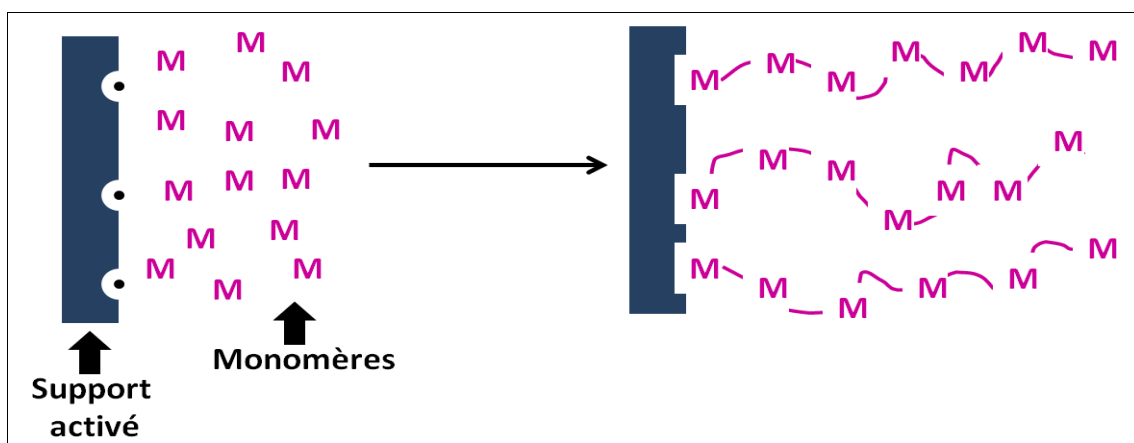


Figure 13 : Principe du greffage « grafting from »

Un monomère porteur d'une insaturation de type vinylique, allylique ou acrylique peut se fixer sur une surface traitée par des rayonnements ionisants¹⁷³.

3.2. La copolymérisation greffante pour des applications biomédicales

Nous décrirons par la suite quelques exemples de méthodes de copolymérisation greffante des monomères vinyliques ainsi que leurs intérêts dans le domaine biomédical. Les techniques incluent l'utilisation de méthodes chimiques ainsi que des méthodes d'irradiation déjà décrites dans précédemment. Nous nous intéresserons par la suite plus particulièrement au greffage de l'acide polyacrylique et à ses applications.

3.2.1. Amélioration des propriétés des biomatériaux par greffage des polymères

Nombreux sont les chercheurs qui se sont intéressés au greffage des polymères sur les surfaces pour améliorer les propriétés chimiques, physiques et biologiques des biomatériaux en utilisant les différentes techniques d'irradiation présentées ci dessus.

Le méthacrylate de glycidyle (GMA) a été greffé sur une grande variété de supports polymère (PP, PET, PE, cellulose...)^{174,175,176,177}. Le greffage du poly(GMA) permet l'obtention de fonctions époxydes à la surface. Ces fonctions sont très réactives et permettent de régénérer des amines primaires et des groupements acides carboxyliques qui facilitent l'accrochage de protéines¹⁵².

Martel *et al.*^{178,179,180} puis D.M.Wafa *et al.*^{181,144} ont greffé le poly(GMA) par prétraitement EB sur le PP et PE. Les fibres greffées par le poly(GMA) ont été utilisées pour l'immobilisation de cyclodextrines^{182,174}. Ce revêtement a montré une bonne cytocompatibilité mais aussi, d'après Nava-Ortíz *et al.* une efficacité pour la formation de systèmes à libération contrôlée d'agents thérapeutiques (anti-inflammatoires)¹⁸³.

Liu *et al.* a montré que le greffage du poly(GMA) sur un substrat en PET permet d'immobiliser les protéines par liaison covalente. Leur étude a démontré qu'une réponse contrôlable entre le matériau et les protéines était possible. Ce qui permet de modeler les interactions protéine-protéine, la prolifération des protéines sur le support et d'identifier leurs structures, leurs fonctions et leurs orientations à la surface¹⁸⁴.

Les surfaces greffées en poly(GMA) ont été largement utilisées pour immobiliser des biomolécules^{174,185,186,187}.

Le 2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA) a été polymérisé sur différents supports polymères (en PP, polyacrylonitrile (PAN), polysulfone (PS), PE)^{188,189,190}. Ce greffage est dans le but d'augmenter leur mouillabilité, leur rétention d'eau et leur biocompatibilité¹²⁵. Le poly(HEMA) est parmi les polymères synthétiques admis par les agences fédérales (par exemple : the Food and Drug Administration, USA) pour des applications médicales, pharmaceutiques et industrielles¹⁹¹. Cette modification de surface a été bénéfique pour l'amélioration de l'efficacité des membranes de microfiltration et d'ultrafiltration biologiques¹⁸⁸. Suite à ce greffage, Lee *et al* a de son côté greffé le poly(HEMA) sur des surfaces en silicone afin d'améliorer la biocompatibilité des cornées artificielles¹⁹². Bickerstaff a montré ses avantages pour l'immobilisation des enzymes¹⁹³. Néanmoins, les applications du poly(HEMA) dans le domaine biomédical restent restreintes car il est inhibiteur de l'adhésion cellulaire^{188,192}.

Le polyacrylamide PAAm a été greffé par Lu *et al.* sur des surfaces de PE via un traitement plasma à l'argon¹⁹⁰. Le greffage du PAAm permet d'améliorer la biocompatibilité du PET, du PS, ou du PE par l'immobilisation de molécules bioactives¹⁹⁴. Fujimoto *et al.* a montré que le greffage du PAAm par traitement plasma sur une surface en PU activée par l'ozone réduit de façon significative son interaction avec les plaquettes. Yang *et al.* a greffé le PAAm sur le PET non tissé activé par plasma froid. Ce polymère greffé à la surface a été utilisé pour l'immobilisation du chitosane afin d'obtenir une surface antibactérienne¹⁹⁵.

Grâce à ses groupements très réactifs, **le poly(anhydride maléique)** est très étudié dans la littérature pour la copolymérisation greffante sur différents supports. Sa réactivité provient de l'ouverture de son cycle par hydrolyse pour former un diacide par exemple^{196,197}. Les fonctions réactives formées permettent à leur tour l'initiation d'autres réactions et la fonctionnalisation de la surface.

Ce type de greffage a été réalisé par Soppera *et al.* via la combinaison entre un traitement plasma et une irradiation UV¹⁹⁸. Le revêtement déposé est de structure bien définie avec une fonctionnalité chimique et une géométrie du film bien contrôlées. Cette fonctionnalisation semble avoir un avenir prometteur dans le domaine biologique¹⁹⁹. Elle permettra d'obtenir des

surfaces biocompatibles qui seraient d'excellents candidats contre le développement des biofilms.

Pour beaucoup d'applications, les surfaces riches en amines présentent un grand intérêt. Dans le domaine biomédical par exemple, elles sont capables d'une part d'influencer l'adsorption des protéines et l'adhérence des cellules et d'autre part de fournir des sites favorables à l'immobilisation covalente de polymères et de biomolécules.

Caro *et al.* a réussi à fonctionnaliser des surfaces polymères par des amines via une **copolymérisation greffante de l'allylamine** induite par traitement plasma radiofréquence²⁰⁰. Le poly(allylamine) a également été greffé par Toufik *et al.* sur des membranes en PET²⁰¹. Les membranes ont tout d'abord été traitées par plasma radiofréquence à l'argon ou à l'oxygène, puis un monomère a été vaporisé *in-situ* pour se polymériser à la surface du substrat. La poly(allylamine) a permis l'immobilisation des biomolécules telles que la trypsine²⁰².

Uyama *et al.* a greffé le **poly (N,N-diméthylacrylamide) (DMAA)** sur un film en PET en utilisant l'activation plasma argon²⁰³. La copolymérisation greffante est produite par irradiation UV. Le but est de réaliser un cathéter possédant une basse surface de friction afin d'éviter les échauffements provoqués par des dispositifs médicaux tels que le cystoscope et l'endoscope. Saito *et al.* a montré une amélioration de la biocompatibilité d'un film en PET par le greffage du poly(DMAA)²⁰⁴. La copolymérisation greffante se réalise par traitement laser excimère *in-situ* du monomère le N, N-diméthyle acrylamide en phase gazeuse sur le film activé par traitement laser à excimère.

T. Hirotsu a greffé l'**acide polyméthacrylique (PMAA)** sur des membranes en PP. Les échantillons ont été prétraités par plasma froid basse pression radiofréquence (13,56 MHz) puis la copolymérisation greffante est effectuée par imprégnation dans un bain de monomère²⁰⁵.

Dans une autre étude, la copolymérisation greffante du PMAA sur des films en PET s'effectue à l'aide d'une surface préparée par le formaldéhyde dans l'acide acétique afin de créer des groupements hydroxyles²⁰⁶. Les films en PET hydroxylés sont ensuite placés dans une solution aqueuse du monomère MAA en présence du Ce (IV)/ H₂SO₄. La gélatine a finalement été immobilisée de façon covalente via un carbodiimide sur les échantillons

greffés PMAA. L'objectif était d'améliorer la biocompatibilité des prothèses vasculaires en PET par création d'une surface inerte chimiquement et biologiquement.

Rappelons que l'objectif de cette thèse est d'effectuer le greffage de l'acide polyacrylique sur un polyester. Nous nous intéresserons à décrire de plus près l'intérêt et les principales techniques de réalisation de ce greffage.

Le greffage de l'acide polyacrylique PAA a été effectué sur différents supports : polyuréthane²¹³, polypropylène^{207,208,209,210}, polyéthylène²¹⁷, polystyrène¹⁹⁴, polyéthylène téréphtalate^{211,212}, PTFE²²⁷, polysulfone¹⁸⁹, polyuréthane^{213,214}, polyamide²¹⁵. Nous citons ci-dessous quelques exemples d'application:

- L'amélioration des propriétés d'adhésion d'une surface par l'augmentation de l'hydrophilie pour les emballages alimentaires par exemple^{152,170}.
- L'obtention d'une modification plus durable avec une énergie de surface élevée.
- La création de systèmes à libération contrôlée de médicaments en jouant sur le pH^{216,217}.
- L'amélioration des propriétés filtrantes de membranes^{189,218}.
- L'amélioration de la biocompatibilité et de l'hémocompatibilité²¹⁹.
- L'immobilisation par liaisons covalentes ou liaisons physiques des molécules bioactives^{213,220,221,222,223}.

L'utilisation du plasma pour le greffage a débuté en 1960 alors que son exploitation pour le greffage de l'acide polyacrylique n'a commencé qu'en 1970 et ceci principalement sur des fibres et textiles afin d'améliorer leur mouillabilité et leur affinité avec des colorants.

3.2.2. Les procédés de greffage de l'acide polyacrylique

Dans la littérature on constate un grand intérêt pour le greffage de l'acide polyacrylique PAA sur différents supports, greffage effectué grâce à différentes techniques. Trois principales méthodes sont appliquées dans la littérature: le greffage en solution, le greffage en phase vapeur et la polymérisation par plasma. Ces trois méthodes et leurs applications sont détaillées ci-dessous :

3.2.2.1. Le greffage en solution

La surface est tout d'abord activée par irradiation, puis exposée à l'air pour générer des fonctions oxydées. Les échantillons sont finalement immergés dans une solution contenant le monomère d'acide acrylique à une température bien définie.

Gancarz *et al.* a greffé le PAA sur des membranes en polysulfone (PSU), les surfaces sont tout d'abord activées par plasma micro-onde, puis exposées 5 min à l'air et ensuite immergées dans une solution aqueuse de monomère à 70°C.²¹⁸

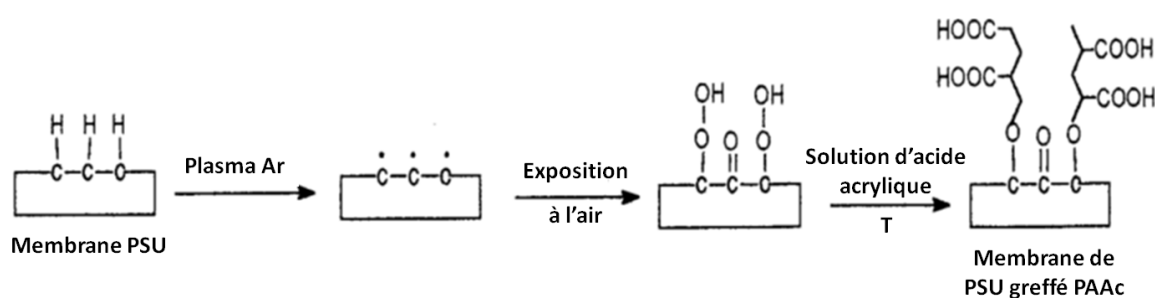


Figure 14 : Le procédé de greffage de l'acide acrylique selon la 1ère méthode de Gancarz *et al.*²¹⁸

Par le même principe Gupta *et al.* a greffé l'acide polyacrylique sur différents types de support en polymères^{220,224,225,226}. Ils ont tout d'abord activé le substrat par traitement plasma argon puis exposé l'échantillon à l'air libre. Ils expliquent que cette exposition permet à l'aide de l'oxygène de l'air la création de fonctions peroxydes et hydroperoxydes à la surface. Ces fonctions vont initier la réaction de polymérisation de l'acide acrylique, réalisée en présence de *sel de Mohr*. Cet additif a été ajouté pour prévenir l'homopolymérisation du monomère d'acide acrylique. L'étude a permis de montrer l'effet des paramètres du traitement plasma (temps, puissance), de la concentration du monomère et du *sel de Mohr* sur le taux de greffage.

Chen *et al.* a étudié le greffage du PAA à la surface d'un film en PP, le substrat ayant préalablement été activé par bombardement électronique. La réaction de greffage a été réalisée dans un bain marie à 70°C en présence du *sel de Mohr*²⁰⁷. La cinétique de la réaction ainsi que son influence sur le taux de greffage ont donc été étudiées. Wang *et al.* a également adopté le même protocole pour greffer le PAA sur le PTFE²²⁷.

Chen-Yang *et al.* a cherché à augmenter l'hydrophilie des membranes en PTFE. Les surfaces ont tout d'abord été activées par traitement plasma froid CO₂ produit par un générateur microondes. Les échantillons prétraités par plasma ont ensuite été immergés dans une solution aqueuse de monomère à une température de 65-70°C pendant 1 à 24 heures. Ils ont prouvé que le traitement plasma a non seulement amélioré la capacité de pénétration des monomères d'AA mais aussi la polymérisation. Les surfaces des membranes traitées par plasma froid ont subi un changement structurel négligeable et leur morphologie globale demeure inchangée²²⁸.

Le greffage du PAA a été réalisé par Yang *et al.* sur la surface des membranes en polysulfone. Les membranes ont été activées par traitement ozone dans le but de créer des fonctions peroxydes initiant la copolymérisation greffante. La réaction de greffage se fait à 65°C pendant 2 heures dans une solution aqueuse d'acide acrylique à 30% en présence du FeSO₄ .7H₂O. La modification de surface a été réalisée afin d'aboutir à l'immobilisation du chitosane ce qui a permis aux membranes d'acquérir un effet antibactérien significatif en particulier sur les bactéries *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*²²⁹.

3.2.2.2. Le greffage par méthode « *in-situ* »

Dans les publications de Gancarz *et al.*, les membranes sont placées dans un réacteur plasma et sont tout d'abord activées par plasma argon. Quand le prétraitement est terminé, le flux de gaz est coupé et le monomère en phase vapeur est envoyé dans la chambre à plasma²¹⁸.

Cette méthode a été également adoptée par Oehr *et al.* pour le greffage du PAA sur des membranes en PP, PTFE et PVDF et par Toufik *et al.* pour le greffage du PAA sur des membranes en PET^{152,201}. Les membranes ont montré, suite à ce greffage, une augmentation significative de leur hydrophilie.

3.2.2.3. La polymérisation par plasma en phase gaz

Dans la publication de Gancarz *et al.*, les membranes sont exposées à un mélange d'argon et du monomère en phase vapeur. Le but de cette méthode est d'obtenir une pression précise dans le réacteur à plasma.

I. Louis Joseph Dogué *et al.* a réussi à greffer le PAA sur un film en PP par les deux méthodes: la première par activation du support par rayonnement gamma ou par plasma (Argon ou azote) puis greffage du PAA en solution et la deuxième directement par dépôt au plasma de l'acide acrylique en phase vapeur¹⁷⁰. Le PAA a été greffé afin de servir d'agent espaceur « *spacer* » pour ensuite immobiliser des molécules thérapeutiques.

En comparant les trois méthodes décrites ci-dessus, Gancarz *et al.* a montré que les membranes de polysulfone préparées par la seconde méthode « Le greffage en phase vapeur » donnent les résultats les plus prometteurs du point de vue des propriétés de filtration.

Les polymères (en particulier l'acide polyacrylique) sont ainsi greffés non seulement pour améliorer l'hydrophilie de la surface du substrat mais aussi pour lui introduire à sa surface groupements fonctionnels qui facilitent l'immobilisation covalente de molécules bioactives. Cette dernière propriété a pour but à la fois de contrôler l'adhésion et la prolifération cellulaire ou protéique et d'inhiber l'adhésion bactérienne afin de lutter contre les différentes complications liées à l'utilisation des biomatériaux implantables.

4. L'immobilisation des molécules bioactives : lysozyme, héparine et gentamicine

Comme nous l'avons déjà vu dans le **paragraphe 1**, afin de palier aux différentes problématiques rencontrées au niveau chirurgical, diverses solutions sont proposées. Les molécules bioactives ou thérapeutiques (antibiotiques, protéines, polypeptides²³⁰...) sont fixées par différentes méthodes. L'adsorption physique ou encore la liaison covalente sont quelques exemples des stratégies suivies¹¹⁷. L'adsorption par liaison physique est la procédure la plus simple mais elle aboutit à la création d'un revêtement relativement instable et incontrôlable.

Le challenge actuel ou « verrou technologique » consiste à greffer la molécule bioactive sans affecter son activité thérapeutique. Les liaisons covalentes jouent un rôle primordial dans la conformation des protéines et leur stabilité. Il est donc nécessaire de prévenir la dénaturation des molécules bioactives lors du greffage. Les conditions expérimentales telles que la température et le pH doivent ainsi être contrôlées puisqu'ils peuvent provoquer une transition conformationnelle et donc le blocage du site actif.

Le greffage de différents polymères décrit dans le **paragraphe 3** assure l'introduction des différents groupements fonctionnels à la surface, facilitant ainsi la liaison avec les molécules bioactives que se soit par des liaisons ioniques ou covalentes.

Nous étudierons en particulier tout au long de ce chapitre l'activité et les mécanismes d'immobilisation des molécules bioactives (lysozyme, héparine et gentamicine) utilisées dans le cadre de ce projet.

4.1. L'héparine:

4.1.1. Effet thérapeutique et activité de l'héparine

L'héparine (*Figure 15*) découverte par Mc Lean en 1916 n'a été utilisée dans des expériences cliniques qu'en 1925 par Reed. C'est est une molécule mucopolysaccharidique d'origine naturelle dont l'activité biologique repose sur une séquence commune

(pentasaccharide) mais dont la structure est très variable. Elle a des propriétés anticoagulantes puissantes et elle est fréquemment utilisée pour son action anti-thrombotique²³¹.

Les héparines sont largement utilisées en pratique clinique et elles représentent un véritable standard pour la prophylaxie et le traitement anti-thrombotique. L'héparine est administrée par voie sous-cutanée ou intraveineuse selon la dose à administrer. Elle est également connue pour le traitement des problèmes inflammatoires et des cancers²³².

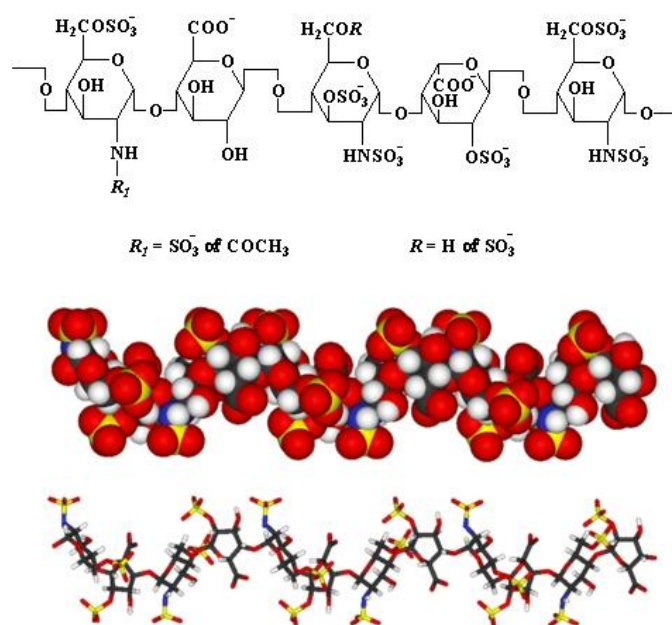


Figure 15 : Formule chimique et conformation spatiale de l'héparine

4.1.2. L'immobilisation de l'héparine et son mécanisme réactionnel

Beaucoup de stratégies ont été développées pour diminuer la thrombogénicité des biomatériaux implantables, comme par exemple appliquer un revêtement d'albumine, de phospholipides, des hydrogels, le polyéthylène glycol (PEG), ou immobiliser des agents d'anti-adhésion plaquettaire. L'héparinisation par une liaison covalente semble être la modification de surface la plus efficace.

Dans la littérature, un intérêt particulier est porté sur l'héparine notamment dans le domaine médical, avec en particulier l'immobilisation de cette molécule sur différents biomatériaux de diverses natures: métallique, film polymère, textile (etc.)²³³.

Whiffen et Gott en 1965 ont été les premiers à expérimenter la fixation de l'héparine sur une surface de graphite par l'intermédiaire du chlorure de benzalkonium^{234,235}. Ils ont ainsi montré une bonne antithrombogénicité de la surface.

L'héparine possède non seulement une efficacité anti-thrombotique exploitée par exemple sur des prothèses vasculaires en PET imprégnées, mais elle permet également d'améliorer leur biocompatibilité d'après les travaux de Van Bilsen *et al.*²³⁶

Cependant, l'héparine peut présenter des effets secondaires indésirables. En effet, bien qu'elle soit d'usage très fréquent (en cardiologie par exemple), son efficacité anticoagulante s'accompagne de risque de complication hémorragique potentiellement grave d'un ordre inférieur à 5%. Elle présente aussi un risque de **Thrombopénie Induite par l'Héparine (TIH)** qui est la conséquence d'une réaction immuno-allergique entre l'héparine et les anticorps spécifiques. Cette réaction entraîne une activation plaquettaire d'où la thrombopénie. Ce risque a notamment été établi par L. Mureebe *et al.* pour des prothèses vasculaires enduites d'héparine. Ceci a amené l'idée de fixer l'héparine ou d'utiliser un système de libération contrôlée afin de pouvoir minimiser et maîtriser la quantité de l'héparine diffusée (ce dernier a notamment fait l'objet des travaux de Noh *et al.*²³⁷ et Knetsch *et al.*²³⁸) pour des prothèses vasculaires en PTFE.

Différentes techniques ont été abordées pour l'immobilisation de l'héparine sur supports polymères destinés à des applications biomédicales.

Dans le but d'immobiliser des molécules bioactives telles que l'héparine, le polyéthylène glycol (PEG) natif ou modifié (fonctions amines par exemple) a été couramment greffé à la surface de biomatériaux implantables. Le PEG est en général utilisé comme « spacer » entre le support et la molécule thérapeutique.

Dans d'autres études, les prothèses ont été greffées avec différentes molécules thérapeutiques telles que la gélatine, le collagène, l'albumine qui assurent la fixation des agents thérapeutiques comme l'héparine. E. Laemmel *et al.* a fixé l'héparine sur ces matrices protéiques adsorbées sur des prothèses en PET par une réticulation de type carbodiimide²³⁹.

L'héparine a également été immobilisée par Kim *et al.* sur des prothèses en PET greffées en PAA un « spacer » : l'oxyde de polyéthylène (PEO) porteur de fonctions amines terminales sur le PAA²⁴⁰ (*Figure 16*).

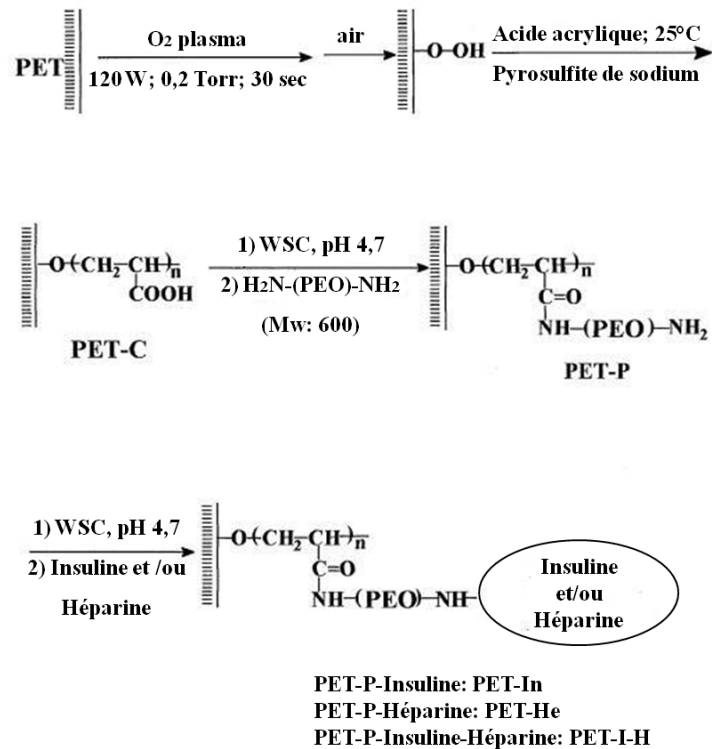


Figure 16 : Protocole de l'immobilisation de l'héparine sur le PET selon Kim *et al.*²⁴⁰

En utilisant le même principe, Pandiyaraj *et al.* a réussi à immobiliser l'héparine sur des films en PET-PAA via le Poyéthylène glycol (PEG)²⁴¹. L'amélioration de la résistance des surfaces vis-à-vis de l'adhésion plaquettaire et de l'adsorption des protéines a été prouvée. De même, Baquey *et al.* a immobilisé l'héparine sur des prothèses vasculaires en PTFE via un « spacer » à base de PEG fonctionnalisé²²².

Lin *et al.* a immobilisé l'héparine sur des membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF) greffées PAA via plasma froid (*Figure 17*)²⁴². Le mécanisme réactionnel de l'immobilisation est basé sur l'utilisation de l'EDAC afin d'activer la réaction entre les fonctions hydroxydes de l'héparine et les fonctions acides du PAA pour former une liaison ester. Contrairement à ce qui a été décrit précédemment, l'immobilisation s'est effectuée sans bras espaceur, les fonctions hydroxyles et non les fonctions COOH de l'héparine réagissant pour former la liaison covalente.

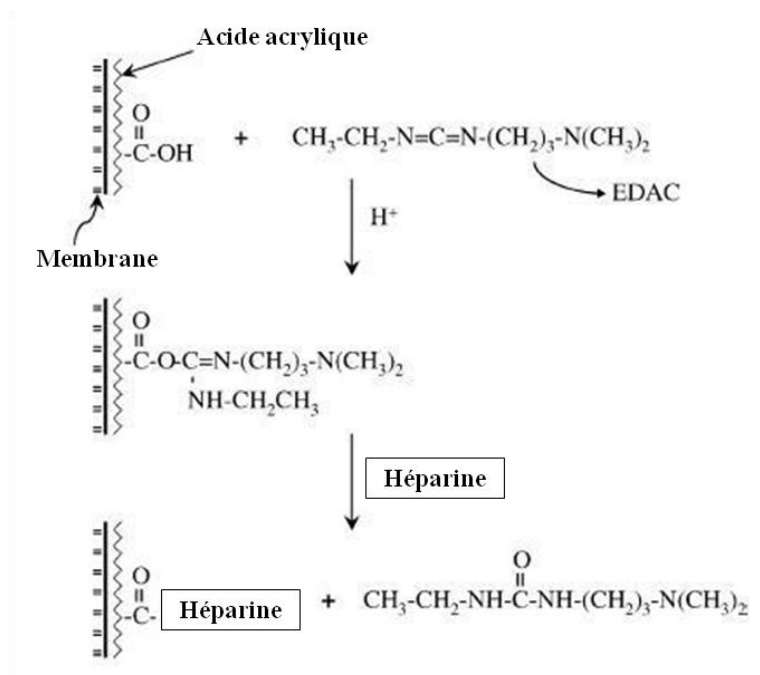


Figure 17 : La réaction de l'immobilisation de l'héparine sur le support en PVDF selon Lin et al. ²⁴²

Ce dernier mécanisme a été adopté dans le cadre de la présente thèse pour l'immobilisation de l'héparine sur nos textiles en PET. Dans la littérature, il est montré que ce type de réaction conduit à un revêtement plus efficace puisque les fonctions carboxylates, sulfates et sulfonamides dites « actives » de l'héparine restent libres donc bio-disponibles²⁴³. L'activité anticoagulante de l'héparine reste donc plus efficace.

4.2. La gentamicine

Afin de lutter contre l'infection, différents antibiotiques sont utilisés pour la modification de surface des biomatériaux implantables. Parmi ces antibiotiques nous pouvons citer la gentamicine. Dans les paragraphes qui suivent, la gentamicine, son effet thérapeutique et son immobilisation sur les surfaces seront décrites.

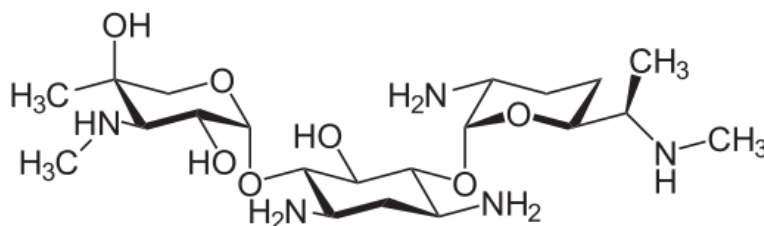


Figure 18 : Formule chimique de la gentamicine

4.2.1. Effet thérapeutique et activité de la gentamicine

La gentamicine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides largement utilisé dans le domaine médical pour traiter des infections bactériennes. Son effet antibiotique est approuvé sur les bactéries essentiellement à gram négatif mais aussi certaines à gram positif. La gentamicine agit en se liant à l'ARN ribosomique au site A du ribosome bactérien, qui est le site de décodage des codons de l'ARN messenger. La fixation de la gentamicine augmente fortement le taux d'erreur de lecture par le ribosome, ce qui provoque la synthèse de protéines anormales conduisant à la destruction de la bactérie.

La gentamicine est un aminoglycoside 4,6-disubstitué, proche de la kanamycine. La présence des groupements méthyles permet à la gentamicine d'éviter les mécanismes de résistances aux antibiotiques. Pour cette raison, elle est très efficace en antibiothérapie.

4.2.2. L'immobilisation de la gentamicine et son mécanisme réactionnel

La gentamicine a été utilisée pour améliorer la résistance des biomatériaux aux infections. Elle est très étudiée dans la chirurgie orthopédique pour inhiber l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms à la surface de prothèses orthopédiques (en Polyméthacrylate de méthyle²⁴⁴, etc...)

La gentamicine a été immobilisée sur des surfaces de prothèses vasculaires en PET modifiées par la gélatine. Le revêtement ainsi obtenu a montré son efficacité antibactérienne envers différentes bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* pendant plus de 28 jours²⁴⁵.

Un film en polyuréthane a tout d'abord été greffé à l'aide d'un mélange de monomères vinyliques (acide acrylique et acrylamide en présence de nitrate de cérium et d'ammonium et d'acide nitrique). Le revêtement a ensuite été utilisé comme réservoir pour des agents antibactériens tels que la gentamicine : les échantillons greffés ont été immergés dans une solution tampon MES à pH 6 pendant minimum 30 min puis immergés dans une solution de gentamicine dissoute dans la solution tampon (0,5 mg/mL) à pH 6 pendant 30 min. Les échantillons ont finalement été lavés pendant 5 à 10 secondes dans l'eau ionisée. La surface ainsi modifiée a montré une efficacité antibactérienne (envers *Staphylococcus*.

aureus) jusqu'à 6 semaines sans induire de cytotoxicité (prouvée par un test de culture cellulaire *in vitro* sur des cellules fibroblastes)⁷⁶.

Une comparaison de l'efficacité des prothèses vasculaires sur lesquelles est immobilisée la gentamicine et celles sur lesquelles de l'argent est immobilisé a été réalisée par M. Osinska-Jaroszuk *et al.* Les résultats montrent bien que le revêtement par la gentamicine est bien plus efficace et plus favorable que celui de l'argent.²⁴⁶

4.3. Le lysozyme

4.3.1. La bioactivité du lysozyme

Découvert par Alexander Fleming en 1922²⁴⁷, le lysozyme (*Figure 19*) est une protéine composée de 129 acides aminés en une seule chaîne polypeptidique comportant 4 ponts disulfures de masse molaire de l'ordre de 14600 g/mol.

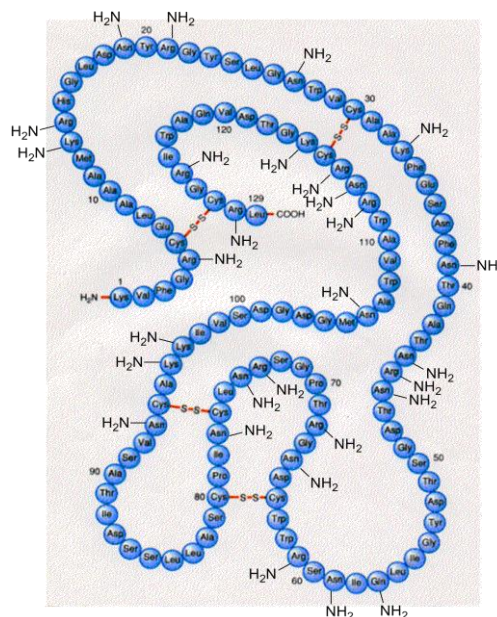


Figure 19 : Représentation de la structure du lysozyme²⁴⁸

Cette protéine est présente dans un certain nombre de sécrétions (larmes, salive, mucus nasal, etc.) mais également dans le blanc d'œuf. C'est une enzyme mucolytique* qui conduit à la dissolution des mucopolysaccharides de la paroi bactérienne et lui confère ainsi

*mucolytique : désigné en pharmacologie comme une substance qui réduit la viscosité des mucus et augmente les expectorations.

un effet antibactérien²⁴⁹. Cette propriété est observée principalement au niveau des parois des bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram positifs sont donc plus sensibles que les bactéries à Gram négatifs à l'action de cette enzyme²⁵⁰. Dans cette classe figurent les pathogènes les plus communs comme le *Staphylocoque*, le *Streptocoque* par exemple. Le lysozyme apparaît comme une première ligne de défense dans l'arsenal anti-infectieux des vertébrés.

Dans la littérature différents exemples d'activité bactéricide du lysozyme sont présentés. L'activité antimicrobienne et bactériolytique du lysozyme a été prouvée sur des bactéries de type *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens* et les *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.^{251,252,253,254}

Lee *et al.* a également observé cette activité sur *Haemophilus influenzae* (NTHi), *Moraxella catarrhalis* O35E et *Streptococcus pneumoniae*²⁵⁵.

4.3.2. L'immobilisation du lysozyme et son mécanisme réactionnel

Reconnu pour son activité antibactérienne, le lysozyme est utilisé depuis plusieurs années par les industries pharmaceutiques et agroalimentaires^{253,256}. Depuis août 2001, il est employé en œnologie afin de dégrader la paroi des bactéries lactiques. Il est également utilisé dans la fonctionnalisation des surfaces d'acier inoxydable en vue d'empêcher l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms en eau de mer²⁵⁷.

A notre connaissance, l'idée d'immobiliser le lysozyme sur un support polymère a été très rarement expérimentée pour des applications biomédicales. Le lysozyme a été immobilisé sur des films polymères pour la réalisation des emballages alimentaires antibactériens^{258,259}.

Conte *et al.* a immobilisé le lysozyme via le glutaraldéhyde sur un film en alcool polyvinylique utilisé pour des emballages alimentaires²⁴⁹.

Wang *et al.* a réalisé la fixation du lysozyme sur un support en laine également via le glutaraldéhyde²⁶⁰.

D'autre part, une surface de coton modifiée par la glycine a permis l'immobilisation du lysozyme via un carbodiimide²⁵¹.

Très récemment en 2011, Muszanska *et al.* a réussi à immobiliser le lysozyme via l'oxyde de polyéthylène (PEO) (*Figure 20*) pour l'amélioration de la biocompatibilité des implants biomédicaux. Le revêtement a montré une bonne efficacité antibactérienne vis-à-vis de la bactérie *Bacillus subtilis*, même avec une faible quantité de lysozyme immobilisé²⁶¹.

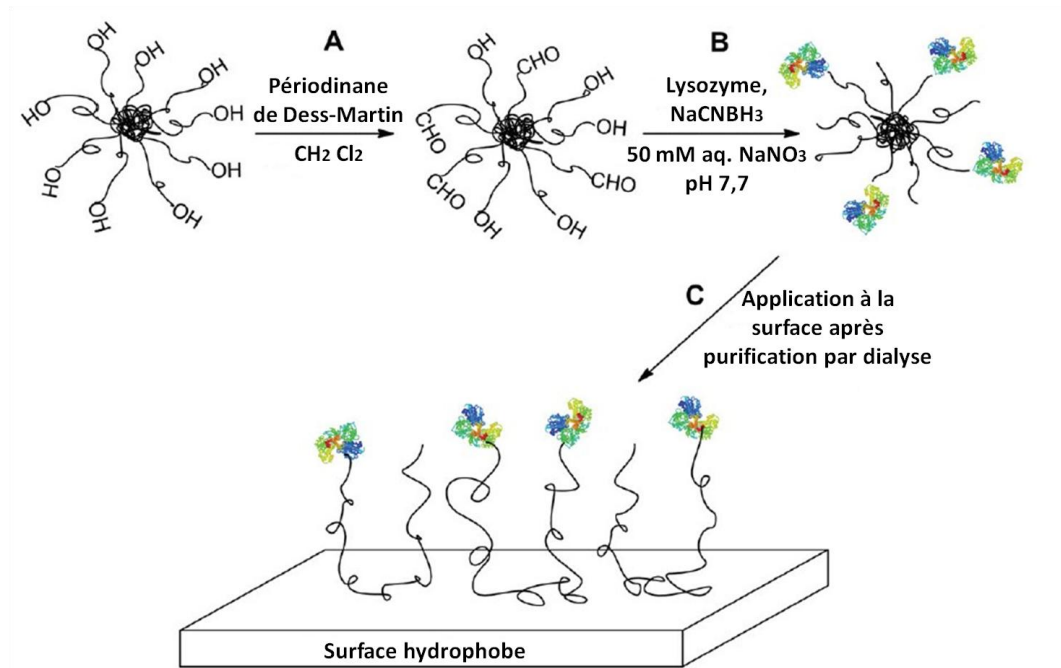


Figure 20 : Mécanisme d'immobilisation du lysozyme sur une surface hydrophobe selon Muszanska *et al.*²⁶¹

SYNTHESE DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique nous a permis de repérer l'intérêt de chaque étape réalisée au cours de ce projet et les meilleures stratégies à suivre.

Le polyéthylène téréphtalate PET est un matériau très largement utilisé dans le domaine biomédical pour ses différentes caractéristiques favorables. Néanmoins, les implants biomédicaux en PET sous différentes formes textiles souffrent en générale des complications post-opératoires telles que l'infection et la thrombose. Ces complications s'avèrent très graves pour le succès de l'implantation. La modification de surface est une technique très à la mode afin de lutter contre ces diverses problématiques. Toutes les recherches actuelles sont focalisées sur les traitements respectant des caractéristiques mécaniques, physico-chimiques et biologiques bien définies répondant aux attentes des chirurgiens et des patients.

L'immobilisation des agents bioactives (la gentamicine, le lysozyme et l'héparine) par des liaisons covalentes se montre une technique très efficace. Pour réaliser cette liaison, la copolymérisation greffante des polymères à intérêt biomédicale sur la surface du textile a été nécessaire.

Pour ses applications diversifiées et ses avantages, l'acide polyacrylique a été choisi comme l'intermédiaire qui facilite la fixation de la molécule bioactive. Il paraît que les techniques d'irradiation de la surface permettent non seulement la fonctionnalisation de la surface mais aussi amorcer cette copolymérisation greffante, réticuler et polymériser l'acide polyacrylique.

Sa simplicité, sa facilité de mise en œuvre, ses critères économiques et écologiques rendent la technologie plasma très attractive pour cette application. L'avantage des procédés plasma est que la modification est limitée à la couche externe de la surface (1-10 nm) et n'affecte donc pas les propriétés du matériau. Considérée comme une technologie d'avenir, elle est de plus en plus étudiée par l'industrie et ses applications sont nombreuses. La technique du plasma froid basse pression est l'une des techniques les plus étudiées et la plus efficace pour notre étude. Elle sera servie non seulement pour l'activation des surfaces de PET mais aussi pour la réticulation et la polymérisation du monomère de l'acide acrylique. Dans le but d'améliorer la biocompatibilité et hémocompatibilité du biomatériau, les surfaces modifiées se sont servies pour l'immobilisation de l'héparine, le lysozyme et la gentamicine.

Lors de cette étude, le choix des molécules bioactives s'est basé sur leurs bio-activités c-à-dire l'activité antibactérienne et anticoagulante de ses molécules qui ont été démontrées. Les résultats demandés sont de prouver l'amélioration de la biocompatibilité des surfaces modifiées, ainsi de montrer une activité antibactérienne et anticoagulante des textiles modifiés.

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

II. DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

Rappelons que le but de notre étude est l'élaboration d'un biomatériau implantable à propriété antibactérienne ou anticoagulante selon la demande. La *Figure 21* résume notre stratégie :

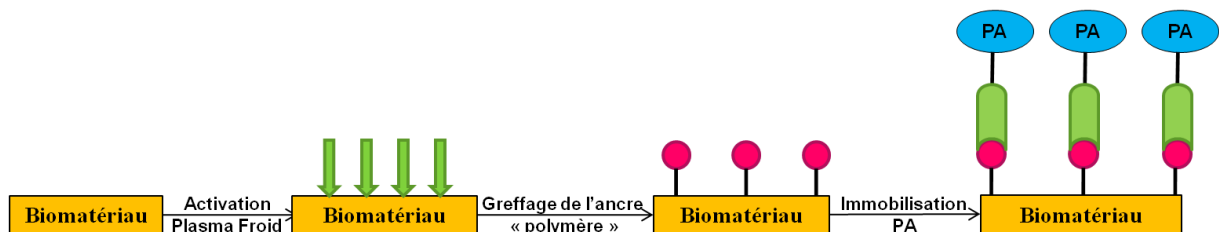


Figure 21 : Les étapes de modification de surface envisagée sur les textiles en PET, activation par plasma, greffage de l'ancre et immobilisation du principe actif

Cette étude se réalise donc par :

- Les modifications de surface par des méthodes chimiques et physiques.
- Les caractérisations des surfaces traitées.
- L'évaluation biologique par l'étude de la biocompatibilité (contact avec les cellules) et l'hémocompatibilité (contact avec le sang) des surfaces modifiées.
- L'évaluation microbiologique par l'étude de l'activité antibactérienne des surfaces greffées.

1. Le greffage de l'acide polyacrylique sur surface textile

1.1. Matériels : le polyéthylène téréphtalate

Le polyéthylène téréphtalate (PET) est un thermoplastique de la famille des polyesters, obtenu par la polycondensation entre l'acide téréphtalique et l'éthylène glycol

Figure 22 :

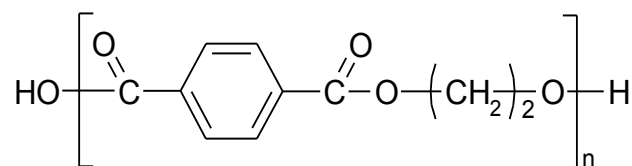


Figure 22 : Formule chimique du polyéthylène téréphtalate (PET)

Nous avons utilisé deux types de textile en PET:

- Le textile non-tissé est sous forme de membrane de 100 g/m^2 , d'épaisseur de 0,139 mm provenant de Pridesa (Tratamiento De Aguas Y Residuos, España) (*Figure 23*).
- Le textile en tulle utilisé est un tissu en mailles serrées employé en chirurgie viscérale provenant de Cousin Biotech (Wervicq-Sud, France) de 100 g/m^2 et d'épaisseur de 0,4 mm (*Figure 23*). Contenant deux types de fils (chaîne et trame) tricotées.

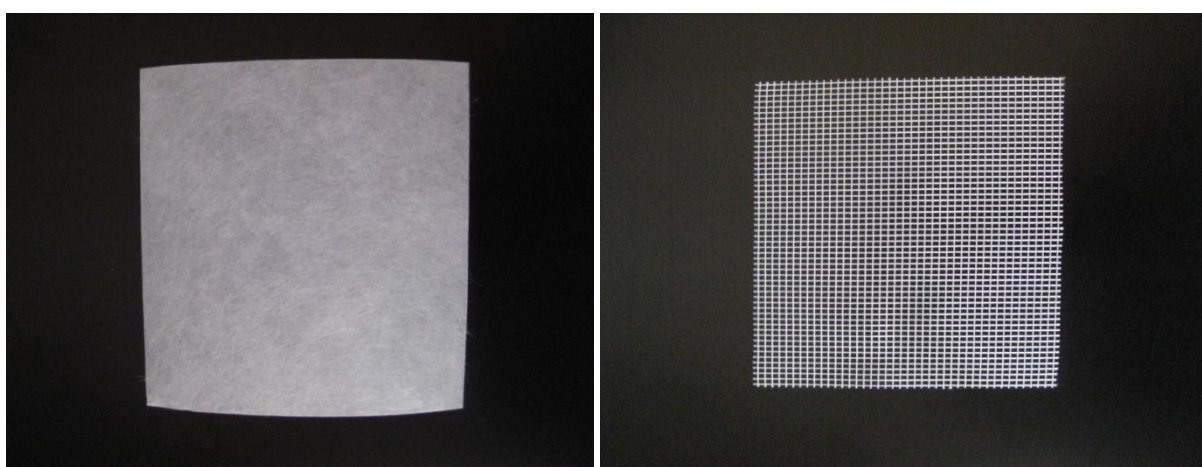


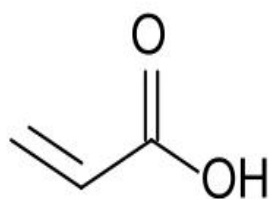
Figure 23 : Photo des textiles en PET: non tissé (gauche) et en tulle (droite)

Les textiles sont découpés sous forme d'échantillons de $10 \times 10 \text{ cm}^2$, puis lavés par soxhlet pendant 3h30 à l'éthanol et 3h30 à l'eau distillée, afin d'éliminer l'ensimage. Ils sont ensuite séchés toute la nuit à 50°C . Selon les études, ils sont découpés sous forme de carrés de $5 \times 5 \text{ cm}^2$ ou sous forme de pastilles de 10 ou 11 mm de diamètre à l'aide des emportes pièces.

1.2. Produits : l'acide acrylique

L'acide acrylique (acide acroléique ou acide prop-2-énoïque, AA) (

Figure 24) utilisé provient d'Acros Organics, France. Il est stabilisé par l'éther monométhyle d'hydroquinone (MEHQ). Pour éliminer cet inhibiteur, la réalisation d'une purification dans une colonne remplie d'*Inhibitor Removers* de (Aldrich, France) est nécessaire pour l'optimisation du greffage.



Acide-2-propénoïque (acide acroléique)			
Formule brute	$C_3H_4O_2$	Stabilisants	180-220 mg/L (MEHQ)
Masse molaire	$72,06 \text{ g.mol}^{-1}$	Ebullition	141°C
Densité	1,051	Point éclair	48°C
Pureté	99,5%	N° CAS	79-10-7

Figure 24: Formule chimique et caractéristiques de l'acide acrylique

L'AA est un composé très réactif qui polymérise facilement même à température ambiante lorsqu'il n'est pas stabilisé convenablement. La chaleur, la lumière, le contact avec des catalyseurs (produits oxydants tels que les peroxydes, les acides forts, sels de fer) provoquent ou accélèrent la polymérisation.

