

N° Ordre : 40797



Université des sciences et technologies de Lille
École Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

Thèse
pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille
Molécules et Matière Condensée

Soutenue par
VERMET Guillaume

Le 30 mars 2012

Apport de nouvelles propriétés antibactériennes et
analgésiques sur un implant de réfection pariétale

Directeur de la Thèse :

Prof. Bernard MARTEL (UMET – Lille 1)

Membres du jury :

Prof. Véronique MIGONNEY (CSPBAT – Paris 13)

Rapporteur

Prof. Jean COUDANE (UMR5247 – Montpellier 1)

Rapporteur

Prof. Sophie FOURMENTIN (UCEIV – ULCO)

Examineur

Dr. Jean-Maurice MALLET (UMR7203 – ENS Paris)

Examineur

Dr. Nicolas BLANCHEMAIN (Inserm U1008 – Lille 2)

Examineur

Dr. Stéphanie DEGOUTIN (UMET – Lille 1)

Membre invité

Dr. Benjamin BERTIN (Inserm U995 – Lille 2)

Membre invité

Mr. Gilles SOLECKI (COUSIN BIOTECH)

Membre invité

A mes parents sans qui je ne serais pas là

(dans tous les sens du termes !)

A Annie, à ma famille,

A Mélanie pour m'avoir supporté

(dans tous les sens du termes également!)

Remerciements

Ce projet a été réalisé au sein des laboratoires Unité Matériaux Et Transformations (UMET) de l'Université Lille 1 et Unité INSERM U1008 Médicaments et Biomatériaux à libération contrôlée de l'Université Lille 2. Une partie des travaux ont également été menés au sein de l'entreprise COUSIN BIOTECH, Wervicq-Sud.

Mes remerciements vont en tout premier lieu à Monsieur Bernard MARTEL, Professeur de l'Université Lille 1 Sciences et Technologies, pour m'avoir fait confiance dans ce projet. Ces trois années de thèse, et l'année de Master 2 qui a précédé, m'ont apporté énormément et vous en êtes pour beaucoup. Je vous remercie pour vos conseils avisés, votre disponibilité et votre amabilité au laboratoire comme en dehors. J'espère qu'à l'avenir, nous aurons l'occasion de travailler de nouveau ensemble.

Je remercie également Monsieur François COUSIN, Directeur de COUSIN BIOTECH ainsi que Monsieur Valéry DALLE, Responsable Recherche et Développement de COUSIN BIOTECH, pour m'avoir également fait confiance pour mener à bien ce projet.

Je remercie Monsieur Frederich HILDEBRAND, Directeur de recherche INSERM, et Monsieur Juergen Siepmann, Professeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Lille 2, pour avoir consenti à m'accueillir au sein du Groupe de Recherche sur le Biomatériaux de l'Unité INSERM U1008. Mes remerciements vont également au Docteur Feng CHAI, Ingénieur de recherche, pour son aide précieuse lors des évaluations biologiques.

Ce projet doit également énormément à Madame Stéphanie DEGOUTIN, Maître de Conférences, Monsieur Nicolas BLANCHEMAIN, Maître de Conférences HDR et Monsieur Gilles SOLECKI, Ingénieur R&D, Chef de projet, pour leur aide précieuse, leur soutien, leur expertise et leur sympathie.

Je remercie le Docteur Christel NEUT, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques pour son accueil dans le laboratoire de bactériologie ainsi que Monsieur Mickaël MATON, Assistant ingénieur, pour sa sympathie et son aide précieuse et grandement apprécié à la paille.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame Cécile DANIEL, Maître de conférences et Monsieur Marc BRIA, Ingénieur de Recherches, pour leur aide, leur disponibilité et leur expertise en électrophorèse capillaire et en RMN.

Je remercie l'ensemble du personnel des laboratoires UMET et U1008 pour leur sympathie et leur aide et tout particulièrement Monsieur Nicolas TABARY, Maître de Conférences.

Je ne peux toutefois pas oublier mes collègues doctorants et stagiaires rencontrés pendant le déroulement de ce projet : Mariam, Cécile, Adeline, Imen, Nadir, Adrien, Cédric, Julien B., Stéphane,... ainsi que tout ce que j'aurais omis par mégarde.

Je remercie Madame Véronique MIGONNEY, Professeur de l'Université Paris 13, ainsi que Monsieur Jean COUDANE, Professeur de l'Université de Montpellier 1, pour avoir accepté de juger ces travaux en qualité de rapporteurs.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Jean-Maurice MALLET, Directeur de recherche CNRS et Monsieur Benjamin BERTHIN, Maître de Conférence de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques pour leur participation à mon jury de thèse. Mes remerciements vont également à Madame Sophie FOURMENTIN, Professeur de l'Université du Littoral-Côte d'Opale, pour sa participation à mon jury de thèse. Vous fûtes mon professeur de Chimie Organique en 1^{ère} année de DEUG, vous voilà dans mon jury de thèse, la boucle est bouclée...

Apport de nouvelles propriétés antibactériennes et analgésiques sur un implant de réfection pariétale

Longtemps sous-estimées, les complications (douleurs, infections) en chirurgie viscérale par pose d'implants pariétaux s'avèrent critiques par leur implication sur le retour à une activité normale du patient. Les techniques actuelles (ex. infiltration cicatricielle) ne parviennent à assurer qu'une analgésie de courte durée, voir des effets indésirables. La solution proposée a consisté à modifier deux implants pariétaux, l'un biostable (PET) et l'autre résorbable (PLA), par un polymère de cyclodextrine (polyCD), molécule cage connue pour sa capacité à former des complexes d'inclusions réversibles avec des médicaments. L'étude a d'abord porté sur la fonctionnalisation des supports en faisant varier les paramètres afin de maîtriser le degré de polyCD présent sur le textile, ensuite caractérisé par diverses techniques. Une étude de cytocompatibilité *in vitro* a été réalisée afin de détecter l'impact du polyCD sur la vitalité cellulaire. Les supports ont été imprégnés de ciprofloxacine. Après avoir mesuré leur capacité de chargement, des études de libération *in vitro* ont été menées, suivies de tests microbiologiques sur *E. coli* et *S. aureus*. Ces derniers ont montré la contribution du polyCD à augmenter la durée de l'activité antibactérienne. Puis deux molécules anesthésiques (lidocaïne et ropivacaine) ont été étudiées. D'abord, leur inclusion dans la cavité de la CD a été observée en solution par RMN et électrophorèse capillaire. Leurs isothermes d'adsorption ont été réalisées pour évaluer leur taux de chargement respectif sur le textile modifié. Ce taux s'est avéré correspondre aux doses thérapeutiques couramment appliquées localement dans les thérapies existantes.