1.3. Méthodes de greffage

Le greffage du PAA sur le textile en polyester (Figure 25) est effectué selon deux procédés: procédé dit 'en solution' et procédé dit 'par foulardage':

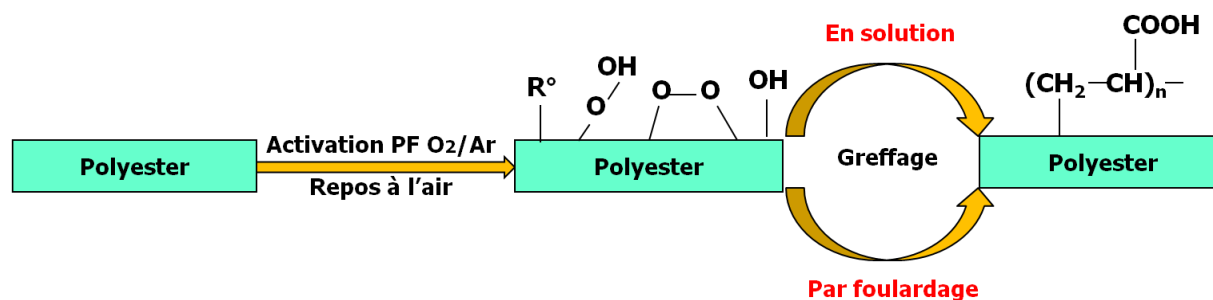


Figure 25 : Procédés 'en solution' et 'par foulardage' de greffage du PAA sur les textiles

1.3.1. Activation de la surface par plasma froid

Dans le but d'introduire des sites actifs à la surface, nous avons choisi d'utiliser le plasma froid (PF) à basse pression. L'appareillage plasma froid radiofréquence utilisé lors de cette étude est un Europlasma apparatus CD1200-400 COMBI MC avec un générateur Radio Fréquence (Dressler) de 13,56 MHz (Figure 26).

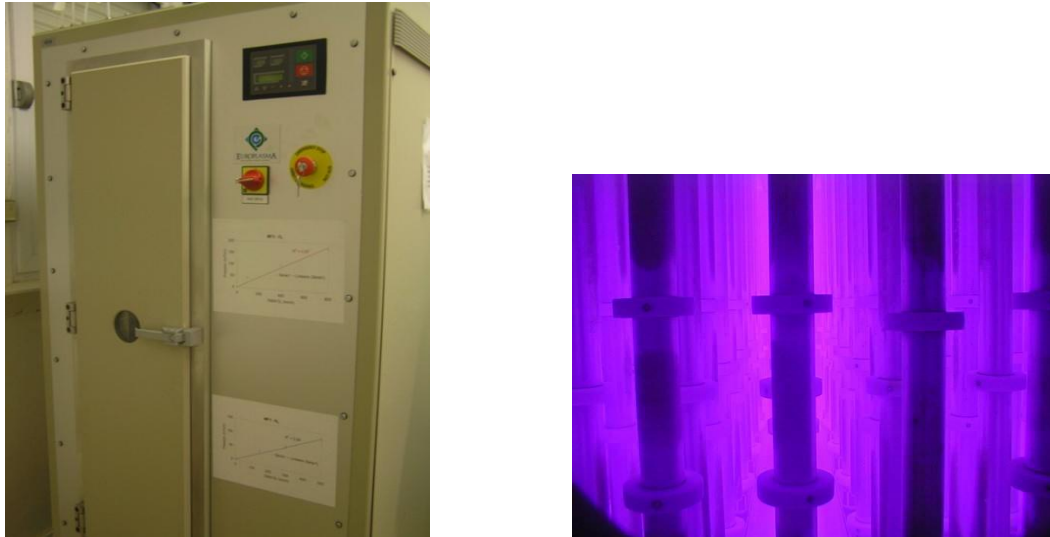


Figure 26 : Machine du plasma basse pression à générateur Radio fréquence (gauche) et photo du gaz ionisé dans l'enceinte à plasma en marche (composition de gaz Ar/O₂)(droite)

Le dispositif expérimental (Figure 27) suit le modèle suivant: on introduit dans l'enceinte fermée un gaz dont on contrôle la composition, la pression et le débit. Le gaz (un mélange d'O₂ et Ar) est envoyé dans l'enceinte du réacteur en condition sous vide. Un champ électrique radiofréquence est alors appliqué et la fréquence dans l'enceinte est contrôlée (13,56 MHz). La puissance appliquée est de 300 watts.

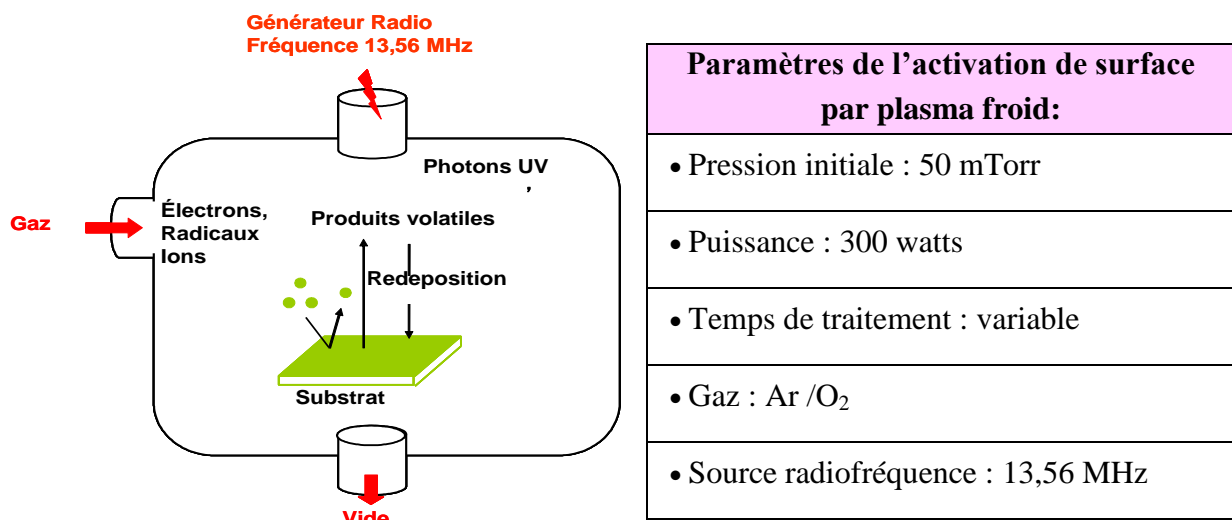
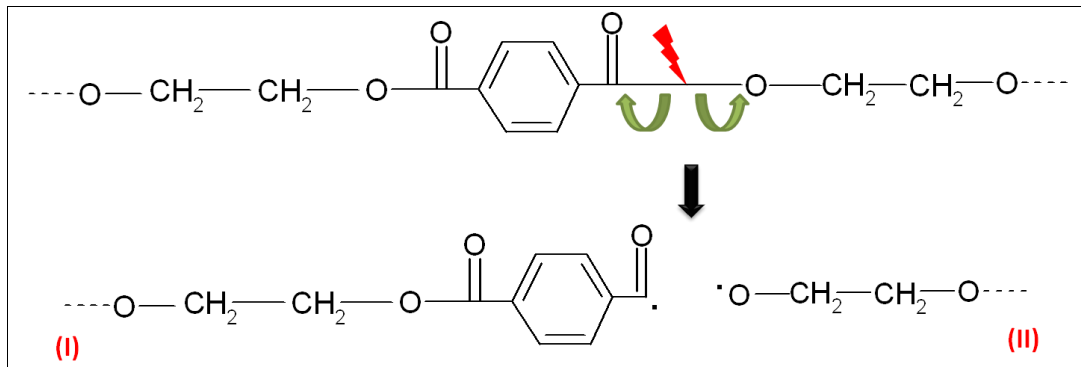


Figure 27 : Schématisation de la modification de surface par traitement plasma et paramètres utilisés

Les échantillons sous forme de pastilles de 10 et 11 mm ou sous forme de carrés de 5*5 cm² sont alors placés entre les deux électrodes à l'intérieur de cette enceinte à plasma. Ils sont donc exposés à un mélange de gaz ionisé constitué d'électrons libres (provenant de

l'ionisation des molécules neutres de gaz introduits), de photons, d'espèces excitées et d'espèces radicalaires. Ces derniers éléments sont très réactifs et vont venir se greffer à la surface de l'échantillon en formant des liaisons chimiques avec les atomes de celle-ci :

Scissions de chaînes de type 1



Scissions de chaînes de type 2

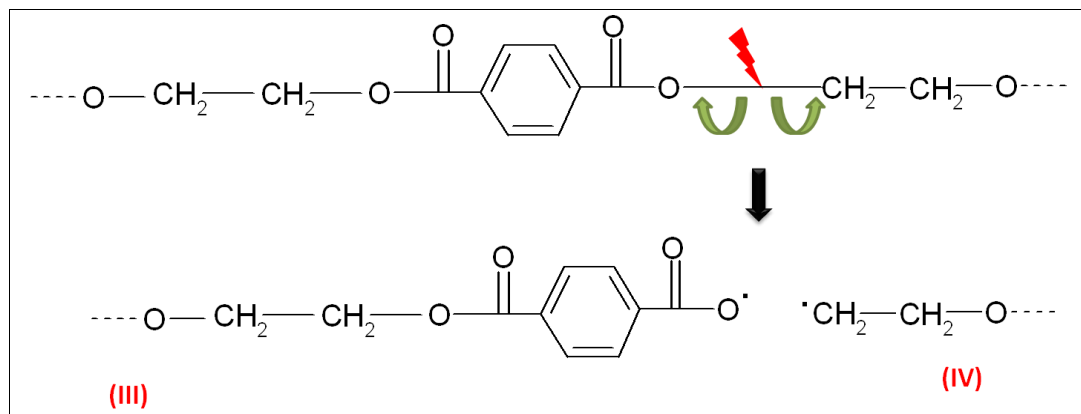
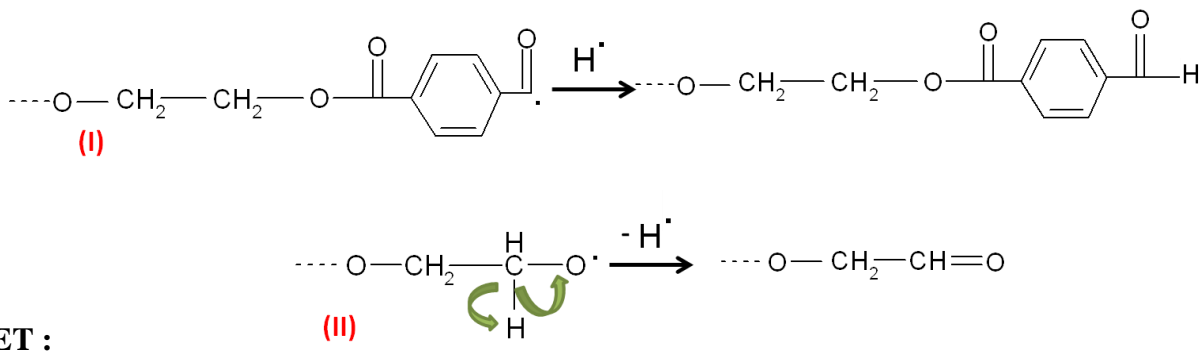


Figure 28 : Deux types (1) et (2) des scissions possibles des chaînes de PET lors d'un traitement plasma froid Ar/O₂ sur une surface de PET



ET :

Figure 29 : Les mécanismes de formation de groupes carbonyles suite au traitement plasma froid Ar/O₂ sur une surface de PET

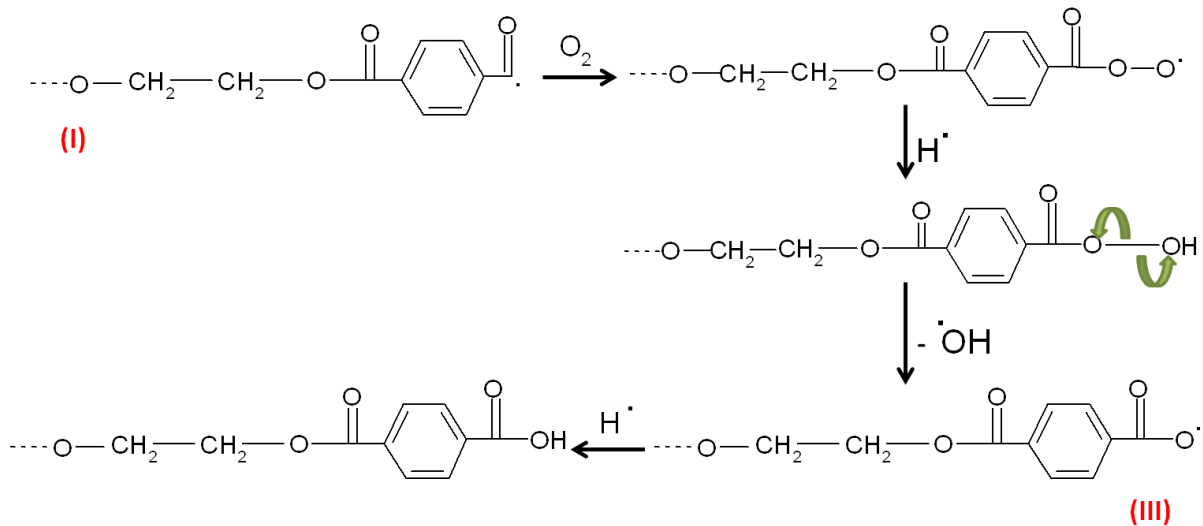


Figure 30 : Les mécanismes de formation de groupes carboxyles suite au traitement plasma froid Ar/O₂ sur une surface de PET

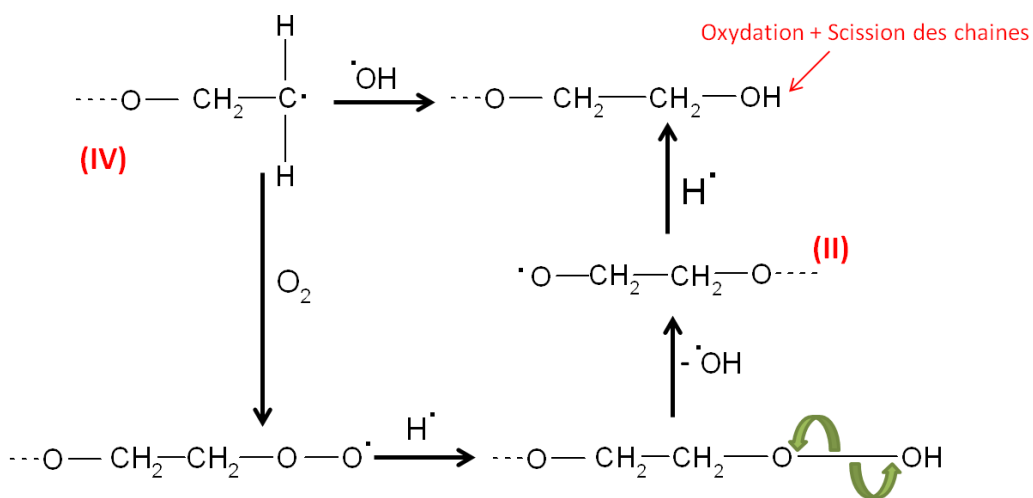


Figure 31 : Les mécanismes de formation des radicaux hydroperoxyles suite au traitement plasma froid Ar/O₂ sur une surface de PET

Les proportions des deux gaz utilisés (Argon/Oxygène) vont faire l'objet d'une étude afin d'optimiser la densité de charge et de fonctions en surface. Après cette étape d'activation de surface, deux procédés de greffage ont été étudiés et les paramètres optimaux du traitement plasma froid ont été recherchés.

1.3.2. Le procédé de greffage dit 'en solution'

Après une activation du textile par traitement plasma froid, un temps d'attente de 45 minutes a été fixé pour favoriser à la fois la stabilisation des radicaux créés à la surface et la

formation des fonctions peroxydes et hydroperoxydes. Les échantillons sont placés dans un ballon contenant la solution d'acide acrylique (AA). Le rapport de bain est de 3,3 mL d'AA par échantillon de 11 mm de diamètre. Ce montage est porté sous agitation à une température comprise entre 40 et 80°C sous flux d'azote (1 bar) pendant 1 à 6 heures.

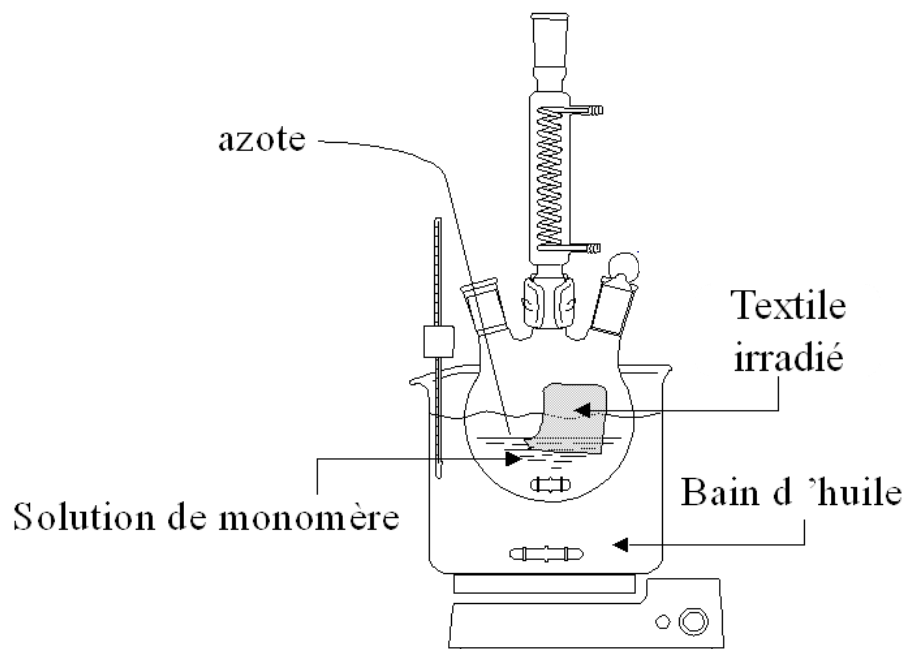


Figure 32 : Schéma du montage expérimentale du procédé de greffage de l'acide polyacrylique dit 'en solution'

En solution, nous pouvons imaginer différentes terminaisons de la copolymérisation greffante. La *Figure 33* présente quelques exemples de terminaison de greffage de PAA sur le PET.

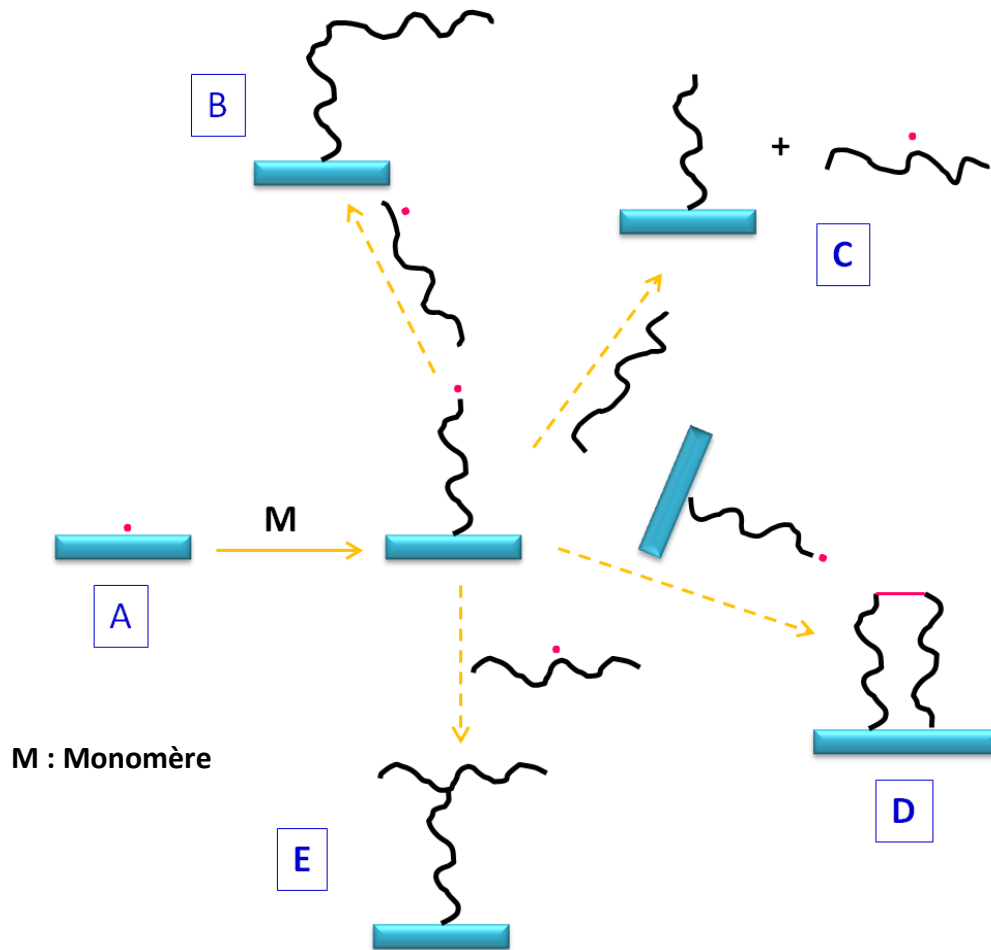


Figure 33 : Schéma représentatif de la terminaison de la polymérisation des chaînes polymères en croissance

Les différents paramètres du greffage tel que la concentration de l'AA, la température et le temps de traitement seront donc optimisés.

1.3.3. Le procédé de greffage dit 'par foulardage'

1.3.3.1. Méthode de greffage

Dans cette étude, le greffage est basé essentiellement sur le traitement plasma en deux étapes: en première étape l'activation et en seconde la polymérisation et la réticulation de l'acide acrylique à la surface du textile.

Les échantillons sont coupés sous forme de carrés de $5 \times 5 = 25 \text{ cm}^2$. Après activation par plasma froid (Ar/O_2) (85%/15%), les échantillons sont imprégnés dans une solution d'acide acrylique de concentration comprise entre 20 et 100% en volume puis agités pendant

2 à 10 minutes à température ambiante. Afin d'enlever l'excès de solution et permettre l'imprégnation maximale des fibres, les échantillons sont ensuite exprimés à l'aide d'un foulard (LDP Laboratory Dye Padder, LAB-PRO GmbH, Switzerland) (Figure 34). La pression entre les rouleaux du foulard est maintenue à 2 bars, la vitesse de rotation est fixée à 5 mètres/min (un seul passage).



Figure 34 : Photo du foulard utilisé pour la finition du textile

Les échantillons sont ensuite traités par un plasma froid à 100% d'argon. Ce traitement permet la polymérisation et la réticulation de l'acide acrylique à la surface du textile.

1.3.3.2. Optimisation du procédé de greffage par la méthode des plans d'expériences

Dans le but d'optimiser et d'évaluer l'impact des différents paramètres qui influencent le taux de greffage ainsi que l'aspect de la surface, un plan d'expériences a été réalisé.

Afin de restreindre le nombre de facteurs à étudier, la première étape du procédé de greffage a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le procédé dit 'en solution'. L'activation des échantillons par irradiation plasma froid est ainsi réalisée avec un mélange de gaz Ar /O₂ (85/15) pendant 120 secondes à 300 Watts.

Cinq paramètres ont été pris en compte pour l'optimisation. Ils sont liés à l'étape d'imprégnation des échantillons (la concentration de la solution en AA entre 20% et 100% et le temps d'imprégnation entre 2 et 10 min) mais aussi à l'étape d'irradiation PF des échantillons imprégnés. Les paramètres du traitement PF étudiés sont la puissance du plasma comprise entre 100 et 500 Watts, le débit des gaz variable entre 50 et 700 sccm (standard cubic centimeters per minute) et le temps de traitement entre 30 et 700 secondes.

Le nombre de facteurs à optimiser étant relativement faible et l'objectif étant de trouver le réglage dit 'optimal' de chacune de ces variables, le plan d'expériences choisi est un plan composite centré réduit.²⁶²

L'utilisation de variables codées est nécessaire afin de pouvoir réaliser l'exploitation statistique du plan et permettre la comparaison directe des différents facteurs. La relation entre les variables expérimentales et les variables codées est la suivante :

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

Où X_i est la valeur codée sans dimension de la variable U_i

U_0 représente la valeur expérimentale au centre du domaine

ΔU_i est le pas de variation

Les valeurs expérimentales associées aux niveaux de codage des différentes variables sont regroupées dans le *Tableau 2*.

Tableau 2 : Domaine expérimental et niveaux utilisés pour le plan d'expériences

Variables codées	Paramètres	Niveaux		
		-1	0	+1
X ₁	U ₁ : Concentration d'AA (% volumique)	40	60	80
X ₂	U ₂ : Puissance du PF (Watts)	200	300	400
X ₃	U ₃ : Temps du traitement PF (s)	247	465	683
X ₄	U ₄ : Débit de l'argon (sccm)	213	375	537
X ₅	U ₅ : Temps d'imprégnation (min)	4	6	8

La matrice réalisée comporte 29 expériences réparties en 3 blocs (Voir *Tableau 2*):

- Une matrice factorielle fractionnaire composée de 2^{k-1} expériences, k étant le nombre de facteurs, soit 16 expériences.
- Une matrice en étoile composée de $2 \times k$ expériences soit 10 expériences. Dans ce bloc, la distance des points en étoile notée α est égale à la racine quatrième du nombre d'expériences du premier bloc donc $\alpha=2$.
- Une matrice au centre du domaine contenant 3 expériences. Ces répétitions permettent d'évaluer l'erreur expérimentale.

Deux résultats également appelés réponses devront être optimisés :

- Y₁ qui correspond au taux de greffage de l'acide polyacrylique obtenu par dosage au TBO (nombre de fonctions -COOH)
- Y₂ qui correspond à la qualité de l'enrobage des fibres obtenue par observation au MEB

La méthodologie des plans d'expériences permet d'aboutir à un modèle mathématique qui va relier chaque réponse Y aux différents facteurs X_i. Dans le cas des matrices composites, ce modèle mathématique est une fonction polynômiale du second degré qui peut s'écrire sous la forme suivante :

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

Où β_0 est la constante du modèle, les β_i sont les termes linéaires, les β_{ij} sont les interactions et les β_{ii} sont les termes quadratiques.

La méthode des moindres carrés est appliquée pour estimer ces différents coefficients de régression:

$$\beta = (X^t X)^{-1} X^t Y \quad (3)$$

Où X est la matrice d'expériences en variables codées

X^t est la matrice transposée

Y est la matrice des réponses

1.3.4. Le nettoyage des échantillons

Afin d'enlever toutes traces d'homopolymères de PAA, les échantillons greffés sont d'abord rincés à l'eau distillée puis placés une heure aux ultrasons et enfin mis sous agitation dans l'eau pendant toute une nuit. Une extraction au soxhlet à l'eau distillée pendant 6 heures est réalisée. Les échantillons sont séchés à 50°C pendant une nuit puis stockés à température ambiante.

1.3.5. Bilan

Les étapes des procédés de la copolymérisation greffante du PAA à la surface du textile sont résumées dans la *Figure 35*:

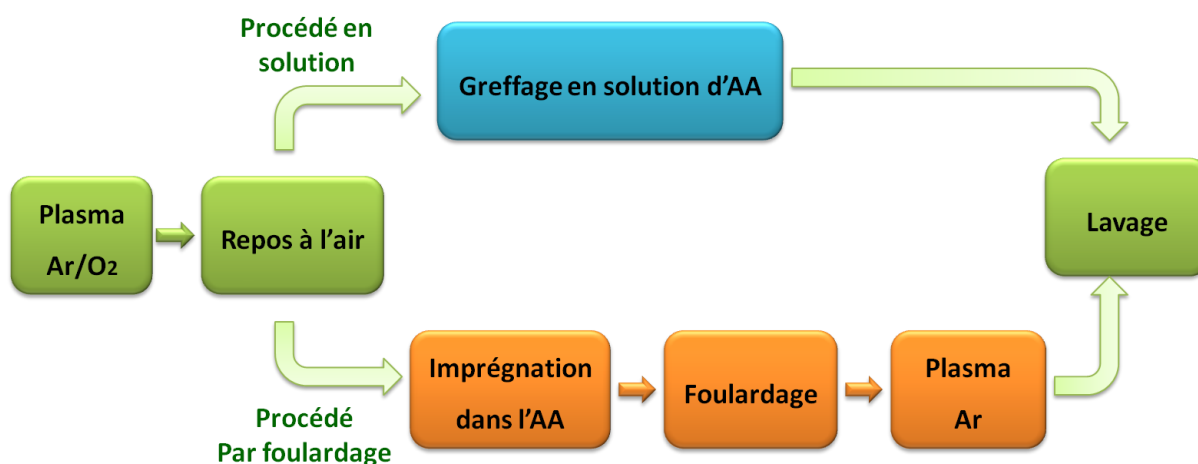


Figure 35 : Bilan des étapes des deux procédés de greffage de l'acide polyacrylique sur le textile en PET

1.4. Caractérisations des surfaces greffées

1.4.1. Dosage des fonctions acide carboxyliques par le TBO

Pour déterminer le nombre de fonctions COOH greffées sur le PET, un dosage par le Bleu de Toluidine Ortho (TBO) a été effectué (Figure 36) :

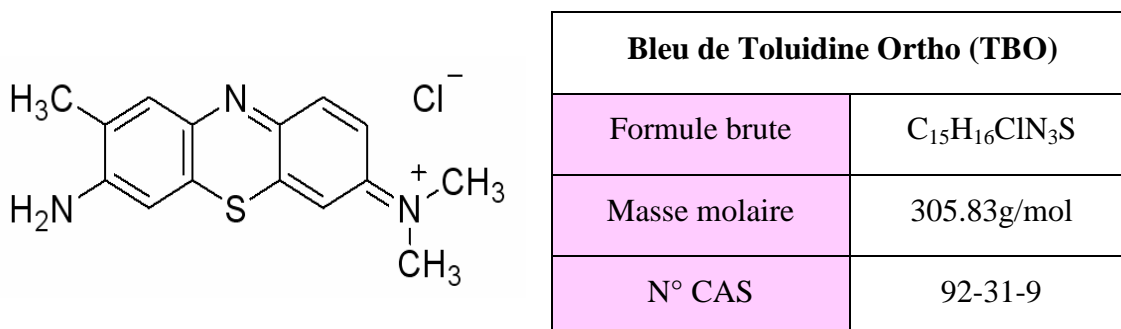


Figure 36: Formule chimique du TBO

Une solution de TBO ($5 \cdot 10^{-4}$ M, pH 10) est préparée puis mise en présence du textile greffé ou non avec le PAA pendant 6 heures à 30°C à l'abri de la lumière. Le groupe acide carboxylique -COOH greffé sur le PET complexe avec le TBO ionisé (TBO⁺) en milieu basique (Figure 37)²²⁴.

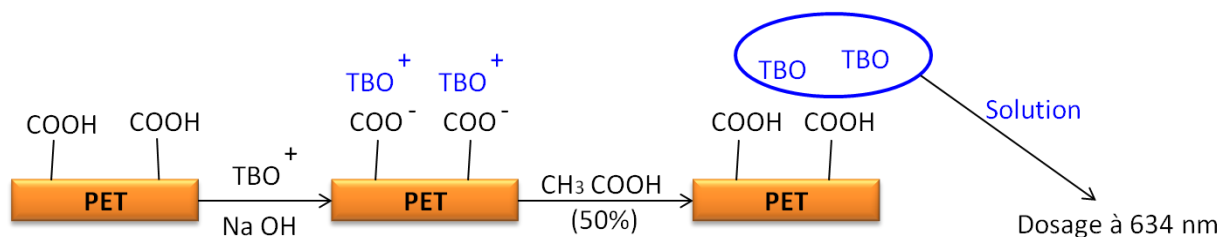


Figure 37: Absorption du TBO sur le PET greffé par PAA. Addition du TBO (TBO⁺), Complexation, Désorption. Complexation par une solution à 5×10^{-4} M de TBO, pH 10, 6 heures. Désorption par l'acide acétique/eau (50/50, V/V)

Les échantillons sont ensuite rincés dans une solution de NaOH (pH = 10) afin d'enlever le TBO non complexé. Les échantillons sont après plongés dans 10 mL d'une solution d'acide acétique à 50% en volume, pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Le TBO complexé sur le PET est alors désorbé²²⁰. L'absorbance de la solution est mesurée à 634 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de la marque Shimadzu UV-1800, le nombre de fonctions COOH greffées sur le textile est déterminé grâce à la loi de Beer Lambert. Le coefficient d'extinction molaire est de $75,594 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ avec le coefficient de corrélation $R^2 = 1$. Pour les deux types de textiles (en non tissé et en tulle) le nombre de fonctions acide carboxylique greffées dosées par TBO sera exprimé en mol/g afin de pouvoir simplifier les calculs des surfaces.

1.4.2. L'analyse thermogravimétrique (ATG)

Les mesures ont été réalisées sur une machine de marque TA Instruments, modèle TGA-Q50. Nos analyses sont effectuées de la température ambiante à 600°C, avec une rampe de 5°C/minute, sous flux constant d'azote (100 mL/min)²¹¹.

1.4.3. La mouillabilité

La mesure de l'angle de contact d'une goutte de liquides ayant des polarités différentes permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la détermination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. Dans le cadre de ce travail, seul la mesure de l'angle de contact avec l'eau, témoignant de l'hydrophilie/hydrophobie du support a été réalisée.

En pratique, pour la mesure de l'angle de contact, une méthode simple basée sur la photographie d'une goutte de dimension définie a été utilisée. Pour cela, un instrument (DIGIDROP GBX) qui se compose des deux parties principales décrites ci-dessous a été employé (*Figure 38*):

- Un microscope avec caméra numérique connectée à un ordinateur
- Une table de translation XYZ permettant de positionner l'échantillon en face du microscope.

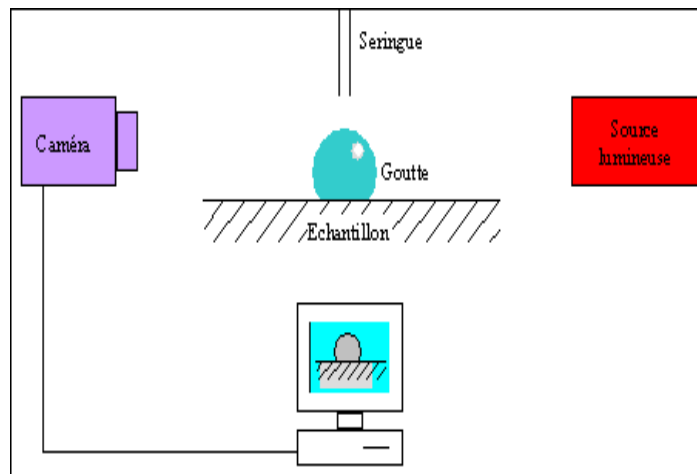


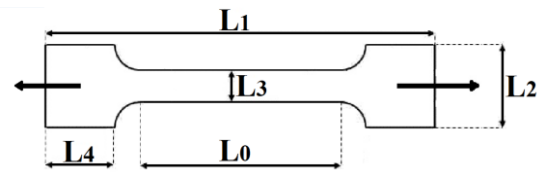
Figure 38 : Principe de l'appareil de mesure de l'énergie de surface (Digidrop, GBX)

Une goutte de faible volume ($5 \mu\text{L}$) est déposée à l'aide d'une seringue à la surface du non tissé thermostaté à 25°C . L'image de la goutte est capturée par la caméra vidéo et le logiciel WINDROP++ permet de numériser le contour de la goutte. 5 gouttes sont réalisées par type d'échantillons.

1.4.4. Les essais mécaniques

Les essais mécaniques de traction uni-axiale sont réalisés avec une machine de traction INSTRON 4466. Les échantillons étudiés sont découpés sous presse à partir de feuilles préalablement lavées. Il existe différentes normes de ce test de traction pour les textiles telles que ISO 13934-1 : 1999. Afin d'appliquer le test de traction mécanique sur des petites éprouvettes, la norme internationale pour les plastiques ISO 6239-1986 (F)²⁶³ a été choisie. Les éprouvettes sont désignées comme des petites éprouvettes de type A dites éprouvettes ISO 527. Les dimensions de l'éprouvette sont présentées sur la *Figure 39* :

Symbole et Description	Dimensions (mm)
L_0 : Longueur utile	27 mm
L_1 : Longueur totale	75 mm
L_2 : Longueur des extrémités	12,5 mm
L_3 : Largeur de la partie calibrée	4 mm
L_4 : Longueur incluse dans les mords de l'appareil	15 mm



Eprouvette de type A

Figure 39 : Description d'une éprouvette de type A

Les essais sont réalisés sur les échantillons du non tissé à température ambiante à la vitesse d'étirement de 20 mm/min jusqu'à la rupture de l'échantillon.

1.4.5. La microscopie électronique à balayage (MEB)

Après métallisation au carbone à l'aide d'un évaporateur au carbone de type Baltec SCD 005 mis sous vide, les échantillons sont observés au MEB, afin de caractériser la couche de PAA greffée sur les fibres du textile. Les observations sont réalisées sur des échantillons avec des taux de greffage différents en utilisant plusieurs grossissements.. Le MEB (HITACHI 54700) est réglé sur 6 kV lors des manipulations.

1.5. Evaluation de la cytocompatibilité des textiles greffés

L'évaluation biologique consiste à étudier la cytocompatibilité du textile greffé. Les tests de cytocompatibilité sont effectués sur des lignées cellulaires animales ou humaines provenant de préférence du site d'implantation (concept de cellules cibles): ostéoblastes, fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales, etc... faisant partie des cellules recommandées par les normes internationales d'évaluation de la biocompatibilité. (ISO 10993-5).

1.5.1. Les cellules

Les cellules HUVEC (PromoCell[®], C-12200) ou *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* sont des cellules issues de la culture primaire de cellules provenant de

l'endothélium des veines ombilicales humaines. Les cellules endothéliales assurent la régulation des échanges convectifs entre le plasma et le liquide interstitiel assurant la stabilité du volume plasmatique. Par ailleurs, exposées en permanence aux signaux environnementaux et aux facteurs humoraux, les cellules endothéliales participent activement aux réponses immunitaires²⁶⁴. Les cellules HUVEC sont cultivées dans un milieu spécifique aux cellules endothéliales, «*endothelial cells growth medium MV (PromoCell® , France)*», supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau «*SupplementMix/endothelial cells growth medium MV (PromoCell® , France)*».

Les cellules HPASMC (PromoCell®, C-12521) ou *Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells* sont des cultures primaires de cellules musculaires lisses dérivées de la *tunica media* et de l'*intima* d'artères pulmonaires humaines saines. Elles ont été cryo-conservées après leur deuxième passage et peuvent être cultivées après dégel jusqu'au douzième doublement de population. Elles ont été cultivées dans un milieu spécifique, le *smooth muscle cell growth medium 2* (PromoCell®, C-22062,) additionné du *SupplementMix/smooth muscle cell growth medium 2* (PromoCell®, C-39267).

Les cellules L132 (ATCC CCL-5) sont issues d'une lignée de cellules embryonnaires humaines. Cette lignée a été créée par Davis et Bolin en 1959²⁶⁵. Ces cellules seront utilisées dans les différents tests biologiques, elles ont les caractéristiques des lignées cellulaires immortalisées et ont la particularité de former des colonies ou clones avec un coefficient de clonage optimal de 37 à 40%.

Les cellules NIH3T3 sont des lignées cellulaires de cellules fibroblastiques embryonnaires de souris²⁶⁶. Elles présentent une inhibition de contact et sont maintenues en vie par des repiquages réguliers.

Les cellules épithéliales (L132) et fibroblastiques (NIH3T3) sont cultivées respectivement dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM, Gibco) et le D-MEM (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio).

Les milieux de culture contiennent de la fungizone (25 µg/mL, Gibco BRL) et de la gentamicine (50 µg/mL, Panpharma). Les cellules sont incubées à 37°C, 5% de CO₂ en atmosphère contrôlée (100% humidité relative) dans un incubateur (CB 150/APT line/Binder).

1.5.2. La vitalité cellulaire

Ce test consiste à quantifier la vitalité des cellules ayant proliféré sur le support par dosage fluorométrique. Le réactif Bleu Alamar (Interchim) incorpore un indicateur de croissance colorimétrique et fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire. Le système comprend un indicateur de l'oxydation / réduction qui devient fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique du milieu de culture, cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes et l'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité cellulaire. De plus, ce test a la particularité de ne pas être destructif puisque le réactif ne présente aucune toxicité, ce qui permet entre autre de poursuivre la culture après l'expérience.

Les échantillons, sous forme de pastilles de 10 mm, ont été stérilisés dans l'alcool à 90% pendant 5 min puis séchés sous la hotte à flux laminaire (PSM).

Les cellules sontensemencées sur les échantillons placés au fond des boîtes à multi-puits Costar (48 puits) à la densité de 4000 cellules/puits pour les cellules endothéliales (HUVEC), 6000 pour les cellules musculaires lisses (HPASMC), 3000 pour les cellules épithéliales L132 (ATCC CCL-5) et 8000 pour les cellules fibroblastiques (NIH3T3). Un anneau en caoutchouc (Viton®) biocompatible est placé sur l'échantillon afin de le maintenir au fond du puits.

A la fin des périodes d'incubation des cellules (3 et 6 jours), le milieu est prélevé, 500 μ L de milieu de culture à 10% en volume de Bleu Alamar sont ajoutés dans les puits. La boîte est placée dans l'incubateur à 37°C pendant 3 heures.

Après réaction, 200 μ L du mélange milieu de culture / Bleu Alamar sont récupérés et transférés dans une boîte NUNC 96 puits à fond noir. Les mesures de la fluorescence à 560 nm sont effectuées à l'aide d'un fluorimètre (Twinkle LB 97, Berthold).

La vitalité relative est exprimée en pourcentage \pm écart type de la culture témoin. Trois expériences séparées seront effectuées sur trois échantillons pour chaque période d'exposition.

1.6. Test d'adhésion plaquettaire

Le but de ce test est de déterminer l'hémocompatibilité des textiles modifiés par un test de quantification de l'adhésion des plaquettes sur la surface du textile. L'adhésion plaquettaire étant une marque de thrombogénicité des biomatériaux implantables. Le test est réalisé selon la norme ISO 10993-4.

Le sang total est prélevé dans des tubes citratés sur des donneurs sains et volontaires ne recevant ni anticoagulant ni antiagrégant plaquettaire. Il est ensuite centrifugé à 1000 tr/min pendant 15 minutes pour recueillir le Plasma Riche en Plaquettes (PRP). Ce plasma est placé en dans une colonne de chromatographie de séparation (gel = Sepharose 2B; Milieu tampon = PSB (*plaquette suspending Buffer*)), pour récupérer les plaquettes du plasma²⁶⁷.

Les plaquettes, une fois séparées sont comptées et déposées sur les tissus à analyser. Les échantillons en PET modifié ou non ont été placés dans des plaques 24 puits (Nunc, Polylabo, France). Des anneaux Viton® en caoutchouc servaient à maintenir les disques au fond de ces puits et à limiter le contact des plaquettes aux seuls échantillons, sans contact avec le TCPS.

Quatre échantillons de chaque groupe ont étéensemencés avec 200 μL d'un concentré plaquettaire à $5 \cdot 10^7$ plaquettes par mL. Après 30 min d'incubation à 37°C sans agitation, le surnageant a été aspiré et le puits rincé 6 fois avec du PBS. 100 μL respectivement de TPS et de Triton-PBS à 1,5% ont ensuite été ajoutés afin de détacher les plaquettes adhérentes sur les supports. Au bout d'une heure à 37°C, on ajoute du Triton à 2% (dans du PBS) qui provoque une lyse des plaquettes et libère de LDH (Lactico déshydrogénase). L'indicateur colorimétrique de la LDH est ensuite ajouté (100 μL dans chaque puits) et la plaque remise à incuber pendant 20 min à 37°C à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 μL d'HCl 1N. 175 μL de cette nouvelle solution sont prélevés pour chaque échantillon et transférés dans la plaque 96-puits. La LDH est dosée par un kit de coloration et les puits sont placés dans un spectrophotomètre permettant de mesurer la densité optique à 490 nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des plaquettes prélevées. Les plaquettes ont été diluées pour arriver à une concentration de $5 \cdot 10^7$ plaquettes/mL. 1 mL de solution a été placé dans les premiers puits et des dilutions par 2 sont ensuite réalisées dans les puits

suivants. Afin de déterminer la courbe d'étalonnage, 7 dilutions ont été réalisées et la densité optique a été mesurée comme précédemment. Cette courbe obéit à la loi de Beer Lambert qui permet de passer de la densité optique à la concentration en plaquette.

2. L'immobilisation des molécules bioactives

2.1. Produits : les molécules bioactives

L'héparine utilisée lors de l'étude est de l'Héparine Choay à 5000 U.I/mL provenant des Laboratoires Sanofi Aventis sous forme d'ampoules de 1 mL. La forme utilisée est l'Héparine sodique.

Le lysozyme, a été choisi pour créer un support anti-bactérien. Les textiles ont été fonctionnalisés par le lysozyme de blanc d'œuf de poule commercialisé par Sigma Aldrich (n° CAS : 12650-88-3).

La gentamicine est un antibiotique utilisé sous forme de solution injectable de concentration 40 mg / mL provenant des Laboratoires Panpharma, sous forme d'ampoules de 2 mL. La forme utilisée est le sulfate de gentamicine.

2.2. Méthodes : les procédés d'immobilisation des molécules bioactives

L'immobilisation des principes actifs sur le textile greffé à été réalisée selon deux modes opératoires : La voie 1 direct et la voie 2 avec un 'spacer'. Les étapes de l'immobilisation des molécules bioactives sont résumées sur la *Figure 40* :

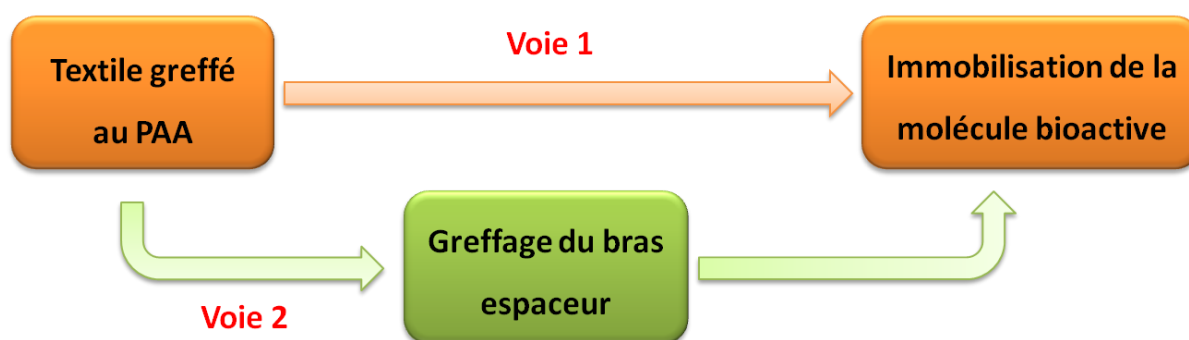


Figure 40 : Les deux voies de l'immobilisation des molécules bioactives sur le textile greffé au PAA

2.2.1. Procédé d'immobilisation des molécules bioactives par voie 1 : directe

Afin d'immobiliser les molécules bioactives par liaison covalente, l'utilisation d'EDAC (chlorhydrate de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) est nécessaire

(Figure 41). Il s'agit d'un carbodiimide utilisé pour activer les fonctions acides carboxyliques obtenues suite au greffage du PAA sur le textile.

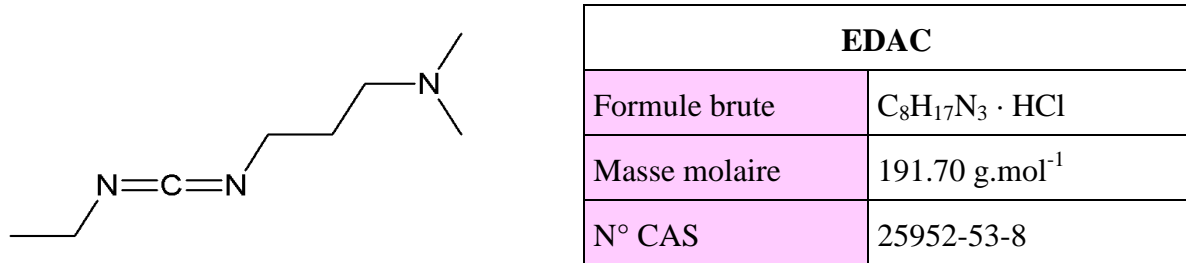


Figure 41 : Formule chimique de l'EDAC

La fixation des molécules bioactives telles que le lysozyme, la gentamicine, l'héparine s'effectue sur les fonctions COOH du textile greffé par le PAA à l'aide de l'EDAC. Cette fixation se réalise par formation d'une liaison amide ou ester, résultat de la réaction entre la fonction acide avec la fonction amine $-NH_2$ du lysozyme ou gentamicine ou avec la fonction hydroxyle $-OH$ de l'héparine (Figure 42).

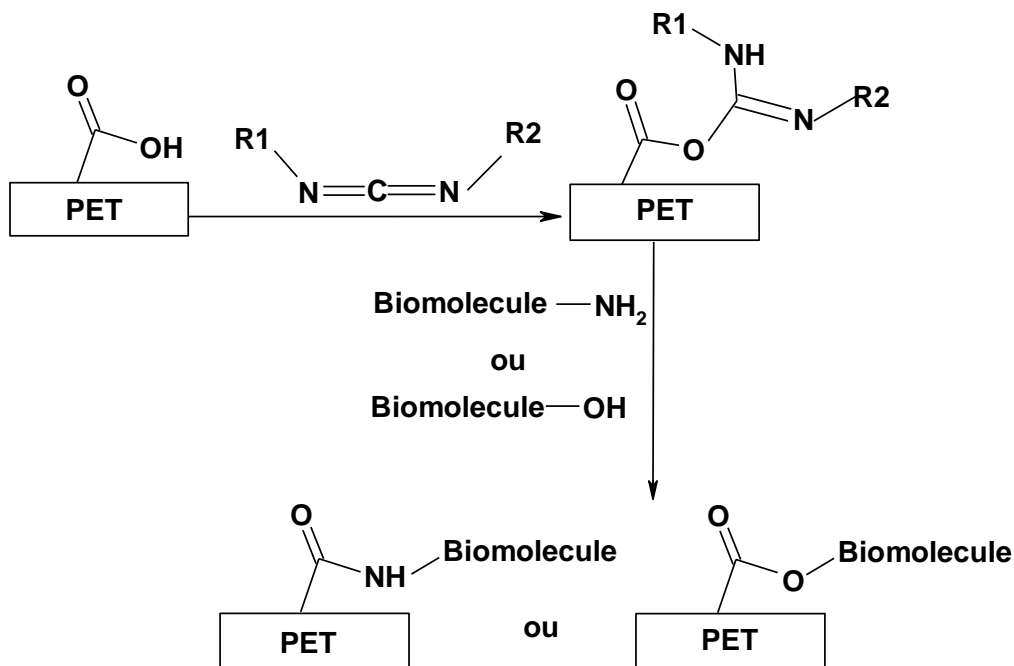


Figure 42 : Mécanismes de la fixation d'une molécule bioactive par activation avec un carbodiimide

Une solution d'EDAC (1 g/L) dans une solution tampon de citrate de sodium (22 g/L) à $pH = 4,7$ a été tout d'abord préparée. Les échantillons sont immergés dans la solution à

4°C pendant 2 heures. Après imprégnation, les échantillons sont lavés deux fois successivement dans le citrate de sodium (1 échantillon / 5 mL) pendant 10 min sous agitation. Ces lavages permettent d'enlever l'EDAC n'ayant pas réagi avec les fonctions COOH. Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution contenant la molécule bioactive :

- **Héparine** : les échantillons sont imprégnés dans la solution d'héparine prête à l'emploi avec un rapport de bain de 1 échantillon / 3 mL. La réaction est réalisée à 4°C pendant 24 heures, les échantillons sont ensuite lavés deux fois pendant 10 min dans une solution de PBS (tampon phosphate salin) (1 échantillon / 5 mL).
- **Gentamicine** : les échantillons sont imprégnés dans la solution de gentamicine (40 mg / mL) à pH = 5,1 ajustée par une solution d'acétate de sodium (1 M). Le rapport de bain est de 1 échantillon / 1 mL et la réaction est réalisée à 4°C pendant 24 heures. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois pendant 10 min dans une solution de PBS (tampon phosphate salin) (1 échantillon / 5 mL).
- **Lysozyme** : les échantillons sont imprégnés dans une solution du lysozyme recomposé dans le NaCl (0,9%) filtrée à une concentration de 50 g/L avec un rapport de bain de 1 échantillon / 3 mL. La réaction est réalisée à 4°C pendant 24 heures, les échantillons sont ensuite lavés deux fois pendant 10 min dans une solution de NaCl (0,9%) filtrée (1 échantillon / 5 mL).

Tous les échantillons sont séchés à 37°C pendant une nuit et conservés à 4°C.

2.2.2. Procédé d'immobilisation des peptides voie 2 : via « spacer »

Une autre méthode d'immobilisation du lysozyme a été testée en fixant une molécule espaceur entre le PAA greffé et la molécule bioactive. L'idée est de fixer le O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylène glycol-block-polyéthylène glycol-block-polypropylène glycol noté (bNH₂PEG) (*Figure 43*) sur les textiles greffés avec le PAA (PET-PAA). Le (bNH₂PEG) utilisé provient de Sigma Aldrich et a les caractéristiques suivantes :

O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol	
Formule brute	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_l(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m[\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]_n\text{NH}_2$
Masse molaire	$M_r \sim 600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
N° CAS	65605-36-9

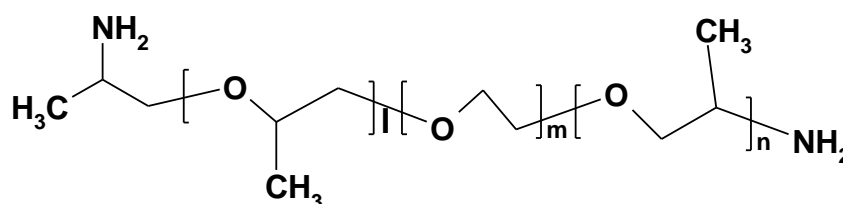
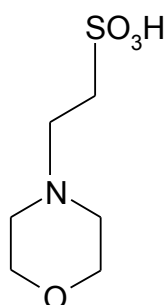


Figure 43 : Formule chimique et caractéristiques du $b\text{NH}_2\text{PEG}$

Le procédé d'immobilisation du lysozyme par la 'voie 2' comporte deux grandes étapes :

- **1ère étape : Greffer le bras espaceur ($b\text{NH}_2\text{PEG}$)**

L'EDAC a tout d'abord été dissout (14 g/L) dans une solution tampon (pH = 5) d'acide 4-Morpholineethanesulfonique (MES) (*Figure 44*).



MES	
Formule brute	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$
Masse molaire	$195.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
N° CAS	4432-31-9

Figure 44 : Formule chimique et caractéristiques du MES

Chaque échantillon a ensuite été imprégné dans 1 mL de la solution d'EDAC à 4°C. Après 1 heure de réaction, 4 mL de la solution de ($b\text{NH}_2\text{PEG}$) à 0,1 M ont été ajoutées pour chaque échantillon, puis tous les échantillons ont été conservés à 4°C pendant 24 heures.

Les échantillons sont finalement rincés par un traitement ultrason à l'eau distillée trois fois pendant 5 min successivement (1 échantillon / 5 mL d'eau). Le greffage du bNH₂PEG sur les surfaces des textiles greffés par le PAA permet d'introduire au support des fonctions amines (*Figure 45*) :

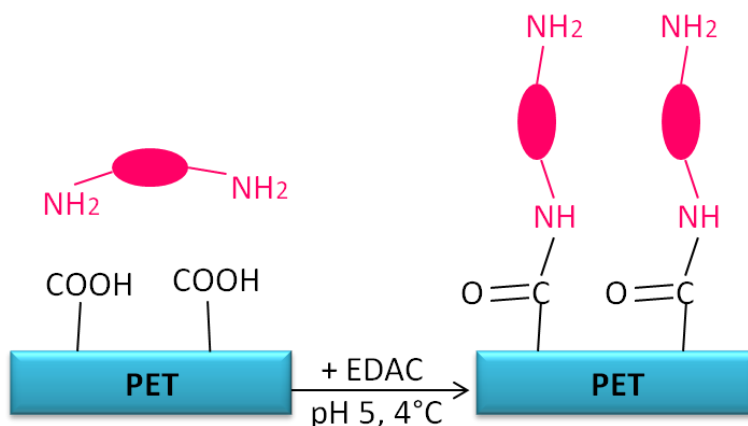


Figure 45 : Immobilisation du bras espaceur le bNH₂PEG sur le textile en PET greffé par l'acide polyacrylique

- **2ème étape : Immobiliser le peptide**

Le peptide (lysozyme) a ensuite été dissout ($3.5 \cdot 10^{-2}$ M) dans une solution de MES à pH = 5. L'EDAC a été dissout dans cette même solution à une concentration de 10 g/L. Chaque échantillon (greffé bNH₂PEG) a été imprégné dans 1 mL de cette dernière solution pendant 24 heures à 4°C. Les échantillons ont été lavés 3 fois successives à l'eau distillée à température ambiante pendant 5 min puis séchés à 37°C pendant une nuit. Les différentes fonctions rentrant au mécanisme réactionnel sont présentés sur la *Figure 46*.

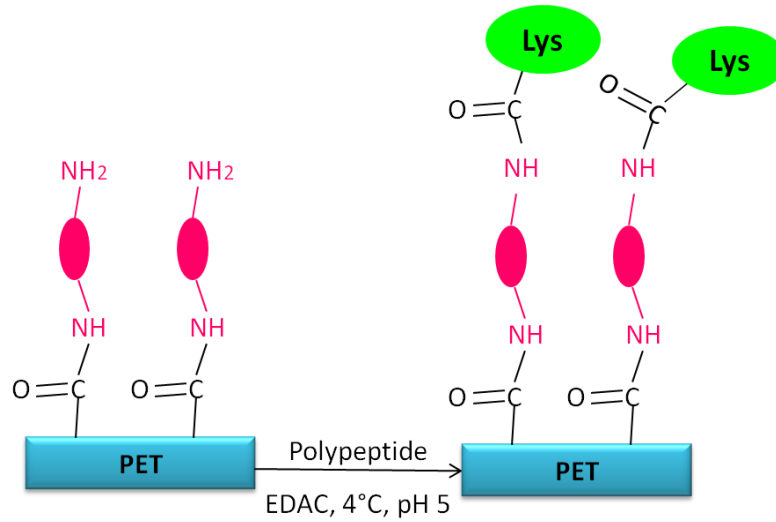


Figure 46 : Immobilisation du lysozyme via le bras espaceur le bNH₂PEG

2.2.3. Bilan

L'immobilisation du lysozyme a été réalisée selon deux concepts (voir Figure 47):

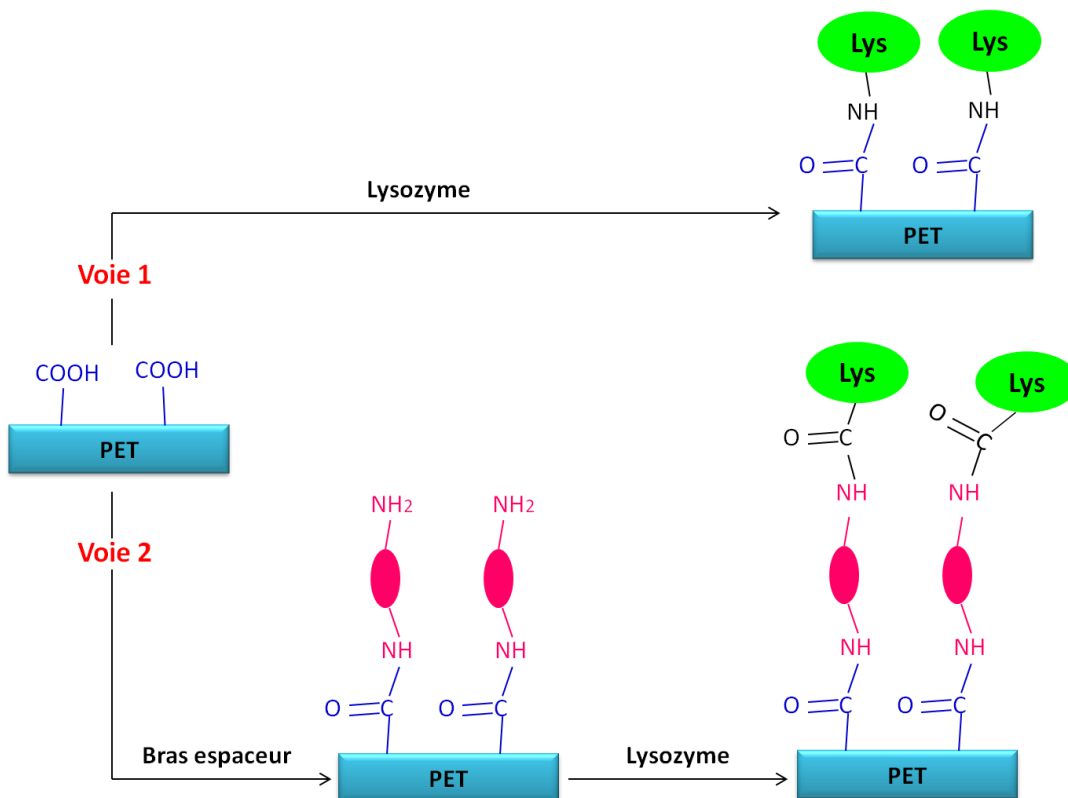


Figure 47 : Schéma résumant les deux concepts d'immobilisation du lysozyme sur le PET greffé au PAA ; 'voie 1' direct et 'voie 2' avec bras espaceur

2.3. Caractérisations des surfaces modifiées

2.3.1. Dosage des fonctions amines primaires

Pour déterminer le nombre d'amines primaires greffées à la surface des textiles, un dosage par le 4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo) benzenesulfonate de sodium ou Acide Orange 7 a été effectué. Ses caractéristiques sont présentées sur la *Figure 48* :

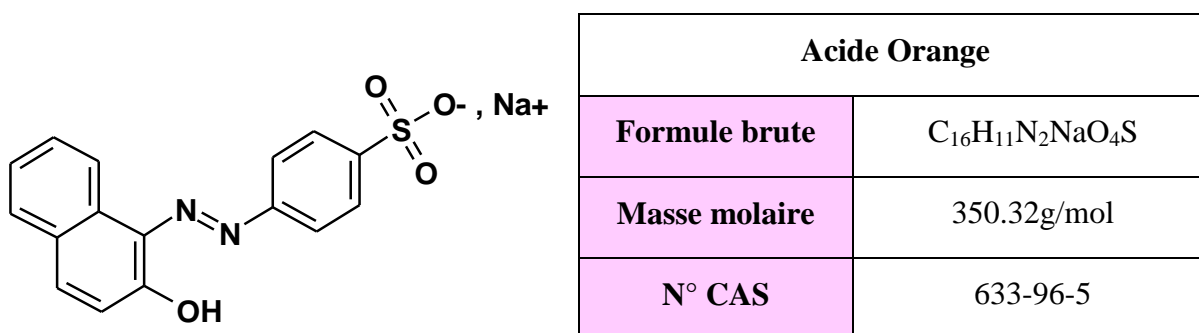


Figure 48 : Formule chimique de l'Acide Orange 7

Le principe du dosage par l'Acide Orange (AO) est très ressemblant au dosage TBO. Les échantillons sont plongés dans 10 mL d'une solution d'AO à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M (pH = 3) en agitation pendant une nuit à 25°C et à l'abri de la lumière. L'acide orange complexe avec les fonctions amines greffées à la surface du PET. Les échantillons sont ensuite rincés dans l'eau pH = 3 afin d'enlever toute molécule d'AO non complexée puis sont déposés dans 5 mL d'eau tamponnée pH = 12 pendant une nuit sous agitation à 25°C à l'abri de la lumière afin de désorber l'AO complexé avec les fonctions amines. Le pH de chaque solution est ajusté à 3 à l'aide d'une solution de HCl (1M) et la mesure de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre UV à 485 nm. Le nombre de fonctions NH₂ greffées sur le PET peut être calculé grâce à la loi de Beer Lambert. Le coefficient d'extinction molaire est de $19,157 \cdot 10^3$ L mol⁻¹. cm⁻¹ avec le coefficient de corrélation $R^2 = 0,9999$.

Ce dosage est utilisé pour déterminer le nombre de fonctions amines primaires greffées à la surface du textile provenant du bNH₂PEG (PET-PAA-NPEG). Il sera également utilisé pour quantifier la fixation de la gentamicine sur nos textiles. Pour des raisons pratiques, le nombre de fonctions amines greffées à la surface des deux types de textiles est calculé en mol/g du textile.

2.3.2. Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge (IRTF) permet d'évaluer de façon qualitative la surface modifiée. Les différentes analyses IRTF ont été réalisées avec un spectromètre infrarouge PERKIN ELMER de modèle « *Spectrum one* ». Certaines analyses ont été faites par ATR (ou Réflexion Totale Atténuée) d'autres en transmission pour les textiles en PET. Les molécules bioactives (gentamicine, héparine et lysozyme) ont été caractérisées en utilisant un accessoire de dispersion et en formant des pastilles de KBr. Le balayage en nombre d'onde pour chacun des échantillons a été effectué entre 600 et 4000 cm^{-1} (4 scans).

2.3.3. Analyse Élémentaire (AE)

Cette analyse a été effectuée pour déterminer la quantité de molécules bioactives fixées sur les échantillons. Différents éléments tels que le carbone, l'oxygène, l'azote et le soufre présents sur nos textiles fonctionnalisés ont été dosés. Les analyses ont été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison (69390, France).

2.3.4. La spectrométrie photoélectronique X (XPS)

La spectrométrie photoélectronique X, ou spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (*X-Ray photoelectron spectroscopy, XPS*) est une méthode physique d'analyse élémentaire et chimique par des informations qualitatives ou semi-quantitatives de la composition atomique d'une surface jusqu'à une profondeur en général de 0,5-10 nm¹²⁷. L'analyseur XPS est de la marque AXIS ULTRA DLD – KRATOS ANALYTICAL, la source utilisée est une source monochromatique $\text{AlK}\alpha$ (à une énergie d'irradiation de 1486 eV). L'énergie de passage est de 40 eV région et 160 eV Survey. La compensation de charge est de 1,4 A (courant filament) - 2,6 V (tension filament)- 1,1V (bias). L'analyseur est en mode Hybrid et en « Slot » en ouverture²⁶⁸. Le vide est créé à 2.10^{-9} torr. Cette technique d'analyse a été utilisée pour déterminer si les différentes molécules bioactives ont bien été immobilisées à la surface des échantillons. Les analyses ont été réalisées par le Pôle Régional d'Analyse de Surface UCCS - UMR CNRS 8181 (59655, France). Test de coagulation

Ce test a été réalisé afin de déterminer l'activité anti-thrombotique des échantillons modifiés à l'héparine. Le sang est prélevé le même jour que le test sur des donneurs sains et

volontaires ne recevant pas d'anticoagulant. Les échantillons sous forme de disques de 11 mm sont placés dans des plaques à 12 puits. Après le dépôt de 40 µL de sang frais sur chaque échantillon, les plaques sont incubées à 37°C de 5 à 50 minutes.

Le processus de coagulation a été stoppé par l'ajout de 1 mL de PBS dans chaque puits. La plaque est mise sous agitation à 80 tr/min pendant 10 min, le PBS est ensuite collecté dans un tube à hémolyse et 4 mL d'eau ultra pure sont ajoutés. Les globules rouges non immobilisés dans le caillot sanguin se retrouvent dans le PBS. Les tubes sont congelés à -20°C pendant 30 min puis décongelés dans un bain-marie à 37°C pendant 10 min pour provoquer l'hémolyse des globules rouges²⁶⁹. La concentration de l'hémoglobine libérée est ensuite déterminée par la mesure de l'absorbance à 540 nm.

2.4. Evaluation microbiologique des surfaces

2.4.1. Les bactéries

Afin de valider et vérifier l'efficacité antibactérienne des textiles fonctionnalisés avec le lysozyme ou la gentamicine, différentes bactéries ont été utilisées dans nos tests.

Staphylococcus aureus est le plus pathogène, c'est un coque à Gram positif d'un diamètre de 1 µm apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il se cultive aussi bien en aérobie qu'en anaérobie en formant des colonies lisses, luisantes, bombées, plus ou moins pigmentées de jaune d'où son appellation. Les conditions idéales de culture sont de 37°C et un pH de 7,5. C'est un germe pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses, il surinfecte les plaies négligées. *Staphylococcus aureus* de la souche (CIP 224) a été utilisé pour cette étude.

Escherichia coli est une bactérie isolée en 1885 par *Theodor von Escherich* et couramment appelée "colibacille", elle est de la famille des *Enterobacteriaceae* (Entérobactéries). Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif de 2 à 3 µm de long sur 0,6 µm de large. C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, et c'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. Sa présence ou celle d'espèces voisines (les coliformes) dans l'eau est un témoin de contamination fécale. La souche de la bactérie utilisée lors de cette étude est *Escherichia coli* Q28CL5.

2.4.2. Entretien des bactéries et préparation de l'inoculum

La culture des bactéries est réalisée sur une gélose Muller Hinton inclinée (PC65-OXOID). La gélose (Oxoid (PC66, France)) est préparée à l'avance : 38 grammes de poudre de gélose sont dissouts dans 1 litre d'eau distillée puis portés à ébullition jusqu'à dissolution complète. Le tout est stérilisé pendant 15 minutes à l'autoclave à 121°C. Le jour suivant, 10 mL de Ringer Cystéiné (RC) (PC19, Oxoid) sont ajoutés puis à l'aide d'une pipette Pasteur fermée, on décroche la totalité des colonies que l'on remet en suspension. Une dilution de 10 de cette suspension est réalisée pour obtenir l'inoculum bactérien. Afin de déterminer la charge bactérienne de l'inoculum préparé, on procède à 7 dilutions décimales successives puis 0,1 mL de chacune des dilutions est étalée sur une gélose MHA qui forme une couche de 2-3 mm dans une boîte de Pétri (de 90 mm de diamètre). Une lecture de ce dénombrement est réalisée le jour suivant afin de déterminer la charge bactérienne.

2.4.3. La mesure de la CMI

Comme nous l'avons déjà vu dans l'étude bibliographique, le lysozyme est un peptide antibactérien, il est donc nécessaire de déterminer à partir de quelle concentration il peut inhiber la croissance d'une souche bactérienne : la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Nous avons choisi pour ce test *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, car la CMI d'un principe actif est propre à chaque souche. Les CMI ont été déterminées à partir d'une solution du lysozyme de 1 mg / mL préparée dans le milieu de culture.

La CMI est déterminée par dilutions successives par deux des solutions précédemment préparées, puis par ensemencement des dilutions par une suspension à 10^4 unités formant colonies (ufc) / mL de la souche à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, la CMI est déterminée par observation du trouble du milieu de culture lié au développement bactérien, et par comparaison à un témoin de culture positif et un témoin négatif. La concentration minimale inhibitrice correspond donc au premier puits de la série croissante de dilution par lequel on observe une absence du trouble.

La CMI a été également réalisée pour la gentamicine sur la bactérie *Escherichia coli*.

2.4.4. Tests d'adhésion bactérienne

Le test d'adhésion bactérienne permet de quantifier le nombre de bactéries adhérant sur un support pendant une durée donnée. Les tests d'adhésion bactérienne ont été réalisés selon deux Normes (Japonaise et Française). Nous pouvons résumer les deux tests d'adhésion bactérienne en deux étapes présentés dans la *Figure 49*:

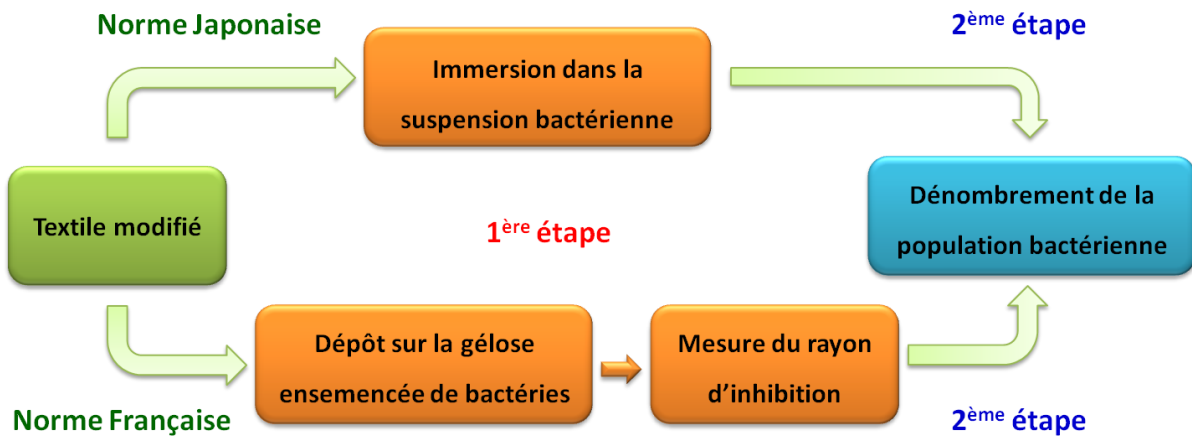


Figure 49 : Schéma représentatif des deux étapes des tests d'adhésion bactérienne (1) selon la Norme Japonaise et (2) selon la Norme Française.

2.4.4.1. 1^{ère} étape : la mise en contact avec les bactéries

2.4.4.1.1. Selon la Norme Japonaise (méthode par immersion)

Le test d'adhésion bactérienne consiste à déterminer la quantité de bactéries adhérant sur un support afin d'en évaluer son activité.

Les échantillons de 6 ou 11 mm de diamètre sont placés dans une plaque à 24 puits où l'on dépose 2 mL d'une suspension bactérienne à 10^4 bactéries / mL (*Staphylococcus aureus*). La plaque est ensuite incubée à 37°C sous atmosphère humide relative de 100% pendant 1 heure ou 48 heures selon l'étude. A l'issue de cette incubation, les échantillons sont récupérés pour la deuxième étape : le dénombrement des bactéries.

2.4.4.1.2. Selon la Norme Française (méthode par dépôt)

Ce test selon la Norme Française permet non seulement de déterminer le nombre de bactéries adhérant sur la surface mais aussi de mesurer le rayon d'inhibition bactérienne.

Le jour de la manipulation, 0,1 mL de la suspension bactérienne à 10^5 bactéries/mL est étalé sur la gélose de chaque boîte de Pétri. Les échantillons de 11 mm de diamètre sont ensuite déposés sur la gélose (trois pastilles de la même série par boîte).

Après 24 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère humide relative de 100%, le rayon d'inhibition autour de la pastille (*Figure 50*) est mesuré et comparé à un échantillon de référence (textile vierge et imprégné du même principe actif). Ensuite, les échantillons sont récupérés pour la deuxième étape: le dénombrement des bactéries.

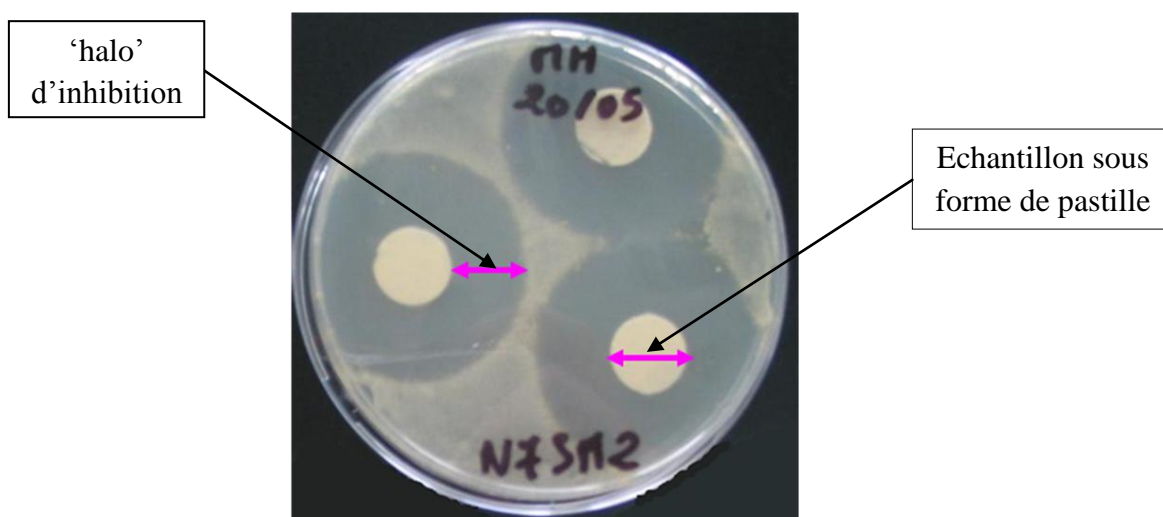


Figure 50 : Détermination du rayon d'inhibition du principe actif sur les échantillons fonctionnalisés

2.4.4.2. 2^{ème} étape : le dénombrement des bactéries

Les échantillons sont rincés 1 fois dans 5 mL d'une solution de PBS stérile pendant 10 min sans agitation. L'échantillon est ensuite déposé dans un tube contenant 10 mL de PBS, celui-ci est passé aux ultrasons (45 kHz) durant une minute puis au Vortex durant 30 secondes, le tout à température ambiante. Une suspension bactérienne est alors obtenue. A partir de cette suspension, 4 dilutions décimales successives sont réalisées. 0,1 mL de chaque suspension bactérienne est déposé sur une boîte de Pétri contenant la gélose. Pour chaque échantillon, 5 géloses ont été donc réalisées. Les boîtes sont ensuite incubées durant 24 heures

à 37°C sous une atmosphère relative de 100%. Trois expériences seront effectuées pour chaque série d'échantillons.

Afin de déterminer le nombre de bactéries ayant adhéré à l'échantillon, on détermine le nombre d'unités formant colonies (UFC) par millilitre de solution mère, représentative de la population bactérienne sur l'échantillon. Les colonies sont comptées sur chacune des boîtes. On calcule le nombre d'unités formant colonies par millilitre de suspension mère à partir de la boîte où l'on trouve entre 15 et 150 colonies, selon la formule suivante :

$$N = n \times 10 \times 10^d$$

Avec :

- **N** : le nombre d'unités formant colonies par mL de solution mère (UFC / mL)
- **n** : le nombre de colonies complétées sur la boîte la plus interprétable
- **d** : la dilution à laquelle les colonies sont comptées, en valeur absolue
- **x 10** : on multiplie une première fois par 10 car lors de l'ensemencement, on dépose 0,1 mL de suspension bactérienne que l'on doit ramener au mL pour exprimer le résultat en UFC / mL.

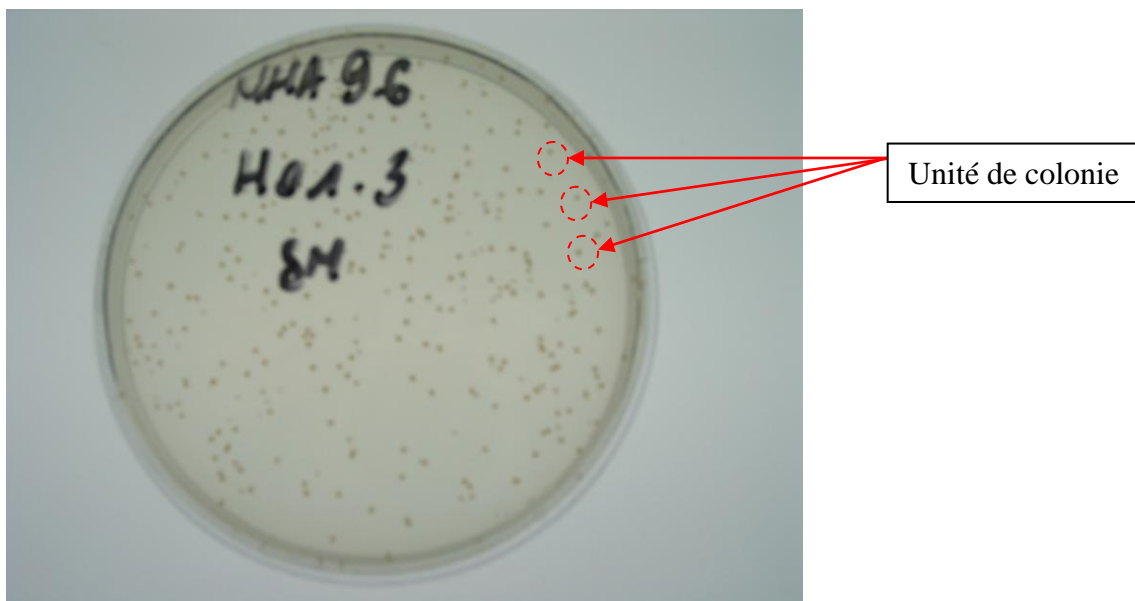


Figure 51 : Une boîte de gélose ensemencée de bactérie *Staphylococcus aureus* et incubée pendant 24 heures à 37°C

La réduction bactérienne R% est calculée selon la formule suivante^{270,271} :

$$R (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Avec : A = le nombre d'unités formant colonies sur le textile vierge

B = le nombre d'unités formant colonies sur le textile fonctionnalisé

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

III. TROISIEME PARTIE: RESULTATS

1. Greffage de l'acide polyacrylique

1.1. Le traitement par plasma froid

L'optimisation du greffage du PAA a commencé par l'étude des paramètres appliqués lors du traitement par plasma froid:

- La nature des gaz utilisés et leurs proportions
- Le temps d'activation
- Le temps d'attente avant l'étape de greffage

1.1.1. Composition des gaz dans le plasma

Lors de cette étude, les proportions optimales des gaz argon et oxygène utilisés ont été recherchées. Dans cette partie, toutes les études ont été réalisées sur le textile non tissé.

Les textiles ont été traités par plasma froid pendant 120 secondes à 300 Watts en utilisant sept proportions de gaz (Ar/O₂) de 0%/100% à 90%/10% (*Tableau 3*). Nous nous sommes limités à des proportions où l'Argon est majoritaire car au-delà de 50% d'oxygène, une dégradation du non tissé sera observée. Néanmoins, une proportion de gaz argon / oxygène : 0 % / 100% a été appliquée comme référence pour étudier les effets du plasma sur le textile en présence d'oxygène pur.

Tableau 3 : Les différentes proportions d'argon et d'oxygène utilisées

Proportion	1	2	3	4	5	6	7
Argon (Ar)	0%	50%	60%	70%	80%	85%	90%
Oxygène (O ₂)	100%	50%	40%	30%	20%	15%	10%

Pour chaque proportion de gaz (Ar/O₂) deux séries ont été étudiées :

- **1^{ère} série** : les textiles non tissés activés seulement par plasma froid PF (120 s, 300 Watts) notés 'PET-PF'
- **2^{ème} série** : les textiles non tissés activés par plasma froid (120 s, 300 watts) puis greffés par le PAA par le procédé dit 'en solution' et selon les paramètres préfixés (2,5 M; 80 °C; 4 h). Les échantillons sont notés 'PET-PAA(2,5M)'.

Un non tissé vierge a été ajouté comme témoin pour les deux séries (T).

1.1.1.1. Influence des proportions des gaz sur les propriétés mécaniques

La *Figure 52 a)* et *b)* présentent respectivement la contrainte et la déformation à la rupture des textiles avant et après greffage. Les courbes déformation-contrainte sont présentées en *ANNEXE 1* et *ANNEXE 2*.

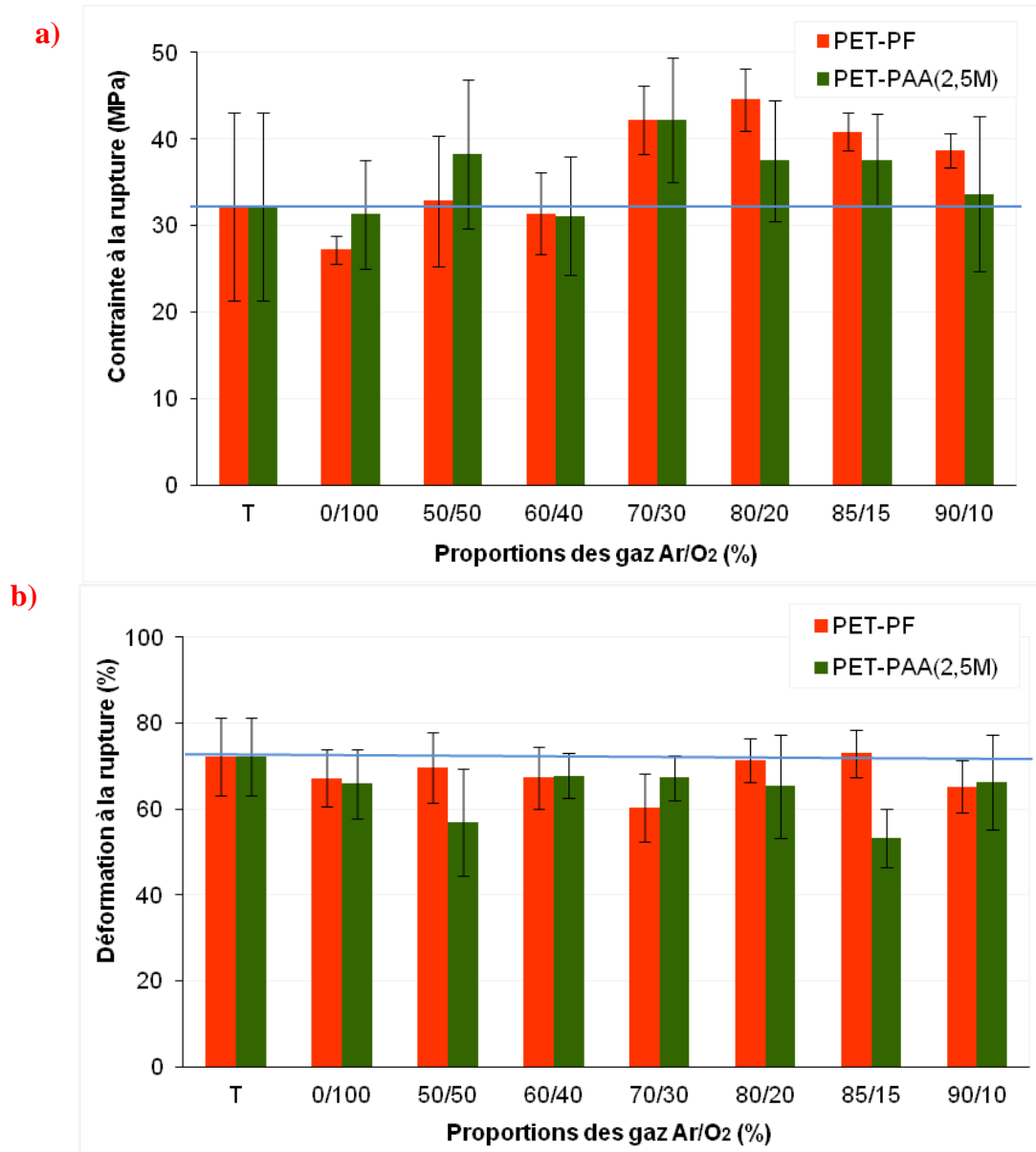


Figure 52 : Effet de la proportion des gaz Ar/O₂ sur (a) la contrainte à la rupture et (b) la déformation à la rupture des textiles non tissés avant greffage (PET-PF) et après greffage du PAA à (2,5 M; 80°C; 4 H) (PET-PAA(2,5M))

La Figure 52 a) montre une amélioration de la contrainte à la rupture à partir de 70% d'argon pour les deux séries d'échantillons : le PET-PF et le PET-PAA(2,5M) et notamment pour une proportion de gaz de 80/20 pour le PET-PF. Pour la série PET-PAA(2,5M), la contrainte à la rupture se trouve améliorée à partir d'une proportion d'oxygène inférieure à 30%. Cette amélioration des propriétés mécaniques peut être expliquée par la réticulation des chaînes polymères du textile favorisée par l'argon.

D'autre part, si nous comparons les textiles vierges (T) et ceux ayant subi le traitement plasma O₂ pur (0/100), nous constatons que ces derniers possèdent la plus faible contrainte à la rupture (27 MPa) révélant la dégradation du textile par l'ablation des chaînes polymères favorisée par la forte présence de l'O₂. Nous remarquons également que le textile non tissé présente des propriétés mécaniques qui diminuent quand la proportion d'oxygène augmente.

Dans la *Figure 52 b*), nous remarquons, pour les différents traitements de surface (PF et PAA) et par comparaison au textile vierge (T), une tendance à la diminution de la déformation à la rupture des textiles avant et après greffage du PAA. Par ailleurs, en considérant des écarts types, nous pouvons conclure que les différents traitements de surface (PF et PAA) n'ont pas d'influence significative sur la déformation à la rupture des échantillons.

Les essais mécaniques permettent de conclure que lorsque les textiles sont activés par plasma froid et greffés ou non avec le PAA, la contrainte à la rupture se trouve améliorée pour une proportion d'oxygène inférieure à 40% tandis que la déformation à la rupture de son côté reste quelle que soit la composition des gaz non affectée par les modifications de surface (traitement par plasma froid et greffage du PAA).

Selon les résultats précédents, les textiles non tissés seront activés par PF sous une atmosphère composée de 30% d'oxygène au maximum.

1.1.1.2. Influence des proportions des gaz sur le taux de greffage

L'influence de la composition des gaz au sein de l'enceinte plasma sur le taux de greffage du PAA a été mesurée par dosage de fonctions -COOH par le TBO.

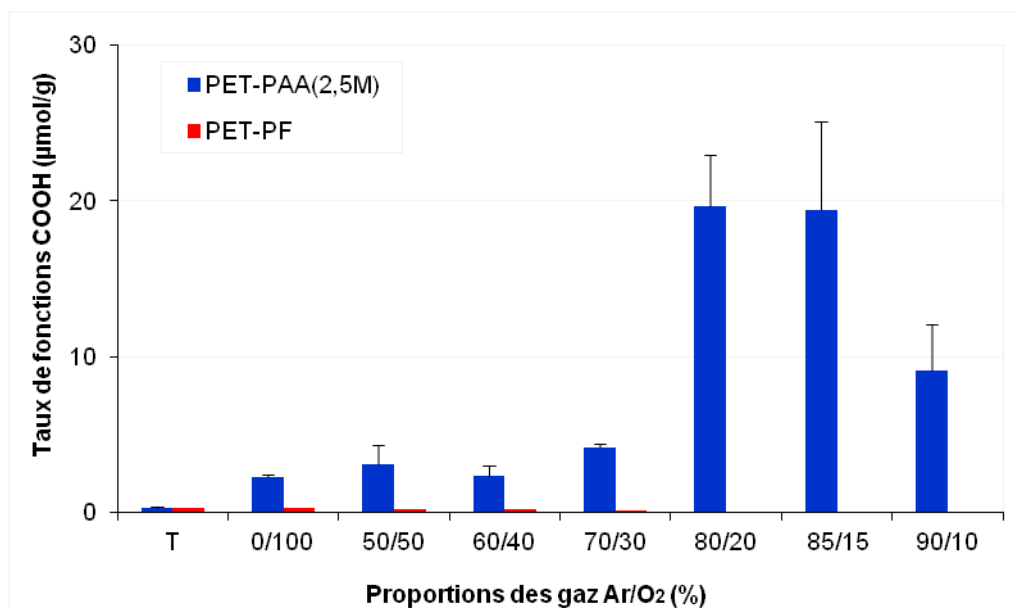


Figure 53 : Etude de l'influence des proportions Ar/O₂ appliquées lors du traitement plasma froid sur le greffage de l'acide polyacrylique suivi par dosage TBO, sur support PET (PET-PF) et PET greffé par l'acide acrylique à [AA] = 2.5 M (PET-PAA(2.5M))

Dans le cas des non tissés activés (PET-PF), la *Figure 53* montre que la quantité de fonctions COOH produite par traitement PF seul reste négligeable (inférieure à 1 µmol/g) pour toutes les proportions de gaz (Ar/O₂).

La *Figure 53* montre que lorsque la part d'oxygène est supérieure ou égale à 30%, la densité de fonctions COOH dosée est inférieure à 5 µmol/g. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en augmentant le pourcentage d'oxygène (supérieur à 30%) la surface subit plutôt une oxydation et que le phénomène d'ablation est favorisé. Avec une proportion d'oxygène inférieure ou égale à 20%, la densité de fonctions COOH est multipliée par 4. Malgré les écarts types relativement élevés, les proportions 80/20 et 85/15 sont les plus favorables pour le greffage de l'acide polyacrylique. L'augmentation de la proportion d'argon a donc favorisé la création de radicaux permettant davantage le greffage de l'acide acrylique.

Pour la proportion 90/10, la densité de fonctions COOH est divisée par 2 comparée aux proportions 80/20 et 85/15. Ce phénomène peut s'expliquer par la faible proportion d'oxygène et donc la faible création de fonctions oxydées sur le textile. Ceci induit une faible proportion de fonctions peroxydes et hydroperoxydes nécessaires au greffage du PAA sur le non tissé.

Cette étude nous permet de fixer un pourcentage optimal d'oxygène compris entre 20% et 15% pour le greffage de l'acide polyacrylique.

1.1.1.3. Caractérisation par ATG

L'analyse thermogravimétrique a été réalisée pour les textiles non tissés série 1 (PET-PF) et série 2 (PET-PAA(2,5M)). La *Figure 54* présente les thermogrammes de la série 2 : PET-PAA(2.5M). Notant que ces analyses ont été réalisées pour un seul échantillon de chaque textile modifié (n=1).

La *Figure 54* montre que la dégradation du polymère d'acide acrylique seul (PAA) commence à 225°C et que celle du PET vierge commence à 410°C. Les deux températures de dégradation sont donc suffisamment décalées pour pouvoir être distinguées, ce qui permet de détecter la présence du PAA sur le non tissé greffé grâce aux paliers observables sur les thermogrammes entre 200 et 400°C.

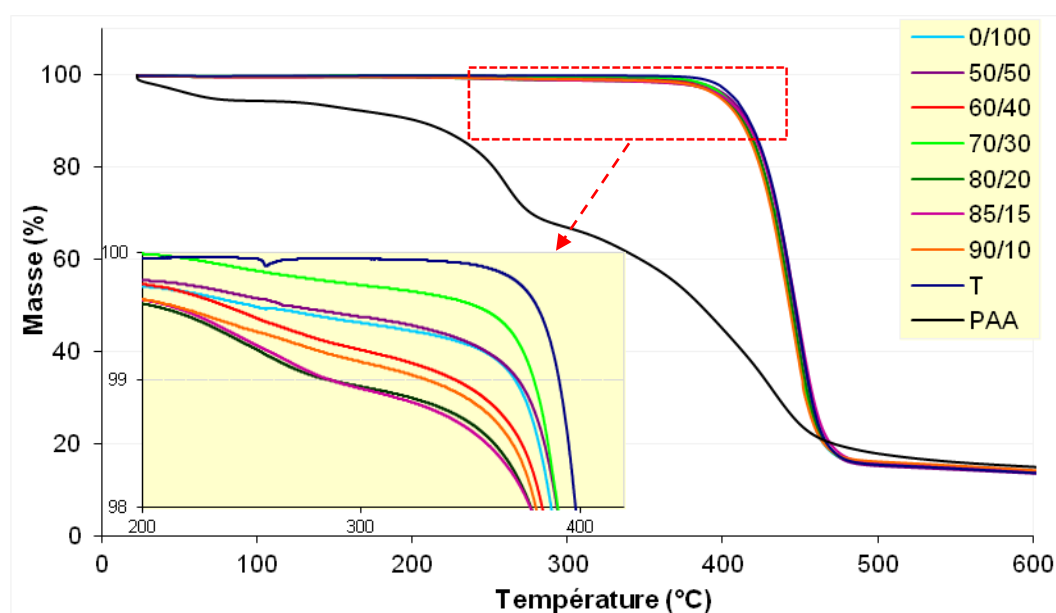


Figure 54 : Thermogrammes des non tissés traités PF à différentes proportions de gaz et greffés par l'acide acrylique à $[AA] = 2.5 M$ (PET-PAA(2.5M))

L'agrandissement de la *Figure 54* montre une légèredifférence entre les différents non tissés greffés en fonction de la proportion des gaz utilisés. Pour chacune des proportions, même si le phénomène reste assez peu visible (de l'ordre de 1% en masse de PAA), deux

étapes ont été observées dans la dégradation. D'abord, la dégradation du PAA greffé sur le textile (vers 280°C) puis l'étape de dégradation du PET qui commence un peu avant 410°C.

D'autre part, pour chacun des échantillons les pertes de masse à 280°C ont été déterminées graphiquement. La méthode est basée sur le tracé des deux tangentes du diagramme correspondant au début et la fin de la dégradation de chaque échantillon. L'intersection de la perpendiculaire des deux tangentes correspond à la perte de masse de l'échantillon. La différence entre la perte de masse du textile vierge (T) et celle du textile greffé PET-PAA(2,5M) a été calculée. La perte de masse retrouvée correspond, en effet, à la quantité du PAA greffé. Ce calcul a été réalisé pour tous les échantillons greffés PAA prétraités par les différentes proportions de gaz. Les résultats sont présentés dans la *Figure 55*.

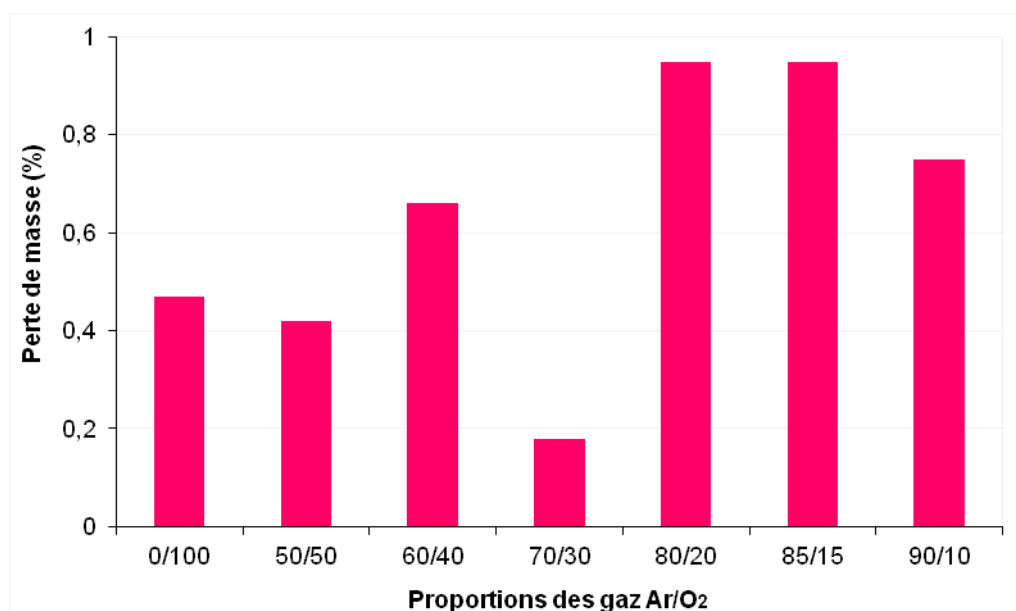


Figure 55 : Pertes de masse mesurée par ATG liées à la dégradation de l'acide polyacrylique greffés sur les non tissés traités PF à différentes proportions de gaz et greffés par l'acide acrylique à $[AA]=2.5 M$ (PET-PAA(2.5M))

Il est constaté que les pertes de masse en PAA les plus importantes sont observées pour les non tissés greffés en présence d'une atmosphère riche en argon (supérieure à 70%) notamment pour 85/15 et 80/20. Ce sont donc les échantillons les plus greffés comme cela a été montré par dosage TBO. Par contre, les résultats obtenus pour la proportion 70/30 devaient être supérieurs à ceux de la proportion 60/40 comme nous l'avions constaté avec le dosage TBO, or ici ce n'est pas le cas. La technique d'analyse par ATG, au vu des faibles quantités de perte de masse observée, à la faible quantité d'échantillon à analyser (6-8 mg) et

à l'hétérogénéité du greffage à cette échelle, ne semble pas être aussi précise que le dosage TBO surtout que les analyses ont été réalisées sur un seul échantillon par série. Pourtant la tendance reste la même avec des taux de greffage les plus importants pour des proportions de gaz de 80/20 et 85/15.