Mots clés : Modification de surface – cyclodextrines - antibactérien – analgésique – libération prolongée – biomatériaux

Contribution of new antibacterial and analgesic properties on an implant for parietal refection

For a long time underestimated, complications (pain, infection) in visceral surgery with implants, are critical in their impact on the return to normal activity of the patient. Current techniques (scar infiltration,...) only ensure a short analgesia with sometimes side effects. The proposed solution is to confer bioactivity to the prosthesis. To this end, two textiles, a biostable (PET) and an absorbable (PLA), one were modified by coating fibers with a cyclodextrin polymer (polyCD). Cyclodextrins are cage molecules known for their ability to form reversible inclusion complexes with bioactive molecules. The study initially focused on the functionalization of materials by varying the parameters to control the degree of polyCD, then characterized by various techniques. Cytocompatibility study was performed to detect the polyCDs impact on the cell vitality. Concerning the biological activation of the materials, a series of tests was performed with ciprofloxacin. After measuring their loading capacity, release studies were conducted in vitro, followed by microbiological tests on *E. coli* and *S. aureus*. The latter showed the contribution of polyCD on the duration of the antibacterial activity. Then two local anesthetics (lidocaine and ropivacaine) were studied. First, their inclusion in the cyclodextrin was observed in solution by NMR and capillary electrophoresis. Their sorption isotherms were conducted to evaluate their respective loading rate, which corresponded to therapeutic doses commonly used in usual therapeutics.

Keywords : Surface modification – cyclodextrin - antibacterial – analgesic – substained release – biomaterials

Table des matières

Table des matières	1
Glossaire	5
Introduction générale.....	7
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
I. Les hernies de la paroi abdominale	13
<i>I.1. Généralités</i>	<i>13</i>
I.1.1. Hernie ombilicale	14
I.1.2. Hernie épigastrique	15
I.1.3. Hernie fémorale	15
I.1.4. Hernie inguinale.....	15
I.1.5. Autres types de hernies.....	17
<i>I.2. La cure de hernie inguinale.....</i>	<i>18</i>
I.2.1. Méthode avec tension	18
I.2.2. Méthode sans tension - « Tension- Free ».....	19
<i>I.3. Les implants de réfection de la paroi abdominale.....</i>	<i>21</i>
I.3.1. Généralités	21
I.3.2. Implants collagénés.....	22
I.3.3. Implants anti-adhésiogène et adhésifs.....	23
I.3.4. Structure et porosité	24
<i>I.4. Modes d'anesthésie</i>	<i>26</i>
II. Les complications de la cure de hernie inguinale.....	27
<i>II.1. Douleurs chroniques</i>	<i>27</i>
II.1.1. Facteurs et mécanisme	27
II.1.2. Prévention de la chronicisation de la douleur postopératoire	29
<i>II.2. Infections.....</i>	<i>39</i>
II.2.1. Facteurs.....	39
II.2.2. Solutions préventives	40
III. Les cyclodextrines, leurs dérivés et leurs polymères	44
<i>III.1. Généralités</i>	<i>44</i>
<i>III.2. Complexes d'inclusion par les cyclodextrines</i>	<i>47</i>
<i>III.3. Applications</i>	<i>50</i>

III.4. Les cyclodextrines dans l'ennoblissement textile.....	52
III.5. La fonctionnalisation par les cyclodextrines réticulées.....	54
IV. Cahier des charges.....	57
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES	59
I. Matériels, Réactifs et principes actifs.....	61
I.1. Supports textiles.....	61
I.1.1. Polyéthylène téréphtalate (PET)	61
I.1.2. Acide poly-L-lactique (PLLA)	62
I.2. Réactifs.....	63
I.2.1. Cyclodextrines	63
I.2.2. Acides carboxyliques.....	63
I.2.3. Catalyseur	64
I.3. Principes actifs.....	65
I.3.1. Antibiotique.....	65
I.3.2. Anesthésiques locaux.....	65
II. Méthodes	67
II.1. Préparation des polymères de cyclodextrines et fonctionnalisation des supports.....	67
II.1.1. Synthèse du polymère de cyclodextrines.....	67
II.1.2. Procédé d'ennoblissement.....	68
II.2. Caractérisations des supports.....	70
II.2.1. Taux de fonctionnalisation.....	70
II.2.2. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	70
II.2.3. Analyse enthalpique différentielle (DSC).....	70
II.2.4. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	71
II.2.5. Adsorption du bleu de o-toluidine.....	71
II.2.6. Essais mécaniques.....	72
II.2.7. Résonance magnétique nucléaire du solide	72
II.3. Etudes des interactions ALs/CDs et ALs/polymère de CDs.....	72
II.3.1. Résonance Magnétique Nucléaire	72
II.3.2. Electrophorèse-capillaire.....	73
II.4. Etudes d'adsorption/libération des principes actifs par les supports vierges et fonctionnalisés	76
II.4.1. Techniques analytiques.....	76
II.4.2. Cinétiques d'adsorption de principe actif.....	77
II.4.3. Cinétiques de libération de principe actif.....	77

II.4.4. Isothermes d'adsorption	79
II.5. Evaluation biologique.....	81
II.5.1. Les cellules.....	82
II.5.2. Vitalité cellulaire.....	82
II.5.3. Efficacité antibactérienne - Test de Kirby-Bauer (diffusion sur gélose)	83
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	87
I. Fonctionnalisation et caractérisations.....	90
I.1. Caractérisations des supports vierges.....	90
I.1.1. Taux d'emport.....	90
I.1.2. Analyse thermogravimétrique des supports vierges	91
I.1.3. Analyse enthalpique différentielle.....	92
I.2. Paramètres de la thermofixation.....	95
I.3. Influence de la concentration et du couple de réactifs	98
I.4. Caractérisations des supports fonctionnalisés	101
I.4.1. Analyse thermogravimétrique.....	101
I.4.2. Analyse enthalpique différentielle - DSC.....	104
I.4.3. Essais mécaniques.....	106
I.4.4. Microscopie électronique à balayage	107
I.4.5. Résonance magnétique du solide	109
I.4.6. Adsorption du bleu de o-toluidine.....	113
I.4.7. Influence de la méthode de stérilisation	115
I.4.8. Evaluation biologique des supports fonctionnalisés.....	116
I.5. Biodégradation du polyCD.....	119
II. Interactions support fonctionnalisé/antibiotique.....	121
II.1. Influence de la méthode de stérilisation.....	121
II.2. Choix de la CD et de l'agent réticulant	122
II.3. Cinétique d'adsorption de la CFX	123
II.3.1. PET.....	124
II.3.2. PLLA.....	126
II.4. Cinétiques de libération.....	127
II.4.1. Libération en système semi-dynamique « batch »	128
II.4.2. Système dynamique USP-IV	131
II.4.3. Etude de l'activité microbiologique	133
II.4.4. Efficacité antibactérienne sur <i>E.coli</i>	133
II.4.5. Efficacité antibactérienne sur <i>S.aureus</i>	134
III. Interactions support fonctionnalisé/anesthésique local	135