Ce test, malgré l'imprécision due au tracé graphique, confirme donc le précédent dosage. Néanmoins, la quantité de PAA greffé sur les échantillons reste très faible (de l'ordre de 1% en masse).

En considérant l'ensemble les résultats des trois techniques de caractérisation, l'activation des échantillons par plasma froid sera dès lors effectuée sous une atmosphère Ar/O₂ de composition 85/15.

1.1.2. Durée de l'activation par traitement plasma froid

Le temps d'activation du textile par plasma froid est l'un des paramètres importants dans le procédé. Les non tissés découpés sous forme de disques de 11 mm de diamètre sont traités par plasma froid (Ar/O₂, 85/15, 300 watts) pendant des temps variables : 5, 10, 15, 20, 40, 120, 240, 300 et 600 secondes. La *Figure 56* présente l'évolution de l'angle de contact en fonction du temps de traitement.

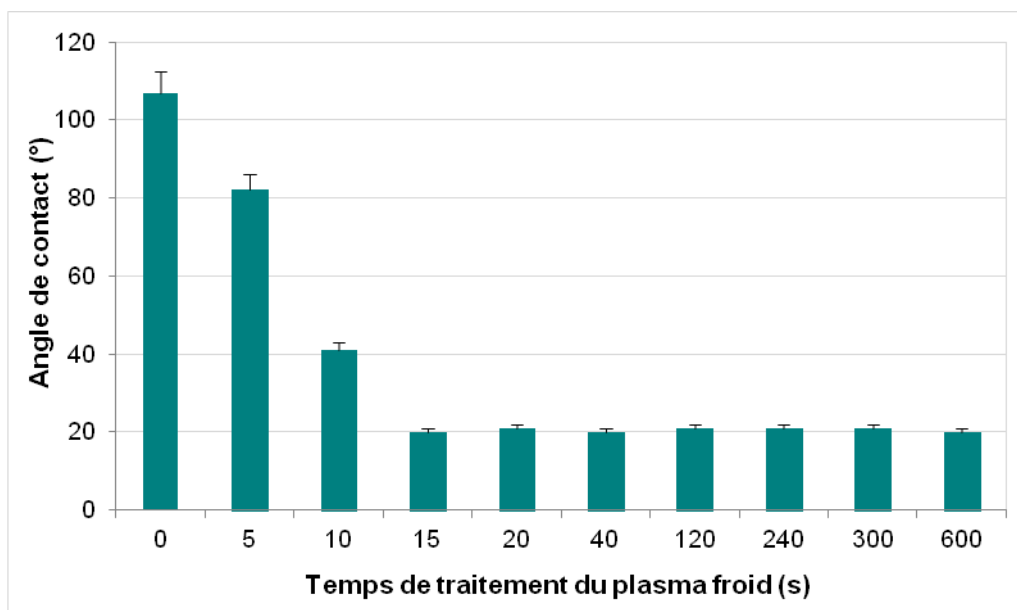


Figure 56 : Evolution de l'angle de contact de l'eau sur le non tissé en fonction du temps d'activation au plasma froid (Ar/O₂ (85/15))

La *Figure 56* montre que le traitement par plasma froid (Ar/O₂) diminue l'angle de contact à l'eau de 107°C à 20°C en moins de 15 secondes. L'hydrophilie du textile augmente donc en fonction de l'augmentation du temps du traitement. En effet, il faut traiter le textile suffisamment longtemps pour créer un maximum de radicaux, de fonctions hydroxyles, peroxydes et hydroperoxydes hydrophiles sur la surface. Au-delà de 15 secondes, l'angle de goutte reste inchangé. L'augmentation du caractère l'hydrophile de la surface est directement liée à l'augmentation du nombre de fonctions peroxydes et hydroperoxydes créées par traitement plasma (Ar/O₂).

Une durée de 120 s sera appliquée pour la suite des manipulations afin d'assurer un temps d'équilibre et une reproductibilité du traitement plasma froid ainsi que d'avoir un vieillissement moins rapide des textiles traités (résultat prouvé selon une étude antérieure au laboratoire).

Par ailleurs, nous avons tenté de quantifier ces fonctions peroxydes et hydroperoxydes créées par traitement plasma à l'aide d'un dosage au DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) dissout dans le toluène, selon la méthode de Suzuki *et al.*^{189,272}. Selon le protocole, les échantillons ont été immergés dans une solution de DPPH dans le benzène à 70°C, température nécessaire pour la décomposition des fonctions peroxydes et hydroperoxydes²⁷³. Le nombre de molécules de DPPH consommées va être mesuré par spectrophotométrie UV à 520 nm à partir de la différence d'absorption entre « la solution avec des échantillons non traités » et « la solution avec échantillons traités ». Ceci permettra, grâce à la loi de Beer Lambert, de calculer le nombre de molécules de DPPH consommées et donc le nombre de fonctions peroxydes produites par le traitement Plasma Froid. Une fonction peroxyde réagit avec deux radicaux de DPPH²⁷⁴.

Nous avons essayé plutôt le toluène et l'éthanol comme solvant du DPPH afin de remplacer le benzène qui est interdit selon le règlement intérieur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille 1. Malgré les multiples tentatives du dosage avec la variation de différents paramètres (tel que le solvant, la concentration de la solution et le temps d'imprégnation), les résultats obtenus ne sont pas reproductibles et exploitables.

Face à l'incohérence des résultats, nous avons mis en cause la trop faible quantité de fonctions peroxydes et hydroperoxydes introduites sur nos textiles par traitement plasma froid

ainsi que le montage nécessite des équipements plus adaptés au niveau de la mise sous vide et la propriété du matériel.

1.2. Greffage de l'acide polyacrylique par procédé dit 'en solution'

1.2.1. Etude préliminaire

Dans le cadre d'une étude préliminaire, différents protocoles de greffage ont été testés. Le textile non tissé a été greffé à l'aide de l'acide acrylique avec ou sans prétraitement plasma froid ; Ar/O₂ (85/15), 120 secondes, 300 watts. Les résultats sont présentés sur la *Figure 57*.

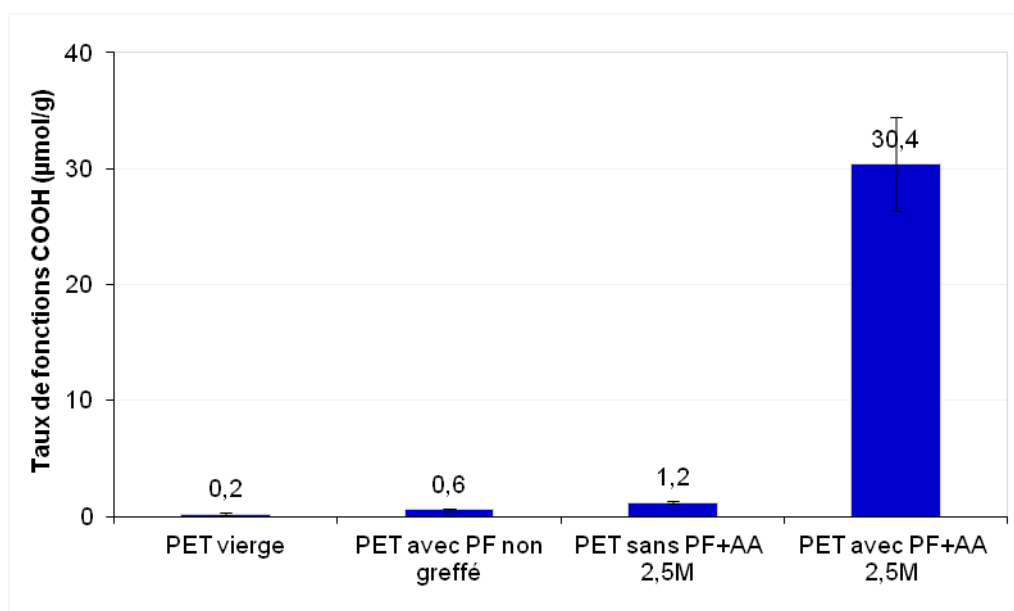


Figure 57: Comparaison des textiles non tissés traités ou non par plasma froid (Ar/O₂ (85/15), 120s) puis greffés ou non par l'acide acrylique à [AA]=2,5M

Nous pouvons remarquer dans la *Figure 57* qu'un simple traitement au plasma froid sur le textile non tissé ne fait pratiquement pas évoluer le nombre de fonctions COOH comparé au textile vierge, on obtient respectivement 0,2 et 0,6 µmol/g. De même, un simple greffage d'AA sur le textile non traité au plasma n'apporte pratiquement pas de fonctions COOH supplémentaires comparé au textile vierge : on obtient respectivement 1,2 et 0,2 µmol/g. Par contre, la combinaison des deux traitements amène une augmentation significative du nombre de fonctions COOH (30,4 µmol/g).

Cette étude préliminaire permet donc de mettre en évidence la nécessité de combiner le traitement plasma froid et le greffage de l'acide polyacrylique pour obtenir un maximum de fonctions COOH à la surface du textile.

Dans la partie suivante une optimisation des conditions de greffage va donc être réalisée, afin d'obtenir un greffage de PAA sur le textile, homogène, reproductible et suffisant pour fixer les molécules bioactives. Les paramètres suivant vont être optimisés :

- Le temps de greffage
- La température de greffage
- La concentration de la solution de l'acide acrylique

1.2.2. Influence temps / température

Dans cette étude, il s'agit de voir l'influence de deux paramètres de la copolymérisation greffante de l'acide polyacrylique sur le textile activé par plasma froid: la température et le temps de greffage. Cette étude a été réalisée sur des textiles non tissés sous la forme de disques de 11 mm de diamètre découpés à l'emporte pièce.

Le greffage du PAA sur le non tissé a été réalisé à 40, 60 et 80°C. Lors de chaque étude, les échantillons sont prélevés toutes les heures (de 1 à 6 heures) puis le nombre de fonctions COOH fixées est quantifié par dosage TBO (*Figure 58*).

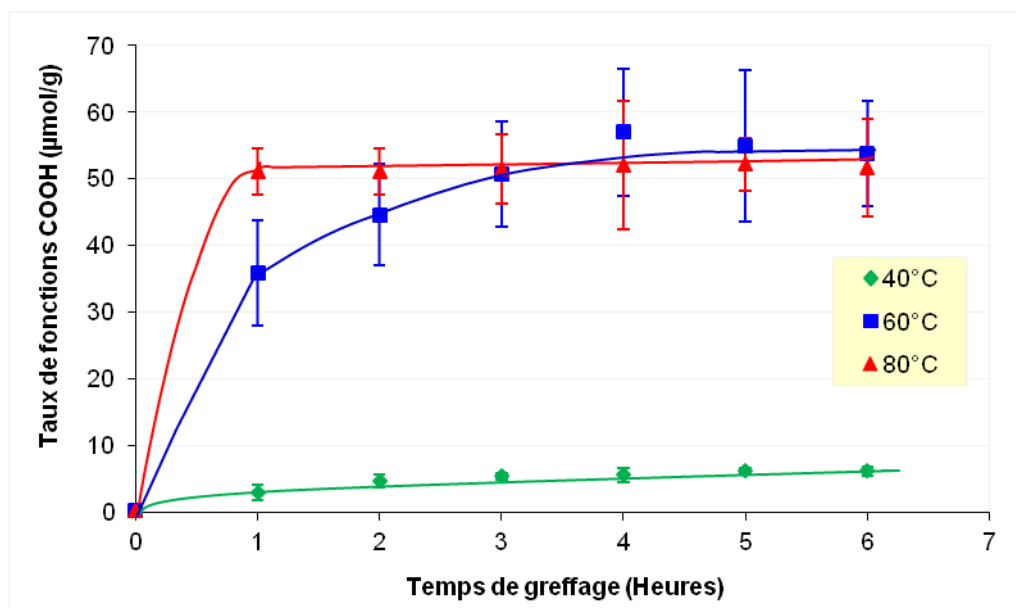


Figure 58: Etude de l'influence du temps et de la température de greffage de l'AA (2,5 M) sur le non tissé prétraité au plasma froid (Ar/O₂ – 85%/15%, 120 sec) n=5

La Figure 58 montre que d'après la pente à l'origine de chaque courbe, l'augmentation de la température a une influence sur la vitesse initiale de polymérisation. Visiblement, une température de 40°C ne suffit pas à l'amorçage de la polymérisation puisque le taux de fonctions COOH n'augmente pas de manière significative quelques soit le temps de la polymérisation. A 60°C, nous pouvons remarquer que le taux de greffage augmente progressivement en fonction du temps pour atteindre sa valeur maximale 53 µmol / g au bout de 4 heures. A 80°C, le taux maximal est atteint au bout d'une heure seulement (51 µmol / g).

On peut donc en conclure, conformément à la littérature que les fonctions hydroxydes et peroxydes ne se décomposent qu'à partir d'une température de 60°C. Au plus la température est élevée, au plus l'amorçage se fait rapidement puisque la vitesse d'amorçage (V_a) est directement reliée à la densité en groupes alcoyles. Nous pouvons remarquer toutefois que dès lors la température de dissociation des peroxydes atteinte, un taux de greffage maximum identique est atteint 50 µmol/g à 60°C ou à 80°C.

Le temps optimal pour obtenir une stabilisation du taux de greffage est donc compris entre 4 et 5 heures pour une température de 60°C et d'une heure pour la température de 80°C. Par la suite, on appliquera une température de greffage de 80°C pendant 4 heures.

1.2.3. Influence de la concentration d'acide acrylique sur le taux de greffage

Cette étude a été réalisée pour les deux textiles : le textile non tissé et le textile en tulle afin de déterminer l'influence de la concentration de la solution d'AA sur le taux de greffage des fonctions COOH.

Le protocole de la copolymérisation greffante retenu est le même pour les deux types de textiles. Pour réaliser cette étude et conformément aux résultats précédents, le temps de greffage est fixé à 4 heures et la température est de 80°C. Les concentrations d'AA étudiées sont les suivantes : 0,5M ; 1,5M ; 2,5M ; 5M. Les résultats du dosage TBO obtenus pour les deux textiles sont présentés dans la *Figure 59* en mol par gramme de textile. Cette unité a été choisie pour les deux types de textile par des raisons de simplification du calcul de surface (surtout pour le textile en tulle).

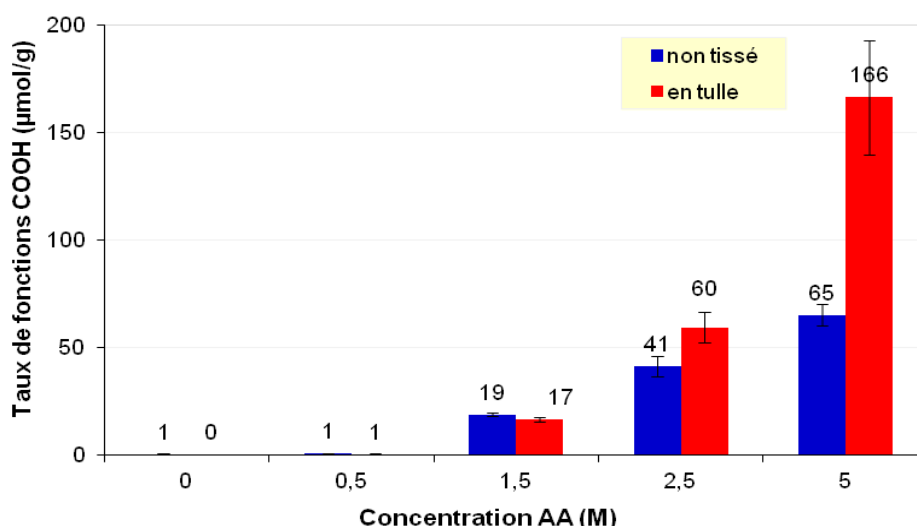


Figure 59: Etude de l'influence de la concentration en AA sur son greffage (80°C, 4 heures) pour les deux types de textiles non tissé et tulle activés par plasma froid (Ar/O₂ – 85/15, 120 sec) n=5

La *Figure 59* montre une augmentation du nombre de fonctions COOH en fonction de l'augmentation de la concentration en AA de 0.5 M à 5 M

Dans le cas du non tissé, le nombre de fonctions COOH augmente de 0,7 µmol/g pour le PET vierge à 65 µmol/g pour le PET greffé avec le PAA à une concentration de 5 M. Par ailleurs, la formation d'un gel a été observée à partir d'une concentration de 5 M. Il s'agit d'un phénomène d'homopolymérisation de l'AA.

Dans le cas du tulle, pour la plus forte concentration d'AA (5M), le nombre de fonctions COOH augmente également en fonction de la concentration de la solution en AA de 0,3 $\mu\text{mol/g}$ à 166,4 $\mu\text{mol/g}$. Le même phénomène d'homopolymérisation a été observé à partir d'une concentration de la solution à 5 M. Pour la concentration d'AA en 5M, en comparant les deux textiles, la différence en nombre de fonctions d'acides carboxyliques greffées à la surface de chaque textile est expliquée par la différence de structure (non tissé et tulle) puisque le nombre est calculé par rapport à la masse et non pas par rapport à la surface. Ce nombre de fonctions plus important peut être donc expliqué par la surface spécifique plus importante pour le textile en tulle que pour le textile non tissé.

Pour les deux textiles, le greffage sera réalisé en ajustant la concentration du bain à $[\text{AA}] = 2,5 \text{ M}$.

1.2.4. Caractérisations des textiles greffés par le PAA

1.2.4.1. Observation par MEB

Les textiles greffés traités à différentes concentrations d'AA ont été observés par Microscopie Electronique à Balayage. Les analyses au MEB permettent d'avoir une meilleure idée de l'état de surface des échantillons après le greffage du PAA sur le textile. Cela nous permet de voir l'homogénéité du greffage et l'influence de la densité du PAA sur l'enrobage des fibres.

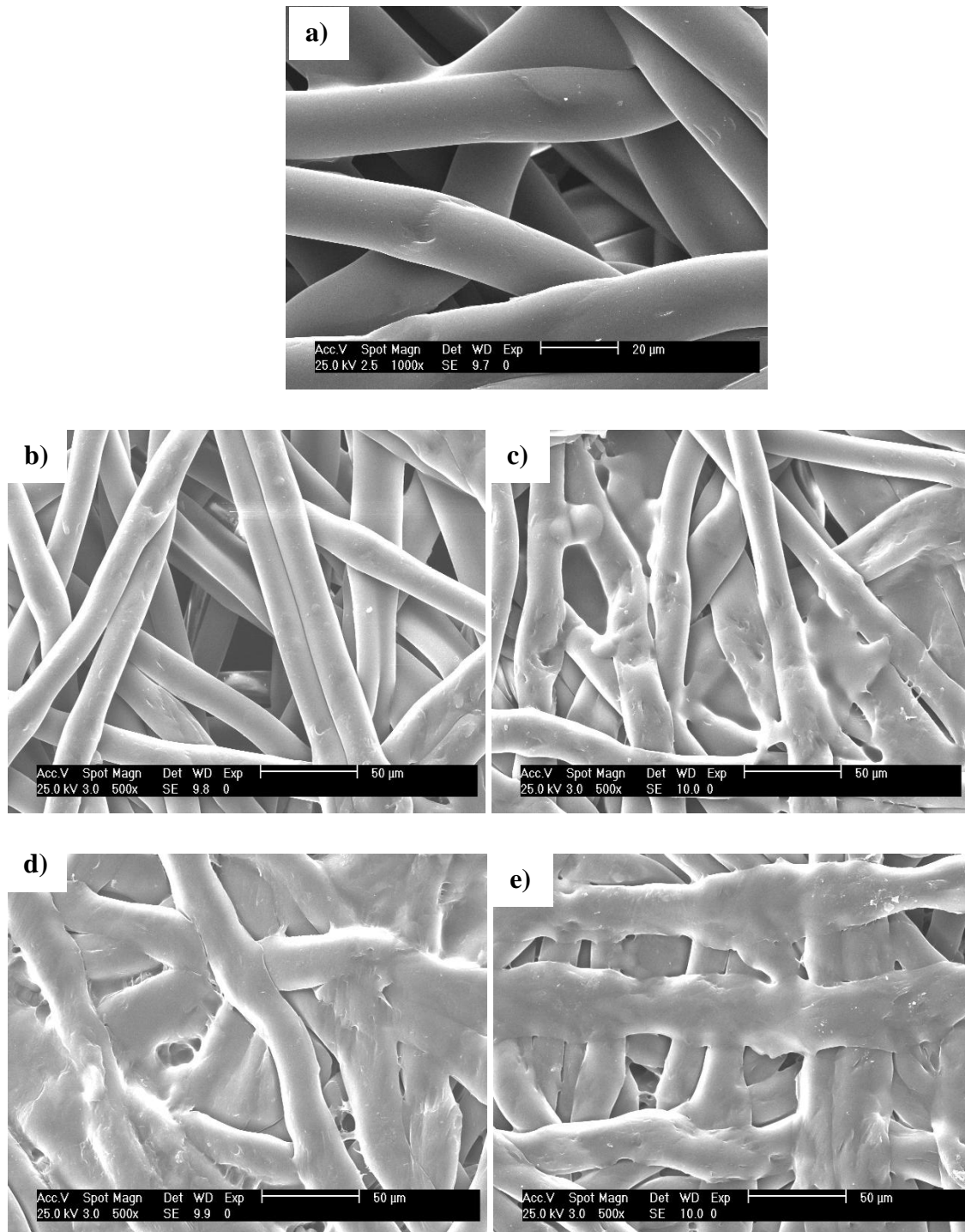


Figure 60 : Photos MEB du non tissé greffé à différentes concentrations de l'AA: vierge(a) ; 0,5M (b); 1,5 M (c); 2,5 M (d) et 5M (e)

Lorsque le greffage est réalisé avec une solution d'AA à une concentration inférieure à 2,5 M, les fibres sont partiellement recouverte par le PAA comme le montre *Figure 60 b et c*. Tandis qu'en augmentant la concentration de l'AA jusqu'à 5 M (*Figure 60 d et e*),

l'enrobage est plutôt homogène formant une 'gaine' caractéristique d'un recouvrement complet des fibres et un remplissage des interstices entre les fibres.

La même constatation peut être faite en observant le tulle (*Figure 61*). Pour un greffage avec des concentrations inférieures à 5 M, les fibres sont enrobées d'une très fine couche de PAA. La *Figure 61 b)* et son agrandissement, montrent cette fine couche.

Pour les textiles en tulles greffés à une concentration supérieure à 2,5 M nous observons sur la *Figure 61 c) et d)*, une couche plus dense de PAA sur les fibres. La présence du PAA peut être constatée à travers les craquelures constatées sur les fibres du textile. Nous pouvons conclure dans ce cas que, l'enrobage du PAA sur le textile en tulle est plutôt homogène et régulier pour toutes les concentrations inférieures à 5 M. Pour une concentration de 5 M, nous remarquons la présence de PAA aux interstices inter-fibrillaires (*Figure 61 d)*).

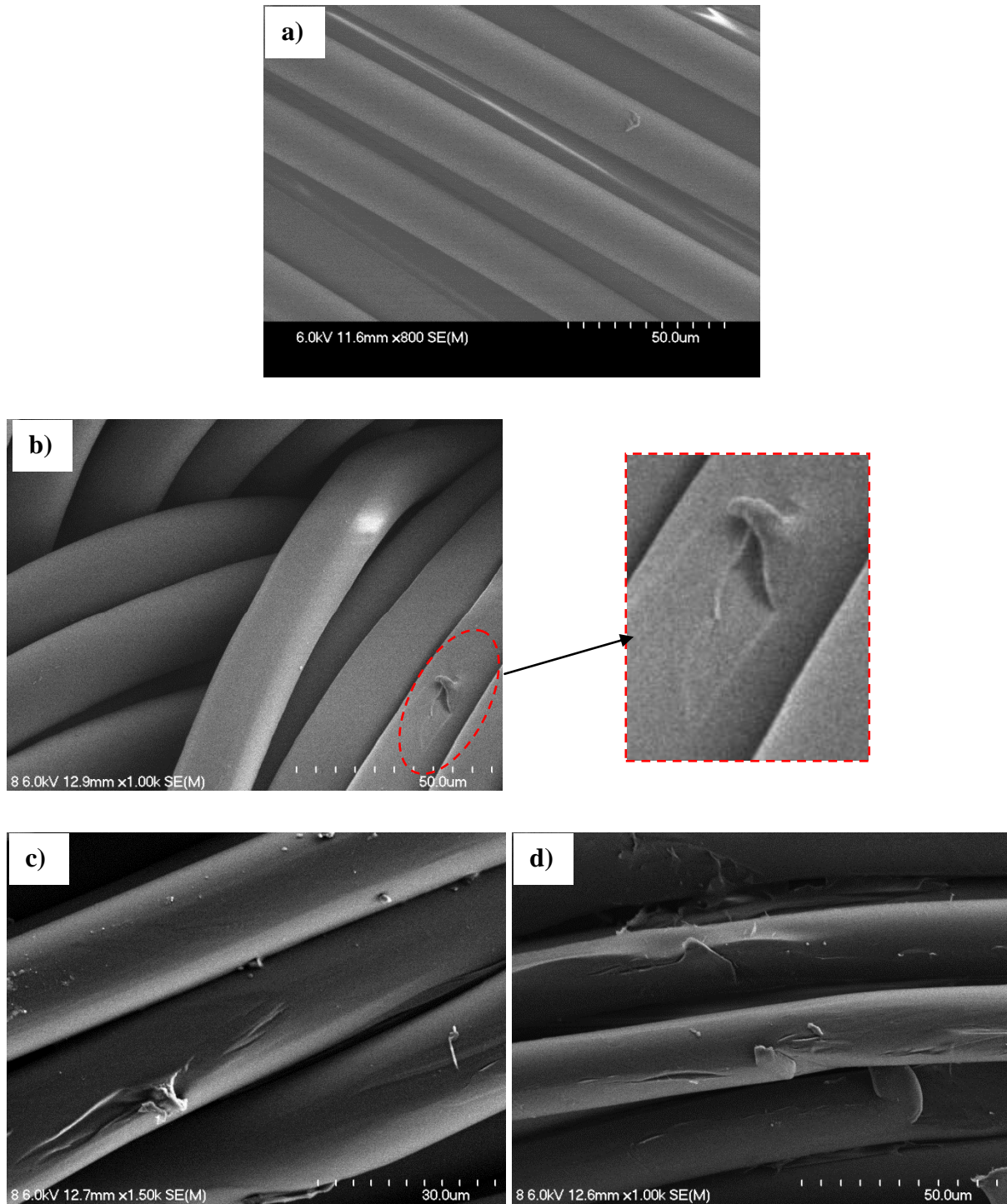


Figure 61 : Photos MEB du tulle greffé à différentes concentrations de l'AA : vierge(a) ; 1,5 M (b); 2,5 M (c) et 5 M (d)

Le greffage avec les conditions suivantes: 80°C ; 4 heures ; 2,5 M d'AA, est le protocole qui permet d'obtenir l'enrobage le plus homogène.

1.2.4.1.1. Mouillabilité

L'étude de mouillabilité a été réalisée sur les textiles non tissés greffés par les différentes concentrations d'AA. Dans la *Figure 62*, l'angle de contact de l'eau mesuré est exprimé en fonction du taux de greffage (nombre de fonctions -COOH).

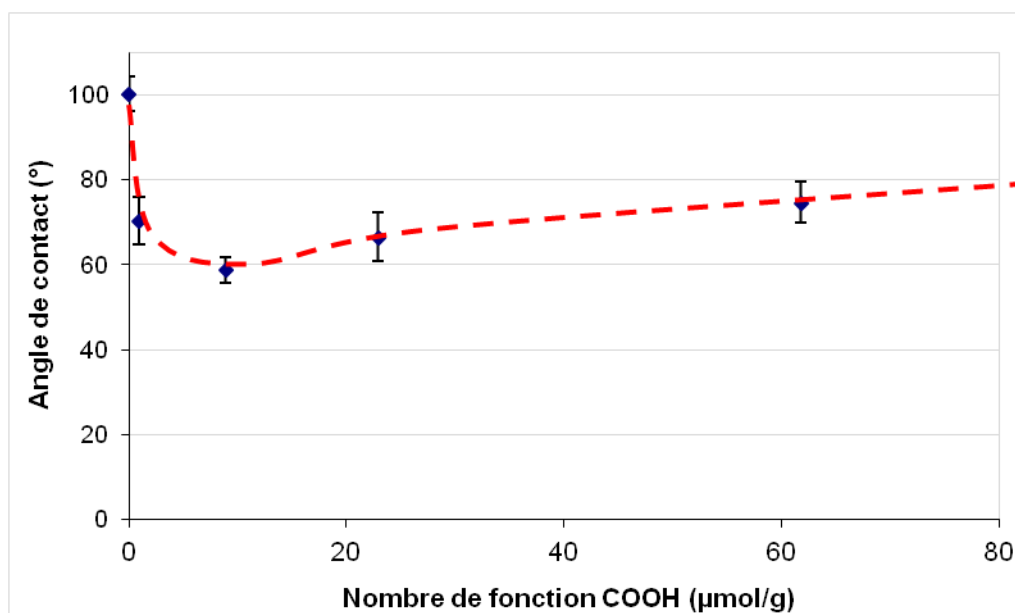


Figure 62 : Mesure de l'angle de contact sur le PET traité PF (Ar/O₂ – 85/15, 120 s) et greffé par l'acide acrylique aux différentes concentrations

La *Figure 62* montre que le traitement plasma froid associé au greffage du PAA permet d'augmenter sensiblement le caractère hydrophile du matériau, l'angle de contact est passé de 100° pour le PET vierge à près de 70° pour un PET greffé au PAA (5 M). La légère augmentation de l'angle de contact avec l'augmentation du nombre de fonctions acides carboxyliques peut être expliquée par l'augmentation de la densité du polymère d'acide acrylique avec la formation des amas qui mènent à l'augmentation de l'augmentation de l'angle de contact de l'eau sur l'échantillon.

1.2.4.2. Caractérisation par ATG

L'ATG a été réalisée pour les textiles greffés PAA à différentes concentrations sur le non tissé, sur le tulle et le PAA. La *Figure 63* a) et b) présentent respectivement les courbes ATG des textiles non tissé et textiles en tulle.

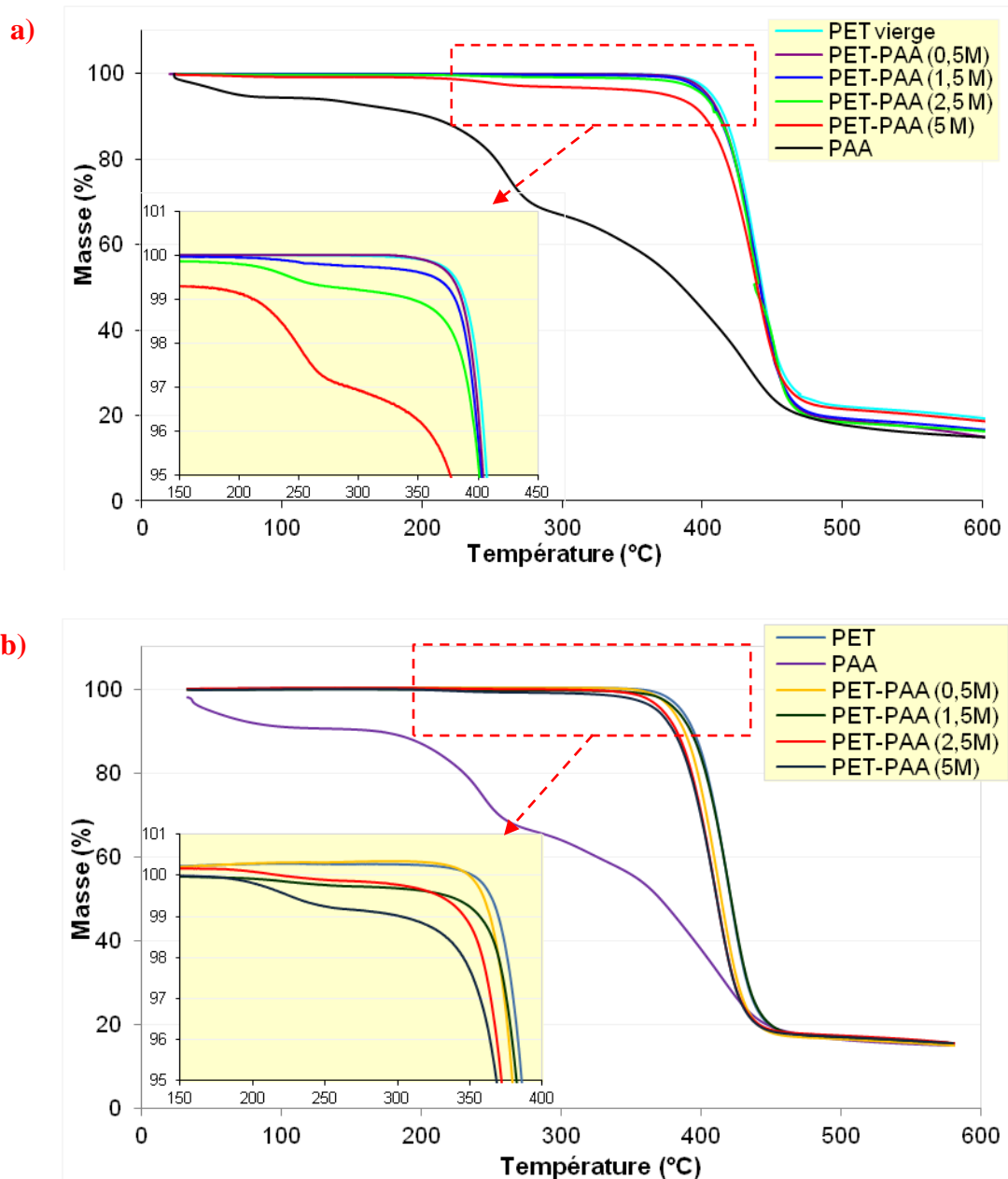


Figure 63: Courbes ATG des textiles **a)** non tissé et **b)** en tulle ; vierge et greffés avec l'AA à différentes concentrations (80°C, 4 heures), et PAA seul

Les courbes d'ATG des *Figure 63 a)* et *b)* présentant respectivement le non tissé et le tulle montrent que les échantillons greffés PAA se dégradent en deux étapes correspondant

successivement à l'étape de dégradation du PAA puis celle du PET. L'agrandissement des courbes (*Figure 63* a) et b)) permet de mieux observer la différence des profils de décomposition des textiles vierges et greffés. Cette différence avec le PET vierge est surtout visible dans le cas où la concentration d'AA = 5M en remarquant ainsi un léger décalage de la température de dégradation du PET greffé PAA vers 370°C (un peu avant celle du vierge à 490°C). L'ATG sur ces échantillons greffés PAA reste très limité sachant que la quantité d'acide polyacrylique greffé est très faible ainsi que les analyses sont réalisées sur seulement un échantillon par série.

1.2.5. Evaluation biologique des textiles greffés au PAA

1.2.5.1. Vitalité cellulaire

Ce test a été réalisé dans le but de voir la cytocompatibilité du textile après le greffage du PAA. Cette propriété est évaluée par la mesure de la vitalité de différents types de cellules en contact direct avec les textiles: les cellules épithéliales L132, les cellules endothéliales HUVEC, des cellules musculaires lisses HPASMC et les cellules fibroblastes NIH. Les expériences de vitalité cellulaire ont été réalisées sur les textiles non tissés vierges (PET), activés PF (PET-PF) et greffés (PET-PAA) à l'aide de l'AA à différentes concentrations (0,5M à 5M) (*Figure 64* a, b, c et d).

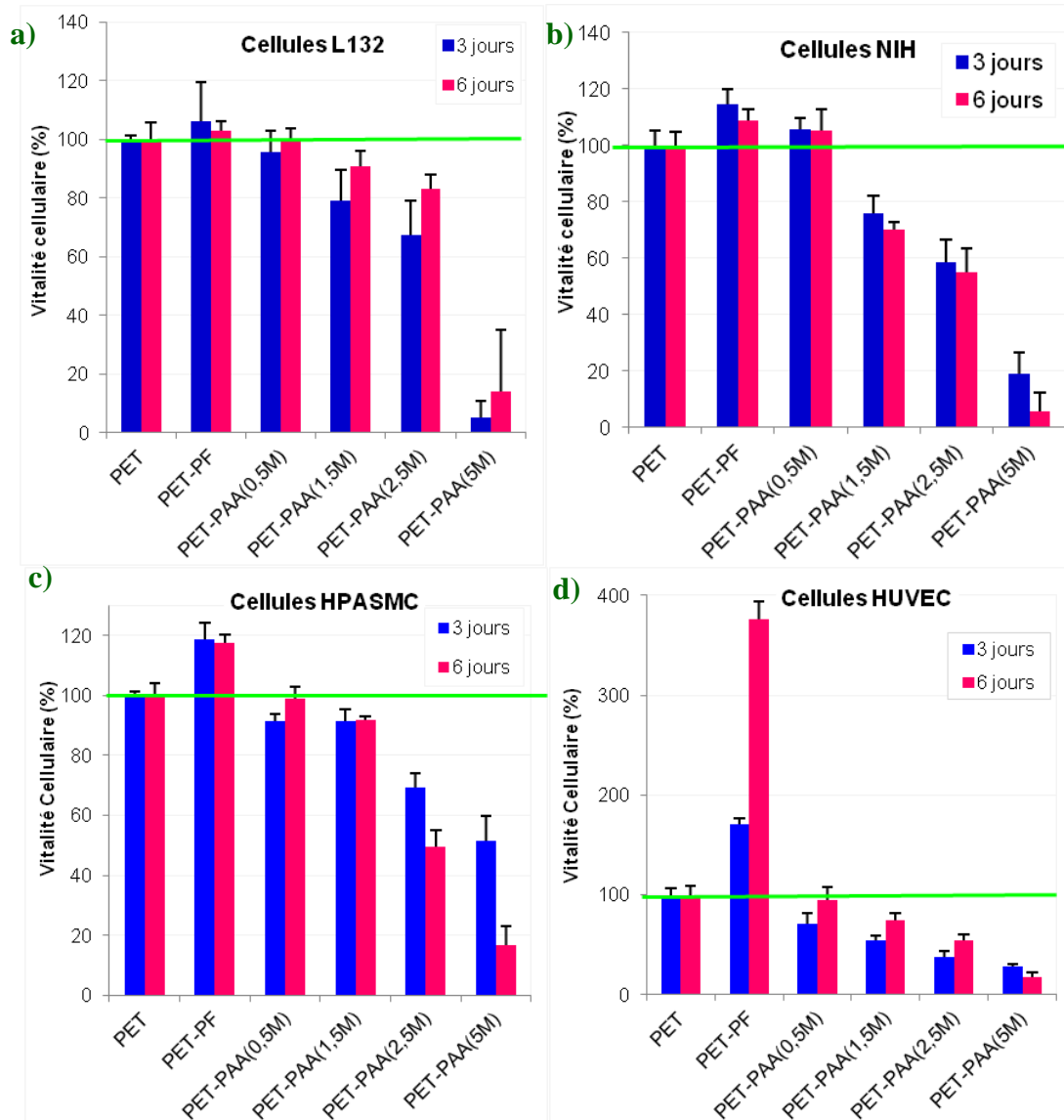


Figure 64 : Vitalité cellulaire des cellules sur les textiles non tissés vierge, traités plasma froid et greffés à l'aide de différentes concentrations d'AA (0.5M à 5M) : cellules épithéliales L132 a) ; cellules fibroblastes NIH b) ; cellules musculaires lisses HPASMC c) ; cellules endothéliales HUVEC d)

D'une manière générale, les résultats présentés sur les *Figure 64 a), b), c) et d)* montrent que les cellules prolifèrent moins bien sur un textile greffé par le PAA que sur le témoin (PET). Nous observons que plus la densité de fonctions acide carboxyliques augmente à la surface du support moins la vitalité cellulaire sera bonne. Nous pouvons également remarquer que le support commence à avoir un caractère toxique à partir de la densité la plus grande de fonctions COOH correspondant à la concentration de 5 M de la solution d'AA (PET-PAA(5M)) et ceci quelque soit le type de cellule.

D'autre part, l'effet du traitement plasma froid est bien remarqué. Les textiles traités uniquement plasma froid (PET-PF) montrent une bonne réponse biologique pour tous les types de cellules. En effet, les textiles montrent une amélioration de la vitalité cellulaire par rapport au témoin (PET). Ceci peut être expliqué par le changement de la mouillabilité de la surface traitée au plasma froid. Il est intéressant de noter la forte sensibilité et l'adaptation de cellules HUVEC *Figure 64 d*) au support traité uniquement par plasma froid, les résultats montrent qu'au bout de 6 jours la vitalité cellulaire dépasse les 370% par rapport au textile vierge. Par ailleurs, cette forte prolifération cellulaire n'est pas conseillée, il est donc nécessaire de maîtriser les réponses de la cellule par rapport au textile modifié.

Pour deux types de cellules, endothéliales (HUVEC) et épithéliales (L132), une augmentation de la prolifération des cellules entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour a été observée ce qui témoigne d'une adaptation de ces cellules vis-à-vis de la surface modifiée. Le retard de croissance des cellules par rapport au textile vierge peut s'expliquer par la présence de fonctions acides sur le support en milieu statique.

D'autre part la *Figure 64 c*) montre que les cellules musculaires lisses (HPASMC) et fibroblastiques (NIH3T3) gardent un taux de vitalité similaire entre 3 et 6 jours sur les échantillons greffés au PAA jusqu'à un taux de fonctions COOH correspondant à l'AA 1,5 M. Les cellules HPASMC montrent une diminution de leur vitalité entre 3 et 6 jours à partir de 2,5 M, la vitalité cellulaire a chuté jusqu'à 50% et à moins de 20 % pour PET-PAA (5 M). La cytocompatibilité de ces types de cellules est confirmée jusqu'à une concentration de AA de 5M.

Ce test montre une bonne cytocompatibilité de tous les supports greffés PAA à l'exception des forts taux de fonctionnalisation PET-PAA(5M) où la croissance cellulaire est inhibée par d'une part une acidité de surface, d'autre part, une rugosité trop importante.

1.2.5.2. Adhésion plaquettaire

L'étude de l'adhésion plaquettaire a été réalisée sur le non tissé greffé par l'acide polyacrylique (PET-PAA(2,5M)) et un témoin (PET).

Les résultats de la *Figure 65* montrent une réduction significative du nombre de plaquettes adhérentes pour les échantillons greffés PAA en comparaison avec le PET vierge.

Cette réduction signifie que les plaquettes adhèrent moins sur les textiles greffés avec le PAA provoquant une diminution significative de 28% de l'adhésion des plaquettes par rapport au textile vierge.

Le greffage des textiles avec le PAA devrait donc permettre, en condition *in vivo*, de diminuer la thrombogénicité du support.

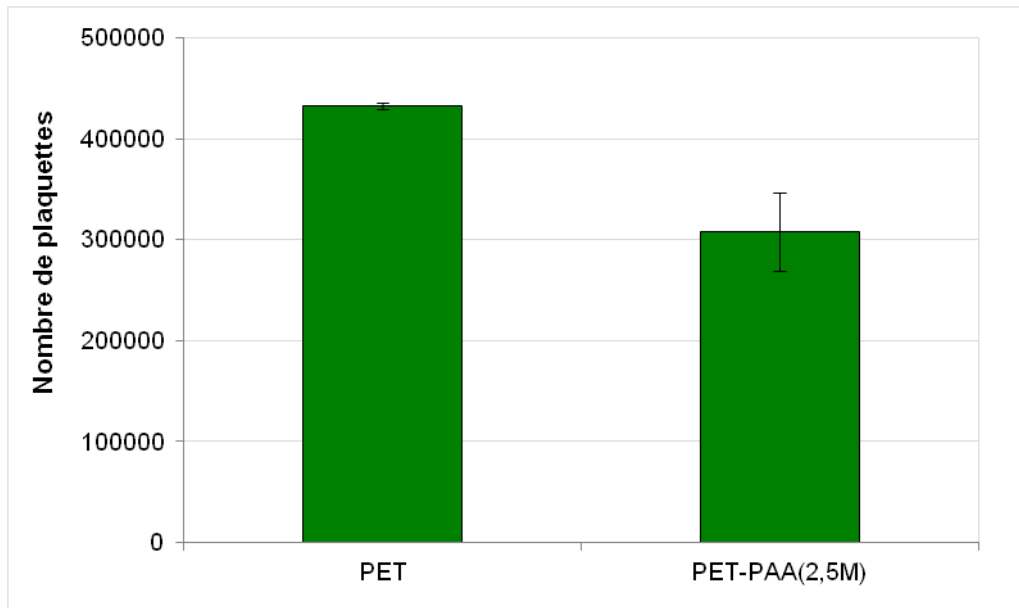


Figure 65 : Comparaison de l'adhésion plaquettaire sur le non tissé vierge et greffé PAA

1.2.6. Evaluation microbiologique des textiles greffés au PAA

Le test d'adhésion bactérienne consiste à mesurer la quantité de bactéries adhérant sur les différents supports en PET vierge et greffés à l'aide de l'acide acrylique à concentrations croissantes (de 0,5 M à 5 M). Le textile utilisé dans cette étude est le non tissé. La bactérie testée est *Staphylococcus aureus*, une des bactéries les plus rencontrées lors des infections des implants.

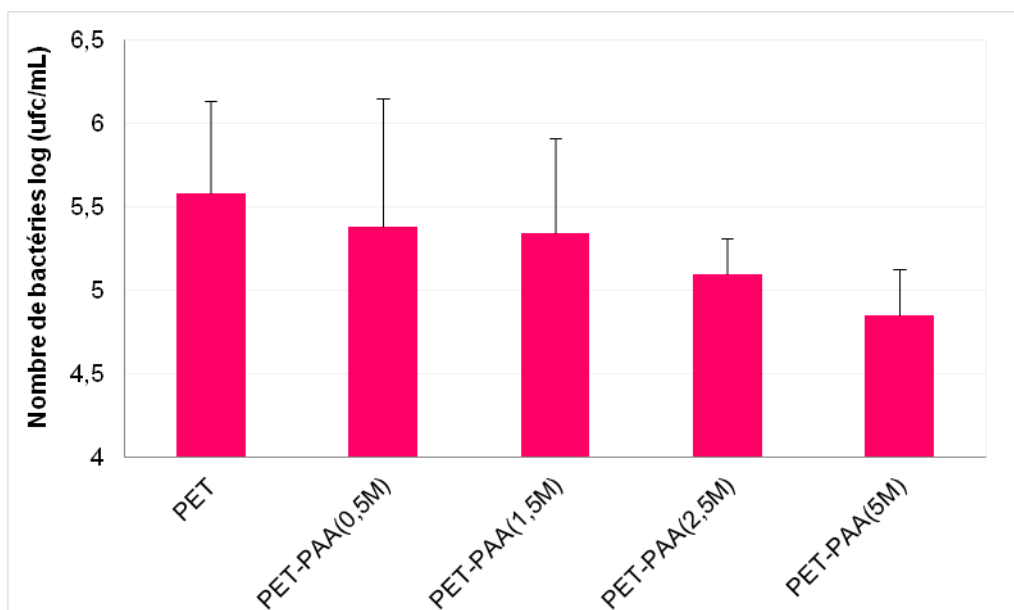


Figure 66 : Nombre d'unités formant colonies (ufc) de bactéries ayant adhéré sur les différents supports PET, sans ou avec greffage par l'acide acrylique à concentrations croissantes.

Les résultats présentés dans la *Figure 66*, montrent une tendance à la diminution de l'adhésion bactérienne: plus la densité en fonctions acide carboxyliques augmente, moins de colonies bactériennes (ufc) adhèrent à la surface modifiée. Ceci montre que le support en PET greffé PAA serait moins favorable à l'adhésion des bactéries. On ne peut toutefois affirmer que ce support a acquis des propriétés antibactériennes, tant que cette diminution est faible : moins d'une seule unité logarithmique (87% en réduction bactérienne pour les échantillons à la plus forte concentration d'AA (PET-PAA(5M))).

1.3. Conclusion

Nous avons étudié dans cette première partie le greffage de l'acide polyacrylique par copolymérisation greffante sur deux types de textiles en non tissé et en tulle ainsi que son impact sur leur cytocompatibilité, leur l'hémocompatibilité et leur évaluation microbiologique.

L'étude a permis de mettre en évidence l'importance du couplage : activation par plasma froid – greffage du PAA pour obtenir une fonctionnalisation optimale de la surface du PET par les groupements acides carboxyliques COOH. Pour optimiser le greffage du PAA à la surface, il était donc judicieux de commencer par l'optimisation des paramètres d'activation au plasma froid à savoir la proportion des gaz utilisés, le temps du traitement ainsi que le

temps d'attente entre le traitement et l'imprégnation dans l'acide acrylique. L'étude a pu aboutir à des conclusions confirmant que la proportion de gaz optimale tend vers un pourcentage plus élevé en argon qu'en oxygène.

Etant donné que le PF dénature le support à la surface, il était important de vérifier son influence sur les propriétés mécaniques du support. Ainsi les tests de traction ont montré que le traitement plasma seul permettait de renforcer le matériau quand les proportions en argon dépassaient au moins les 70%, or pour ces proportions une fois le matériau greffé la contrainte et la déformation à la rupture ont diminué tout en restant proche des valeurs respectives de 40 MPa et 72%. Suite au dosage au TBO des fonctions acide carboxyliques greffées, il est apparu qu'une proportion seuil en d'argon/oxygène, soit de 80/20 ou 85/15, est nécessaire pour greffer de façon efficace l'acide polyacrylique sur le support. Malgré les écarts types, les proportions 80/20 et 85/15 sont les proportions les plus favorables au greffage de l'acide polyacrylique. Cette tendance est vérifiée avec l'analyse d'ATG. Nous avons constaté assez facilement que les plus grandes pertes de masse en PAA sont attribuées aux échantillons 80/20 et 85/15, révélant ainsi que ce sont les textiles les mieux greffés.

Cette étude permet donc de confirmer qu'il existe une proportion seuil en argon / oxygène de 85/15 et 80/20 favorables au greffage de l'acide polyacrylique sur le textile en PET, ces proportions respectent un bon compromis entre la quantité d'acide polyacrylique greffé et les propriétés mécaniques.

Le temps d'activation par plasma froid a été ensuite optimisé et fixé à 120 secondes. Par ailleurs, nous avons cherché à démontrer que le nombre de fonctions peroxydes et hydroperoxydes, créées lors du traitement plasma froid, est en relation directe avec le taux de greffage de l'acide polyacrylique. Nous avons donc recherché à établir un protocole du dosage par DPPH et l'adapter à nos échantillons. L'optimisation du dosage au DPPH n'a pu être amenée à son terme, à cause de l'incohérence des résultats.

Après optimisation des paramètres d'activation de la surface, l'optimisation des paramètres de la copolymérisation greffante de PAA a été recherchée. L'étude des paramètres a permis d'obtenir un protocole optimisé à 80°C pendant 4 heures à 2,5 M en concentration d'acide acrylique.

Dans l'optique d'une application biomédicale, il était nécessaire dans un premier temps d'étudier et caractériser tous les échantillons avec différents taux de greffage par tests de cytocompatibilité et hémocompatibilité. Les tests de vitalité cellulaire sur les cellules épithéliales L132, les cellules endothéliales HUVEC, des cellules musculaires lisses HPASMC et les cellules fibroblastes NIH ont démontré que le biomatériau demeure cytocompatible pour les taux de fonctions COOH correspondant à la concentration de 2,5 M d'acide acrylique dans le bain de greffage. Le test d'adhésion bactérienne montre bien la diminution de 28% des plaquettes adhérant sur le textile greffé à 2,5 M.

Par ailleurs, l'évaluation microbiologique a pu montrer la tendance de la diminution de l'adhésion bactérienne en fonction de l'augmentation du taux de fonctions acide carboxyliques greffées.

2. Immobilisation des molécules bioactives

2.1. Immobilisation de l'héparine

Le but de cette étude est d'élaborer un biomatériau antithrombogène via l'immobilisation de l'héparine.

L'immobilisation de l'héparine a été réalisée sur le textile non tissé, greffé ou non avec le PAA, après activation des fonctions acide carboxyliques du textile à l'aide du carbodiimide (EDAC). La fixation de la molécule bioactive a été optimisée sur des échantillons de PET-PF (Ar/O₂ 85/15) puis greffés par la copolymérisation greffante du PAA 'procédé en solution' dans les conditions (80°C; 4 h; 2,5 M AA). Des caractérisations par IRTF, ATG, Analyses Élémentaires (AE) et mesure d'angle de contact des échantillons modifiés ont été réalisées. Ces analyses ont été effectuées pour mettre en évidence la fixation de l'héparine sur le textile greffé PAA. Enfin, une évaluation du textile modifié a été réalisée par le test de coagulation afin de montrer l'efficacité du traitement des surfaces par l'héparine.

2.1.1. Caractérisation de l'immobilisation de l'héparine

2.1.1.1. Caractérisation de la fixation par infrarouge

L'analyse par infrarouge a été effectuée sur l'héparine seule, le PAA, le non tissé vierge (PET), puis sur le textile greffé PAA (PET-PAA) et modifié par l'héparine (PET-PAA-EDAC-hep). Les spectres IRTF de tous ces échantillons ont été superposés et présentés sur la *Figure 68*. Les spectres IR du PAA ainsi que de l'héparine seule sont présentés sur la *Figure 67*.

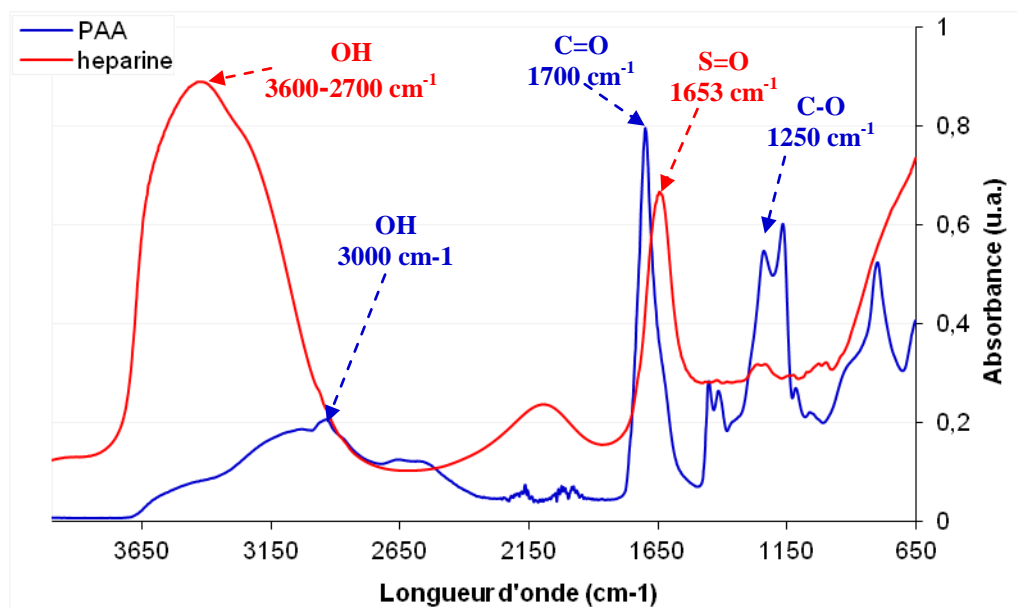


Figure 67 : Les spectres IR de l'acide polyacrylique (PAA) obtenu par ATR et de l'héparine par pastille KBr.

Dans la *Figure 67*, le spectre IR de l'acide polyacrylique (PAA) montre des bandes d'absorbance C=O à 1700 cm^{-1} , C-O à 1250 cm^{-1} et une bande large à 3000 cm^{-1} OH caractéristiques des fonctions COOH.

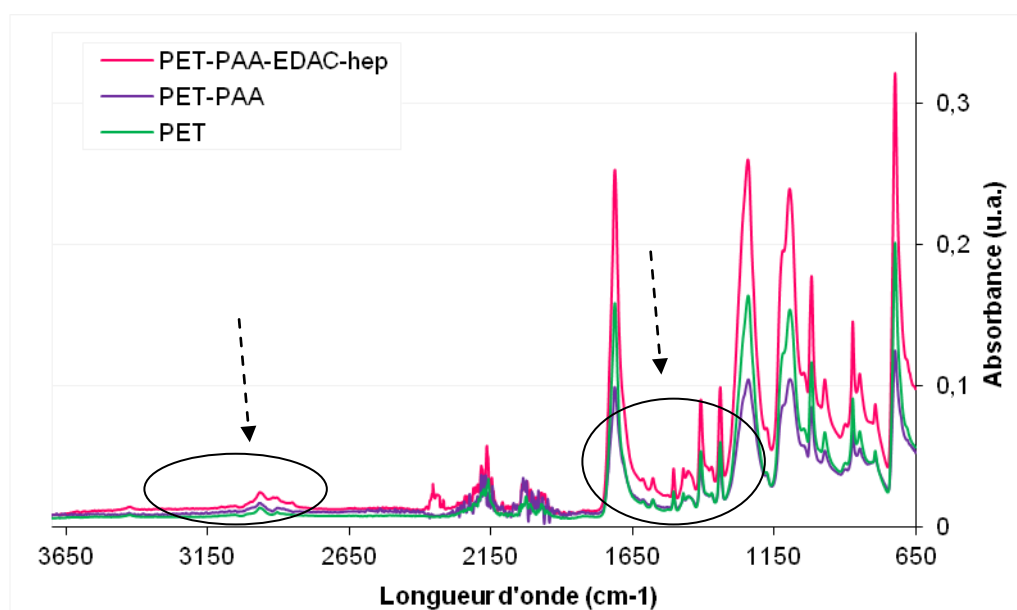


Figure 68 : La superposition des spectres IR-ATR de textile non tissé en PET vierge (PET), PET greffé PAA (PET-PAA) et PET greffé PAA et modifié à l'héparine (PET-PAA-EDAC-hep)

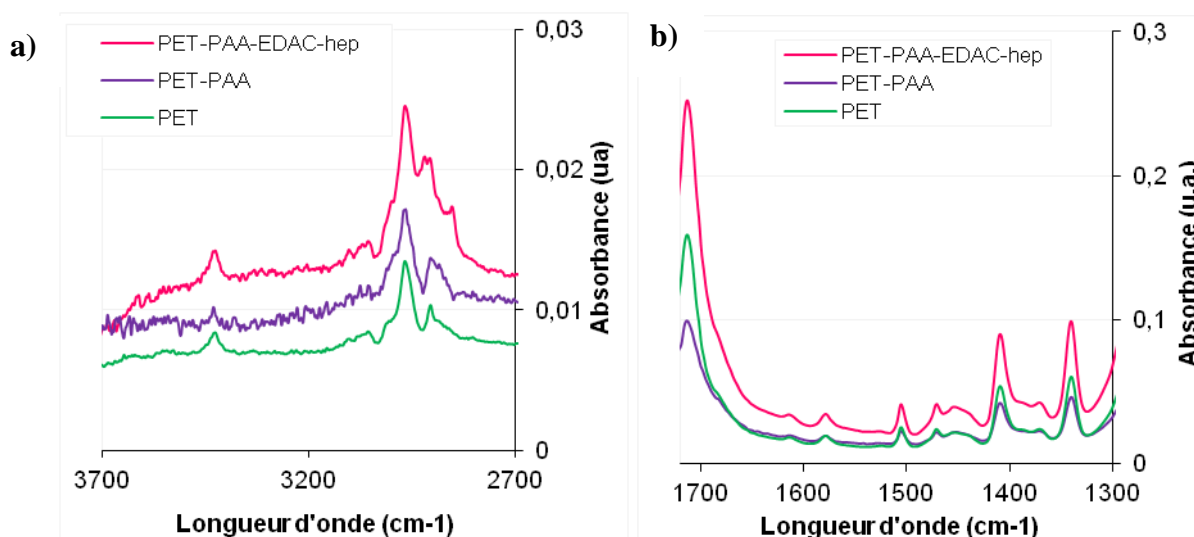


Figure 69 : Agrandissements (a, b) du spectre IR-ATR représentant le textile non tissé en PET vierge (PET), le PET greffé PAA (PET-PAA) et le PET greffé PAA et modifié à l'héparine (PET-PAA-EDAC-hep)

La *Figure 68* ne montre pas de différence significative entre les spectres IR des différents échantillons. Néanmoins, en effectuant un agrandissement *Figure 69* de la *Figure 68*, nous remarquons que le spectre du PET-PAA-EDAC-hep présente des pics significatifs de la présence de l'héparine en particulier pour la bande d'absorption située entre 2700 et 3600 cm⁻¹ les. Cette bande est très importante sur le spectre de l'héparine puisqu'elle représente les fonctions OH de la biomolécule. Néanmoins, les bandes significatives des groupements sulfates de l'héparine ne se retrouvent pas très visibles sur les textiles en PET puisque la bande entre 1600 et 1700 cm⁻¹ se croise avec les bandes (C=O). Par ailleurs, une étude effectuée en parallèle sur un textile en polypropylène a pu montrer l'existence de l'héparine par la même technique de modification de surface²⁷⁵.

L'analyse par IR nous révèle la fixation probable de l'héparine sur le support en PET modifié par le PAA. Néanmoins, l'IRFT-ATR ne permet pas de mettre en évidence la présence de ce revêtement de surface d'une épaisseur aussi réduite.

2.1.1.2. Caractérisation de la fixation par analyse élémentaire

L'analyse élémentaire permet de doser les éléments présents dans les échantillons. Les éléments recherchés sont C, O, N et S car l'héparine contient du soufre et de l'azote (*Tableau 4*).

Tableau 4: Composition pondérale en C,O,S,N des échantillons vierges et modifiés

Analyse élémentaire (% en masse)			
Eléments	PET	PET-PAA	PET-PAA-EDAC-hep
C	61,92	61,35	61,52
O	33,69	33,80	33,19
S	*	*	<0,20
N	*	*	<0,30

Dans le *Tableau 4*, pour le PET vierge et le PET-PAA, nous observons une diminution du %C et une augmentation du %O. Or, en calculant les compositions en carbone et oxygène par unité du monomère, le PET est composé de 68% du C et 27% d'O. Ces valeurs pour le PAA sont respectivement de 50% et 44%. Il est donc logique de voir la composition du PET-PAA diminuer en carbone et augmenter en oxygène par rapport au PET vierge.

L'azote et le soufre ont été recherchés pour les échantillons PET-PAA-EDAC-hep afin de montrer la fixation de l'héparine et essayer ainsi de déterminer sa quantité. Les résultats montrent que malheureusement les seuils de détection du soufre et de l'azote ne sont pas atteints pour les échantillons.

2.1.1.3. Caractérisation par mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact à l'eau a été réalisée sur les différents échantillons afin de montrer la fixation de l'héparine. La *Figure 70* montre l'évolution de l'angle de contact en fonction de la nature du revêtement de la surface.

* Élément non recherché

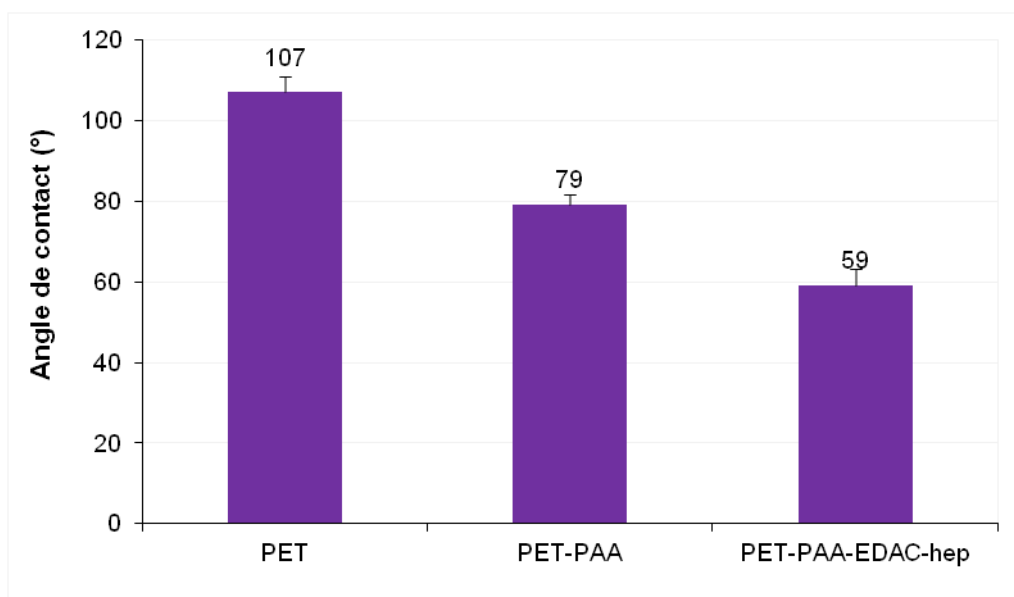


Figure 70 : La mesure de l'angle de contact de l'eau sur le textile en PET vierge, PET greffé PAA et PET modifié à l'héparine.

Sur la *Figure 70*, et comme nous l'avons déjà vu précédemment le greffage du PAA permet d'augmenter le caractère l'hydrophile de la surface (79°) par rapport au textile non greffé (PET) (107°). Une augmentation de l'hydrophilie des échantillons en PET-PAA-EDAC-hep avec la diminution de l'angle de contact à 59° a été ensuite observée. Cette augmentation d'hydrophilie peut être expliquée par la présence des fonctions hydrophiles de l'héparine. La mesure de l'angle de contact tend donc à confirmer la fixation de l'héparine à la surface du textile greffé PAA.

2.1.2. Evaluation biologique: Test de coagulation

Le test de coagulation consiste à déposer une goutte de sang à la surface du textile durant 5, 10, 20, 40 et 50 minutes. Le processus de coagulation est stoppé par l'ajout du PBS sur les échantillons. Les globules rouges non immobilisés dans le caillot sanguin se retrouvent dans le PBS. Après l'hémolyse des globules rouges, la mesure de l'absorbance de la solution à 540 nm est réalisée.

Le test de coagulation a été effectué sur les échantillons en PET vierge (PET) et modifié par l'héparine (PET-PAA-EDAC-hep). Les résultats sont présentés sur la *Figure 71*.

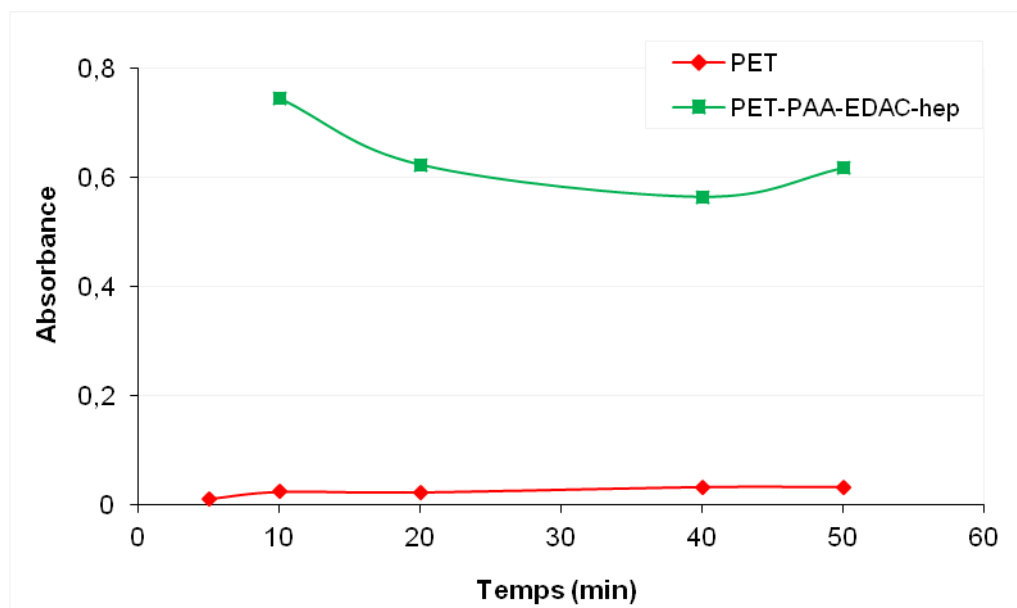


Figure 71 : Cinétique de la coagulation du sang sur les échantillons modifiés ou non par l'héparine par mesure de l'absorbance à 540 nm de l'hémoglobine libérée.

La *Figure 71* montre l'efficacité des échantillons greffés PAA et modifiés par l'héparine PET-PAA-EDAC-hep. En effet, sur les échantillons vierges, le sang a coagulé rapidement (5 min) tandis que les échantillons PET-PAA-EDAC-hep possèdent une activité anticoagulante prolongée jusqu'à 50 minutes.

Ce test de coagulation vient donc confirmer la fixation de l'héparine sur le PAA via le carbodiimide et l'amélioration des propriétés anticoagulantes du nouveau textile modifié. Cette modification de surface présente une alternative très prometteuse pour des applications biomédicales telles des prothèses vasculaires anti-thrombotique par exemple.

2.2. Immobilisation de la gentamicine

Le test d'immobilisation de la gentamicine a été réalisé en suivant deux protocoles. Le premier consiste, comme dans le cas de l'héparine, à activer les groupements COOH par le carbodiimide (EDAC) puis à immobiliser la gentamicine (PET-PAA-EDAC-genta). Le second est basé sur la simple adsorption de la molécule ionisée à la surface du textile fonctionnalisé par les groupements COOH (PET-PAA-genta). Le but est donc de voir l'influence de la liaison covalente sur l'efficacité antibactérienne des textiles modifiés par la gentamicine. Différentes techniques de caractérisations ont été réalisées sur les textiles modifiés telles que l'IRTF, l'ATG, l'analyse par XPS et le dosage par AO.

2.2.1. Caractérisations de la fixation de gentamicine

Les analyses IRTF n'ont montré aucune différence entre les échantillons vierges et modifiés. Ceci peut être expliqué par le fait que les bandes d'absorbance du PET masquent les bandes caractéristiques de la gentamicine. Cette hypothèse a été bien confirmée par une étude effectuée en parallèle sur des échantillons en PP où on a bien montré l'apparition de bandes d'absorbance caractéristiques de la gentamicine sur le textile PP greffé PAA et modifié par la gentamicine (surtout à 1585 cm^{-1})²⁷⁵.

2.2.1.1. Caractérisation de la fixation par analyse XPS

Les analyses XPS ont été réalisées sur les échantillons (PET-PAA-genta) et (PET-PAA-EDAC-genta). Les spectres XPS des différents échantillons ainsi que ceux des échantillons témoins (PET) et (PET-PAA) sont répertoriés dans les *Figure 73 a)* et *b)*. Les concentrations atomiques sont présentées dans le *Tableau 5*.

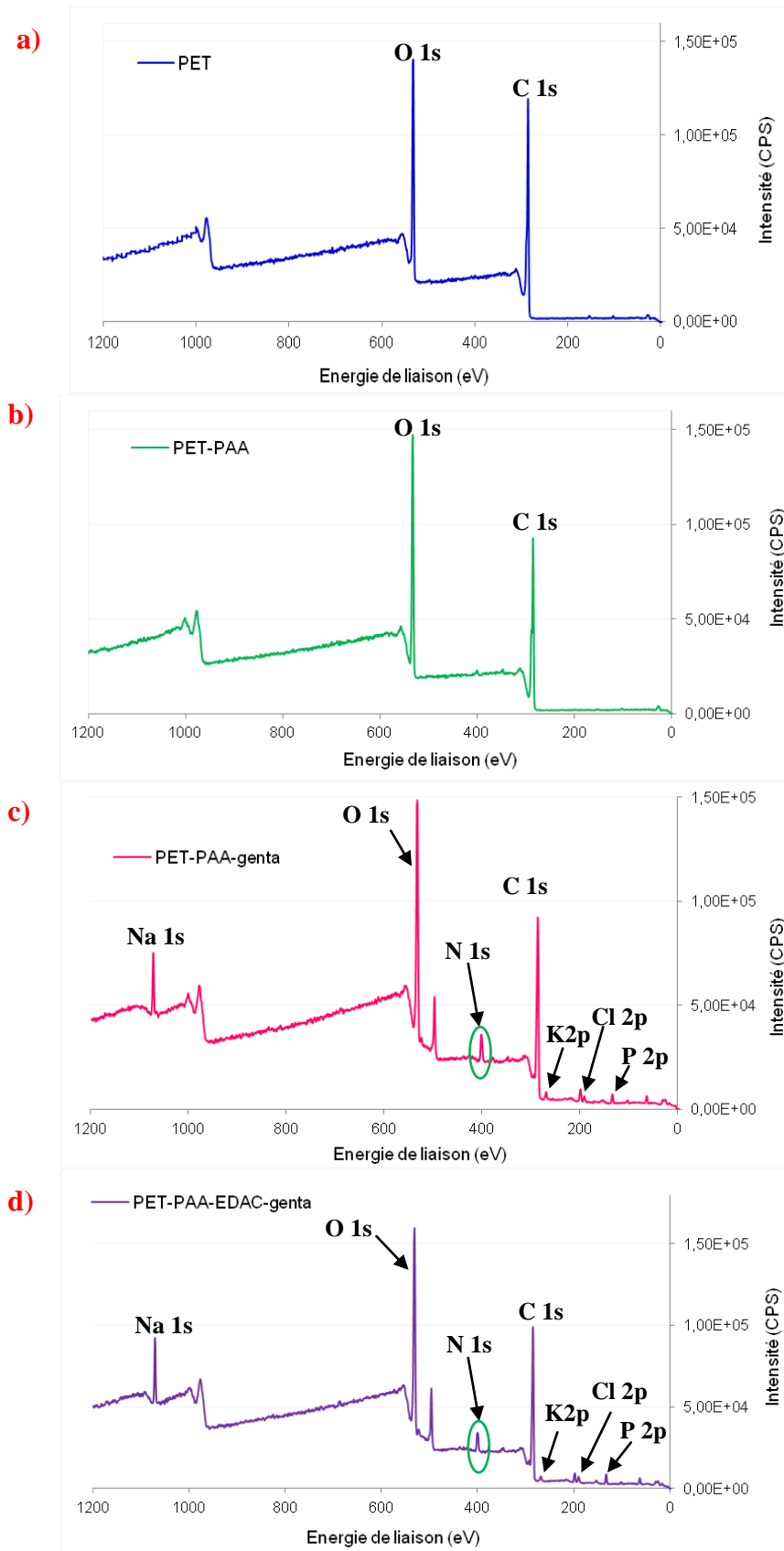


Figure 72 : Spectres XPS à partir du textile (a) en PET vierge, (b) PET greffé PAA et (c) PET modifié gentamicine sans EDAC et (d) PET modifié gentamicine avec EDAC

Tableau 5 : Concentration atomique obtenue par XPS à partir des surfaces en PET, PET greffé PAA et PET modifié par la gentamicine sans et avec EDAC

Echantillon	XPS : Concentration Atomique (%)						
	C 1s 285 eV	O 1s 532,4 eV	N 1s 401,5 eV	K 2p 292,8 eV	Cl 2p 198,5 eV	P 2p 133,2 eV	Na 1s 1071,3 eV
PET	75,55	23,96	0	0	0	0	0
PET-PAA	70,94	27,7	0,72	0	0	0	0
PET-PAA-genta	61,36	26,87	5,42	0,58	1,4	1,39	2,12
PET-PAA-EDAC-genta	58,37	28,84	5,1	0,86	1,18	1,93	2,81

Dans le Tableau 5 et Figure 72 a) et b), le spectre XPS de la surface vierge montre la présence du Carbone (C 1s à 285 eV) et d'Oxygène (O 1s à 531,8 eV). Le greffage du PAA sur les textiles (PET-PAA) est également montré par l'augmentation de la composition en oxygène (27,7% contre 23,96 % pour le textile vierge) et par la diminution de la composition du carbone (70,94% au lieu de 75,55%) par rapport au PET-PAA.

Dans le cas des échantillons modifiés par la gentamicine avec et sans EDAC, les résultats montrent l'apparition d'une composition importante de l'azote (N 1s à 400 eV) sur les deux échantillons PET-PAA-genta (5,42%) et PET-PAA-EDAC-genta (5,1%). Ces résultats confirment donc la présence de la gentamicine sur les échantillons modifiés.

Par ailleurs la présence de traces de Potassium (K 2p à 292,8 eV), Chlore (Cl 2p à 198,5 eV), Phosphore (P 2p à 133,2 eV) et Sodium (Na 1s à 1071,3 eV) peut être expliquée par des lavages réalisés durant la préparation des échantillons avec une solution tampon, le PBS, composée de NaCl, KCl, Na₂HPO₄ et KH₂PO₄.

Les décompositions des spectres C 1s des textiles PET-PAA-genta et PET-PAA-EDAC-genta ont été réalisées et sont présentées dans la Figure 73 :

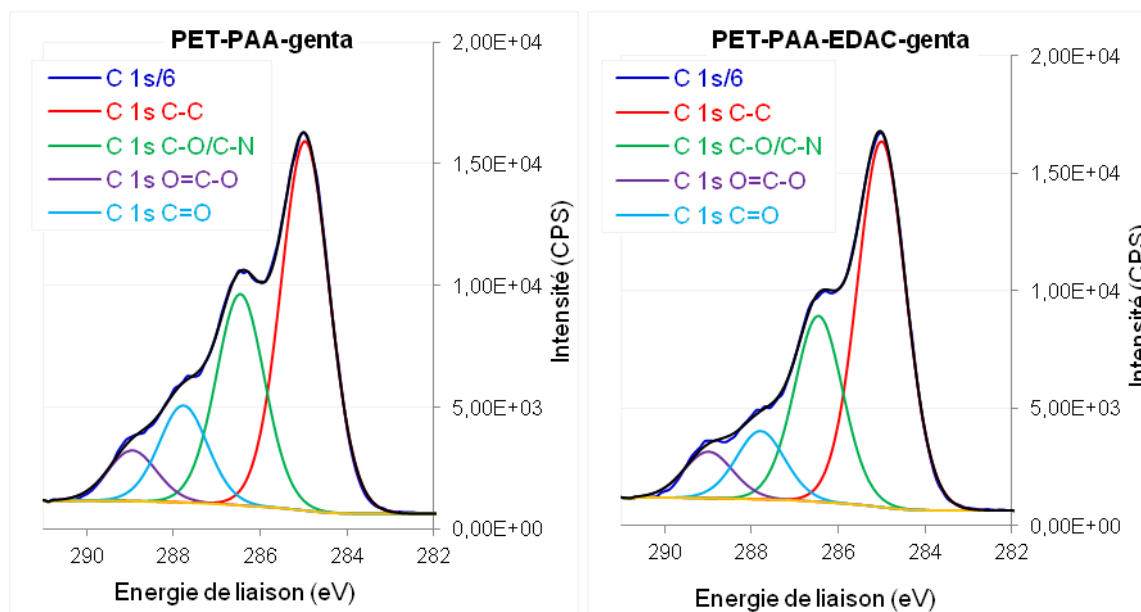


Figure 73 : La décomposition du spectre C1s pour les textiles en PET greffés PAA et modifiés par les deux méthodes d'immobilisation de la gentamicine : sans EDAC le PET-PAA-genta (gauche) et avec EDAC le PET-PAA-EDAC-genta (droite)

Dans la *Figure 73*, les décompositions des spectres C 1s montrent bien la présence des fonctions amines (pic C-O/C-N) sur les deux textiles PET-PAA-genta et PET-PAA-EDAC-genta et donc confirme bien la fonctionnalisation par la gentamicine. Par ailleurs, nous avons réalisé la décomposition du signal N 1s (401,5 eV) des deux échantillons. Les résultats sont illustrés dans le *Tableau 6*:

Tableau 6 : La décomposition du signal N 1s des échantillons modifiés par la gentamicine

Echantillon	Décomposition du N1s	
	Nom	Concentration Atomique (%)
PET-PAA-genta	N 1s NH ₃ ⁺ 401,43 eV	56,8
	N 1s NH ₂ 399,46 eV	43,2
PET-PAA-EDAC-genta	N 1s NH ₃ ⁺ 401,43 eV	51,5
	N 1s NH ₂ 399,46 eV	48,5

Le *Tableau 6* nous montre que la décomposition du signal N 1s révèle la présence des fonctions aminées sous deux formes: ioniques NH₃⁺ (N 1s NH₃⁺ à 401,43 eV) et amines

primaires NH_2 (N 1s NH_2 à 399,46 eV) et cela pour les deux types de fonctionnalisation PET-PAA-genta et PET-PAA-EDAC-genta. En effet, les compositions du signal en NH_2 et NH_3^+ montrent que la gentamicine est à 56,8 % sous la forme NH_3^+ et à 43,2 % sous la forme NH_2 pour le PET-PAA-genta, tandis que ces proportions sont respectivement de 51,5% et 48,5% pour le PET-PAA-EDAC-genta.

2.2.1.2. Quantification des fonctions amines disponibles de la gentamicine fixée.

Afin de déterminer le nombre de fonctions amines NH_2 disponibles à la surface des différents échantillons, un dosage à l'AO a été effectué. Une série d'échantillons témoins a été également dosée pour la comparaison avec le PET-genta et le PET-EDAC-genta. Les résultats sont présentés sur la *Figure 74*.

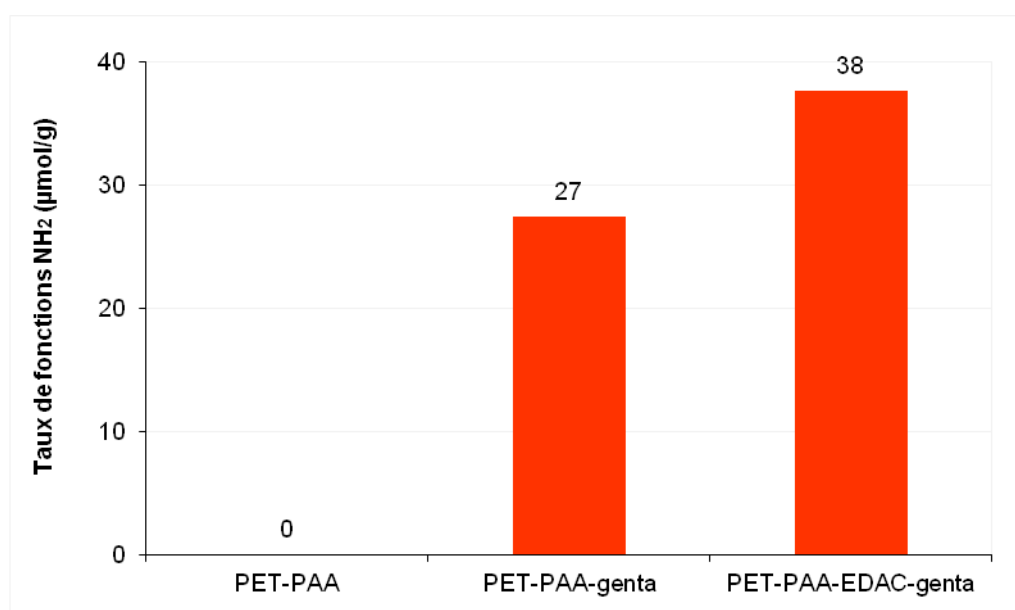


Figure 74: Nombre de fonctions NH_2 disponibles immobilisées à la surface des différents textiles en PET déterminé par dosage à l'acide orange

Les résultats de la *Figure 74* montrent que les échantillons sur lesquels la gentamicine est immobilisée via l'EDAC ont plus de fonctions amines primaires (NH_2) disponibles (37 $\mu\text{mol/g}$) à la surface (PET-PAA-EDAC-genta) que ceux sur lesquels la gentamicine est simplement adsorbée (PET-PAA-genta) (27 $\mu\text{mol/g}$). Ce test est venu confirmer la présence de la gentamicine à la surface du textile greffé PAA avec quantification des fonctions amines primaires de la gentamicine immobilisée.

Après avoir confirmé la fonctionnalisation des textiles par la gentamicine nous avons procédé à leur évaluation microbiologique.

2.2.2. Evaluation microbiologique de la fonctionnalisation par la gentamicine

Le test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la bactérie choisie *Escherichia coli* Q28CL5 a été effectué afin de déterminer l'efficacité de la gentamicine envers la bactérie. Les résultats ont montré une CMI de 1,575 mg/L.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des textiles fonctionnalisés a été réalisée par le test d'adhésion bactérienne selon la norme Française qui permet de mesurer le rayon d'inhibition des échantillons fonctionnalisés et de quantifier le nombre de bactéries ayant adhéré sur ce même échantillon après 24 heures d'incubation.

Les différentes séries d'échantillons modifiés ont été testées pour les deux types de textile : non tissé et en tulle. Les résultats de la mesure du rayon d'inhibition et de la réduction bactérienne sont présentés dans le *Tableau 7*. Le dénombrement des colonies bactériennes adhérentes est présenté sur la *Figure 75*.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des résultats du test d'adhésion bactérienne d'*Escherichia coli* sur les textiles en PET fonctionnalisés par la gentamicine : la mesure de l'halo d'inhibition et le calcul de la réduction du nombre de bactéries adhérent (Norme Française, 24 heures d'incubation)

	Rayon d'inhibition (mm)	Réduction bactérienne (UFC / mL)
PET	0	
PET-PAA	0	
PET-PAA-genta	8,5 ± 0,3	99,34 % ± 0,29
PET-PAA-EDAC-genta	7,6 ± 1	99,76% ± 0,04

Le *Tableau 7* montre que les échantillons fonctionnalisés avec la gentamicine par simple adsorption (PET-PAA-genta) ou par immobilisation via le carbodiimide (PET-PAA-EDAC-genta) sont les seuls qui possèdent des rayons d'inhibition bactérienne significatifs respectivement de 8,5 mm et 7,6 mm. Ce résultat montre donc l'efficacité des textiles

fonctionnalisés à la gentamicine (PET-PAA-genta et PET-PAA-EDAC-genta) à inhiber la prolifération bactérienne autour des différents échantillons.

Le dénombrement des bactéries qui ont adhéré sur les différentes surfaces est présenté sur la *Figure 75* :

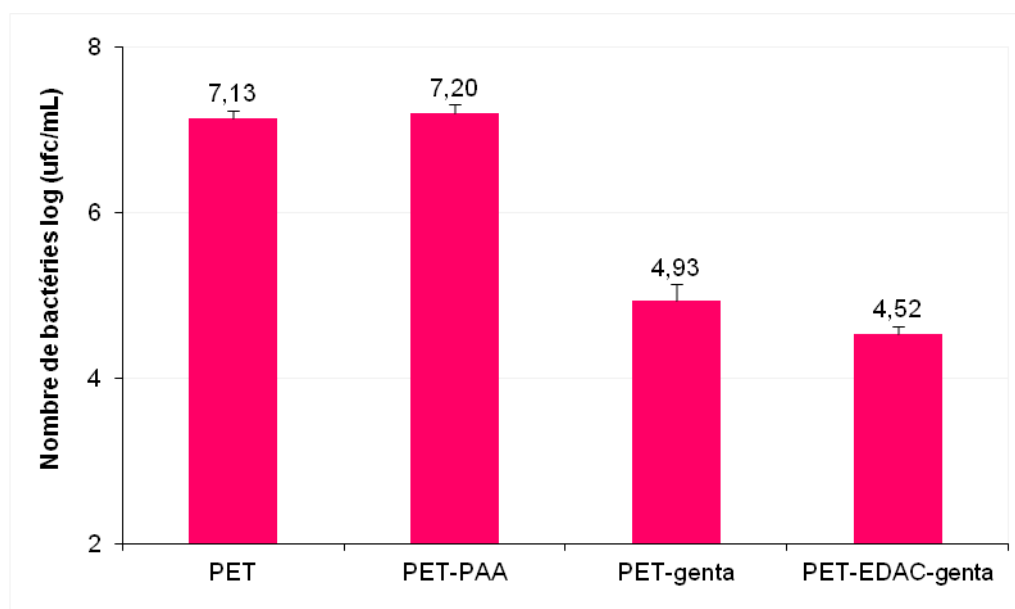


Figure 75 : Nombre d'unité formant colonies (ufc) de bactéries *Escherichia coli* ayant adhéré sur les textiles avec ou sans greffage du PAA et fonctionnalisés par la gentamicine avec ou sans carbodiimide (Norme Française)

Dans la *Figure 75*, nous pouvons remarquer l'efficacité antibactérienne des échantillons fonctionnalisés à la gentamicine surtout pour les échantillons greffés PAA puis fonctionnalisés à la gentamicine. Une diminution de l'adhésion bactérienne a été déterminée pour le PET-PAA-genta (4,93 ufc/mL) et pour le PET-PAA-EDAC-genta (4,52 ufc/mL) par rapport aux textiles vierges (7,13 ufc/mL) grâce à la fonctionnalisation avec la gentamicine. Le calcul de la réduction bactérienne montre une diminution importante pour les deux textiles préparés par les deux méthodes de fonctionnalisation : soit (99,34 % \pm 0,29) pour le PET-PAA-genta et (99,76% \pm 0,04) pour le PET-PAA-EDAC-genta. Au vu de ces résultats nous pouvons conclure que les échantillons fonctionnalisés par la gentamicine via le carbodiimide (PET-PAA-EDAC-genta) sont les plus actifs.

En conclusion, la fonctionnalisation des textiles par la gentamicine et leur efficacité antibactérienne contre les bactéries *Escherichia coli* a été prouvée par les tests d'évaluation microbiologique, que la fixation se fasse par simple absorption ou par utilisation d'un

carbodiimide (EDAC). Ce test a permis de montrer l'efficacité des supports pour réduire l'adhésion bactérienne d'une part et pour inhiber la prolifération bactérienne d'une autre part. Cette étude a montré que la molécule n'a pas été affectée par la technique d'immobilisation à la surface du textile par liaison covalente en comparaison avec celle par adsorption.

L'immobilisation de la gentamicine selon les deux techniques de modification de surface est une méthode efficace pour lutter contre les infections des différents textiles biomédicaux telles que les plaques d'éventration, les prothèses vasculaires, etc...

2.3. Immobilisation du lysozyme

Cette immobilisation a été réalisée sur des échantillons de textiles greffés par du PAA. Des caractérisations par IRTF, ATG, AE, XPS des échantillons modifiés ont été réalisées pour mettre en évidence la fixation du lysozyme.

2.3.1. Immobilisation du lysozyme par la « voie 1 »

La méthode d'immobilisation du lysozyme est similaire à celle de l'héparine, elle est basée sur l'activation des fonctions acide carboxyliques du PAA via un carbodiimide (EDAC). Les deux types de textile ont été testés : le non tissé et le tulle. Les résultats présentés ici concernent les textiles en tulle (les résultats sont identiques pour les textiles non tissés).

2.3.1.1. Caractérisations de l'immobilisation du lysozyme

2.3.1.1.1. Caractérisation de la fixation par infrarouge IRTF

Les analyses Infrarouge IRTF ont été réalisées pour le PAA, le lysozyme, le PET vierge, le PET greffé PAA (PET-PAA) et les textiles modifiés par le lysozyme via le carbodiimide EDAC (PET-PAA-EDAC-lys). Le spectre IR du lysozyme est présenté sur la *Figure 76* et la superposition des spectres IR des différents échantillons est présentée dans la *Figure 77*. Nous avons également effectué des agrandissements des spectres IR dans la *Figure 78*.

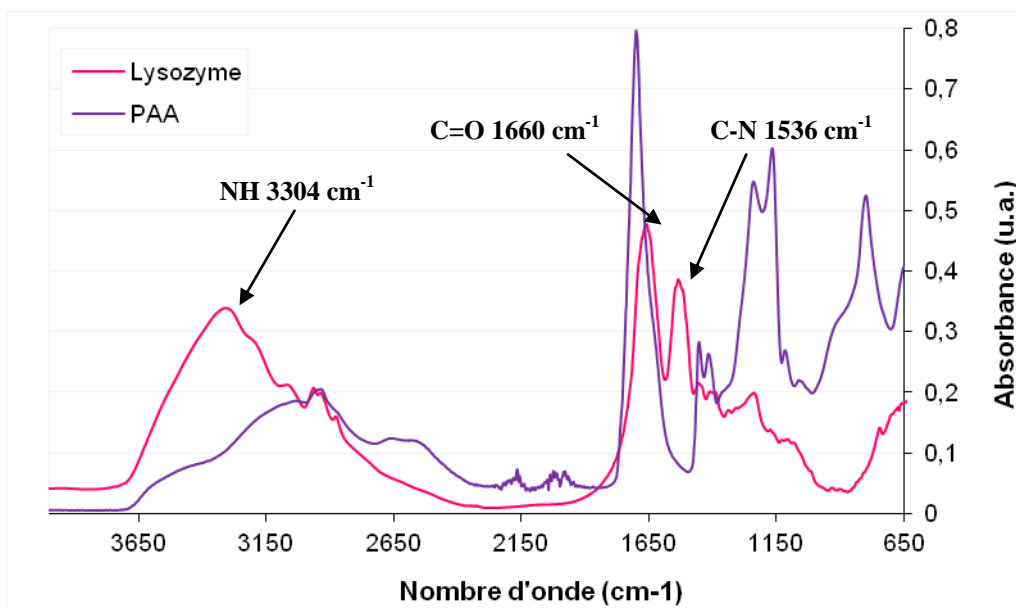


Figure 76 : Spectre Infrarouge du lysozyme réalisé sur pastille de KBr

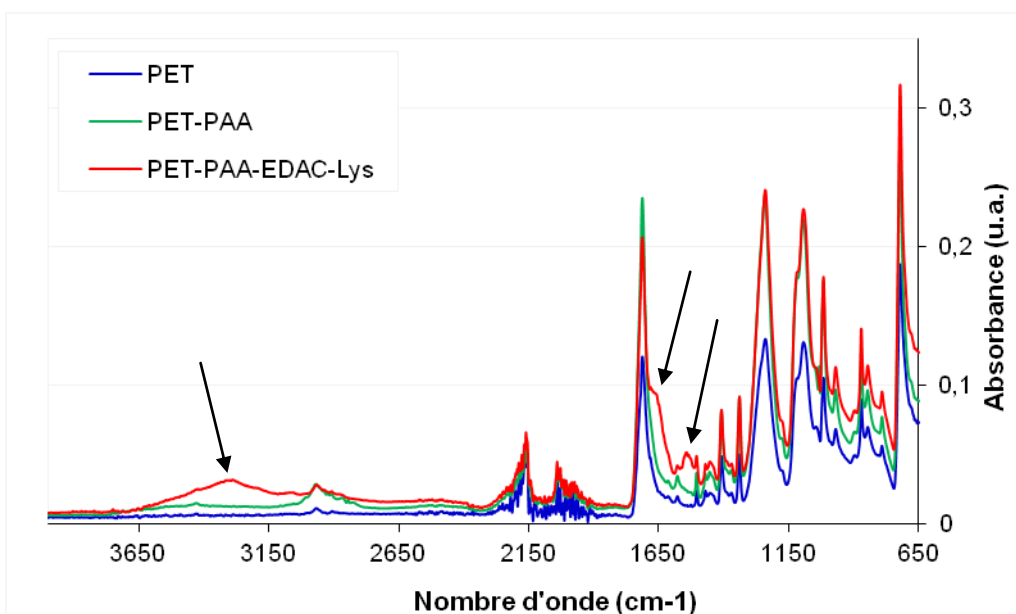


Figure 77: La superposition des spectres IR -ATR des textiles en PET vierge, greffé PAA et modifié au lysozyme

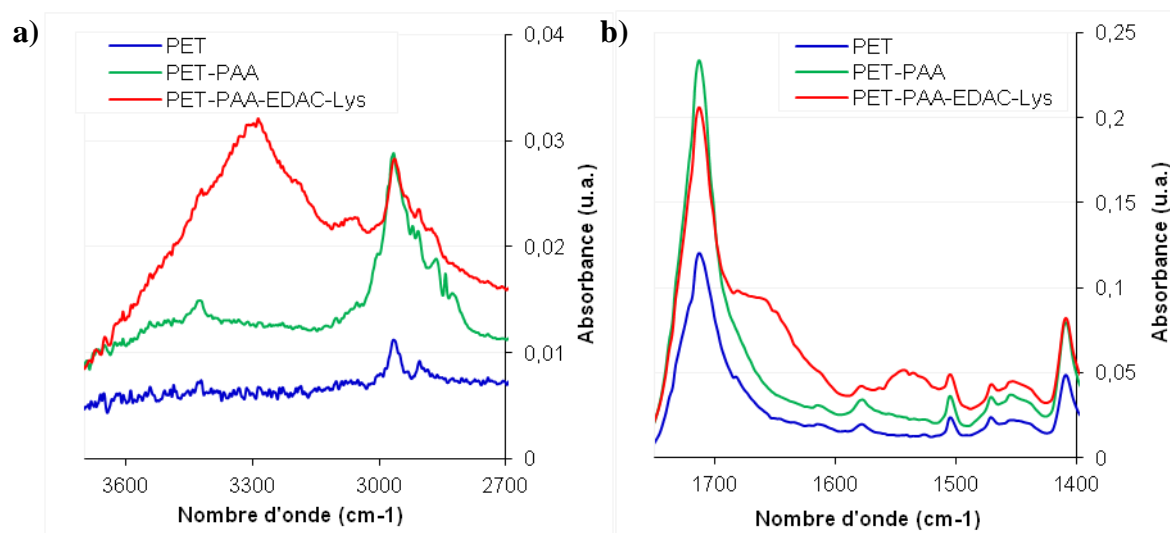


Figure 78 : Agrandissements (a), (b) du spectre infrarouge représentant la fixation du lysozyme

Dans la *Figure 76*, nous constatons que le lysozyme possède deux bandes d'absorption à 1660 cm^{-1} correspondant à la liaison C=O et 1536 cm^{-1} correspondant à la liaison C-N caractéristiques des liaisons acides aminés. Sur l'agrandissement *Figure 78 b*), nous remarquons les mêmes bandes uniquement sur le spectre du PET-PAA-EDAC-lys correspondant aux liaisons amides du lysozyme.