<i>III.1. Etude de la formation du complexe d'inclusion par RMN.....</i>	<i>135</i>
<i>III.2. Electrophorèse capillaire.....</i>	<i>147</i>
<i>III.3. Cinétiques d'adsorption</i>	<i>150</i>
<i>III.4. Isotherme d'adsorption –Etude en concentrations</i>	<i>152</i>
<i>III.5. Evaluation biologique du dispositif implantable fonctionnalisé et activé</i>	<i>158</i>
DISCUSSION	161
CONCLUSION.....	169
Bibliographie	175
ANNEXES	I

Glossaire

PET	:	Polyéthylène téréphtalate
PLLA	:	Acide Poly-L-lactique
PP	:	Polypropylène
CD	:	Cyclodextrine
β CD	:	β -cyclodextrine
HP β CD	:	Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
CTR	:	Acide citrique
BTCA	:	Acide 1,2,3,4-butanetétracarboxylique
NaH ₂ PO ₂	:	Hypophosphite de sodium
PolyCD	:	Polymère de cyclodextrines
PolyCTR-HP β CD	:	Polymère d'Hydroxypropyl- β -cyclodextrine réticulée par l'acide citrique
PA	:	Principe actif
CFX	:	Ciprofloxacine
AL	:	Anesthésique local
PBS	:	Phosphate Buffer Solution – Tampon phosphate à pH=7,4
NaOH	:	Hydroxyde de sodium – Soude
NIH3T3	:	Cellules fibroblastiques humaines
<i>E.coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i> – Bactérie à Gram-
<i>S.aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i> – Bactérie à Gram+
UV	:	Ultra-violet
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire
HPLC	:	Chromatographie Liquide Haute Performance

Introduction générale

Les complications postopératoires représentent une problématique pour la Santé Publique d'un point de vue clinique mais également d'un point de vue économique. Leurs conséquences sont majeures sur la durée de la convalescence et sur le retour à une activité physique et professionnelle normal.

Avec plus de 160 000 interventions en France chaque année [1], les cures de hernies de la paroi abdominale se placent au second rang des interventions chirurgicales. Paradoxalement, elles sont méconnues du grand public. Ce type de pathologie consiste en la migration d'une partie des viscères de la cavité abdominale à travers des orifices de cette dernière. Le plus souvent bénignes, elles peuvent engendrer des complications très sévères. Elles sont donc systématiquement traitées chirurgicalement. La cure de hernie est un acte rapide, qui dure moins d'une heure, qui est le plus souvent pratiqué en employant une prothèse textile qui permet le renforcement de la paroi abdominale et la réduction du risque de récurrence. Cette opération est par ailleurs maîtrisée par la plupart des praticiens spécialisés dans la chirurgie générale ou non. Mais comme pour tout acte invasif, aussi réduit soit-il, un risque de complications persiste.

Les infections du site chirurgical représentent la complication la plus sévère car elle peut nécessiter un retrait de la prothèse. De plus, la zone infectée ne peut faire l'objet d'une nouvelle implantation, ce qui engendre un risque de récurrence. Une antibioprophylaxie préventive est donc systématiquement administrée par voie intraveineuse lors de l'intervention. Cette technique n'est toutefois pas exempte d'effets secondaires.

Les douleurs post-opératoires des premiers jours ont été récemment liées à l'apparition de douleurs chroniques [2], se manifestant plusieurs mois après l'intervention, entraînant gênes, arrêts de travail voire même pour les cas les plus graves, une intervention supplémentaire. Pour les douleurs en revanche, aucun protocole réellement efficace n'existe, les pratiques courantes reposent sur la prise d'analgésiques conventionnels type paracétamol, voire pour les douleurs aiguës l'injection de morphiniques. En effet, la difficulté du traitement de la douleur repose sur son caractère subjectif. Néanmoins, de nombreux protocoles d'analgésie postopératoire par infiltration directe du site opéré ou par instillation continue d'anesthésiques locaux ont été proposés sans toutefois aboutir à un compromis satisfaisant entre la facilité du procédé et une

efficacité analgésique sur la durée (4 à 7 jours) [3-5]. Cela s'explique par une élimination rapide du principe actif par les fluides corporels après injection.

Une approche consiste à modifier le dispositif implantable textile, afin de lui conférer les propriétés d'un système à libération prolongée ou *Drug Delivery System* (DDS) et ainsi agir directement sur le site opératoire.

De nombreuses techniques ont été développées afin d'apporter les propriétés de molécules bioactives à la surface d'un matériau en passant notamment par le greffage covalent. Dans le cas présent, une mobilité du principe actif est nécessaire afin qu'il agisse directement au niveau du nerf et de l'influx nerveux. Il conviendra donc d'accroître la capacité d'adsorption du textile afin qu'il puisse libérer la substance active choisie de manière prolongée *in situ* après l'implantation.

Partant de ce constat, un partenariat est né entre la société COUSIN BIOTECH, fabricant d'implants textiles destinés notamment à la chirurgie viscérale et l'Unité Matériaux et Transformation (UMET) de l'Université de Lille 1 et l'Unité INSERM U1008 Médicaments et biomatériaux à libération contrôlée, sous la forme d'une thèse en convention CIFRE (n°1032/2008).

L'équipe Ingénierie des Systèmes Polymères de l'UMET a breveté au début des années 2000 [6, 7] un procédé permettant de traiter les fibres d'un matériau textile en les enrobant par un polymère de cyclodextrines. Ces molécules cages ont la capacité de former des complexes d'inclusion réversibles avec une large gamme de principes actifs.