Nous observons le même phénomène à 3300 cm^{-1} , où le lysozyme seul présente une large bande de forte intensité entre 3000 et 3600 cm^{-1} qui correspond à la fois à la présence de groupements OH, de groupements NH_2 mais également à des liaisons amides précédemment évoquées. Nous pouvons de nouveau observer que seul le spectre du PET-PAA-EDAC-lys présente une bande d'absorption à cet endroit. Ces deux agrandissements nous permettent d'observer la fixation du lysozyme sur le support PET.

En conclusion, l'analyse infrarouge confirme bien la fixation du lysozyme sur le support PET.

Par ailleurs, une caractérisation par ATG a été également réalisée sur toutes les séries d'échantillons (résultats non présentés ici), aucune différence n'a été observée, ceci peut être expliqué par une faible quantité de lysozyme non détectable par cette technique.

2.3.1.1.2. Caractérisation de la fixation du lysozyme par analyse élémentaire

Trois séries ont été caractérisées, le PET vierge, PET-PAA, PET-PAA-EDAC-lys. Pour les échantillons modifiés avec le lysozyme nous avons recherché les éléments C, O et N.

Tableau 8: Pourcentage en masse des éléments analysés sur les échantillons de PET modifiés par le lysozyme

Analyse élémentaire (% en masse)			
Eléments	PET	PET-PAA	PET-PAA-EDAC-lys
C	61,92	61,35	61,85
O	33,69	33,80	31,90
S	*	*	<0,20
N	*	*	<0,30

Malheureusement, le seuil de détection de l'azote n'est pas atteint pour le PET-PAA-EDAC-lys. Néanmoins, lorsque les échantillons en PET greffés PAA (PET-PAA) sont comparés avec le PET-PAA-EDAC-lys, la proportion en carbone augmente et celle en oxygène diminue, ce qui révèle qu'un composé autre que le PAA présent sur l'échantillon.

2.3.1.1.3. Caractérisation de la fixation du lysozyme par XPS

L'immobilisation du lysozyme à la surface du textile a été caractérisée par des analyses XPS. La caractérisation a été réalisée sur les échantillons PET-PAA-EDAC-lys, en utilisant le PET vierge et le PET-PAA comme témoins. Les spectres XPS des différents échantillons sont présentés dans la *Figure 79*. La composition chimique des éléments présents sur chaque échantillon est répertoriée dans le *Tableau 9*.

* Élément non recherché

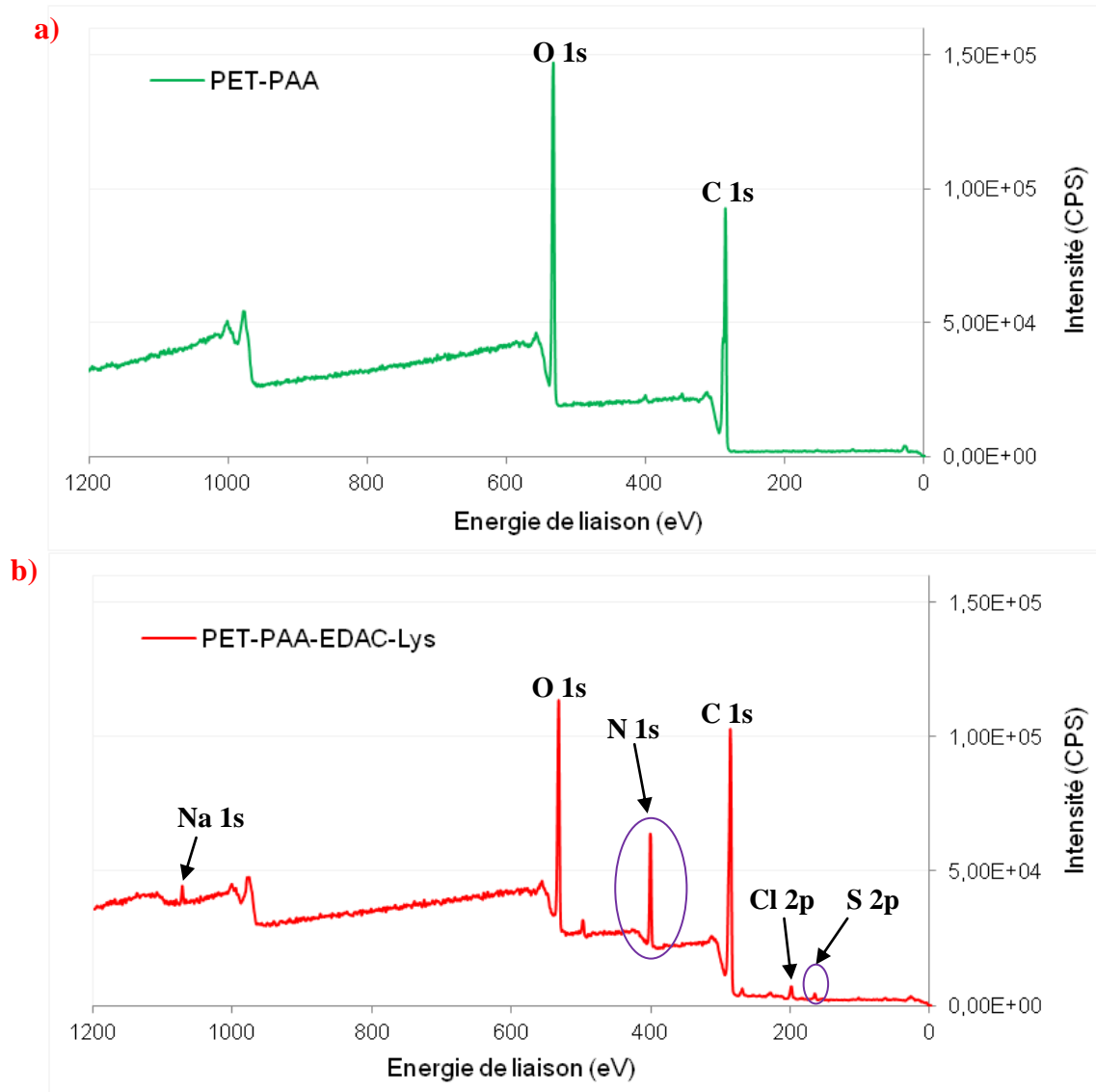


Figure 79 : Spectre d'XPS du textile en PET greffé PAA modifié par l'immobilisation du lysozyme

Tableau 9: Concentration atomique obtenue par XPS à partir des surfaces de PET, PET greffé PAA et PET modifié par le lysozyme

Echantillon	XPS : Concentration Atomique (%)					
	C 1s 285 eV	O 1s 531,8 eV	N 1s 400 eV	S 2p 163,9eV	Na 1s 1071,5 eV	Cl 2p 197,9 eV
PET	75,55	23,96	0	0	0	0
PET-PAA	70,94	27,7	0,72	0	0	0
PET-PAA-EDAC-lys	69,23	15,84	12,75	0,66	0,38	0,92

Dans le *Tableau 9*, la composition du spectre XPS montre qu'après l'immobilisation du lysozyme sur le textile greffé PAA (PET-PAA-EDAC-lys) la teneur en azote augmente de (12,75%) et le soufre (S 2p à 163,9 eV) apparaît en faible quantité (0,66%).

Par ailleurs, l'augmentation du signal de l'azote est prouvée sur le spectre XPS de l'échantillon présenté dans la *Figure 79 c)*. La présence de l'azote et du soufre correspond donc bien à la composition du lysozyme principalement en acide aminé et quelques ponts disulfures entre les chaînes peptidiques provenant de la cystéine.

La détection des traces du sodium (Na 1s à 1071,5 eV) et de chlore (Cl 2p à 197,9 eV) est expliquée par le fait que les échantillons préparés sont lavés avec une solution de Na Cl.

Afin de déterminer le changement des fonctions à la surface du PET-PAA-EDAC-lys, le spectre C1s est analysé. Les décompositions du spectre C1s des textiles PET-PAA et PET-PAA-EDAC-lys sont présentées dans les *Figure 80 a) et b)* :

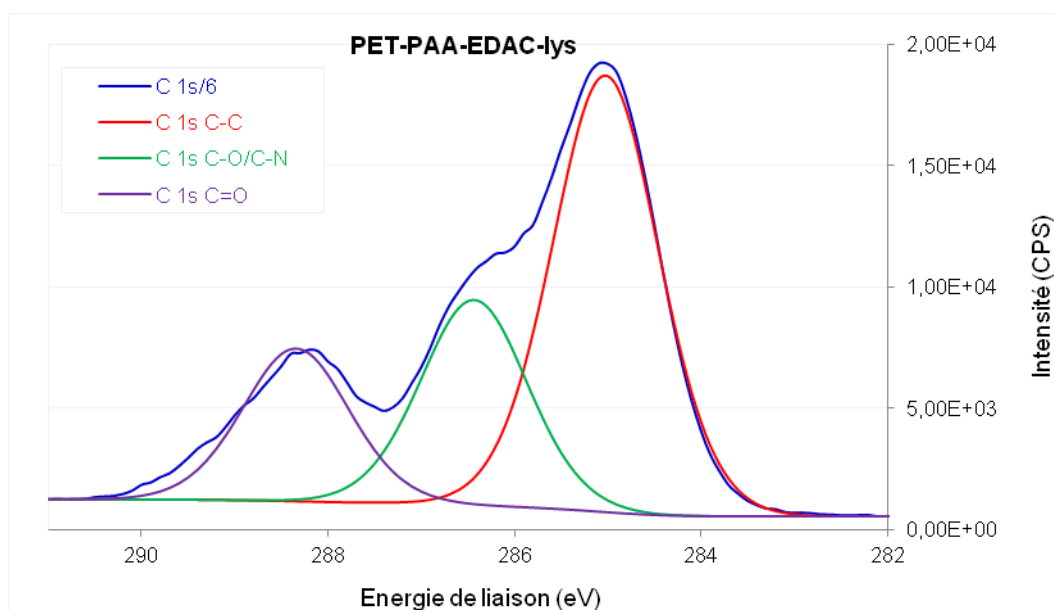


Figure 80 : La décomposition du spectre C 1s de l'analyse en XPS réalisée pour les textiles (a) en PET fonctionnalisé par le lysozyme (PET-PAA-EDAC-lys)

La *Figure 80* montre que le spectre C1s est décomposé aux composants existants. Le pic à 285,02 eV correspond aux groupements C-C et le pic à 286,43 eV représente les groupements C-O et C-N. Les différentes concentrations atomiques sont illustrées dans le *Tableau 10*.

Tableau 10 : Concentration atomique du spectre C1s décomposé en C-C et C-O/C-N pour la surface du PET greffé PAA (PET-PAA) et PET fonctionnalisé par le lysozyme (PET-PAA-EDAC-lys)

Echantillon	XPS: Concentration atomique (%)	
	C 1s C-C 285,02 eV	C 1s C-O/C-N 286,43 eV
PET-PAA	54,09	12,48
PET-PAA-EDAC-lys	54,88	25,85

Les résultats présentés dans La Figure 80 et le Tableau 10 montrent l'augmentation de la composition du pic C-O/C-N pour le PET-PAA-EDAC-lys 25,85% par rapport à 12,48% pour le PET-PAA. Ce résultat peut confirmer la présence des fonctions amines et amides correspondant à la présence du lysozyme. La diminution des groupements carbonyles et acide carboxylique peut être expliquée par la formation davantage des groupements amides et la présence des groupements amines du lysozyme.

En conclusion, les analyses en XPS confirment bien la fonctionnalisation de la surface des textiles par le lysozyme.

2.3.1.2. Evaluation microbiologique

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne du lysozyme immobilisé. Différents tests ont été réalisés sur les échantillons greffés PAA puis modifiés par le lysozyme (PET-PAA-EDAC-lys) en conservant toujours comme témoins le textile vierge (PET) et le textile greffé PAA (PET-PAA).

2.3.1.2.1. Influence de l'immobilisation du lysozyme sur l'adhésion bactérienne

Les tests d'adhésion bactérienne ont été réalisés selon la norme Japonaise. Tous les échantillons ont été stérilisés à l'alcool pendant 5 min et les échantillons ont été testés sur la bactérie *Staphylococcus aureus*. Les résultats sont présentés dans la Figure 81.

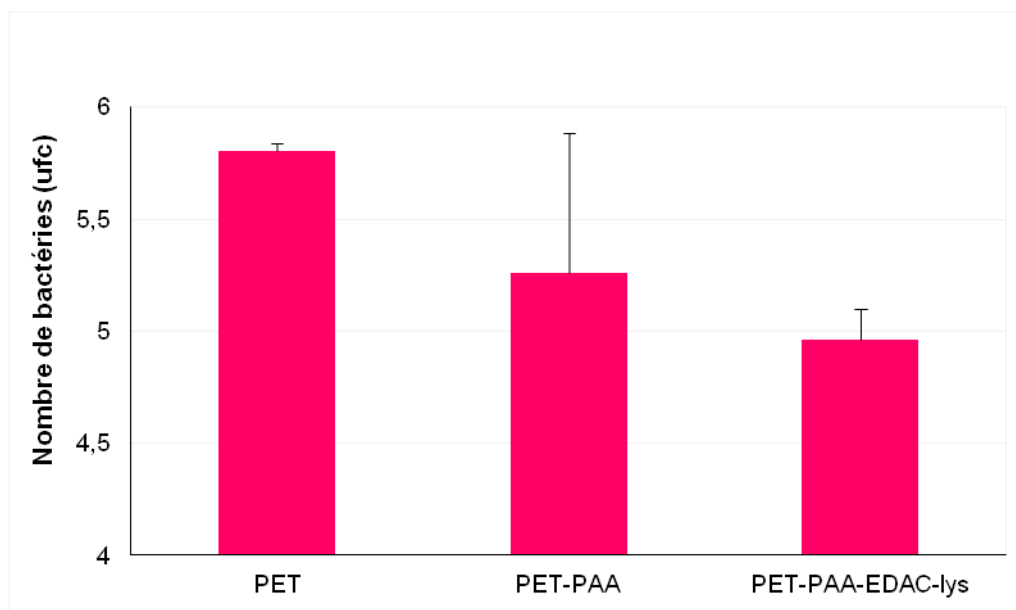


Figure 81 : Nombre d'unité formant colonies (ufc) de bactéries ayant adhéré sur les différents textiles du non tissé, avec ou sans immobilisation du lysozyme, Norme Japonaise

Pour le PET-PAA, les résultats sont positifs car nous constatons une diminution d'environ un demi-log du nombre de bactéries adhérees. Le calcul de la réduction bactérienne par rapport au textile vierge nous révèle une baisse de la population bactérienne en greffant uniquement le PAA. Comme déjà présenté dans le chapitre 2, le caractère acide du support inhibe le développement de ces bactéries ce qui explique cette diminution.

Néanmoins, ces résultats sont beaucoup moins significatifs que ceux des échantillons sur lesquels le lysozyme est immobilisé. Pour le PET-PAA-EDAC-lys, les résultats montrent une diminution d'environ un log par rapport au support vierge. Nous supposons que ce support inhibe la croissance bactérienne grâce à un double effet: l'acidité du support (avec les fonctions acide qui n'ont pas réagi) et le rôle antibactérien du lysozyme.

Toutefois, l'ampleur de la réduction du taux de colonies (de l'ordre d'une unité log) ne nous permet pas de qualifier ce support d'antibactérien. Cette faible efficacité antibactérienne des échantillons modifiés par le lysozyme peut être expliquée par une trop faible quantité de lysozyme immobilisée à la surface du textile et qu'elle n'est pas suffisante pour inhiber l'adhésion la bactérie *Staphylococcus aureus* qui est elle-même relativement résistante au lysozyme (la CMI est de 500 mg/ L relativement très élevée).

2.3.2. Immobilisation du lysozyme par la « voie 2 » : via un bras espaceur

Cette fois l'immobilisation est basée sur l'idée de greffer un agent espaceur sur le PAA greffé à la surface, ce qui, selon la littérature, facilitera à la fois la fixation de la molécule bioactive et sa biodisponibilité

Pour cela le greffage du bNH₂PEG a été réalisé sur les textiles en PET afin de donner à la surface de nouvelles fonctionnalités permettant l'immobilisation des peptides. L'étude a donc été optimisée sur les textiles greffés PAA (PET-PAA-NPEG) en ajoutant comme témoin le textile greffé PAA (PET-PAA). Cette étude a été réalisée pour les deux types de textile, le non tissé et le tulle. Etant donné que les résultats sont presque similaires, nous ne présenterons dans la suite que les résultats relatifs au tulle.

2.3.2.1. Caractérisation du greffage de l'agent espaceur

Afin de suivre la fonctionnalisation de la surface, un dosage à l'acide orange (AO) a été réalisé pour déterminer le nombre de fonctions amines primaires (NH₂) créées, ainsi qu'un dosage au TBO permettant de déterminer le nombre de fonctions acide carboxylique restantes. Les résultats du dosage à l'AO et les résultats du dosage au TBO sont présentés respectivement sur les *Figure 82 a)* et *b)*.

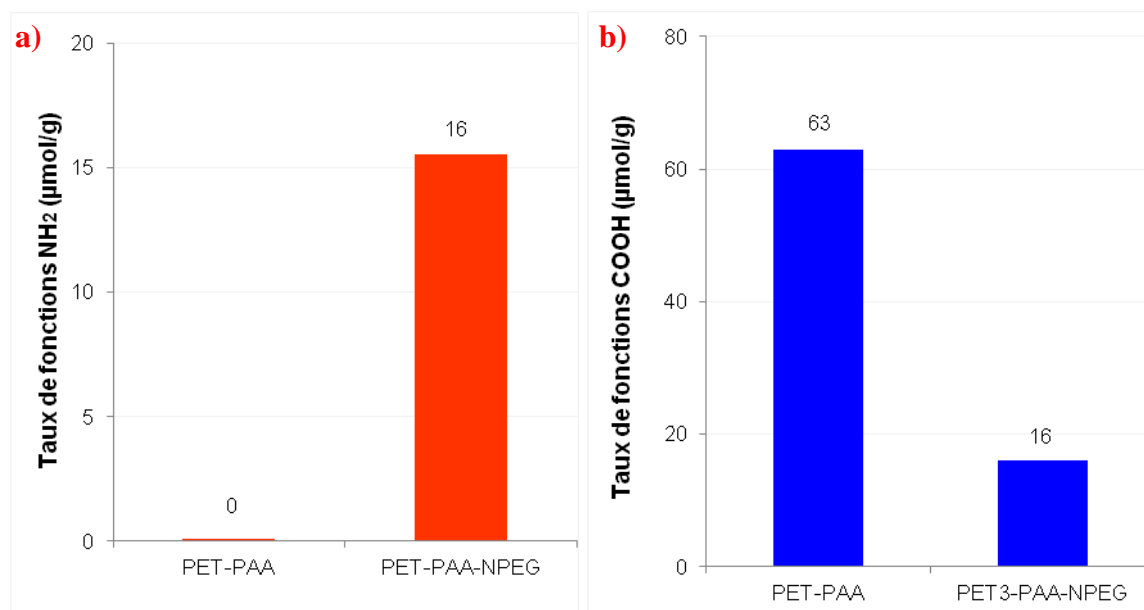


Figure 82 : Quantification du nombre de fonctions amines primaires créées dosées par AO (a) et du nombre de fonctions acide carboxyliques restants dosées par TBO (b) suite au greffage du bNH₂PEG à la surface du textile en PET greffé PAA

Le résultat du dosage par l'AO des fonctions amines primaires présenté dans la *Figure 82 a)* montre en comparant avec le PET-PAA (0 µmol/g), la fonctionnalisation de la surface par 16 µmol/g en taux de fonctions amines primaires provenant de bNH₂PEG greffé. Les résultats confirment bien la fonctionnalisation de la surface par le bNH₂PEG.

Le dosage au TBO (*Figure 82 b)*) a de son côté bien prouvé cette fixation. La diminution du nombre de fonctions acide carboxyliques sur le textile de 63 µmol/g (PET-PAA) à 16 µmol/g montre bien l'engagement des fonctions COOH dans la réaction avec les fonctions NH₂ du bNH₂PEG pour la formation de liaisons amides avec le support.

Par ailleurs, cette diminution du nombre de fonctions COOH nous permet d'imaginer que le greffage du bNH₂PEG ne s'effectue pas 1 par 1 mais qu'une molécule bNH₂PEG peut être greffée à la surface du PET fonctionnalisé au COOH via ces deux fonctions amines. Le schéma présenté à la *Figure 83* montre les deux possibilités de greffage du bNH₂PEG à la surface du PET greffé au PAA.

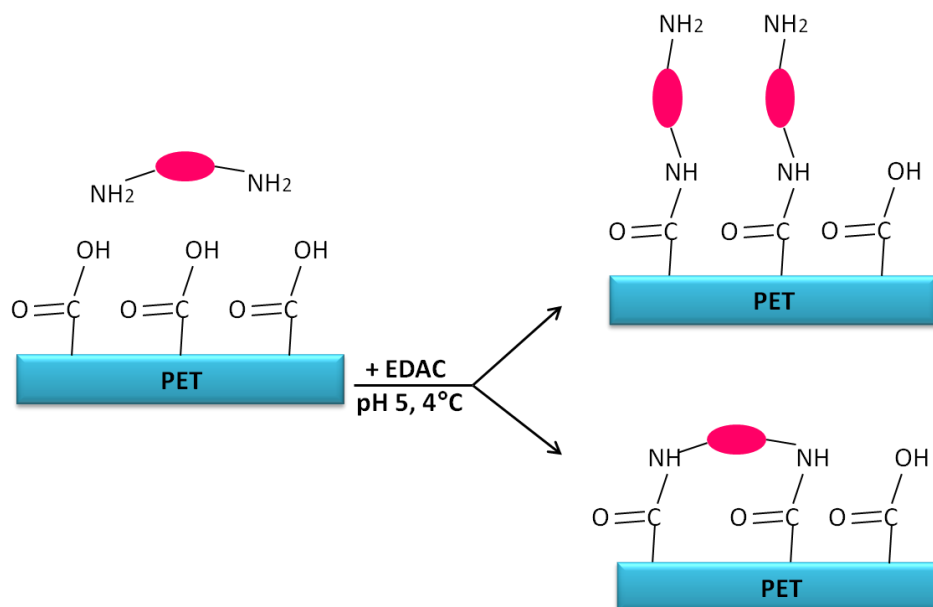


Figure 83 : Les possibilités du greffage du bNH_2PEG sur le textile en PET greffé au PAA

Ces échantillons préparés sont ensuite utilisés pour l'immobilisation du lysozyme.

2.3.2.2. Caractérisation de la fixation du lysozyme

Les échantillons préparés greffés PAA et fonctionnalisés par le bNH_2PEG ont été utilisés pour l'immobilisation du lysozyme. Des caractérisations ont été réalisées sur le lysozyme seul, le PET vierge, PET-PAA, PET-PAA-NPEG et PET-PAA-NPEG-lys.

Bien que les spectres IRTF ne montrent pas de différences particulières, la caractérisation par ATG du PET-PAA-NPEG-lys montre une légère différence avec les ATG des autres échantillons. La superposition des courbes des différentes séries est présentée dans la *Figure 84*.

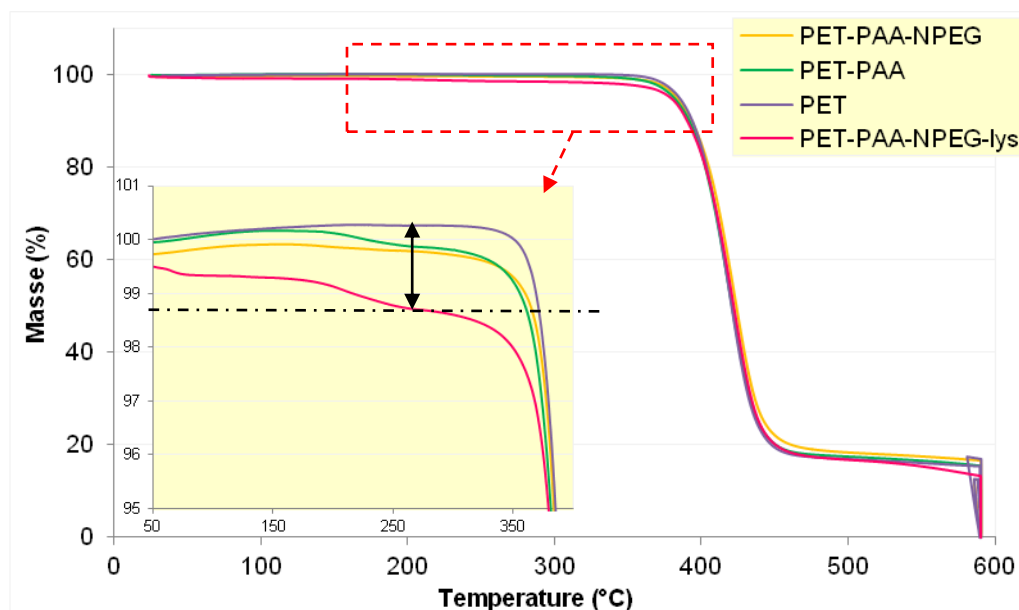


Figure 84 : Courbes ATG du PET vierge, du lysozyme et des échantillons greffés PAA puis bNH_2PEG et modifiés par le lysozyme Agrandissement des courbes ATG du PET vierge et des échantillons greffés PAA puis bNH_2PEG et modifiés par le lysozyme

L'agrandissement des courbes ATG présenté dans la *Figure 84* montre que le textile greffé PAA, fonctionnalisé par le bNH_2PEG puis le lysozyme (PET-PAA-NPEG-lys) est le plus démarqué du reste des échantillons. La courbe montre une dégradation plus décalée du textile modifié qui correspond à la dégradation du lysozyme de presque 1,5% en masse.

D'autre part, nous pouvons remarquer un très léger décalage de dégradation des textiles greffés au PAA (PET-PAA) et au bNH_2PEG (PET-PAA-NPEG) qui correspond à la dégradation respective du PAA et du bNH_2PEG .

Cette étude a donc confirmée que l'utilisation d'un bras espaceur permet l'immobilisation du lysozyme. Il reste cependant à vérifier l'effet de cet agent espaceur sur la biodisponibilité de la molécule bioactive immobilisée par cette voie.

2.4. Conclusion

Après la fonctionnalisation de la surface des textiles en PET par les fonctions acide carboxyliques, l'immobilisation de différentes molécules bioactives a été recherchée dans cette deuxième étude. Le but est de créer une surface de propriétés améliorées soit

anticoagulante par l'héparine ou antibactérienne par la gentamicine ou le lysozyme. Pour la fixation des biomolécules, la caractérisation s'est déroulée en plusieurs étapes.

Dans une première étude, la fixation de l'héparine a été montrée et l'efficacité anticoagulante a été prouvée. Le test de coagulation montre une propriété anticoagulante du textile modifié jusqu'à plus que 50 min du temps de contact avec le sang tandis que le sang coagule juste après 5 min du contact avec le textile vierge.

Dans une deuxième étude, l'immobilisation de la gentamicine réalisée sur les textiles par deux techniques avec ou sans carbodiimide a été confirmée par l'analyse en XPS et le dosage en acide orange. Le test d'adhésion bactérienne réalisé sur la bactérie *Escherichia coli* a permis de montrer donc l'efficacité antibactérienne des supports par la diminution de l'adhésion bactérienne d'une part et l'inhibition de la prolifération bactérienne d'une autre part. L'inhibition de la prolifération bactérienne autour des textiles immobilisés sans ou avec le carbodiimide a été prouvé par la mesure des rayons d'inhibition bactérienne de 8,5 mm et 7,6 mm respectivement. Le dénombrement du nombre des bactéries adhérant à la surface a montré une réduction bactérienne significative de 99,34 % et 99,76% respectivement pour les textiles modifiés par la gentamicine sans ou avec le carbodiimide.

Dans une troisième étude, l'immobilisation du lysozyme a été réalisée selon deux voies : voie 1 dit 'direct' et voie 2 dit avec 'bras espaceur'. Il est nécessaire de noter que dans cette étude le lysozyme est considéré comme modèle des peptides antibactériens dans le but d'avoir une alternative de remplacement des antibiotiques qui sont de plus en plus déconseillés pour les traitements des infections à cause de leurs contre indications.

Pour la 'voie 1', le principe est basé sur la réaction entre les fonctions carboxyles du textile greffé PAA et les fonctions amines du lysozyme via le carbodiimide. La fixation a été bien prouvée par analyse IRTF et XPS. Néanmoins, une légère efficacité antibactérienne mesurée par le test d'adhésion bactérienne a été observée. Le calcul du nombre de bactéries adhérant à la surface du textile modifié montre une diminution de moins de 1 log par rapport au textile vierge ce qui ne permet pas qualifier le textile d'antibactérien.

Pour l'immobilisation par voie 2, nous avons réalisé un greffage d'un agent espaceur le bNH_2PEG contenant des fonctions amines sur les textiles greffés au PAA. Ce bras espaceur a été servi pour effectuer l'immobilisation du lysozyme. L'analyse en ATG a montré un

greffage d'environ 1% en masse du lysozyme à la surface du textile. Néanmoins, il reste à déterminer l'efficacité antibactérienne de ces derniers textiles modifiés.

3. Approche du greffage "par foulardage" selon un plan d'expériences

Le greffage de l'acide polyacrylique par méthode 'en solution' est basé sur une polymérisation en solution où la reproductibilité du greffage est très influencée par certains paramètres très sensibles: la température relativement élevée (80°C), la vitesse d'agitation des échantillons, le barbotage d'azote ainsi que la durée de la réaction est relativement longue (4 heures). Afin d'éviter ces problématiques, nous avons procédé à une deuxième méthode de greffage dite 'par foulardage' cette méthode est basée sur la polymérisation et la réticulation de l'acide acrylique sous effet du plasma à 100% d'argon.

Comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes, différents paramètres peuvent influencer le taux de greffage du PAA et l'aspect d'enrobage du textile : la concentration de l'acide acrylique, le temps d'imprégnation dans la solution, le débit de l'argon, la puissance et le temps du traitement plasma froid. Afin d'optimiser et étudier l'influence de ces paramètres, un plan d'expérience a été mis en place.

Visant l'application médicale dans notre étude, le but est de réaliser un textile qui possède à la fois un nombre de fonctions acides carboxyliques COOH suffisant pour l'immobilisation des molécules bioactives et une cytocompatibilité indispensable. Le test de vitalité cellulaire réalisé sur les cellules L132, nous a montré qu'un textile en tulle greffé à 80 $\mu\text{mol/g}$ (AA - 2.5M) est cytocompatible.

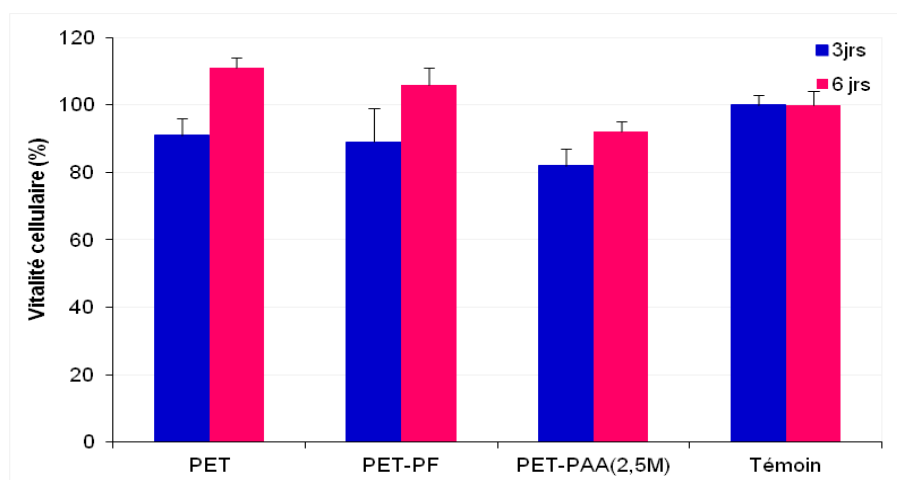


Figure 85 : Vitalité cellulaire des cellules épithéliales L132 sur les textiles en tulle vierges, traité plasma froid (Ar/O₂ (85/15), 120 s, 300 watts) et greffés à l'acide polyacrylique (2,5M, 80°C, 4 h)

Par ailleurs, un enrobage homogène des fibres textiles est recherché lors de cette étude. Un plan d'expériences a été réalisé afin de déterminer les paramètres de greffage en minimisant le nombre d'expériences. L'évaluation se fait par rapport à la densité de fonctions acides carboxyliques COOH et l'aspect de la surface du textile.

3.1. Evaluation de l'enrobage

Remarquons que le textile possède deux types de fils : 'tricotés' et 'simples' (Figure 86).

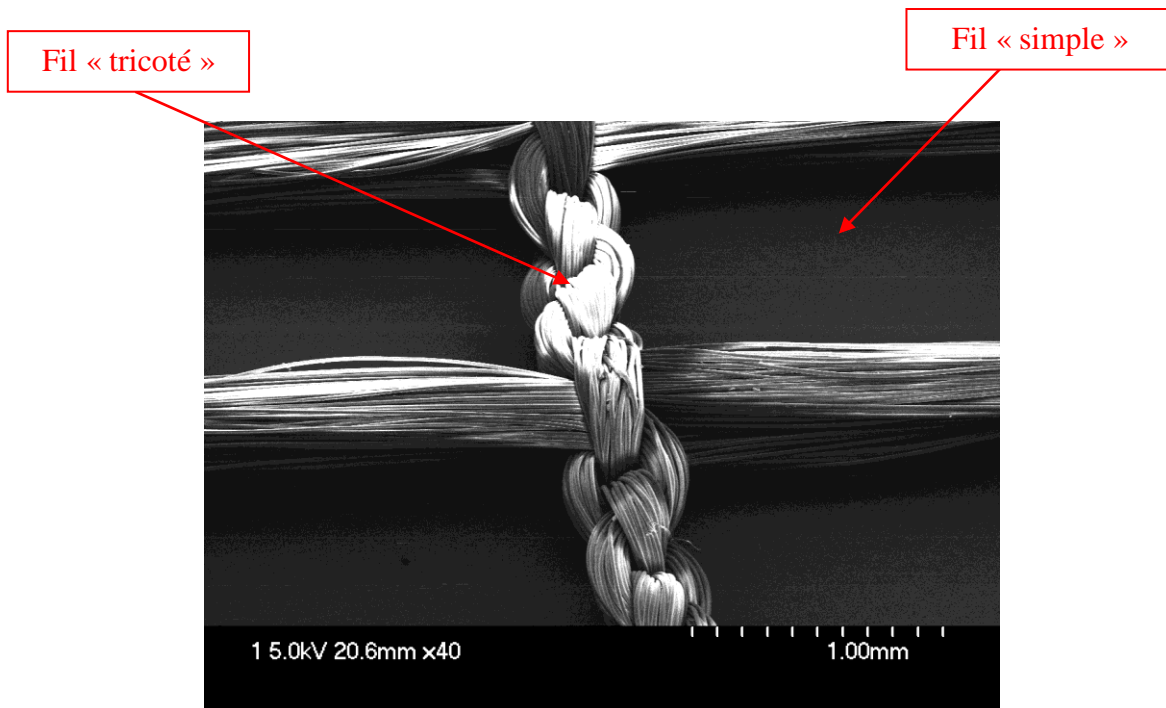


Figure 86 : Image MEB du textile en PET en tulle vierge : présentation des deux types de fils 'tricotés' et 'simples'

Afin d'évaluer l'enrobage des différents échantillons, une échelle de l'aspect de l'enrobage des fibres tricotées allant de 0 à 5 a été mise en place Figure 87 :

- **Enrobage 0** attribué au textile vierge (sans greffage) (Figure 87-0).
- **Enrobage 1** : présence d'un revêtement de PAA très fin dans quelques zones des fibres (Figure 87-1)
- **Enrobage 2** : très fine couche homogène du PAA sur les fibres (Figure 87- 2).

- **Enrobage 3** : un enrobage plus remarquable des fibres avec la formation du polymère entre les fibres sous forme de filaments fins (*Figure 87-3*).
- **Enrobage 4** : un enrobage des fibres par des couches denses de PAA est observé avec du polymère (*Figure 87- 4*).
- **Enrobage 5**, une couche de PAA très dense recouvre les fibres et bouche les interstices entre les fibres (*Figure 87-5*)

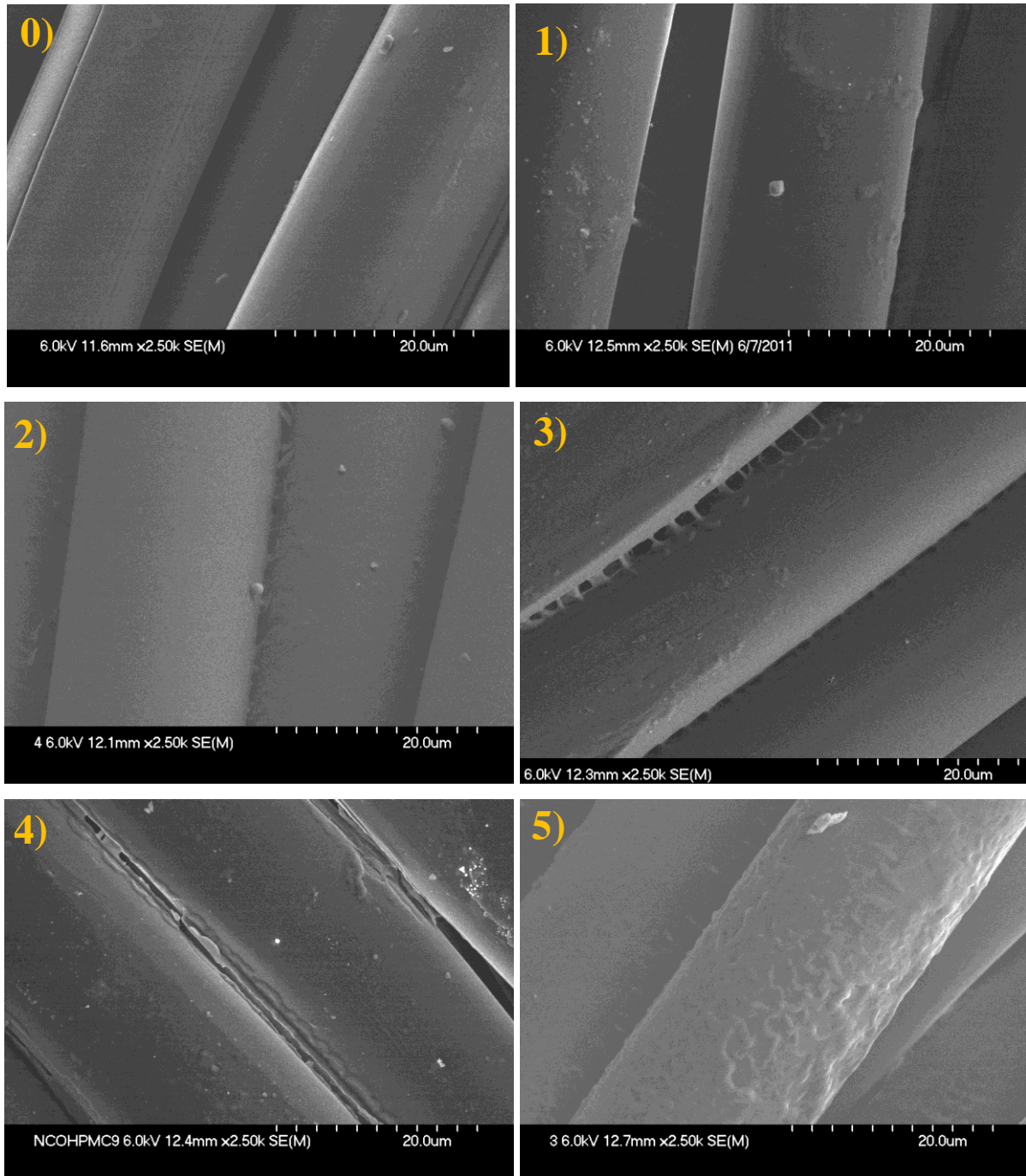


Figure 87 : Photos MEB permettant d'illustrer l'échelle de 0 à 5 de l'enrobage réalisé sur les fils tricotés du tulle greffé par PAA.

L'enrobage homogène (**enrobage 5**) ainsi qu'un taux de greffage de fonctions COOH ne dépassant pas $80 \mu\text{mol/g}$ sont donc souhaités pour l'optimisation de cette étude.

3.2. Résultats obtenus grâce au plan d'expériences

Les vingt-neuf expériences réalisées et les résultats expérimentaux sont présentés dans le *Tableau 11*. Chaque expérience a été réalisée 6 fois afin de déterminer le taux de greffage moyen et l'écart-type correspondant.

Tableau 11 : Matrice d'expériences et résultats obtenus pour le greffage du PAA sur le textile en tulle pour les 2 réponses : Taux de greffage (Y_1) et Enrobage des fibres (Y_2)

Expériences	Variables codées					Variables naturelles					Taux de greffage Y_1 ($\mu\text{mol/g}$)	Enrobage Y_2
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	U1	U2	U3	U4	U5		
1	-1	-1	-1	-1	1	40	200	247	213	8	79 ± 68	2
2	1	-1	-1	-1	-1	80	200	247	213	4	22 ± 3	2
3	-1	1	-1	-1	-1	40	400	247	213	4	24 ± 4	2
4	1	1	-1	-1	1	80	400	247	213	8	17 ± 1	1
5	-1	-1	1	-1	-1	40	200	683	213	4	55 ± 5	3
6	1	-1	1	-1	1	80	200	683	213	8	30 ± 4	3
7	-1	1	1	-1	1	40	400	683	213	8	37 ± 4	1
8	1	1	1	-1	-1	80	400	683	213	4	37 ± 4	3
9	-1	-1	-1	1	-1	40	200	247	537	4	43 ± 2	3
10	1	-1	-1	1	1	80	200	247	537	8	26 ± 5	3
11	-1	1	-1	1	1	40	400	247	537	8	42 ± 7	2
12	1	1	-1	1	-1	80	400	247	537	4	24 ± 1	1
13	-1	-1	1	1	1	40	200	683	537	8	41 ± 8	3
14	1	-1	1	1	-1	80	200	683	537	4	36 ± 9	4
15	-1	1	1	1	-1	40	400	683	537	4	39 ± 6	3
16	1	1	1	1	1	80	400	683	537	8	48 ± 7	4
17	-2	0	0	0	0	20	300	465	375	6	45 ± 14	4
18	2	0	0	0	0	100	300	465	375	6	31 ± 1	3
19	0	-2	0	0	0	60	100	465	375	6	26 ± 3	4
20	0	2	0	0	0	60	500	465	375	6	40 ± 6	2
21	0	0	-2	0	0	60	300	30	375	6	21 ± 1	1
22	0	0	2	0	0	60	300	900	375	6	29 ± 5	2
23	0	0	0	-2	0	60	300	465	50	6	29 ± 2	3
24	0	0	0	2	0	60	300	465	700	6	36 ± 3	3
25	0	0	0	0	-2	60	300	465	375	2	42 ± 7	1
26	0	0	0	0	2	60	300	465	375	10	43 ± 6	3
27	0	0	0	0	0	60	300	465	375	6	41 ± 6	2
28	0	0	0	0	0	60	300	465	375	6	57 ± 7	2
29	0	0	0	0	0	60	300	465	375	6	41 ± 9	2

En étudiant les résultats expérimentaux obtenus pour le taux de greffage (Y_1), nous constatons que l'expérience 1 se distingue nettement des autres en raison de valeurs très élevées du taux de greffage et de l'écart-type. Si l'on ne tient pas compte de la première expérience, les résultats du dosage au TBO montrent que le taux de greffage est compris globalement entre $17 \mu\text{mol/g}$ et $57 \mu\text{mol/g}$ avec un écart type compris entre $1 \mu\text{mol/g}$ et $9 \mu\text{mol/g}$ (à l'exception de l'expérience 17 qui possède un écart-type de $14 \mu\text{mol/g}$). Cet écart peut s'expliquer par la nature même du textile dont le tissage avec une grande porosité de 80% rend difficile l'exprimage complet de la solution lors du foulardage après imprégnation dans la solution. La quantité de solution à greffer peut donc varier légèrement d'un échantillon à l'autre.

En considérant l'enrobage observé par MEB (réponse Y_2), la plupart des résultats expérimentaux sont de l'enrobage **2** ou **3** correspondant à l'obtention d'un revêtement de PAA très fin sur les fibres. Toutefois, l'évaluation de l'enrobage reste très subjective et compliquée à réaliser. Les résultats obtenus pour l'enrobage sont totalement différents selon que les fils soient tricotés ou pas.

Par exemple, sur la *Figure 88*, l'enrobage considéré de 'enrobage **1**' qui effectué sur les fibres 'tricotés' sera estimé d' 'enrobage **3**' en regardant uniquement les fils 'simples'.

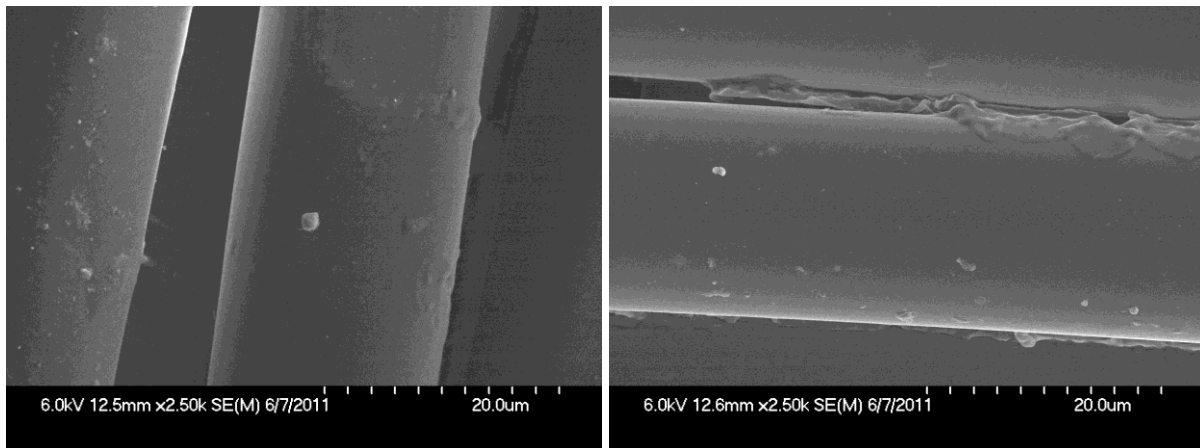


Figure 88 : Photo MEB avec les fils tricotés (gauche) et les fils simples (droite) d'un textile tulle correspondant à la qualité 1

L'évaluation de la qualité de l'enrobage étant plus délicate et moins précise que la détermination du taux de greffage, cette dernière réponse sera donc préférentiellement prise en compte pour l'optimisation des conditions expérimentales.

3.3. Exploitation du plan d'expériences

Le logiciel MODDE 7.0 (Umetrics) a été utilisé pour le calcul des effets, l'analyse statistique et l'étude graphique des résultats.

Tableau 12 : Valeurs des différents effets estimés par le logiciel MODDE7.0 pour les 2 réponses

Coefficients	Greffage (Y ₁)	Enrobage (Y ₂)
β_0	40,60	2
β_1	-5,95	-0,25
β_2	-5,53	-0,54
β_3	1,48	0,29
β_4	1,57	$8,94 \cdot 10^{-8}$
β_5	0,69	0,25
β_{11}	-1,74	0,37
β_{22}	2,61	0,25
β_{33}	-3,92	-0,12
β_{44}	-2,00	0,25
β_{55}	0,41	0,12
β_{12}	7,08	0,18
β_{13}	6,47	0,56
β_{14}	1,99	0,37
β_{15}	-0,66	-0,12
β_{23}	2,29	0,5
β_{24}	6,39	0,18
β_{25}	-1,65	-0,18
β_{34}	2,24	0,31
β_{35}	-5,50	-0,31
β_{45}	0,93	-0,12

Avant d'exploiter les valeurs des effets donnés par le logiciel et discuter de leur importance relative, il faut vérifier que le modèle obtenu présente une bonne adéquation avec

les résultats expérimentaux. Ainsi, le coefficient de détermination R^2 et le coefficient de prédiction Q^2 ont été déterminés. Ils décrivent respectivement le pourcentage de variation de la réponse expliqué par le modèle et le pourcentage de variation de la réponse qui peut être prédit par le modèle. Les tables d'ANOVA ont été réalisées et vérifiées pour les deux réponses Y_1 et Y_2 (annexes 3 et 4). Afin de pouvoir ajuster le modèle, il est noté qu'il était nécessaire de supprimer les expériences 7, 18, 19 et 28 pour la réponse Y_1 et les expériences 1, 7 et 25 pour la réponse Y_2 .

Pour la matrice composite réalisée, les (R^2) obtenus pour Y_1 et Y_2 sont respectivement de 99,9% et 99,8 %. Le pouvoir prédictif des modèles (Q^2) sont quant à eux de 87,9% pour Y_1 et 82,9% pour Y_2 .

La variance de l'erreur expérimentale est donc égale à 0,068 pour la réponse Y_1 et de 0 pour la réponse Y_2 . Cette dernière valeur peut être expliquée par le fait que pour toutes les expériences la valeur de l'enrobage est comprise entre 1 et 4.

Le modèle est donc représentatif du comportement réel du procédé et l'exploitation des données recueillies va donc permettre d'optimiser les conditions expérimentales.

Pour pouvoir déterminer quels facteurs ont une incidence sur le procédé étudié, il faut comparer les effets obtenus pour une même réponse. En effet, plus un effet est important (en valeur absolue), plus la variation de la valeur de la réponse est importante ce qui signifie que le facteur a une forte influence sur le résultat.

D'après le *Tableau 12*, les coefficients β_5 et β_{55} sont faibles comparativement aux autres valeurs d'effets pour la réponse correspondant au taux de greffage (Y_1). Cela veut donc dire que le temps d'imprégnation a peu d'influence sur le taux de greffage obtenu. Cette tendance est confirmée par les valeurs faibles des interactions β_{15} , β_{25} et β_{45} . Pour cette réponse, les valeurs les plus élevées correspondent à β_1 , β_2 pour les coefficients linéaires et à β_{12} , β_{13} , et β_{24} pour les effets d'interactions ce qui montre que les facteurs X_1 (concentration en acide acrylique) et X_2 (puissance du plasma) ont une forte influence sur le taux de greffage.

En ce qui concerne la qualité de l'enrobage (Y_2), le coefficient linéaire β_4 est nettement plus faible que les autres β_i et a une valeur quasiment égale à 0. L'influence du débit d'argon sur la valeur de l'enrobage est donc faible. En revanche, β_2 a une valeur plus élevée que les autres coefficients linéaires ce qui montre que la puissance du plasma a

également une influence sur la deuxième réponse. En ce qui concerne le taux de greffage (Y_1), les coefficients β_4 , β_{44} , β_{14} , β_{34} et β_{45} sont moins importants que les coefficients relatifs aux facteurs X_1 et X_2 donc le facteur X_4 a une influence relativement faible.

3.4. Détermination des conditions optimales

L'objectif de la démarche est d'optimiser les deux réponses simultanément : taux de fonctionnalisation maximal (ne dépasse pas 80 $\mu\text{mol/g}$) et une qualité de l'enrobage maximale (enrobage 5). Dans la poursuite de l'étude, le facteur X_5 a été considéré comme négligeable. En effet, nous avons montré que ce facteur avait très peu d'influence sur le taux de greffage. De même, le facteur X_4 peut être considéré comme peu influent. Cela a été démontré précédemment pour la réponse Y_2 . Les facteurs X_4 et X_5 ont donc été placés à une valeur centrale (niveau 0 en variable codée) ce qui correspond à un débit d'argon de 375 sccm et un temps d'imprégnation de 6 minutes.

Finalement, pour déterminer les valeurs optimales auxquelles placer les facteurs X_1 , X_2 et X_3 , nous avons tracé les surfaces de réponses en prenant comme axes les facteurs X_1 et X_2 (qui sont les 2 facteurs les plus influents) et en fixant le facteur X_3 (temps de traitement plasma) à différentes valeurs comprises entre 30 et 900 secondes. Pour chaque valeur de X_3 nous avons déterminé les valeurs de X_1 et X_2 qui permettaient d'obtenir un taux de greffage maximal et l'enrobage le plus dense.

Quelle que soit la valeur de X_3 , les conditions permettant de maximiser le taux de greffage et l'enrobage sont toujours obtenues pour les mêmes valeurs de X_1 et X_2 . Une légère exception est observée lorsque la valeur de X_3 est au centre (c'est-à-dire que le temps de traitement est de 465 secondes) : dans ce cas, une même valeur maximale d'enrobage est obtenue pour 2 conditions expérimentales diamétralement opposées. Le modèle prédit ainsi une valeur d'enrobage de 3,6, soit lorsque $U_1=40\%$ et $U_2=200\text{W}$, soit lorsque $U_1=100\%$ et $U_2=500\text{W}$ (*Figure 90*). Mais pour une telle valeur de U_3 (465s), le taux de greffage maximal est obtenu lorsque $U_1=40\%$ et $U_2=200\text{W}$ (*Figure 89*).

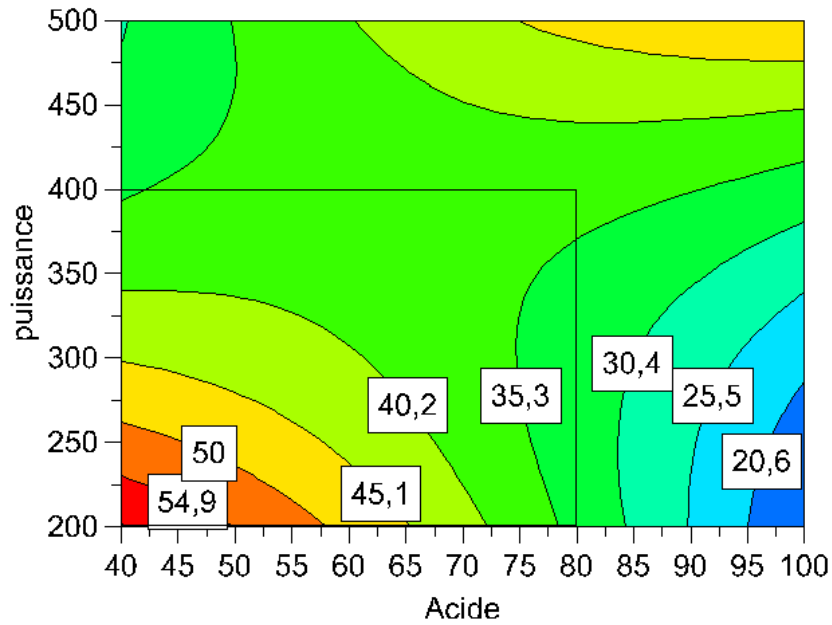


Figure 89 : Surface de réponse obtenue pour le taux de greffage (Y_1) en fonction de la concentration en acide acrylique (X_1) et la puissance du plasma froid (X_2) ($U_3 = 465$ s), ($U_4 = 375$ sccm) et ($U_5 = 6$ min)

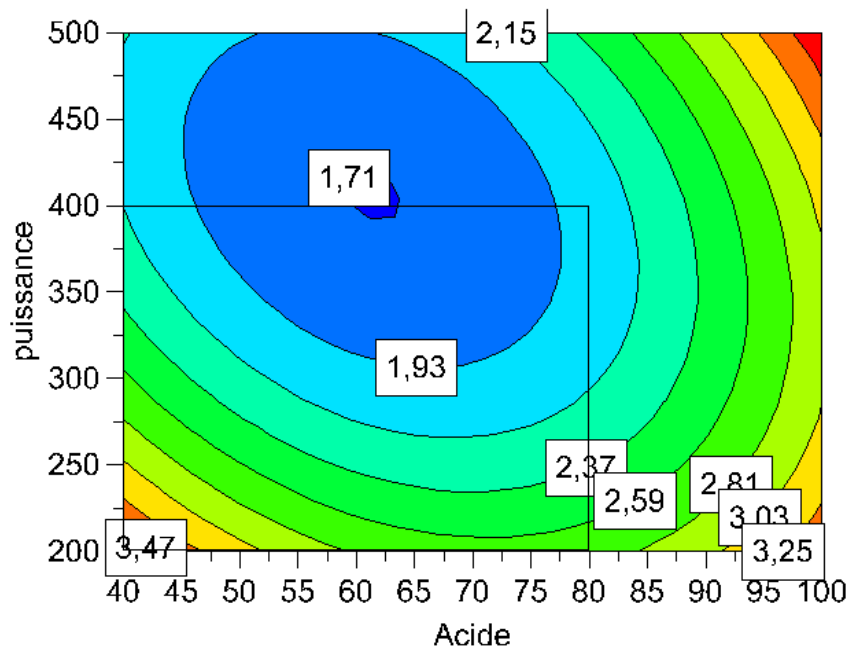


Figure 90 : Surface de réponse obtenue pour l'enrobage (Y_2) en fonction de la concentration en acide acrylique (X_1) et la puissance du plasma froid (X_2) ($U_3 = 465$ s), ($U_4 = 375$ sccm) et ($U_5 = 6$ min)

La synthèse des résultats est donnée dans le *Tableau 13*. Il est à noter que pour des valeurs de U_3 de 683 et 900 secondes, l'enrobage obtenu est respectivement de 6 et 8. Même si la cotation maximale pouvant être donnée pour la qualité de l'enrobage est de 5, il ne faut pas oublier que ces valeurs sont prédites par le modèle et peuvent donc être supérieures à la valeur maximale admissible. Cela signifie qu'un enrobage optimal peut être obtenu dans ces conditions (683 et 900 secondes avec $U_1=100\%$ et $U_2=500W$).

D'après le *Tableau 13*, le temps de traitement plasma (X_3) de 900s a été sélectionné puisqu'il permet d'obtenir le taux de greffage les plus élevés (afin d'avoir un maximum de fonctions pour l'immobilisation des molécules bioactives) tout en conservant l'enrobage le plus élevé. Les surfaces de réponses obtenues pour le taux de greffage et pour l'enrobage lorsque le temps de traitement plasma est de 900 secondes, le débit d'argon de 375 sccm et le temps d'imprégnation de 6 minutes correspondent respectivement aux *Figure 91* et *Figure 92*.

Tableau 13 : Détermination des conditions optimales pour différentes valeurs de X_3

Valeur de X_3	Valeurs optimales de U_1 et U_2	Taux de greffage (Y_1) maximal (en $\mu\text{mol/g}$)	Enrobage (Y_2) maximal
$U_3 = 30s$	$U_1 = 40\%$ $U_2 = 200W$	58,5	4,6
$U_3 = 247s$	$U_1 = 40\%$ $U_2 = 200W$	63,3	4,2
$U_3 = 465s$	$U_1 = 40\%$ $U_2 = 200W$	59,9	3,6
$U_3 = 683s$	$U_1 = 100\%$ $U_2 = 500W$	64,4	6
$U_3 = 900s$	$U_1 = 100\%$ $U_2 = 500W$	71,7	8

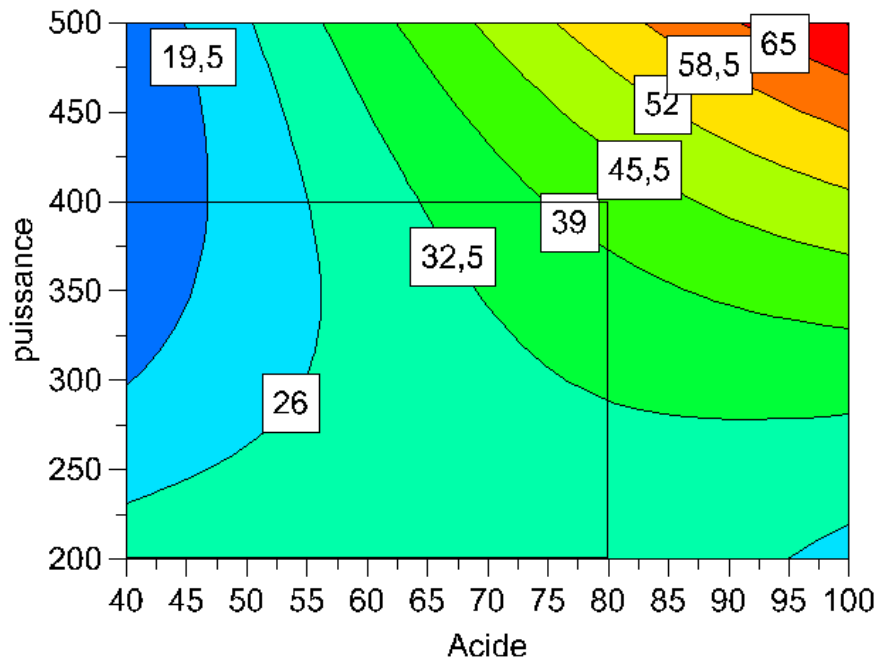


Figure 91 : Surface de réponse obtenue pour le taux de greffage (Y_1) en fonction de la concentration en acide acrylique (X_1) et la puissance du plasma froid (X_2) ($U_3 = 900$ s), ($U_4 = 375$ sccm) et ($U_5 = 6$ min)

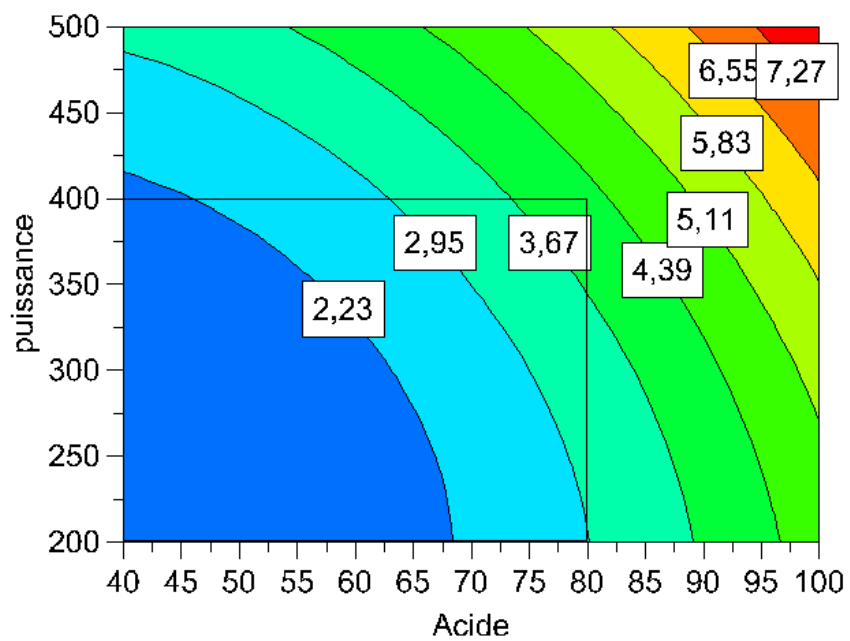


Figure 92 : Surface de réponse obtenue pour l'enrobage (Y_2) en fonction de la concentration en acide acrylique (X_1) et la puissance du plasma froid (X_2) ($U_3 = 900$ s), ($U_4 = 375$ sccm) et ($U_5 = 6$ min)

3.5. Validation des résultats du plan d'expériences

Les conditions optimales déterminées précédemment à partir des modèles mathématiques sont les suivantes :

- Une concentration en acide acrylique de 100%
- Une puissance du plasma de 500 Watts
- Un temps de traitement plasma de 900 secondes
- Un débit d'argon de 375 sccm
- Un temps d'imprégnation de 6 minutes

Le taux de greffage expérimental obtenu en se plaçant dans ces conditions est de 73 $\mu\text{mol/g}$ (± 5). Compte tenu de l'erreur expérimentale sur les mesures, ce résultat est en accord avec la valeur prédite par le plan d'expériences qui était de 71,7 $\mu\text{mol/g}$.

Le résultat de l'enrobage observé par MEB dans les conditions optimales est présenté sur la *Figure 93*. En observant les images des fibres aspect d'enrobage peuvent être considéré d'enrobage 4 ou 5.

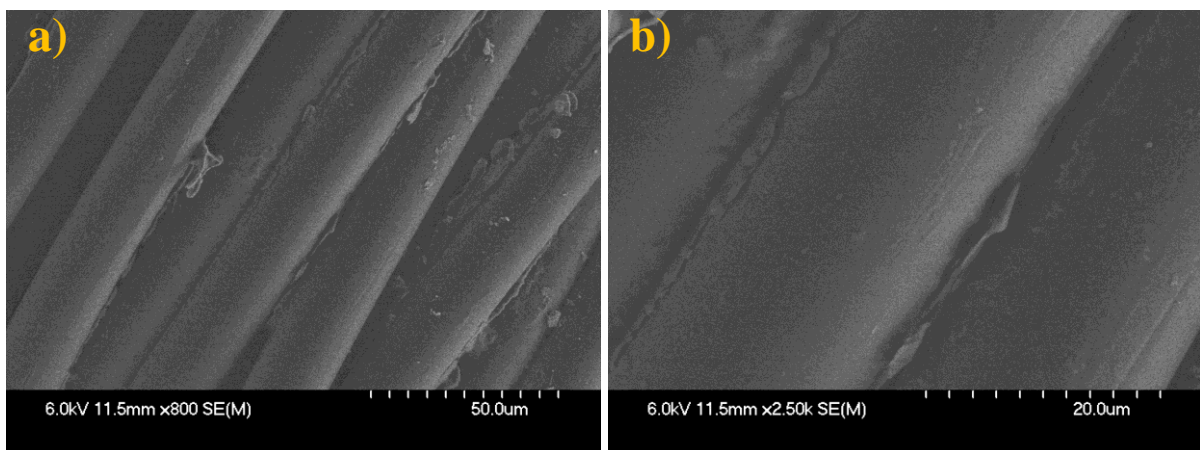


Figure 93 : Images MEB du textile en tulle traité selon les conditions optimales ($U_1 = 100\%$; $U_2 = 500W$; $U_3 = 900 s$; $U_4 = 375 sccm$ et $U_5 = 6 min$) sur les fibres tricotées (a) agrandissement X 800 et (b) agrandissement X 2500

La qualité de l'enrobage est bonne et confirme donc le résultat prédit par le modèle mathématique.

La fiabilité des modèles de prédiction a ainsi été vérifiée et la démarche validée. L'efficacité de la méthode est démontrée puisque le taux de greffage maximal qui avait pu être obtenu en réalisant les 29 expériences était de 57 $\mu\text{mol/g}$ (expérience 28) et un enrobage maximal de 5 n'avait pu être obtenu qu'une seule fois (expérience 17). Dans les conditions optimales déterminées par le plan d'expériences, nous avons pu atteindre un taux de greffage de 73 $\mu\text{mol/g}$ respectant la cytocompatibilité du textile avec un nombre maximal de fonctions COOH nécessaire pour l'immobilisation des molécules bioactives tout en ayant un enrobage acceptable.

3.6. Conclusion

L'objectif de cette partie de l'étude était de réaliser un deuxième protocole de greffage de l'acide polyacrylique dit 'par foulardage' afin d'éviter la polymérisation 'en solution' pendant 4 heures à 80°C. La polymérisation et la réticulation de l'acide acrylique est basée cette fois sur le traitement par plasma froid argon. Le nouveau protocole a pour objectif de greffer le même taux de fonctions COOH abouti par greffage 'en solution' permettant ainsi le respecter de la cytocompatibilité du textile.

Différentes paramètres ont été étudiés ; la concentration de la solution d'acide acrylique, le temps d'imprégnation dans la solution et les paramètres du traitement plasma froid (le débit du gaz, la puissance et le temps du traitement). Afin de minimiser le nombre de manipulations et déterminer l'influence des paramètres étudiés sur le taux de greffage en fonctions COOH et l'enrobage, un plan d'expériences de type plan composite centré réduit a été réalisé. Les résultats montrent que le modèle mathématique prédit est fiable et l'efficacité de la méthode est validée. Des paramètres optimaux pour le taux de greffage et pour l'enrobage sont aboutis lorsque la concentration de l'acide acrylique est de 100% et le temps de traitement plasma est de 900 secondes, le débit d'argon de 375sccm et le temps d'imprégnation de 6 minutes, la puissance de 500 Watts. Le taux de greffage obtenu dans les conditions optimales a pu atteindre 73 $\mu\text{mol/g}$ pouvant respecter la cytocompatibilité du textile ainsi d'avoir un nombre suffisant des fonctions COOH nécessaire pour l'immobilisation des molécules bioactives avec un enrobage relativement homogène. Le but

de cette étude est bien atteint. Cette méthode de greffage dite ‘par foulardage’ se montre une bonne alternative à la méthode de greffage ‘en solution’ qui présente des risques d’homopolymérisation reliés aux paramètres qui restent très sensibles à maîtriser (la température, l’agitation, le barbotage d’azote, temps).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le but de cette thèse est de réaliser un dispositif médical à efficacité antibactérienne ou anticoagulante améliorée pour l'amélioration de sa biocompatibilité. Ce projet est le résultat d'une étroite collaboration entre différentes équipes de spécialités multidisciplinaires : traitement de surface par méthodes physiques et chimiques, traitement par plasma froid, chimie des polymères, biologie et microbiologie.

Notre stratégie s'est basée sur le greffage d'un polymère fonctionnel sur des textiles en polyéthylène téréphtalate à applications biomédicales (textiles non tissés et textile en tulle) qui sert comme point d'ancrage pour des molécules bioactives (antibactériennes, anticoagulante, etc...).

Deux protocoles de la copolymérisation greffante de l'acide polyacrylique dits 'en solution' et 'par foulardage' ont été réalisés. Afin d'amorcer ce greffage, une activation de la surface par plasma froid a été prouvée nécessaire.

Notre première étape de la présente étude a été orientée vers l'optimisation de l'activation de la surface du textile par plasma froid. L'optimisation des proportions des gaz argon / oxygène au sein de l'enceinte à plasma a été tout d'abord déterminée. L'étude réalisée par des tests de traction mécanique ainsi par dosage du taux de greffage en fonctions COOH par TBO, nous a montré que 85% en argon et 15 % en oxygène sont favorables pour avoir un taux de greffage maximal tout en conservant de bonnes propriétés mécaniques. La puissance du plasma froid a été fixée à 300 Watts et l'étude du temps du traitement a été réalisée sur les textiles activés à la proportion des gaz optimisée. Suite à l'étude de l'angle de contact, nous avons fixé 120 s pour atteindre une mouillabilité maximale du textile et donc pour avoir les fonctions peroxydes et hydroperoxydes maximales pour l'amorçage de la copolymérisation greffante. Par ailleurs, nous avons tenté de quantifier ces fonctions produites suite au traitement plasma froid par dosage au DPPH selon le protocole de Susuki et *al.* Malheureusement, les résultats étaient non reproductibles et inexploitable. Ceci peut être expliqué par la trop faible quantité des fonctions introduites à la surface ainsi que la sensibilité de la manipulation. Selon d'autres études, ce dosage nécessite une propreté extrême du matériel et un montage sous vide. Il sera intéressant de doser ces radicaux par la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE).

La deuxième étape a consisté à optimiser les paramètres du greffage de l'acide polyacrylique par une méthode dite 'en solution'. Nous avons montré par l'étude de la température et le temps du greffage qu'une température minimale de 60°C est la température nécessaire pour la décomposition des radicaux peroxydes et hydroperoxydes nécessaires pour l'amorçage de la copolymérisation greffante. L'étude de la température et du temps de la copolymérisation greffante nous a permis de fixer 80°C pendant 4 heures pour greffer le maximum de fonctions acides carboxyliques COOH à la surface du textile. L'étude de l'effet de la concentration de la solution de l'acide acrylique en fonctions de la densité des fonctions acides carboxyliques COOH introduites nous a montré que plus que la concentration augmente plus que la densité augmente. Afin de mieux comprendre la différence du nombre de fonctions acides carboxyliques entre les deux textiles le non tissé et le tulle, il sera intéressant de corréliser les résultats expérimentaux avec celles théoriques selon le 'Test de Student'. Il sera peut être plus intéressant de raisonner le nombre de fonctions greffés par rapport à la surface et non pas par rapport à la masse du textile en lui-même.

Nous avons justifié le choix de la concentration de 2,5 M d'acide acrylique suite aux études correspondant aux observations par MEB et de la cytocompatibilité des textiles greffés à différentes concentrations de l'acide acrylique.

Nous avons démontré que le biomatériau est cytocompatible par les tests de vitalité cellulaire réalisés par différentes cellules : cellules endothéliales HUVEC, les cellules musculaires lisses HPASMC et les cellules fibroblastes NIH. Le test d'adhésion bactérienne montre bien la diminution de 28% des plaquettes adhérant sur le textile greffé à 2,5 M ce qui montre que rien qu'en greffant des fonctions acides carboxyliques COOH nous diminuons l'adhésion plaquettaire et donc le caractère thrombogénique diminue. Nous avons également montré que l'augmentation de la densité des fonctions acides carboxyliques COOH à la surface permet de diminuer l'adhésion bactérienne au bout de 48 heures de contact.

Après validation du protocole du greffage 'en solution' de l'acide polyacrylique l'étape suivante était d'immobiliser des molécules bioactives à la surface du textile.

Nous avons réussi à améliorer le caractère anticoagulant de la surface modifiée par l'héparine jusqu'à 50 min. Néanmoins, l'efficacité de l'héparine reste relative aux quantités réalisées. L'héparine malgré ses avantages son utilisation reste limitée et doit respecter la quantité greffée pour éviter les effets indésirables de cette molécule.

Nous avons étudié en deuxième lieu l'immobilisation de la gentamicine. Nous avons montré par analyse en XPS que nous avons fonctionnalisé la surface du textile par deux techniques différentes 'par simple adsorption' (sans un carbodiimide EDAC), et 'via l'EDAC' qui permet d'avoir d'avantage des liaisons covalentes avec le support. Les textiles modifiés ont montré respectivement une bonne réduction de la prolifération bactérienne par mesure du rayon d'inhibition (7,6 mm et 8,5) et de l'adhésion bactérienne (99,34% et 99,79%) de la bactérie *E. coli* pendant 24 heures de contact. Nous avons donc montré que le fait d'utiliser un carbodiimide au cours de la réaction a amélioré l'efficacité antibactérienne du textile. Dans l'avenir, il sera bien d'étudier l'efficacité antibactérienne des deux textiles à long terme.

Nous avons également étudiée deux voies pour immobiliser le lysozyme, un polypeptide antibactérien très connu dans le domaine alimentaire.

Pour la 'voie 1' dite directe qui correspond à l'immobilisation du lysozyme sur les fonctions COOH greffés, nous avons montré la fixation du lysozyme par analyses IRTF et XPS. L'efficacité antibactérienne déterminée sur la bactérie *S. aureus* nous a montré une légère diminution de l'adhésion bactérienne après 48 heures de contact. Le support ne peut pas être donc qualifié comme antibactérien ceci peut être expliqué par la forte résistance de la bactérie au lysozyme. Le choix de la bactérie a été basé sur l'étude bibliographique qui a montré l'efficacité de la bactérie envers les (Gram +) et en particulier le *S.aureus*. Dans les prochaines études, il sera bien de réaliser des tests d'adhésions bactériennes par d'autres bactéries moins résistantes au lysozyme en prenant plus l'avis des biologistes.

Nous avons réussi également de greffer le lysozyme par la 'voie 2' via un « *spacer* » le bNH₂PEG, un dérivé du polyéthylène glycol fonctionnalisé. La caractérisation par ATG nous a confirmé la fonctionnalisation de la surface par 1 % de lysozyme. Il reste donc, dans les prochaines études, de déterminer l'efficacité antibactérienne de la nouvelle surface. En effet, dans la littérature, des textiles greffés uniquement par PEG ont montré une réduction de l'adhésion bactérienne (*antifouling*). On pourrait donc peut être observé une synergie entre l'effet anti-adhésion du PEG, et de l'effet bactéricide du lysozyme. Par ailleurs, nous pouvons imaginer que la longueur des greffants peut jouer un rôle sur la biodisponibilité de la molécule bioactive et donc sur l'activité biologique du textile modifié.

Finalement et dans la perspective de la réalisation d'une deuxième méthode de greffage de la copolymérisation greffante de l'acide polyacrylique à la surface. Nous avons

procédé à la réalisation d'un protocole évitant le greffage en solution à une température élevée (80°C) sous agitation et pendant un temps de 4 heures qui nous a parfois causé des problèmes de reproductibilité de nos manipulations. Un plan d'expériences a permis de montrer l'influence principale de la concentration de l'acide acrylique et de la puissance du plasma froid. La fiabilité des modèles de prédiction a ainsi été vérifiée et la démarche validée. Les conditions optimales, permettant non seulement de respecter la cytocompatibilité du textile mais aussi d'obtenir un enrobage relativement homogène ont été démontrées. Un taux de greffage maximal a été obtenu qui sera suffisant pour l'immobilisation des molécules bioactives. La méthode sera donc une bonne alternative pour la réalisation du greffage des fonctions COOH à la surface du textile d'une façon plus contrôlable. Reste à confirmer que les propriétés biologiques des textiles obtenus selon la voie « par foulardage », à taux de greffage en fonctions COOH comparables, soient identiques à ceux observés pour ceux qui avaient été obtenus par greffage « en solution »

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ H.F. Hildebrand, N. Blanchemain, G. Mayer, F. Chai, M. Lefebvre, F. Boschini, Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. *Surface & Coatings Technology* **200**: 6318–6324, 2006.
- ² R. Vlachovsky, Long-Term patency of a rat collagen vascular prosthesis. *Scripta Medica (BRNO)* **74**: 255–264, 2001.
- ³ H.F. Hildebrand, N. Blanchemain, G. Mayer, Y.M. Zhang, O. Melnyk, M. Morcellet, B. Martel, Functionalization of biomaterials. *Key Engineering Materials* **228-229**: 47-50, 2005.
- ⁴ D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**: 2941–2953, 2008.
- ⁵ M. Sacar, I. Goksin, A. Baltalarli, H. Turgut, S. Sacar, G. Onem, V. Ozcan, F. Adali, The prophylactic efficacy of rifampicin-soaked graft in combination with systemic vancomycin in the prevention of prosthetic vascular graft infection: an experimental study. *Journal of Surgical Research* **129**: 329-334, 2005.
- ⁶ D.F. Williams, Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, 3-5 March 1986. In: Williams D, ed. *Progress in biomedical engineering*, Elsevier Science 4, Amsterdam, 1987.
- ⁷ N. Blanchemain, Etude de la biocompatibilité et du greffage de cyclodextrines sur les prothèses vasculaires en PET pour la réalisation d'une prothèse à libération contrôlée de principe actif. Thèse Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, 30 septembre 2005.
- ⁸ L. Bordenave, C. Baquey, Médecine nucléaire et prothèses. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique* **28**: 12, 2004.
- ⁹ D.F. Williams, J. Black, P.J. Doherty, Consensus report of second conference on definitions in biomaterials. In: P. Doherty, R. Williams, D. Williams, A. Lee, eds. *Biomaterial tissue interfaces*: Elsevier **10**: 525-533, Amsterdam, 1992.
- ¹⁰ J.Y. Wong, J.D. Bronzino, *Biomaterials*. Taylor & Francis Group, USA, 2007.
- ¹¹ A. Meddahi-Pellé, I. Bataille, P. Subra, D. Letourneur, Biomatériaux vasculaires: du génie biologique et médical au génie tissulaire. *Médecine sciences* **20**: 679-684, 2004.
- ¹² G. Binyamin, B.M. Shafi, C.M. Mery, *Biomaterials: A primer for surgeons*. *Seminars in Pediatric Surgery* **15**: 276-283, 2006.
- ¹³ S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K.W. Leong, Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology* **61**: 1189-1224, 2001.
- ¹⁴ B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of polymer science Part B: polymer physics* **49**: 832–864, 2011.
- ¹⁵ B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R* **34**: 147-230, 2001.
- ¹⁶ J. Jagur-Grodzinski, Biomedical application of functional polymers. *Reactive & Functional Polymers* **39**: 99–138, 1999.

-
- ¹⁷ E. Fournier, C. Passirani, C.N. Montero-Menei, J.P. Benoit, Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials* **24**: 3311–3331, 2003.
- ¹⁸ SP. Lyu, D. Untereker, Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 4033-4065, 2009.
- ¹⁹ B.D. Ratner, Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors & Bioelectronics* **10**: 797-804, 1995.
- ²⁰ H. Knuutila, A. Lehtinen, A. Nummila-Pakarinen, Advanced polyethylene technologies — controlled material properties. *Advances in Polymer Science* **169**: 13–27, 2004.
- ²¹ Y. El Ghouli, N. Blanchemain, T. Laurent, C. Campagne, A. El Achari, S. Roudesli, M. Morcellet, B. Martel, H.F. Hildebrand, Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta Biomaterialia* **4**: 1392–1400, 2008.
- ²² B. Gupta, N. Revagadea, J. Hilborn, Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science* **32**: 455–482, 2007.
- ²³ A.J.R. Lasprilla, G.A.R. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, R. M. Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances* **30**: 321-328, 2012.
- ²⁴ L.-T. Lim, R. Auras, M. Rubino, Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science* **33**: 820–852, 2008.
- ²⁵ B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. 2nd Edition, Elsevier Academic Press, USA, 2004.
- ²⁶ A.D. Pye, D.E.A. Lockhart, M.P. Dawson, C.A. Murray, A.J. Smith, A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection* **72**: 104-110, 2009.
- ²⁷ D. Klee, H. Höcker, Polymers for biomedical applications: improvement of the interface compatibility. *Advances in Polymer Science* **149**, 2000.
- ²⁸ Z. Ge, F. Yang, J.C.H. Goh, S. Ramakrishna, E.H. Lee, Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **77**: 639-652, 2006.
- ²⁹ K. Gao, S. Chen, L. Wang, W. Zhang, Y. Kang, Q. Dong, H. Zhou, L. Li, Anterior cruciate ligament reconstruction with LARS artificial ligament: a multicenter study with 3- to 5-year follow-up. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* **26**: 515-523, 2010.
- ³⁰ S. Ben Abdesslem, H. Jedda, S. Skhiri, S. Karray, J. Dahmen, H. Boughamoura, Influence of thermofixation on artificial ACL ligament dimensional and mechanical properties. *The European Physical Journal - Applied Physics* **32**: 143–147, 2005.
- ³¹ L. Xue, H.P. Greisler, Invited Review: Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery* **37**: 472-480, 2003.
- ³² S. Venkatraman, F. Boey, L.L. Lao, Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired. *Progress in Polymer Science* **33**: 853–874, 2008.
- ³³ J.T. Butcher, G.J. Mahler, L.A. Hockaday, Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**: 242–268, 2011.

-
- ³⁴ S. Ben Abdessalem, H. Jedda, S. Skhiri, J. Dahmen, H. Boughamoura, Improvement of mechanical performances of braided Polyester sutures. *AUTEX Research Journal* **6**: 169-174, 2006.
- ³⁵ T. Laurent, I. Kacem, N. Blanchemain, F. Cazaux, C. Neut, H.F. Hildebrand, B. Martel, Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomaterialia* **7**: 3141–3149, 2011.
- ³⁶ F. Sergent, N. Desilles, Y. Lacoume, J.J. Tuech, J-P. Marie, C. Bunel, Biomechanical analysis of polypropylene prosthetic implants for hernia repair: an experimental study. *The American Journal of Surgery* **200**: 406–412, 2010.
- ³⁷ <http://www.perousemedical.com>
- ³⁸ <http://www.larsligaments.com>
- ³⁹ <http://www.cousin-biotech.com>
- ⁴⁰ S. Ben Abdessalem, B. Durand, S. Akesbi, N. Chakfe, Blood flow in a polyester textile vascular prosthesis: Experimental and numerical study. *Textile Research Journal* **71**: 178-183, 2001.
- ⁴¹ S. Ben Abdessalem, I. Zbali, N. Litim, S. Mokhtar, Impact of compaction treatments on PET yarns used for vascular prostheses manufacturing. *Iranian Polymer Journal* **18**: 15-23, 2009.
- ⁴² J.M. Anderson, Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Science* **31**: 81–110, 2001.
- ⁴³ J.M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, Review Article; Biomaterials/Tissue Interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *The AAPS Journal* **12**: 188-196, 2010.
- ⁴⁴ D.A. Wang, Engineering blood-contact biomaterials by “H-Bond grafting” surface modification. *Advances in Polymer Science* **209**: 179–227, 2007.
- ⁴⁵ H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. Wu, D. Li, Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science* **33**:1059–1087, 2008.
- ⁴⁶ K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, H. Elwing, D. Ricklin, P.H. Nilsson, Y. Teramura, I.A. Nicholls, B. Nilsson, Innate immunity activation on biomaterial surfaces: A mechanistic model and coping strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**:1042–1050, 2011.
- ⁴⁷ M.N. Helmus, Biomaterials in the design and reliability of medical devices. LANDES Bioscience, USA, 2003.
- ⁴⁸ L. Chen, D. Han, L. Jiang, On improving blood compatibility: From bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **85**: 2–7, 2011.
- ⁴⁹ B. Rihova, Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**: 157-176, 1996.
- ⁵⁰ S. Heyraud, Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale. Thèse biologie cellulaire et moléculaire, Université Joseph Fourier Grenoble 1, 8 octobre 2007.

-
- ⁵¹ J.A. Chinn, J.A. Sauter, R.E. Jr. Phillips, Weiyuan J. Kao, J.M. Anderson, S.R. Hanson, T.R. Ashton, Blood and tissue compatibility of modified polyester: Thrombosis, inflammation, and healing. *Journal of Biomedical Materials Research* **39**: 130-140, 1998.
- ⁵² A. Sokolov, B.C. Hellerud, A. Pharo, E.A. Johannessen, T.E. Mollnes, Complement activation by candidate biomaterials of an implantable microfabricated medical device. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **98**: 323-329, 2011.
- ⁵³ R.D. Hagerty, D.L. Salzmann, L.B. Kleinert, S.K. Williams, Cellular proliferation and macrophage populations associated with implanted expanded polytetrafluoroethylene and polyethyleneterephthalate. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 489-497, 2000.
- ⁵⁴ J. Hong, K. Nilsson Ekdahl, H. Reynolds, R. Larsson, B. Nilsson, A new *in vitro* model to study interaction between whole blood and biomaterials, Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin. *Biomaterials* **20**: 603-611, 1999.
- ⁵⁵ G. Stynes, G.K. Kiroff, W.A. Morrison, M.A. Kirkland, Clinical Review: Tissue compatibility of biomaterials: Benefits and problems of skin biointegration. *ANZ Journal of Surgery* **78**: 654–659, 2008.
- ⁵⁶ J. Andersson, R. Larsson, R. Richter, K.N. Ekdahl, B. Nilsson, Binding of a model regulator of complement activation (RCA) to a biomaterial surface: surface-bound factor H inhibits complement activation. *Biomaterials* **22**: 2435-2443, 2001.
- ⁵⁷ K.S. Jones, Effects of biomaterial-induced inflammation on fibrosis and rejection. *Seminars in Immunology* **20**: 130–136, 2008.
- ⁵⁸ L.B. Koh, I. Rodriguez, S.S. Venkatraman, The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials* **31**: 1533–1545, 2010.
- ⁵⁹ B. Nilsson, O. Korsgren, J.D. Lambris, K.N. Ekdahl, Can cells and biomaterials in therapeutic medicine be shielded from innate immune recognition?. *Trends in Immunology* **31**: 32-38, 2010.
- ⁶⁰ D.L. Elbert, J.A. Hubbell, Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annual Review of Materials Science* **26**: 365-394, 1996.
- ⁶¹ B.D. Ratner, S.J. Bryant, Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of biomedical Engineering* **6**: 41–75, 2004.
- ⁶² J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology* **20**: 86–100, 2008.
- ⁶³ W-J. Hu, J.W. Eaton, T.P. Ugarova, L. Tang, Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* **98**: 1231-1238, 2001.
- ⁶⁴ M.B. Gorbet, M.V. Sefton, Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* **25**: 5681–5703, 2004.
- ⁶⁵ J.M. Grunkemeier, W.B. Tsai, T.A. Horbett, Hemocompatibility of treated polystyrene substrates: Contact activation, platelet adhesion, and procoagulant activity of adherent platelets. *Journal of Biomedical Materials Research* **41**: 657-670, 1998.
- ⁶⁶ C. Mao, Y. Qiu, H. Sang, Hua Mei, A. Zhua, J. Shen, S. Lin, Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility. *Advances in Colloid and Interface Science* **110**: 5–17, 2004.

-
- ⁶⁷ G. Pavon-Djavid, G. Hélarly, V. Migonney, Les biomatériaux inhibiteurs de l'adhérence et de la prolifération bactérienne: un enjeu pour la prévention des infections sur matériel prothétique. *ITBM-RBM* **26**: 183–191, 2005.
- ⁶⁸ J.M. Schierholz, J. Beuth, Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection* **49**: 87–93, 2001.
- ⁶⁹ R.M. Donlan, J.W. Costerton, Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 167–193, 2002.
- ⁷⁰ W. Zimmerli, P. Sendi, Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Semin Immunopathol* **33**: 295–306, 2011.
- ⁷¹ T. O'Brien, Mr.J. Collin, Vascular graft infection. *British Journal of Surgery* **79**: 1262-1267, 1992.
- ⁷² H. Gao, L. Lund, J. Prag, J. Sandermann, J.S. Lindholt, Laparoscopic Diagnosis and treatment of aortic vascular prosthetic graft infections in a porcine model. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **35**: 41-45, 2008.
- ⁷³ A. M. Carbonell, B. D. Matthews, D. Dréau, M. Foster, C. E. Austin, K. W. Kercher, R. F. Sing, B. T. Heniford, The susceptibility of prosthetic biomaterials to infection. *Surgical Endoscopy* **19**: 430–435, 2005.
- ⁷⁴ P.G.M. Maathuis, S.K. Bulstra, H.C. Van der Mei, J.R. van Horn, H.J. Busscher, Biomaterial-associated surgery and infection a review of literature, *Biomaterials in Modern Medicine* **7**: 97-112, 2007.
- ⁷⁵ S. Haulon, J. Sobocinski, S. Amiot, L. Garnier, M. Koussa, Infections de prothèses vasculaires, *Chirurgie Vasculaire. Hôpital Cardiologique, CHRU de Lille*.
- ⁷⁶ M. Hendriks, Development of biomaterials with enhanced infection resistance, A surface modification approach. Thèse de doctorat Université Technique d'Eindhoven, 4 Juin 1996.
- ⁷⁷ F. Schneider, J.P. Becquemin, J. Marzelle, E. Allaire, P. Desgranges, Prothèse imprégnée de sel d'argent : étude de la résistance à l'infection. *CHU Henri Mondor, Créteil IMM, Paris XIV*.
- ⁷⁸ N. Khardori, M. Yassien, Biofilms in device-related infections. *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 141-147, 1995.
- ⁷⁹ K.K. Chung, J.F. Schumacher, E.M. Sampson, R.A. Burne, P.J. Antonelli, A.B. Brennan, Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Biointerphases* **2**: 89-94, 2007.
- ⁸⁰ D. Mack, Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* **43**: 113-125, 1999.
- ⁸¹ P.H.S. Kwakman, A.A. te Velde, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, S.J. H. van Deventer, S.A.J. Zaat, Treatment and prevention of *staphylococcus epidermidis* experimental biomaterial-associated infection by bactericidal peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**: 3977–3983, 2006.
- ⁸² T. Coenye, H.J. Nelis, *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* **83**: 89–105, 2010.
- ⁸³ J.D. Bryers, Medical Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **100**: 1-18, 2008.

-
- ⁸⁴ M. Zilberman, J.J. Elsner, Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of Controlled Release* **130**: 202–215, 2008.
- ⁸⁵ L. Montanaro, D. Campoccia, C.R. Arciola, Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* **28**: 5155–5168, 2007.
- ⁸⁶ M. Tirrell, E. Kokkoli, M. Biesalski, The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science* **500**: 61–83, 2002.
- ⁸⁷ L. Wilhelm, R. Zippel, T. von Woedtke, H. Kenk, A. Hoene, M. Patrzyk, M. Schlosser, Immune response against polyester implants is influenced by the coating substances. *Journal of Biomedical Materials research Part A* **83**: 104–113, 2007.
- ⁸⁸ R. Hauert, A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Related Materials* **12**: 583–589, 2003.
- ⁸⁹ S. Martino, F. D'Angelo, I. Armentano, J.M. Kenny, A. Orlacchio, Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology Advances* **30**: 338–51, 2012.
- ⁹⁰ M.S. Kim, G. Khang, H.B. Lee, Gradient polymer surfaces for biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **33**: 138–164, 2008.
- ⁹¹ G. Guerrero, J. Amalric, P.-H. Mutin, A. Sotto, J.-P. Lavigne, Inhibition de l'adhésion bactérienne et prévention de la formation d'un biofilm : utilisation de monocouches autoassemblées organiques sur des surfaces inorganiques. *Pathologie Biologie* **57**: 36–43, 2009.
- ⁹² R.G. Chapman, E. Ostuni, M.N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. Shaw Warren, G.M. Whitesides, Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria. *Langmuir* **17**: 1225–1233, 2001.
- ⁹³ E. Ostuni, R.G. Chapman, M.N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D.E. Ingber, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. *Langmuir* **17**: 6336–6343, 2001.
- ⁹⁴ C. Werner, M.F. Maitz, C. Sperling, Current strategies towards hemocompatible coatings. *Journal of materials chemistry* **17**: 1–10, 2007.
- ⁹⁵ SE Sakiyama-Elbert, JA Hubbell, Functional biomaterials: design of novel biomaterials. *Annual Review of Materials Research* **31**: 183–201, 2001.
- ⁹⁶ O. Guillaume, J.-P. Lavigne, O. Lefranc, B. Nottelet, J. Coudane, X. Garric, New antibiotic-eluting mesh used for soft tissue reinforcement. *Acta Biomaterialia* **7**: 3390–3397, 2011.
- ⁹⁷ V. Gahtan, G.E. Esses, D.F. Bandyk, R.T. Nelson, E. Dupont, J.L. Mills, Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated dacron grafts. *Journal of Surgical Research* **58**: 105–110, 1995.
- ⁹⁸ W.S. Moore, M. Chvapil, G. Seiffert, K. Keown, Development of an infection-resistant vascular prosthesis. *Archives of Surgery* **116**: 1403–1407, 1981.
- ⁹⁹ D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C.R. Arciola, Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* **31**: 6363–6377, 2010.
- ¹⁰⁰ A. Frenot, I.S. Chronakis, Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **8**: 64–75, 2003.

-
- ¹⁰¹ N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **28**: 325–347, 2010.
- ¹⁰² H.S. Yoo, T.G. Kim, T.G. Park, Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 1033–1042, 2009.
- ¹⁰³ K. Page, M. Wilson, I.P. Parkin, Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *Journal of Materials Chemistry* **19**: 3819–3831, 2009.
- ¹⁰⁴ R. Dastjerdi, M. Montazer, A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **79**: 5–18, 2010.
- ¹⁰⁵ S. Silver, L.T. Phung, Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. *Annual Review of Microbiology* **50**: 753–89, 1996.
- ¹⁰⁶ P.S.M. Dunlop, C.P. Sheeran, J.A. Byrne, M.A.S. McMahon, M.A. Boyle, K.G. McGuigan, Inactivation of clinically relevant pathogens by photocatalytic coatings. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **216**: 303–310, 2010.
- ¹⁰⁷ B. Martel, M. Morcellet, M. Weltrowski, Cyclodextrin polymers and/or cyclodextrin derivatives with complexing properties and ion exchange properties and method for the production thereof. PCT/FR00/00378, EP 1165621 (2000); US 6,660,804 B1. WO 00/047630, 2003.
- ¹⁰⁸ M. Weltrowski, M. Morcellet, B. Martel, Fibre présentant des propriétés de complexation améliorées et des propriétés échangeuses de cations FR 99/01967, 1999. PCT/FR00/00378 (2000), US 09913, 448, 2001.
- ¹⁰⁹ D. Ruffin, Polymérisation et greffage sur fibres textiles des cyclodextrines par réticulation au moyen d'acides polycarboxyliques: Etudes des procédés et applications. Thèse Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, 2002.
- ¹¹⁰ N. Blanchemain, T. Laurent, F. Chai, C. Neut, S. Haulon, V. Krump-konvalinkova, M. Morcellet, B. Martel, C.J. Kirkpatrick, H.F. Hildebrand, Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: Cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomaterialia* **4**: 1725–1733, 2008.
- ¹¹¹ N. Blanchemain, S. Haulon, B. Martel, M. Traisnel, M. Morcellet, H.F. Hildebrand, Vascular PET prostheses surface modification with cyclodextrin coating: development of a new drug delivery system. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **29**: 628–632, 2005.
- ¹¹² N. Blanchemain, S. Haulon, F. Boschin, M. Traisnel, M. Morcellet, B. Martel, H.F. Hildebrand, Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomolecular Engineering* **24**: 143–148, 2007.
- ¹¹³ N. Tabary, S. Lepretre, F. Boschin, N. Blanchemain, C. Neut, E. Delcourt-Debruyne, B. Martel, M. Morcellet, H.F. Hildebrand, Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidin. *Biomolecular Engineering* **24**: 472–476, 2007.
- ¹¹⁴ C. Sperling, M. Fischer, M.F. Maitz, C. Werner, Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials* **30**: 4447–4456, 2009.