Le concept basé sur ces travaux nécessitera donc l'imprégnation du dispositif fonctionnalisé pendant l'intervention juste avant son implantation dans une solution contenant un agent antibiotique d'une part, un composé analgésique d'autre part.

Ce document s'articulera en trois parties.

Afin de bien situer le contexte de l'étude, nous débuterons par un rappel des pratiques afin de lutter contre ces complications. A cette occasion, un état de l'art sera dressé afin de situer notre concept par rapport aux produits actuellement sur le marché et par rapport aux autres techniques émergentes faisant appel notamment à la technologie des DDS.

Nous terminerons cette étude bibliographique par la présentation du concept que nous proposons, la fonctionnalisation de plaques inguinales ou d'implants pariétaux par un polymère de cyclodextrines. Nous verrons tout d'abord les méthodes connues pour apporter leurs propriétés particulières à la surface des textiles, pour ensuite revenir sur les travaux antérieurs

dans le domaine des biomatériaux réalisés dans le cadre de la collaboration entre les 2 équipes (UMET et U1008).

Dans une seconde partie, seront présentés les produits, matériels et méthodes employés au cours de ce projet en termes d'ennoblissement des textiles, de caractérisations et d'évaluation biologique et microbiologique.

Enfin dans la troisième et dernière partie, l'optimisation des paramètres d'ennoblissement des implants textiles par les cyclodextrines sera présentée. Les textiles fonctionnalisés par le polymère de cyclodextrines seront caractérisés et leur biocompatibilité sera évaluée. L'activation de ces dispositifs par un antibiotique sera présentée par une étude d'adsorption ainsi que par des cinétiques de libération dans deux milieux et par l'évaluation de la persistance antibactérienne par une étude bactériologique. L'affinité des implants fonctionnalisés vis-à-vis de deux anesthésiques locaux sera présentée à travers une étude fondamentale en résonance magnétique nucléaire et électrophorèse capillaire ainsi que par des isothermes d'adsorption. Ceci permettra de confronter l'approche théorique fondamentale (étude en solution) et l'applicatif (chargement du principe actif sur le textile).

Après avoir discuté les résultats obtenus tout au long de ce projet, nous concluons en évoquant ces perspectives.

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les hernies de la paroi abdominale

I.1. Généralités

Le traitement des hernies de la paroi abdominale, couramment appelé « cure de hernie », est l'un des actes chirurgicaux les plus courants en France [8, 9] avec plus de 200000 interventions en France en 2010. On appelle « hernie », toute protrusion de viscère ou de graisse à travers un orifice (collet) anormal [10]. Ces pathologies, le plus souvent bénignes ne font pas de différences selon l'âge et le sexe, apparaissant aussi bien chez le nouveau né que chez le sportif de haut niveau. Une saillie herniaire de diamètre variable (jusqu'à 40 mm au collet) est visible sur la paroi abdominale. En première intention, on peut parfois réduire cette protubérance en repoussant les organes à l'intérieur de la paroi abdominale à travers cette cavité. Si l'anse herniaire ne peut être repoussée, il peut y avoir formation, au niveau du collet, d'un étranglement des viscères du sac herniaire, qui peut engendrer une nécrose et des douleurs. Afin d'éviter les complications dramatiques, la hernie est maintenant systématiquement traitée chirurgicalement. Après un rapide rappel anatomique de la paroi abdominale, nous décrirons les différents types de hernies pour nous focaliser sur la plus commune, la hernie inguinale, et ses différentes techniques de réparation chirurgicale.

Malgré une paroi musculaire très dense, la sangle abdominale est traversée en quelques points par des canaux traversés par des vaisseaux sanguins (veine et artère fémorales) ou le cordon spermatique chez l'homme. Ces zones sont autant de points faibles de la paroi abdominale.

Sur la face antéro-faciale, on en dénombre quatre principales :

- La région ombilicale
- La région épigastrique
- La région fémorale
- La région inguinale

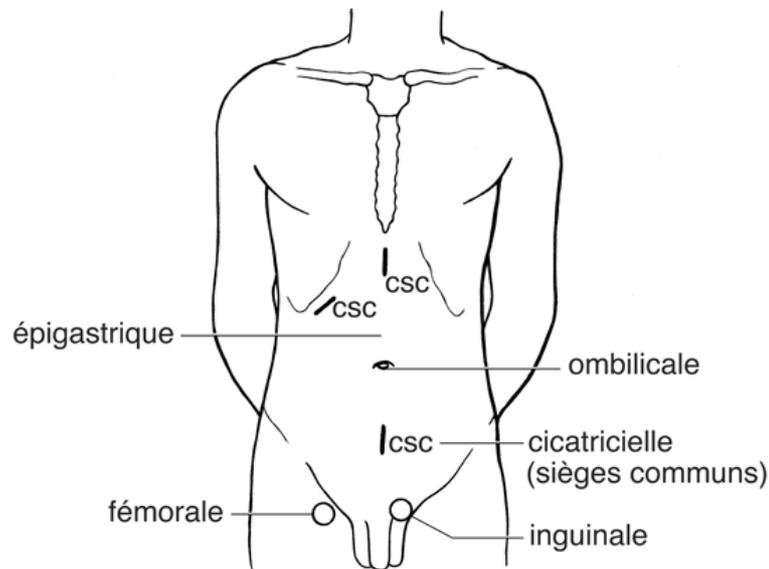


Figure 1 : Principales localisations des hernies de la paroi abdominale [11]

Chacune de ces zones (**Figure 1**) offre la possibilité aux viscères de la cavité abdominale (le plus souvent les intestins) de migrer notamment lors d'efforts, de l'augmentation de la pression intra-abdominale ou d'un relâchement de la paroi dû à l'âge.

L'occurrence de ces hernies est régie par certains facteurs physiologiques ou résultants de l'activité quotidienne du patient.

Ainsi, on différencie deux types de hernies, les hernies dites « congénitales », qui sont consécutives à une malformation ou un défaut de formation lors du développement fœtal, et les hernies dites « acquises », qui sont consécutives à l'activité du sujet ou de son état de santé (surpoids, travail de force, etc...).

Les hernies de l'aîne, inguinales ou fémorales, restent les pathologies les plus rencontrées, représentant 90% des cas.

1.1.1. Hernie ombilicale

Elles sont congénitales chez les nouveaux nés, résultant d'une fermeture incomplète du cordon ombilical. Durant les premières années et le développement de la paroi musculaire, les hernies de moins d'1 cm se résorbent automatiquement et sans besoin de recourir à un traitement chirurgical. Celui-ci devient systématique si les intestins sont incarcerated, pour les anomalies de plus d'un 1 cm de diamètre, chez tout enfant de plus de 2 ans [12].

Chez l'adulte, elle est susceptible de survenir suite à de nombreux facteurs agissant sur la pression intra-abdominale comme l'obésité et la toux chronique [13]. Les femmes sont les plus

touchées [12], pendant ou consécutivement à la grossesse. Comme pour tous les types de pathologies herniaires, l'âge et l'affaiblissement de la paroi abdominale peuvent provoquer la formation d'une hernie.

Le risque d'étranglement du contenu du sac herniaire reste important (10%) [13], ce qui oblige le traitement chirurgical systématique pour les anomalies de plus de 2 cm de diamètre.

I.1.2. Hernie épigastrique

Les hernies épigastriques, aussi appelées hernies de la ligne blanche, sont des hernies acquises [12]. On les retrouve majoritairement au dessus de l'ombilic. Elles résultent d'une augmentation de la pression intra-abdominale mais aussi du vieillissement des tissus aponévrotiques¹. De petite taille (inférieure à 25mm), le sac herniaire ne contient que de la graisse sous-péritonéale, mais rarement des viscères.

Avec les hernies ombilicales, elles ne représentent que 10% des cas.

I.1.3. Hernie fémorale

Les hernies fémorales ont une incidence plus élevée chez la femme, due à la largeur du bassin, plus importante par rapport à l'homme. Dans cette pathologie herniaire, l'anse herniaire descend le long du canal fémoral via l'anneau fémoral [14]. Il s'agit d'une hernie directe de petite taille, qui présente un important risque de complications dû à un étranglement du contenu du sac herniaire, le collet étant assez réduit [15].

De par sa position, le diagnostic de la hernie fémorale est compliqué. Dans 50% des cas, elle est détectée suite à des douleurs dues à un étranglement [16]. Le diagnostic est d'autant plus compliqué si le patient est en surpoids. Elles représentent environ 15% des cas.

I.1.4. Hernie inguinale

Les hernies de la région inguinale représentent la majorité des pathologies herniaires de la paroi abdominale soit 75% [8]. On estime à 160 000 et 700 000 le nombre de cures de hernies de l'aîne (fémorale + inguinale) respectivement en France et aux Etats-Unis. 95% de ces interventions sont consécutives à une hernie inguinale.

On distingue deux types de hernies de la région inguinale, les hernies directes et indirectes.

¹ Tissus fibreux qui entourent les muscles - Aponévrose

- **Les hernies indirectes**

Le sac herniaire contenant le plus souvent les intestins entourés de péritoine² transite dans le canal inguinal, le long du cordon spermatique (**Figure 2**). Il s'agit le plus souvent d'une hernie congénitale qui se déclare sans prédominance de l'âge [17]. Elle résulte alors d'un défaut de fermeture de l'orifice inguinal profond.

L'anse herniaire suit le trajet du cordon spermatique à l'intérieur du canal en passant par l'orifice inguinal profond. Si la migration de l'anse se poursuit, elle descend jusqu'à l'intérieur du scrotum, présentant de ce fait un risque important d'étranglement.

Dans certains cas, les hernies indirectes peuvent être bilatérales et survenir dans les canaux inguinaux gauche et droite simultanément.

- **Les hernies directes**

Elles sont consécutives à une faiblesse musculaire de la paroi postérieure [11] entraînant la protrusion de l'anse herniaire perpendiculairement au *fascia transversalis*³, directement à travers la paroi, entraînant ce dernier ainsi que le péritoine dans le canal inguinal (**Figure 2**).

L'augmentation de la pression intra-abdominale joue un rôle prépondérant dans ce type de pathologie, ce qui en fait une hernie acquise. Cependant, des études ont montré que la paroi de sujets atteints une hernie inguinale directe présentait une faiblesse structurale, par rapport à des sujets sains [18, 19]. De ce fait, l'origine congénitale ou acquise de la hernie directe reste incertaine.

Elle présente néanmoins un faible risque d'étranglement, le diamètre du collet étant relativement important.