-
- ¹¹⁵ S. Berlot-Moirez, G. Pavon-Djavid, B. Montdargent, M. Jozefowicz, V. Migonney, Modulation of *Staphylococcus aureus* adhesion by biofunctional copolymers derived from polystyrene. *ITBM-RBM* **23**: 102-108, 2002.
- ¹¹⁶ F. Poncin-Epaillard, Exploration des traitements par plasma froid pour le contrôle de la bioadhésion d'un matériau.
- ¹¹⁷ J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* **32**: 698–725, 2007.
- ¹¹⁸ C. Freij-Larsson, T. Nylander, P. Jannasch and B. Wesslén, Adsorption behaviour of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption. *Biomaterials* **17**: 2199-2207, 1996.
- ¹¹⁹ K.C. Khulbe, C. Feng, T. Matsuura, The art of surface modification of synthetic polymeric membranes. *Journal of Applied Polymer Science* **115**: 855–895, 2010.
- ¹²⁰ B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T.E. Mollnes, J.D. Lambris, The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Molecular Immunology* **44**: 82–94, 2007.
- ¹²¹ K.D. Park, Y.S. Kim, D.K. Han, Y.H. Kim, E.H. Bae Lee, H. Suh, K.S. Choi, Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials* **19**: 851-859, 1998.
- ¹²² B. Gottenbos, H.J. Busscher, H.C. Van Der Mei, P. Nieuwenhuis, Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **13**: 717-722, 2002.
- ¹²³ K.M. Wienczek, M. Fletcher, Bacterial adhesion to hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiol self- assembled monolayers. *Journal of Bacteriology* **177**: 1959–1966, 1995.
- ¹²⁴ L. Ploux, S. Beckendorff, M. Nardin, S. Neunlist, Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **57**: 174–181, 2007.
- ¹²⁵ Y. Uyama, K. Kato, Y. Ikada, Surface modification of polymers by grafting. *Advances in Polymer Science* **137**: 3-35, 1998.
- ¹²⁶ E.P.K. Currie, W. Norde, M.A. Cohen Stuart, Tethered polymer chains: surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties. *Advances in Colloid and Interface Science* **100–102**: 205–265, 2003.
- ¹²⁷ G.J. Vancso, H. Hillborg, H. Schönherr, Chemical composition of polymer surfaces imaged by atomic force microscopy and complementary approaches. *Advances in Polymer Science* **182**: 55–129, 2005.
- ¹²⁸ V. Roucoules, A. Ponche, A. Geissler, F. Siffer, L. Vidal, S. Ollivier, M. F. Vallat, P. Marie, J. C. Voegel, P. Schaaf, J. Hemmerlé, Changes in Silicon Elastomeric Surface Properties under Stretching Induced by Three Surface Treatments. *Langmuir* **23**: 13136-13145, 2007.
- ¹²⁹ P. Laurens, Préparation de surface de polymères par laser impulsif. LALP –CLFA, Arcueil, Octobre 2007.
- ¹³⁰ D.S. Dunn, A.J. Ouderkerk, Chemical and physical properties of laser-modified polymers, *macromolecules* **23**: 770-774, 1990.
- ¹³¹ J. Deng, L. Wang, L. Liu, W. Yang, Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations. *Progress in Polymer Science* **34**: 156–193, 2009.

-
- ¹³² S. Rouif, Modifications physico-chimiques des plastiques par ionisation, Techniques de l'Ingénieur, traité Plastiques et Composites, AM 3039, 2008.
- ¹³³ A. Chapiro, L'utilisation des rayonnements dans l'industrie. Les Cahiers du MURS **11**: 69-78, 1988.
- ¹³⁴ N. Saito, S. Yamashita, T. Matsuda, Laser-irradiation-induced surface graft Polymerization method. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **35**: 747-750, 1996.
- ¹³⁵ F.Z. Cui, Z.S. Luo, Biomaterials modification by ion-beam processing. Surface and Coatings Technology **112**: 278-285, 1999.
- ¹³⁶ JA. Hunt, RL. Williams, SM. Tavakoli, ST. Riches, Laser surface modification of polymers to improve bio-compatibility. Journal of Materials Science: Materials in Medicine **6**: 813-817, 1995.
- ¹³⁷ G. Mayer, N. Blanchemain, C. Dupas-Bruzek, V. Miri, M. Traisnel, L. Gengembre, D. Derozier, H.F. Hildebrand, Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (pet) surfaces. Biomaterials **27**: 553-566, 2006.
- ¹³⁸ D. He, H. Susanto, M. Ulbricht, Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes. Progress in Polymer Science **34**: 62-98, 2009.
- ¹³⁹ J-L Raimbault, Introduction à la Physique des Plasmas, Cours Master 1 Physique Appliquée et Mécanique. Université Paris-Sud 11, 2010-2011.
- ¹⁴⁰ C. Boucher, Introduction à la physique des plasmas, Cours de Physique des plasmas. Institut National de Recherche Scientifique Centre Énergie-Matériaux Télécommunication, 2011.
- ¹⁴¹ AM Pointu, J. Jolly, J. Perrin, Plasmas froids de décharge. Techniques de l'ingénieur, D 2835, 1997.
- ¹⁴² M-P. Besland, Versatilité des procédés plasma froid pour des défis matériaux. 1ères Journées GRIM 3, Université de Nantes, 8 et 9 Juin 2009.
- ¹⁴³ A-C Dusabineza, Essai d'activation par les traitements Laser YAG et plasma froid de surfaces du PET pour applications biomédicales. Rapport de stage, 2006.
- ¹⁴⁴ D. M. Wafa, F. Breidt, S. M. Gawish, S. R. Matthews, K. V. Donohue, R. M. Roe, M. A. Bourham, Atmospheric plasma-aided biocidal finishes for nonwoven polypropylene fabrics. II. Functionality of synthesized fabrics. Journal of Applied Polymer Science **103**: 1911-1917, 2007.
- ¹⁴⁵ S.S. Asad, C. Dublanche-Tixier, C. Jaoul, J.P. Lavoute, P. Tristant, Application des plasmas froids à pression atmosphérique: de la préparation de surface au revêtement. Université de Limoges, 21 Octobre 2008.
- ¹⁴⁶ C. Sarra-Bournet, Design et réalisation d'un réacteur plasma à pression atmosphérique pour des traitements de surfaces dans le domaine des biomatériaux, Mémoire maîtrise en génie des mines, Métallurgie et Matériaux pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences, Faculté des Sciences et génie, Université Laval Québec, 2007.
- ¹⁴⁷ P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang, Plasma-surface modification of biomaterials. Materials Science and Engineering R **36**: 143-206, 2002.
- ¹⁴⁸ M. Samer Awamat, Adaptation d'un réacteur plasma basse pression de dépôt pour la synthèse d'oxydes soumis à hautes températures. Application aux piles à combustibles type

SOFC et aux barrières thermiques. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 3 Juin 2008.

¹⁴⁹ A. Sublet, Caractérisation de décharges à barrières diélectriques atmosphériques et sub-atmosphériques et application à la déposition de couches d'oxyde de silicium. Thèse de doctorat ès Sciences de l'École polytechnique Fédérale de Lausanne, 22 juin 2007.

¹⁵⁰ R. Morent, N. De Geyter, C. Leys, Effects of operating parameters on plasma-induced PET surface treatment. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **266**: 3081-3085, 2008.

¹⁵¹ N. De Geyter, R. Morent, C. Leys, Influence of ambient conditions on the ageing behavior of plasma-treated PET surfaces. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **266**: 3086–3090, 2008.

¹⁵² C. Oehr, M. Müller, B. Elkin, D. Hegemann, U. Vohrer, Plasma grafting — a method to obtain monofunctional surfaces. *Surface and Coatings Technology* **116–119**: 25–35, 1999.

¹⁵³ F. Massines, Procédés de traitement de surface par décharges, hors équilibre, à la pression atmosphérique., Traitement de surface par plasma-ions (Pise), La lettre destinée aux membres du Club Pise. *Echange & Coordination Recherche-Industrie* **10**: 19-23, Octobre 2003.

¹⁵⁴ N.L. Singh, A. Qureshi, N. Shah, A.K. Rakshit, S. Mukherjee, A. Tripathi, D.K. Avasthi, Surface modification of polyethylene terephthalate by plasma treatment. *Radiation Measurements* **40**: 746 – 749, 2005.

¹⁵⁵ N. Médard, J.C. Soutif, F. Poncin-Epaillard, Characterization of CO₂ plasma-treated 2 polyethylene surface bearing carboxylic groups. *Surface and Coatings Technology* **160**: 197–205, 2002.

¹⁵⁶ R. Bessada, G. Silva, M.C. Paiva, A.V. Machado, Functionalization of PET and PA6.6 woven fabrics. *Applied Surface Science* **257**: 7944–7951, 2011.

¹⁵⁷ N. Delorme, J-F. Bardeau, A. Bulou, F. Poncin-Epaillard, Controlled modification of octadecyltrichlorosilane self-assembled monolayer by CO₂ plasma. *Thin Solid Films* **496**: 612 – 618, 2006.

¹⁵⁸ T. Vrlic, C. Mille, D. Debarnot, F. Poncin-Epaillard, Oxygen atom density in capacitively coupled RF oxygen plasma, *Vacuum* **83**: 792–796, 2009.

¹⁵⁹ I. Gancarz, G. Pozniak, M. Bryjak, Modification of polysulfone membranes 1. CO₂ plasma treatment. *European Polymer Journal* **35**: 1419-1428, 1999.

¹⁶⁰ N. De Geyter, R. Morent, C. Leys, L. Gengembre, E. Payen, S. Van Vlierberghe, E. Schacht, DBD treatment of polyethylene terephthalate: Atmospheric versus medium pressure treatment. *Surface & Coatings Technology* **202**: 3000–3010, 2008.

¹⁶¹ W. Ding, D. Ju, W. Chai., The effect of working pressure on the chemical bond structure and hydrophobic properties of PET surface treated by N ion beams bombardment. *Applied Surface Science* **256**: 6876–6880, 2010.

¹⁶² S. Marais, Y. Hirata, C. Cabot, S. Morin-Grognet, M.-R. Garda, H. Atmani, F. Poncin-Epaillard, Effect of a low-pressure plasma treatment on water vapor diffusivity and permeability of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) and polyethylene films. *Surface & Coatings Technology* **201**: 868–879, 2006.

-
- ¹⁶³ I. Woodward, W.C.E. Schofield, V. Roucoules, J.P.S. Badyal, Super-hydrophobic surfaces produced by plasma fluorination of polybutadiene films. *Langmuir* **19**: 3432-3438, 2003.
- ¹⁶⁴ N.P. Rhodes, D.J. Wilson, R.L. Williams, The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials* **28**: 4561-4570, 2007.
- ¹⁶⁵ M. Takagi, T. Haraguchi, H. Kawai, K. Shaiwaku, T. Inoue, Y. Sawa, H. Matsuda, T. Yoshida, Enhanced adhesion of endothelial cells onto a polypropylene hollow-fiber membrane by discharge treatment and high inoculum cell density. *Journal of Artificial Organs* **4**: 220-225, 2001.
- ¹⁶⁶ E. Amanatides, D. Mataras, M. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, Plasma surface treatment of polyethylene terephthalate films for bacterial repellence. *Surface and Coatings Technology* **200**: 6331-6335, 2006.
- ¹⁶⁷ M. Laroussi, Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Processes and Polymers* **2**: 391-400, 2005.
- ¹⁶⁸ M. Laroussi, (Invited Paper) Low-temperature plasmas for medicine?. *IEEE Transactions on Plasma Science* **37**: 714-725, 2009.
- ¹⁶⁹ M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian, L'H. Yahia, Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* **226**: 1-21, 2001.
- ¹⁷⁰ I. Louis Joseph Dogué, N. Mermilliod, G. Boiron, S. Staveris, Improvement of polypropylene film adhesion in multilayers by various chemical surface modifications. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **15**: 205-210, 1995.
- ¹⁷¹ T. Vrlicic, D. Debarnot, M. Mozetic, A. Vesel, J. Kovac, A. Coudreuse, G. Legeay, F. Poncin-Epaillard, Elaboration of nano-structured grafted polymeric surface. *Journal of Colloid and Interface Science* **362**: 300-310, 2011.
- ¹⁷² K. Kato, E. Uchida, E-T. Kang, Y. Uyamaa, Y. Ikada, Polymer surface with graft chains. *Progress in Polymer Science* **28**: 209-259, 2003.
- ¹⁷³ K.Y. Cho, J-Y. Eom, C-H. Kim, J-K. Park, Grafting of glycidyl methacrylate onto high-density polyethylene with reaction time in the batch mixer. *Journal of Applied Polymer Science* **108**: 1093-1099, 2008.
- ¹⁷⁴ M. Pracella, D. Chionna, Reactive compatibilization of blends of PET and PP modified by GMA grafting. *Macromolecular Symposia* **198**: 161-171, 2003.
- ¹⁷⁵ C.A.B. Nava-Ortiz, G. Burillo, E. Bucio, C. Alvarez-Lorenzo, Modification of polyethylene films by radiation grafting of glycidyl methacrylate and immobilization of β -cyclodextrin. *Radiation Physics and Chemistry* **78**: 19-24, 2009.
- ¹⁷⁶ D. Wang, G. Sun, B. Xiang, B. Chiou, Controllable biotinylated poly(ethylene-co-glycidyl methacrylate) (PE-co-GMA) nanofibers to bind streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) for potential biosensor applications. *European Polymer Journal* **44**: 2032-2039, 2008.
- ¹⁷⁷ A. Alberti, S. Bertini, G. Gastaldi, N. Iannaccone, D. Macciantelli, G. Torri, E. Vismara, Electron beam irradiated textile cellulose fibres. ESR studies and derivatisation with glycidyl methacrylate(GMA). *European Polymer Journal* **41**: 1787-1797, 2005.

-
- ¹⁷⁸ P. Le Thuaut, B. Martel, G. Crini, U. Maschke, X. Coqueret, M. Morcellet, Grafting of Cyclodextrins onto polypropylene nonwoven fabrics for the manufacture of reactive filters. I. Synthesis parameters. *Journal of applied polymer science* **77**: 2118–2125, 2000.
- ¹⁷⁹ B. Martel, P. Le Thuaut, G. Crini, M. Morcellet, A-M Naggi, U. Maschke, S. Bartini, C. Vecchi, X. Coqueret, G. Torri, Grafting of cyclodextrins onto polypropylene nonwoven fabrics for the manufacture of reactive filters. II. Characterization. *Journal of Applied Polymer Science* **78**: 2166–2173, 2000.
- ¹⁸⁰ B. Martel, P. Le Thuaut, S. Bartini, G. Crini, M. Baquet, G. Torri, M. Morcellet, Grafting of cyclodextrins onto polypropylene nonwoven fabrics for the manufacture of reactive filters. III. Study of the sorption properties. *Journal of Applied Polymer Science* **85**: 1771–1778, 2002.
- ¹⁸¹ S.M. Gawish, S.R. Matthews, D.M. Wafa, F. Breidt, M.A. Bourham, Atmospheric plasma-aided biocidal finishes for nonwoven polypropylene Fabrics. I. Synthesis and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science* **103**: 1900–1910, 2007.
- ¹⁸² T. Hirotsu, Plasma graft polymerization of glycidyl methacrylate and cyclodextrin immobilization, *Thin Solid Films* **506–507**: 173 – 175, 2006.
- ¹⁸³ C.A.B. Nava-Ortiz, C. Alvarez-Lorenzo, E. Bucio, A. Concheiro, Cyclodextrin-functionalized polyethylene and polypropylene as biocompatible materials for diclofenac delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **382**: 183–191, 2009.
- ¹⁸⁴ Y. Liu, C.M. Li, W. Hu, Z. Lu, High performance protein microarrays based on glycidyl methacrylate-modified polyethylene terephthalate plastic substrate. *Talanta* **77**: 1165 –1171, 2009.
- ¹⁸⁵ T. Du, B. Liu, X. Hou, B. Zhang, C. Du, Covalent immobilization of glucose oxidase onto Poly(St-GMA-NaSS) monodisperse microspheres via BSA as spacer arm. *Applied Surface Science* **255**: 7937–7941, 2009.
- ¹⁸⁶ N. Milosavic, R. Prodanovic, S. Jovanovic, Z. Vujcic, Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA). *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 1422–1426, 2007.
- ¹⁸⁷ M.K. Danquah, G.M. Forde, The suitability of DEAE-Cl active groups on customized poly(GMA-co-EDMA) continuous stationary phase for fast enzyme-free isolation of plasmid DNA. *Journal of Chromatography B* **853**: 38–46, 2007.
- ¹⁸⁸ J.K. Shim, H.S. Na, Y.M. Lee, H. Huh, Y.C. Nho, Surface modification of polypropylene membranes by γ -ray induced graft copolymerization and their solute permeation characteristics. *Journal of Membrane Science* **190**: 215–226, 2001.
- ¹⁸⁹ M. Ulbricht, G. Belfort, Surface modification of ultrafiltration membranes by low temperature plasma II. Graft polymerization onto polyacrylonitrile and polysulfone. *Journal of Membrane Science* **111**: 193-215, 1996.
- ¹⁹⁰ W-L. Lu, C.Y. Huang, M.L. Roan, Effect of plasma treatment on the degree of AAm grafting for highdensity polyethylene. *Surface and Coatings Technology* **172**: 251–261, 2003.
- ¹⁹¹ M.Y. Arica, A. Denizli, B. Salih, E. Piskin, V. Hasirci, Catalase adsorption onto Cibacron Blue F3GA and Fe(III) - derivatized poly(hydroxyethyl methacrylate) membranes and application to a continuous system. *Journal of Membrane Science* **129**: 65-76, 1997.

-
- ¹⁹² S-D. Lee, G-H. Hsiue, C-Y. Kao, P.C-T. Chang, Artificial cornea: surface modification of silicone rubber membrane by graft polymerization of pHEMA via glow discharge. *Biomaterials* **17**: 567-595, 1996.
- ¹⁹³ G.F. Bickerstaff, Immobilization of enzymes and cells. John M. Walker, Humana Press, 1st edition, UK, 1997.
- ¹⁹⁴ F.C. Loh and K. L. Tan, E. T. Kang, Y. Uyama and Y. Ikada, Structural studies of polyethylene, poly(ethylene terephthalate) and polystyrene films modified by near u.v. light induced surface graft copolymerization. *Polymer* **36**: 21-27, 1995.
- ¹⁹⁵ M-R. Yang, K-S. Chen, J-C. Tsai, C-C. Tseng, S-F. Lin, The antibacterial activities of hydrophilic-modified nonwoven PET. *Materials Science and Engineering* **20**: 167-173, 2002.
- ¹⁹⁶ A. Geissler, M-F. Vallat, L. Vidal, J-C. Voegel, J. Hemmerlé, P. Schaaf, V. Roucoules, Chemical force titration of plasma polymer-modified PDMS substrates by using plasma polymer-modified AFM tips. *Langmuir* **24**: 4874-4880, 2008.
- ¹⁹⁷ V. Roucoules, W.C.E. Schofield, J.P.S. Badyal, Photo-rewritable molecular printing. *Journal of Materials Chemistry* **21**: 16153–16161, 2011.
- ¹⁹⁸ O. Soppera, A. Dirani, V. Roucoules, A. Ponche, DUV-induced micro and nanopatterning of polymer plasma deposited films. *Microelectronic Engineering* **86**: 718–721, 2009.
- ¹⁹⁹ L. Ploux, K. Anselme, A. Dirani, A. Ponche, O. Soppera, and V. Roucoules, Opposite Responses of Cells and Bacteria to Micro/Nanopatterned Surfaces Prepared by Pulsed Plasma Polymerization and UV-Irradiation. *Langmuir* **25**: 8161–8169, 2009.
- ²⁰⁰ M.T. Van Os, B. Menges, R. Foerch, G. J. Vancso, W. Knoll, Characterization of plasma-polymerized allylamine using waveguide mode spectroscopy. *Chemistry of Materials* **11**: 3252-3257, 1999.
- ²⁰¹ M. Toufik, A. Mas, V. Shkinev, A. Nechaev, A. Elharfi, F. Schué, Improvement of performances of PET track membranes by plasma treatment. *European Polymer Journal* **38**: 203-209, 2002.
- ²⁰² A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, P. Supiot, B. Bocquet, C. Vivien, D. Guillochon, Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **73**: 315–324, 2009.
- ²⁰³ Y. Uyama, N. Tomita, Y. Ikada, Preparation of lubricious medical tube device by plasma-induced graft polymerization. *Journal of Photopolymer Science and Technology* **6**: 325 - 330, 1993.
- ²⁰⁴ T. Matsuda, N. Saito, T. Sugawara, Ceric-Ion-Initiating Surface Graft Polymerization with Regional Control and Dimensional Precision. *Macromolecules* **29**: 7446-7451, 1996.
- ²⁰⁵ T. Hirotsu, Graft polymerized membranes of methacrylic acid by plasmas for water-ethanol permseparation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **26**: 1287-1290, 1987.
- ²⁰⁶ Z. Ma, M. Kotaki, T. Yong, W. He, S. Ramakrishna, Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials* **26**: 2527–2536, 2005.
- ²⁰⁷ J. Chen, L. Yang, L. Chen, M. Wu, Y.C. Nho, I. Kaetsua, An interesting grafting reactivity of EB preirradiated polypropylene film. *Radiation Physics and Chemistry* **69**:149–154, 2004.

-
- ²⁰⁸ I. Louis Joseph Dogué, N. Mermilliod, R. Foerch, Grafting of acrylic acid onto polypropylene – comparison of two pretreatments: γ -irradiation and argon plasma. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **105**: 164-167, 1995.
- ²⁰⁹ R. Mazzei, A. Fernandez, G. Garcia Bermudez, A. Torres, M.C. Gutierrez, M. Magni, G. Celma, D. Tadey, Grafting of acrylic acid on etched latent tracks induced by swift heavy ions on polypropylene films. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **266**: 3170–3173, 2008.
- ²¹⁰ Y.S. Ramirez-Fluentes, E. Bucio, G. Burillo, Radiation-induced grafting of N-isopropylacrylamide and acrylic acid onto polypropylene films by two step method. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **265**: 183-186, 2007.
- ²¹¹ M. Kattan, E. El-Nesr, γ -Radiation-induced graft copolymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: A study by thermal analysis. *Journal of Applied Polymer Science* **102**: 198-203, 2006.
- ²¹² Y. Shin, k. Son, D. Il Yoo, Functional finishing by using atmospheric pressure plasma: grafting of PET nonwoven fabric. *Journal of Applied Polymer Science* **103**: 2655-3659, 2007.
- ²¹³ H-S. Choi, Y-S. Kim, Y. Zhang, S. Tang, S-W. Myung, B-C. Shin, Plasma-induced graft co-polymerization of acrylic acid onto the polyurethane surface. *Surface and Coatings Technology* **182**: 55–64, 2004.
- ²¹⁴ J.K. Shim, Y.B. Lee, Y.M. Lee, pH-dependent permeation through polysulfone Ultrafiltration membranes prepared by ultraviolet polymerization technique. *Journal of Applied Polymer Science* **74**: 75–82, 1999.
- ²¹⁵ C. Makhlouf, S. Marais, S. Roudesli, Graft copolymerization of acrylic acid onto polyamide fibers. *Applied Surface Science* **253**: 5521–5528, 2007.
- ²¹⁶ A. Chunder, S. Sarkar, Y. Yu, L. Zhai, Fabrication of ultrathin polyelectrolyte fibers and their controlled release properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58**: 172–179, 2007.
- ²¹⁷ D.E. Bergbreiter, A. Bandella, pH and solvent responsive reactivity of surface-grafted polyethylene films. *Journal of the American Chemical Society* **117**: 10589- 10590, 1995.
- ²¹⁸ I. Gancarz, G. Pozniak, M. Bryjak and A. Frankiewicz, Modification of polysulfone membranes. 2. Plasma grafting and plasma polymerization of acrylic acid. *Acta Polymerica* **50**: 317–326, 1999.
- ²¹⁹ J-P. Chen, Y-P. Chiang, Surface modification of non-woven fabric by DC pulsed plasma treatment and graft polymerization with acrylic acid. *Journal of Membrane Science* **270**: 212–220, 2006.
- ²²⁰ B. Gupta, C. Plummer, I. Bisson, P. Frey, J. Hilborn, Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. *Biomaterials* **23**: 863–871, 2002.
- ²²¹ I. Bisson, M. Kosinski, S. Ruault, B. Gupta, J. Hiborn, F. Wurm, P. Frey, Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials* **23**: 3149–3158, 2002.
- ²²² Ch. Baquey, F. Palumbo, M.C. Porte-Durrieu, G. Legeay, A. Tressaud, R. d'Agostino, Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **151**: 255-262, 1999.

-
- ²²³ R. Jingrun, W. Jin, S. Hong, H. Nan, Surface modification of polyethylene terephthalate with albumin and gelatin for improvement of anticoagulation and endothelialization. *Applied Surface Science* **255**: 263–266, 2008.
- ²²⁴ B. Gupta, J.G. Hilborn, I. Bisson, P. Frey, Plasma-Induced graft polymerization of acrylic acid onto Poly(ethylene terephthalate) films. *Journal of applied polymer science* **81**: 2993–3001, 2001.
- ²²⁵ B. Gupta, A. Srivastava, N. Grover, S. Saxena, Plasma induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) monofilament. *Indian Journal of Fibers & Textile Research* **35**: 9–14, 2010.
- ²²⁶ B. Gupta, S. Saxena, A. Ray, Plasma induced graft polymerization of acrylic acid onto polypropylene monofilament. *Journal of Applied Polymer Science* **107**: 324–330, 2008.
- ²²⁷ C. Wang, J.-R. Chen, Studies on surface graft polymerization of acrylic acid onto PTFE film by remote argon plasma initiation. *Applied Surface Science* **253**: 4599–4606, 2007.
- ²²⁸ Y.W. Chen-Yang, J.D. Liao, J.Y. Kau, J. Huang, W.T. Chang, C.W. Chen, Surface modifications of expanded poly(tetrafluoroethylene) sheets assisted by CO₂ antenna coupling microwave plasma. *Macromolecules* **33**: 5638–5643, 2000.
- ²²⁹ M.-C. Yang, W.-C. Lin, The grafting of chitosan oligomer to polysulfone membrane via ozone-treatment and its effect on anti-bacterial activity. *Journal of Polymer Research* **9**: 135–140, 2002.
- ²³⁰ K.A. Woodhouse, P. Klement, V. Chen, M.B. Gorbet, F.W. Keeley, R. Stahl, J.D. Fromstein, C.M. Bellingham, Investigation of recombinant human elastin polypeptides as non-thrombogenic coatings. *Biomaterials* **25**: 4543–4553, 2004.
- ²³¹ F. Jobain, *La thrombose*. Les Presses de l'Université Laval, Editions Maloine, 1995.
- ²³² B. Casu, A. Naggi, G. Torri, Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer. *Matrix Biology* **29**: 442–452, 2010.
- ²³³ H. Fink, *Artificial blood vessels; Studies on endothelial cell and blood interactions with bacterial cellulose*. Doctoral Thesis for the degree of Doctor of Medicine, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden, 2009.
- ²³⁴ J.D. Whiffen, V.L. Gott, In vivo adsorption of heparin by graphite-benzalkonium intravascular surfaces. *Surgery Gynecology & Obstetrics* **121**: 287–290, 1965.
- ²³⁵ V.L. Gott, J.D. Whiffen, R.C. Dutton, Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* **142**: 1297–1298, 1963.
- ²³⁶ P.H.J. van Bilsena, G. Krenningb, D. Billy, J.L. Duval, J. Hurdeman-Vincent, M.J.A. Van Luyn, Heparin coating of poly(ethylene terephthalate) decreases hydrophobicity, monocyte/leukocyte interaction and tissue interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **67**: 46–53, 2008.
- ²³⁷ I. Noh, M.A. Lovich, E.R. Edelman, Mechanisms of heparin transport through expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular graft. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 112–119, 2000.
- ²³⁸ M.L.W. Knetsch, Y.B.J. Aldenhoff, M. Scharven, L.H. Koole, Human endothelial cell attachment and proliferation on a novel vascular graft prototype. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **71**: 615–62, 2004.

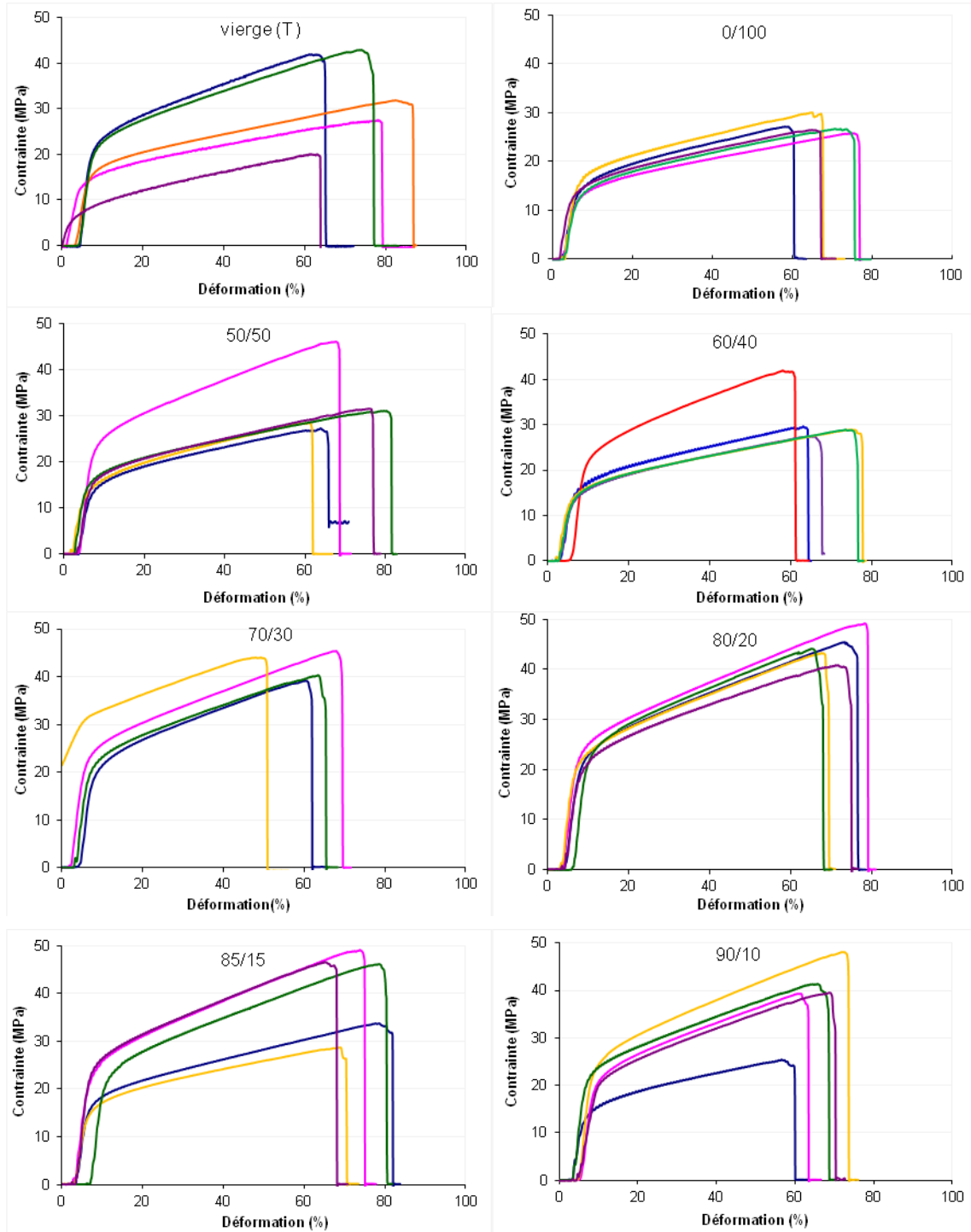
-
- ²³⁹ E. Laemmel, J. Penhoat, R. Warocquier-Clérout, M-F. Sigot-Luizard, Heparin immobilized on proteins usable for arteria prosthesis coating: Growth inhibition of smooth-muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **39**: 446–452, 1998.
- ²⁴⁰ Y.J. Kim, I-K. Kang, M.W. Huh, S-C. Yoon, Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials* **21**: 121-130, 2000.
- ²⁴¹ K. Navaneetha Pandiyaraj, V. Selvarajan, Y.H. Rhee, H.W. Kim, S.I. Shah, Glow discharge plasma-induced immobilization of heparin and insulin on polyethylene terephthalate film surfaces enhances anti-thrombogenic properties. *Materials Science and Engineering C* **29**: 796–805, 2009.
- ²⁴² D-J. Lin, D-T. Lin, T-H. Young, F-M. Huang, C-C. Chen, L-P. Cheng, Immobilization of heparin on PVDF membranes with microporous structures. *Journal of membranes* **245**: 137-146, 2004.
- ²⁴³ G.B. Oliveira, L.B. Carvalho Jr., M.P.C. Silva, Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials* **24**: 4777–4783, 2003.
- ²⁴⁴ D. Neut, H. van de Belt, I. Stokroos, J.R. van Horn, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 885–891, 2001.
- ²⁴⁵ G. Ginalska, D. Kowalczyk, M. Osinska, A chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts. *International Journal of Pharmaceutics* **288**: 131–140, 2005.
- ²⁴⁶ M. Osinska-Jaroszuk, G. Ginalska, A. Belcarz, A. Uryniak, Vascular prostheses with covalently bound gentamicin and amikacin reveal superior antibacterial properties than silver-impregnated ones an in vitro study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **38**: 697-706, 2009.
- ²⁴⁷ A. Fleming, On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the royal society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **93**: 306-317, 1922.
- ²⁴⁸ R.H. Garrett, C.M. Grisham, *Biochemistry 3rd edition*, GARRETT GRISHAM, USA, 2005.
- ²⁴⁹ A. Conte, G.G. Buonocore, M. Sinigaglia, M.A. Del Nobile, Development of immobilized lysozyme based active film. *Journal of Food Engineering* **78**: 741–745, 2007.
- ²⁵⁰ P. Appendini, J.H. Hotchkiss, Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packaging Technology and Science* **10**: 271–279, 1997.
- ²⁵¹ J. Vincent Edwards, K. Sethumadhavan, A.H.J. Ullah, Conjugation and modeled structure/function analysis of lysozyme on glycine esterified cotton cellulose-fibers. *Bioconjugate Chemistry* **11**: 469-473, 2000.
- ²⁵² A. Pellegrini, U. Thomas, R. von Fellenberg, P. Wild, Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *Journal of Applied Bacteriology* **72**: 180-187, 1992.
- ²⁵³ B. Masschalck, C. Garcia-Graells, E. Van Haver, C.W. Michiels, Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **1**: 39-47, 2000.

-
- ²⁵⁴ R.T. Ellison, T.J. Giehl, Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The American Society for Clinical Investigation* **88**: 1080-1091, 1991.
- ²⁵⁵ H.Y. Lee, A. Andalibi, P. Webster, S-K. Moon, K. Teufert, S-H. Kang, J-D. Li, M. Nagura, T. Ganz, D-J. Lim, Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Infectious Diseases* **4**: 12, 2004.
- ²⁵⁶ V.L. Hughey, E.A. Johnson, Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and environmental microbiology* **53**: 2165-2170, 1987.
- ²⁵⁷ A. Caro, V. Humblot, M. Minier, M. Salmain, C. Compère, C.M. Pradier, Fonctionnalisation de surfaces d'acier inoxydable par des enzymes en vue d'inhiber l'adhésion de bactéries et la formation de biofilms en eau de mer. *Matériaux & Techniques, Special Edition: VIIIe Forum de Biodétérioration des Matériaux* **94**: 455, 2007.
- ²⁵⁸ R.D. Joerger, Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging Technology and Science* **20**: 231-273, 2007.
- ²⁵⁹ S. Quintavalla, L. Vicini, Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **62**: 373-380, 2002.
- ²⁶⁰ Q. Wang, X. Fan, Yingjun Hu, J. Yuan, L. Cui, P. Wang, Antibacterial functionalization of wool fabric via immobilizing lysozymes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **32**: 633-639, 2009.
- ²⁶¹ A.K. Muszanska, H.J. Busscher, A. Herrmann, H.C. van der Mei, W. Norde, Pluronic-lysozyme conjugates as anti-adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating. *Biomaterials* **32**: 6333-6341, 2011.
- ²⁶² J. Goupy, Plans d'expériences pour surfaces de réponses. DUNOD, 1999.
- ²⁶³ Norme Internationale ISO 6239-1986 (F) : Plastiques-détermination des caractéristiques en traction sur petites éprouvettes.
- ²⁶⁴ A. Bouafsoun-Ltaief, Caractérisation et quantification de l'adhésion des cellules endothéliales à des biomatériaux fonctionnalisés, Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon et de l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Lyon, 13 Décembre 2006.
- ²⁶⁵ E.V. Davis, V.S. Bolin, Continuous cultivation of isogenous cell lines from the human embryo, *Fred. Proc.* **19**: 386, 1960.
- ²⁶⁶ P. Rocher, L. El Medawar, J.C. Hornez, M. Traisnel, J. Breme, H.F. Hildebrand, Biocorrosion and cytocompatibility assessment of NiTi shape memory alloys. *Scripta Materialia* **50**: 255-260, 2004.
- ²⁶⁷ Y. Tamada, EA. Kulik, Y. Ikada, Simple method for platelet counting. *Biomaterials* **16**: 259-261, 1995.
- ²⁶⁸ P. Kingshott, S. McArthur, H. Thissen, D.G. Castner, H.J. Griesser, Ultrasensitive probing of the protein resistance of PEG surfaces by secondary ion mass spectrometry. *Biomaterials* **23**: 4775-4785, 2002.
- ²⁶⁹ H. Fasl, J. Stana, D. Stropnik, S. Strnad, K. Stana-Kleinschek, V. Ribitsch, Improvement of the hemocompatibility of PET surfaces using different sulphated polysaccharides as coating materials. *Biomacromolecules* **11**: 377-381, 2010.

-
- ²⁷⁰ V. Ilic, Z. Saponjic, V. Vodnik, R. Molina, S. Dimitrijevic, Petar Jovancic, J. Nedeljkovic, M. Radetic, Antifungal efficiency of corona pretreated polyester and polyamide fabrics loaded with Ag nanoparticles. *Journal of Materials Science* **44**: 3983–3990, 2009.
- ²⁷¹ N. Durán, P.D. Marcato, G.I.H. De Souza, O.L. Alves, E. Esposito, Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **3**: 203–208, 2007.
- ²⁷² M. Suzuki, A. Kishida, H. Iwata, Y. Ikada, Graft copolymerization of acrylamide onto a polyethylene surface pretreated with a glow discharge. *Macromolecules* **19**: 1804–1808, 1986.
- ²⁷³ T. Yamaguchi, S.I. Nakao, S. Kimura, Evidence and mechanisms of filling polymerization by plasma-induced graft polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A Polymer Chemistry* **34**: 1203–1208, 1996.
- ²⁷⁴ O.H. Kwon, Y.C. Nho, J.H. Jin, M. J. Lee, Y. M. Lee, Graft polymerization of methyl methacrylate onto radiation-peroxidized ultrahigh molecular weight polyethylene in the presence of metallic salt and acid. *Journal of Applied Polymer Science* **72**: 659–666, 1999.
- ²⁷⁵ S. Degoutin, M. Jimenez, M. Casetta, S. Bellayer, F. Chai, N. Blanchemain, I. Kacem C. Neut, M. Traisnel, B. Martel, Anticoagulant and antimicrobial finishing of nonwoven polypropylene textiles. *Biomedical Materials*, in press, 2012.
-

ANNEXE 1

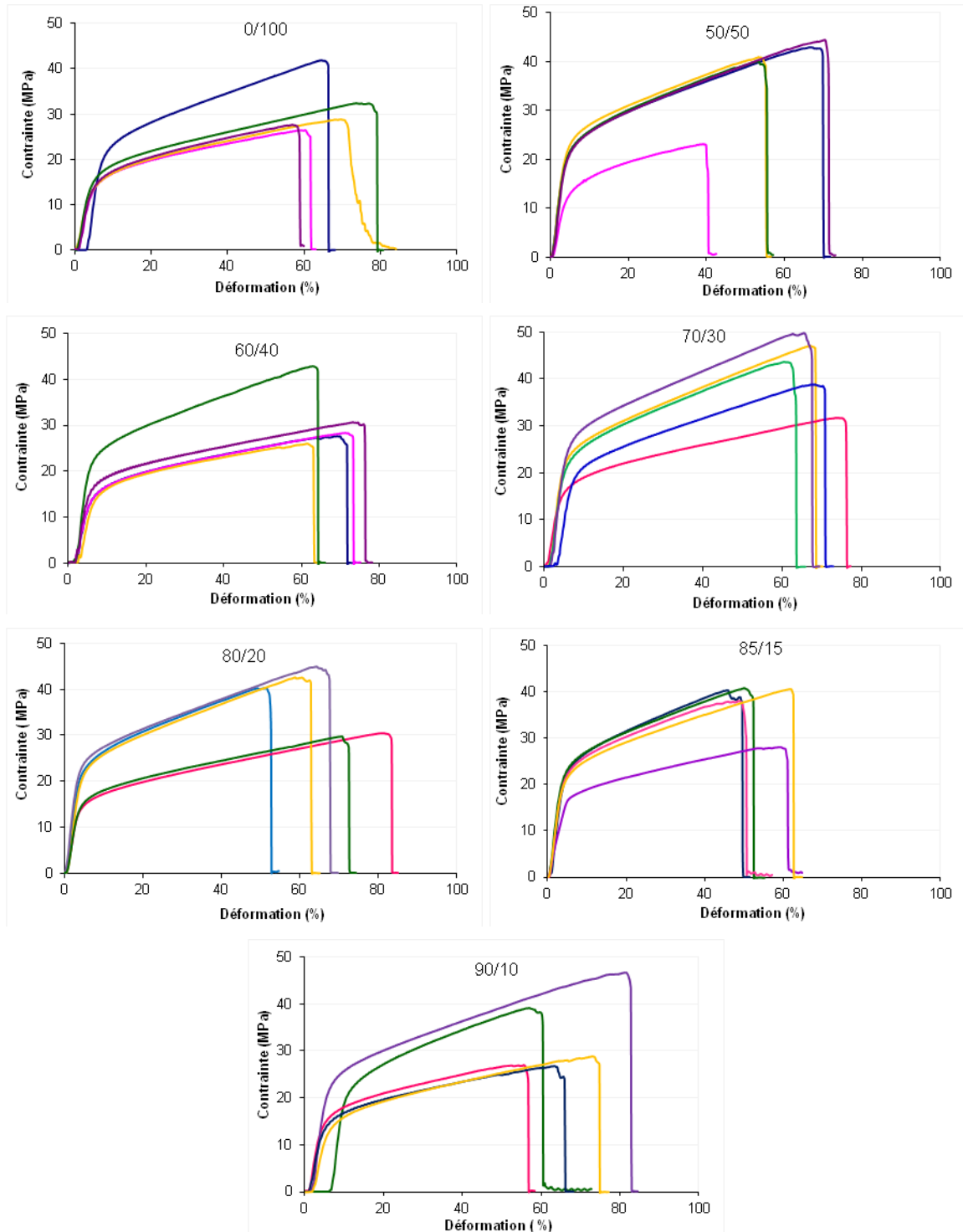
Résultats des essais de traction pour les échantillons de PET traités seulement plasma froid (120s, 300 Watts)



Courbes de traction des textiles en PET non tissés traités au plasma froid (120s, 300 Watts) aux différentes proportions d'Argon / Oxygène et non greffés au PAA (n=5)

ANNEXE 2

Résultats des essais de traction pour les non tissés de PET traités plasma froid (120s, 300 Watts) et greffés PAA (2.5M, 80°C, 4H)



Courbes de traction pour les textiles en PET non tissés greffés à l'acide acrylique (2.5 M) traités au plasma froid à n=5(120s, 300 Watts) aux différentes proportions d'Argon / Oxygène et greffés au PAA (2,5M,80°C,120 s) (n=5)

ANNEXE 3

Données de MODDE pour la réponse Y_1 (le taux de greffage) : Table d'ANOVA

Greffage Y_1	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	25	38567	1542,68			
Constant	1	34602,7	34602,7			
Total Corrected	24	3964,34	165,181			12,8523
Regression	20	3959,22	197,961	154,666	0	14,0699
Residual	4	5,11971	1,27993			1,13134
Lack of Fit	3	5,10526	1,70175	117,766	0,068	1,30451
(Model Error)						
Pure Error	1	0,0144502	0,0144502			0,120209
(Replicate Error)						
	N = 25	Q2 =	0,879	Cond. no. =	9,2646	
	DF = 4	R2 =	0,999	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,992	RSD =	1,1313	

ANNEXE 4

Données de MODDE pour la réponse Y₂(l'enrobage) : Table d'ANOVA

Enrobage Y ₂	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	26	198	7,61538			
Constant	1	177,846	177,846			
Total Corrected	25	20,1539	0,806154			0,897861
Regression	20	20,1122	1,00561	120,673	0	1,0028
Residual	5	0,0416666	0,00833332			0,091287
Lack of Fit (Model Error)	3	0,0416666	0,0138889	1,17E+13	0	0,117851
Pure Error (Replicate Error)	2	2,37E-15	1,18E-15			3,44E-08
	N = 26	Q2 =	0,829	Cond. no. =	9,3514	
	DF = 5	R2 =	0,998	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,99	RSD =	0,0913	

Résumé

Textiles à activité biologique via le greffage par plasma et l'immobilisation de molécules bioactives

L'intérêt des implants médicaux ne cesse de grandir et leur utilisation tend à s'étendre aux différents domaines de la chirurgie, en partie grâce à l'émergence de nouvelles techniques de modification de surface. Ainsi il est possible d'améliorer les propriétés des biomatériaux en vue d'une meilleure intégration dans les tissus vivants et prévenir les diverses complications liées à leur utilisation. Ceci permet à la fois de répondre aux attentes des chirurgiens, d'améliorer les conditions de guérison des patients suite à l'intervention, voire même d'apporter une activité thérapeutique à long terme au biomatériau en évitant la rechute, la thrombose, la restenose ou l'infection. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à fonctionnaliser la surface de textiles en polyester (polyéthylène téréphtalate), matière très largement utilisée dans le domaine médical, par des molécules bioactives connues par leurs propriétés antibactérienne ou anti-thrombotique: le lysozyme, la gentamicine et l'héparine. L'idée développée dans ce travail de thèse fut de fixer dans un premier temps des fonctions acide carboxylique (-COOH) jouant le rôle d'«ancrage» pour la fixation ultérieure des trois principes actifs. La première étape a donc consisté à greffer l'acide polyacrylique (PAA) par copolymérisation greffante assistée par traitement plasma froid, suivie dans un second temps, de la fixation des trois principes actifs, par liaisons physiques (ioniques) et/ou covalentes. L'étude a d'abord porté sur l'optimisation des paramètres de ces deux étapes du traitement via une investigation systématique et un plan d'expériences. Des techniques de caractérisations telles que la spectrophotométrie UV, l'analyse infrarouge IRTF, l'analyse thermique ATG, l'analyse par spectrométrie photoélectronique XPS, la mesure de l'angle de goutte, la microscopie électronique à balayage MEB et des essais mécaniques ont montré l'évolution de la composition de la surface et de propriétés mécaniques des textiles au fil des différentes étapes. Des études biologiques par des tests de vitalité cellulaire, d'adhésion plaquettaire et de coagulation ainsi que différentes études microbiologiques ont pu montrer selon les différentes voies de modification choisies l'obtention de supports fonctionnalisés biocompatibles à efficacité intéressante pour des applications biomédicales.

Mots clés: Biomatériaux – Textile – Plasma – Greffage – Gentamicine – Héparine – Lysozyme – acide acrylique

Abstract

Textiles with biological activity via the grafting by cold plasma and the immobilization of bioactive molecules

The interest in medical implants increases and their use spreads to different surgical domains partially thanks to the new techniques of surface modification. Therefore it is possible to improve the biomaterials properties in order to solve the problems linked with their integration in the living tissues and thereby to prevent the various complications related to their use. This approach allows to respond to the surgeons expectations, to improve the curing process of the patients and even to involve long term therapeutic activities to the biomaterial, thus preventing the release of the disease (such as thrombosis, restenosis, infection). In this context, we have attempted the functionalization of the surface of a polyester fabric (polyethylene terephthalate), widely used in medical field, by three bioactive molecules: lysozyme, gentamicin and heparin known for their antimicrobial or anti thrombotic properties. The concept was to graft polyacrylic acid (PAA) by graft polymerization induced by cold plasma technique, followed by the immobilization of the above mentioned molecules through physical and covalent links. We studied all the experimental parameters involved in the different processes and followed the properties of the obtained materials through the appropriate characterizations techniques, such as spectrophotometry UV, Infrared analysis IRTF, Thermogravimetric analysis (TGA), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), goniometry, scanning electron microscope (SEM), and mechanical tests. Finally, biological studies such as cell vitality tests, platelets adhesion test and coagulation test in addition with various microbiological essays showed the evolution of the biological properties of the materials, depending on the path of their modification resulted in the development of a novel, biocompatible functionalized supports family with very interesting and attractive efficacy for biomedical applications.

Keywords: Biomaterials - Fabric – Plasma – Grafting – Gentamicin – Heparin – Lysozyme – acrylic acid