² Membrane séparant les viscères de l'abdomen et la paroi musculaire

³ Membrane aponévrotique située entre le péritoine et le muscle transverse

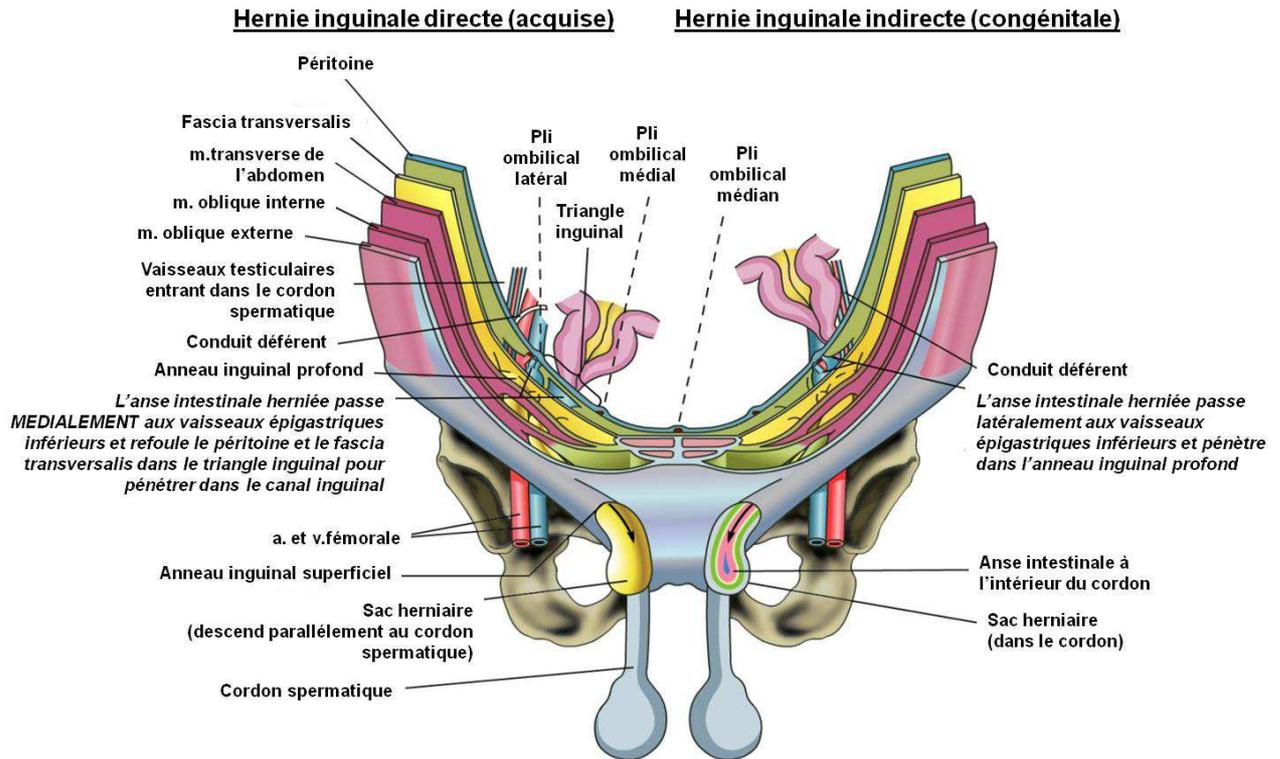


Figure 2 : Hernies inguinales directes et indirectes [20]

I.1.5. Autres types de hernies

Il existe d'autres types de hernies qualifiées de rares car présentant une fréquence largement inférieure à celles citées précédemment.

Les hernies de Spiegel représentent 0,1% des cas de pathologies herniaires. Elles sont le plus souvent diagnostiquées lors de leur complication (étranglement du sac herniaire), entraînant des douleurs.

Les hernies incisionnelles (hernies cicatricielles ou éventrations) sont des hernies acquises qui apparaissent au niveau d'une cicatrice opératoire, d'une faiblesse causée par un traumatisme ou de la déliquescence des tissus fibreux avec l'âge. On estime que 1% des incisions transpéritonéales conduira à la formation d'une hernie incisionnelle.

Enfin, on pourra également citer les hernies lombaires, qui surviennent sur la face postérieure du péritoine.

Dans un souci de clarté, nous n'allons détailler par la suite que les traitements chirurgicaux de la pathologie la plus commune, la hernie inguinale. Les techniques de correction des défauts sont basées sur le même principe, que ce soit par raphie (suture) des berges de l'orifice herniaire ou par obturation au moyen d'un implant textile.

1.2. La cure de hernie inguinale

Des traces de cette intervention remontent à l'antiquité mais c'est au siècle dernier que la cure de hernie inguinale a subi une importante évolution en termes de techniques chirurgicales [21, 22].

C'est un acte chirurgical en deux temps. Dans un premier temps, le sac herniaire est disséqué, son contenu est replacé dans sa cavité naturelle. Dans un second temps, il reste au chirurgien à refermer l'orifice herniaire et surtout à consolider la paroi abdominale environnante, afin d'éliminer au maximum les risques de récurrences herniaires. C'est sur ce point que diffèrent la grande variété de techniques employées de nos jours.

L'utilisation croissante de matériels prothétiques à partir de la seconde moitié du 20^{ème} siècle a conduit à la scission entre deux familles de méthodes chirurgicales : les méthodes avec tension et sans tension.

1.2.1. Méthode avec tension

Ces techniques, également appelées « herniorraphies », préconisent la suture des fascias et autres aponévroses proches de l'orifice herniaire afin de corriger ce défaut.

Le premier protocole standard a été présenté par Bassini, chirurgien italien de la fin du 19^{ème} siècle. Il développa la « cure radicale de hernie inguinale », qui consiste à reconstruire le canal inguinal en utilisant les parois antérieures et extérieures [23]. Cette intervention était accompagnée d'un faible taux de récurrence, ainsi que des plus faibles taux de mortalité et d'infection de l'époque.

En 1945, un chirurgien canadien, Shouldice ouvre un centre destiné aux traitements de la hernie et réalise sur un grand nombre de patients, une étude comparative des techniques alors employées [24]. La méthode Shouldice est inspirée de la méthode de Bassini dont elle diffère par l'ajout d'une anesthésie locale dans le protocole [1]. Elle offre un taux de récurrence moindre (5% contre 10% pour Bassini) et sert de base de comparaison vis-à-vis d'autres techniques, en chirurgie ouverte ou cœlioscopique, avec ou sans utilisation de prothèse [25] [26].

Malgré les très bons résultats qu'elles obtiennent à l'époque, ces différentes méthodes engendrent par la tension des sutures, un fort taux de douleurs postopératoires et de récurrences, ainsi qu'un certain temps de convalescence.

I.2.2. Méthode sans tension - « Tension- Free »

Afin de pallier les problèmes des réfections de paroi sous tension cités précédemment, certains praticiens ont envisagé des solutions incluant l'obturation de l'orifice herniaire par un implant appelé « mesh », on parle alors « d' hernioplasties ».

A la fin des années 1980, Lichtenstein, chirurgien américain, publie une procédure d'implantation [27] qui devient le standard en terme de chirurgie herniaire sans-tension. Dès lors, ces techniques de réparation pariétale vont se multiplier. La cœlioscopie sera introduite dans la chirurgie herniaire au début des années 1990 [28].

Ces évolutions de la cure de chirurgie herniaire sans tension peuvent être classées dans 2 familles : les techniques dites « open » et les techniques laparoscopiques.

I.2.2.a. Les techniques « open »

La plus répandue reste la procédure mise au point par Lichtenstein qui utilise initialement une mesh en polypropylène[27]. Elle préconise la fermeture de l'orifice herniaire et la reconstruction de la paroi par la pose d'une prothèse non résorbable sur le *fascia transversalis* (**Figure 3**). Cette dernière est installée autour du cordon spermatique puis fixée mais non tendue, afin de permettre une certaine liberté de mouvement évitant une tension de la plaque [29].

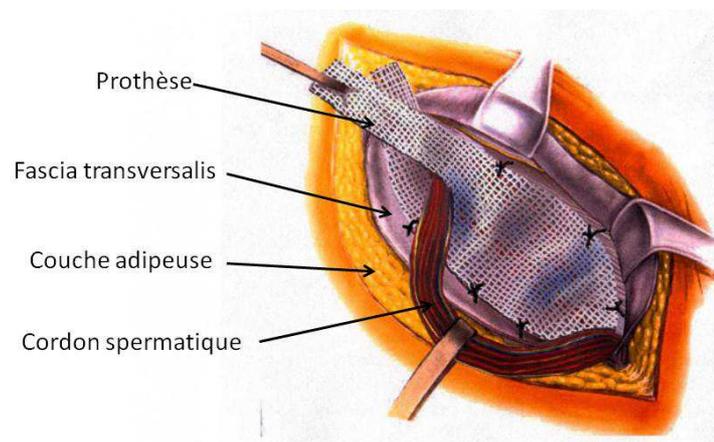


Figure 3 : Techniques de Lichtenstein [30]

L'intervention, praticable en chirurgie générale par tous les chirurgiens, peut être effectuée sous anesthésie locale, locorégionale ou générale [1]. Elle génère un taux de récurrence de 1%, voire moins si elle est effectuée par un chirurgien spécialisé dans le domaine viscéral, ce qui est nettement inférieur aux techniques n'employant pas d'implants prothétiques (jusqu'à 13%) [31].

Il existe d'autres techniques d'hernioplasties, faisant appel à différentes structures d'implants. Une structure trois dimensions, appelée « plug » peut être insérée dans le défaut laissé par l'anse herniaire en comblement [32-34].

Enfin des systèmes combinant le renfort d'une mesh avec le comblement d'un plug ont également été décrits comme le système 4DDOME[®] de COUSIN BIOTECH [35] (**Figure 4**) ou le PROLENE[®] d'Ethicon [36].

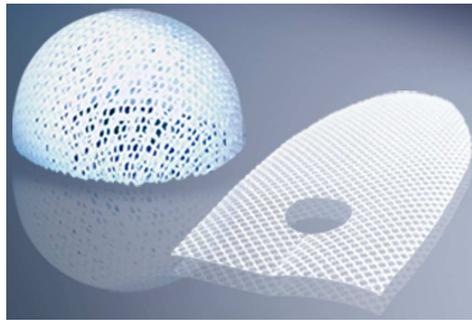


Figure 4 : Structure 3D du système 4DDOME[®] avec implant auto-adhésif ADHESIX[®] de COUSIN BIOTECH [37]

1.2.2.b. Les techniques laparoscopiques

Avec l'avènement des techniques coelioscopiques, mini-invasives, deux méthodes employant des voies d'abord différentes ont été développées pour la cure des hernies inguinales. Dans chaque cas, seuls trois trocarts sont nécessaires ce qui réduit le nombre et la taille des incisions (**Figure 5**). Leur disposition dépend de la procédure suivie.



Figure 5 : Illustration de la laparotomie

La voie « Totalement Extra-Péritonéale » (TEP) consiste à déployer une prothèse après décollement du plan situé entre le péritoine et la paroi abdominale. Lors de l'exsufflation, en fin d'intervention, la prothèse non-fixée épouse les formes anatomiques et sera maintenue en place par la pression abdominale [38].

La seconde voie *d'abord* en chirurgie laparoscopique est la « Trans-Abdominale Pré Péritonéale » (TAPP). L'intervention a lieu dans la cavité abdominale. Après résection de l'anse herniaire par traction et dissection du péritoine, la prothèse est déployée entre le plan musculaire et le péritoine [39, 40]. Ce dernier est refermé, maintenant la prothèse plaquée entre les feuillets.

La chirurgie laparoscopique diffère de la chirurgie ouverte par les moyens mis en œuvre. Néanmoins, des études ont montré que la cœlioscopique génère moins de douleurs postopératoires, ainsi qu'une convalescence et un retour à la vie active plus rapide [17, 41].

Cependant, la cure de hernie inguinale pouvant être pratiquée par des chirurgiens de spécialisations variées, ceux-ci préféreront les voies d'abord ouvertes à la procédure cœlioscopique, plus technique.

1.3. Les implants de réfection de la paroi abdominale

1.3.1. Généralités

L'utilisation de textiles prothétiques dans la cure de hernie de l'abdomen a rencontré un essor considérable avec l'apparition des techniques laparoscopiques et l'engouement face aux faibles taux de récurrences herniaires observés après renfort de la paroi par un implant [42]. Dès lors, ce nouveau marché a favorisé la naissance de nouvelles entreprises spécialisées et la croissance de l'offre de produits innovants. Néanmoins, même si l'offre est très vaste, le nombre de matériaux de base utilisés pour la fabrication de ces implants pariétaux, reste restreint.

Les critères définissant « l'implant idéal » ont été établis par Scales en 1953 [43], mais et sont encore aujourd'hui d'actualité :

- ne pas être altéré par les fluides biologiques (biocompatibilité)
- ne pas générer d'allergies ou d'hypersensibilités (biocompatibilité)
- ne pas générer de réactions à corps étranger ou inflammatoires (biocompatibilité)
- être non-cancérogène (biocompatibilité)
- être chimiquement inerte
- être capable de résister aux contraintes mécaniques inhérentes à sa fonction et à son site implantatoire
- être stérilisable

- être produit aisément dans la forme la plus cohérente avec son utilisation et ce à moindre coût

Voici donc le cahier des charges qu'il ne nous reste plus qu'à respecter pour notre étude.

Earle livre une version plus actuelle incrémentant quelques critères comme la maniabilité, l'absence de contraction/rétraction de la prothèse, la compatibilité avec des environnements contaminés [44].

De nos jours, une large gamme de produits, qui diffèrent par leurs structures et leurs formes sont disponibles afin de répondre au mieux à ces critères.

Les premières cures de hernie par pose d'une prothèse en matériau synthétique non résorbable ont lieu dans les années 1940 [45]. Il s'agit alors de polyamides (Nylon[®]), déjà employés comme fils de suture, tissés en plaque textile. Très vite, il est apparu que ce matériau est altéré par l'environnement biologique rapidement après implantation [46]. La découverte du polyéthylène téréphtalate (PET - Mersilène[®], Dacron[®]) et du polypropylène (PP - Marlex[®], Prolène[®], Surgipro[®]) à cette même époque étend un peu plus l'éventail des matériaux disponibles. De nos jours, la majorité des implants présents sur le marché ont pour base l'un de ces deux polymères avec un net avantage cependant pour les prothèses à base de PP, notamment aux Etats-Unis où il est très présent dans la culture des chirurgiens. En Europe en revanche, de nombreux praticiens emploient des implants en PET.

La chirurgie herniaire nécessite un traitement au cas par cas, dépendant de la localisation, de la voie d'abord choisie, de la récurrence ou encore de l'importance du défaut. Ainsi, de nombreuses prothèses ont été créées afin de répondre à des critères implantatoires particuliers.

1.3.2. Implants collagénés

Lors d'une intervention sur une zone infectée (étranglement herniaire, infection), l'utilisation de matériaux non-résorbables est déconseillée. En effet, la bactérie de taille micrométrique, peut facilement coloniser la prothèse. Pour pallier cette situation, des implants d'origine totalement biologique ont été développés [47, 48]. Ceux-ci sont constitués de collagènes collectés à partir de dermes de porc, de bovin, d'humain ou d'autres sources que la peau, comme la sous-muqueuse intestinale porcine [49]. Un traitement physique, chimique ou enzymatique permet de supprimer les organismes cellulaires afin de ne conserver que la matrice. Dans certains produits commercialisés, celle-ci est ensuite réticulée par des agents de type hexaméthylène diisocyanate

(Permacol[®] de Covidien) ou carbodiimide (CollaMend[®] de Bard) [49]. Une fois implantée, la prothèse consolide la paroi à l'endroit du défaut tout en étant peu à peu remplacée par les tissus naturels. La disponibilité, le prix et la difficulté à former et à stériliser ce type d'implants limitent cependant leur utilisation.

I.3.3. Implants anti-adhésiogène et adhésifs

Les matériaux biostables engendrent automatiquement une réponse immunitaire plus ou moins prononcée, qui génère à son tour une fibrose autour de l'implant et consolide ainsi la réparation. Ce phénomène varie avec la structure, la densité et la composition du « corps étranger » [50]. Le PP est bien connu pour engendrer cette réponse inflammatoire [51]. Néanmoins, ce qui peut s'avérer un avantage dans le cas d'une intervention pré-péritonéale, crée une complication lors d'un abord intrapéritonéal. Ainsi, des cas d'adhésions postopératoires entre l'implant et les organes ont été rapportés lors de chirurgie intrapéritonéale [52]. Cette complication a conduit à l'élaboration d'implants antiadhésiogènes à base de polytétrafluoroéthylène expansé (Gore-Tex[®]) dont la structure ainsi que la porosité ne laissent pas la possibilité à la colonisation par les tissus fibreux [53].

Une autre stratégie consiste à employer des matériaux anti-adhésiogènes qui agissent comme une barrière [44, 53]. Ainsi, ces implants appelés « composites », sont constitués :

- d'une face « classique » en PP ou PET qui sera orientée vers le péritoine afin d'offrir une bonne intégration pariétale
- d'une face enduite d'un matériau anti-adhérent qui permet d'éviter la fibrose de la prothèse et donc les adhérences sur les viscères. Les polymères employés sont le silicone (Intramesh W3[®], COUSIN BIOTECH) ou le polyuréthane (Intraswing[®], Swing, Microval intra HITEX[®], Hi-TEX).

Dans une autre approche, la protection des adhésions est faite par un matériau résorbable qui isole les fibres de l'implant le temps de sa résorption comme le polydioxanone (PROCEED[®], Ethicon) ou le mélange acide hyaluronique/carboxyméthyl-cellulose (Septra Mesh[®], Bard).

A l'opposé de ses concepts, et pour un *abord* en pré-péritonéal, des solutions permettant d'éviter l'ancrage de la prothèse par une suture ou une agrafe, sont depuis peu proposées. La firme COVIDIEN propose ainsi un implant en monofilament de PET tricoté incluant un système d'accroche à base de filaments de polyacide lactique (PLA) (PARIETEX PROGRIP[®], COVIDIEN) [54]. Ce dispositif présente sur une de ses faces des picots de PLA facilitant la mise

en place et l'ancrage (**Figure 6**) à l'image d'un système «Velcro[®]». Le chirurgien n'a alors qu'à réaliser une suture de sécurité du produit au niveau du pubis.

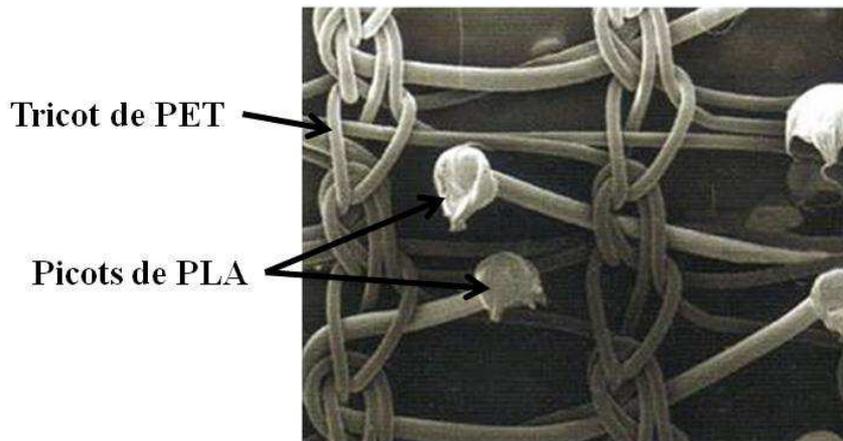


Figure 6 : Observations microscopiques du Parietex ProGrip Mesh[®] [54]

Parallèlement, COUSIN BIOTECH a récemment commercialisé un implant auto-adhésif, l'ADHESIX[®] (**Figure 4**), constitué d'un treillis en polypropylène enrobé d'un hydrogel de polyvinylpyrrolidone (PVP) et de polyéthylène glycol (PEG) [55].

I.3.4. Structure et porosité

La porosité de l'implant a également un rôle à jouer dans l'intégration tissulaire. Il est clair qu'un textile microporeux ne sera jamais complètement intégré mais cet inconvénient pourra s'avérer avantageux pour une implantation au contact des viscères (intrapéritonéal), empêchant le phénomène d'adhésion [42].

Dans cette thèse, seuls des tricots à larges pores (entre 1000 et 2000 μm) de type tulle sont employés. L'intérêt de ce type de treillis (**Figure 7**) réside dans leur faible rigidité qui permet une utilisation en chirurgie laparoscopique. De plus, elles apportent une meilleure « souplesse » à la paroi abdominale après cicatrisation [50]. Enfin, l'intégration tissulaire est facilitée par la structure poreuse qui forme un scaffold au réseau collagène, précurseur de la colonisation par les fibroblastes [42].

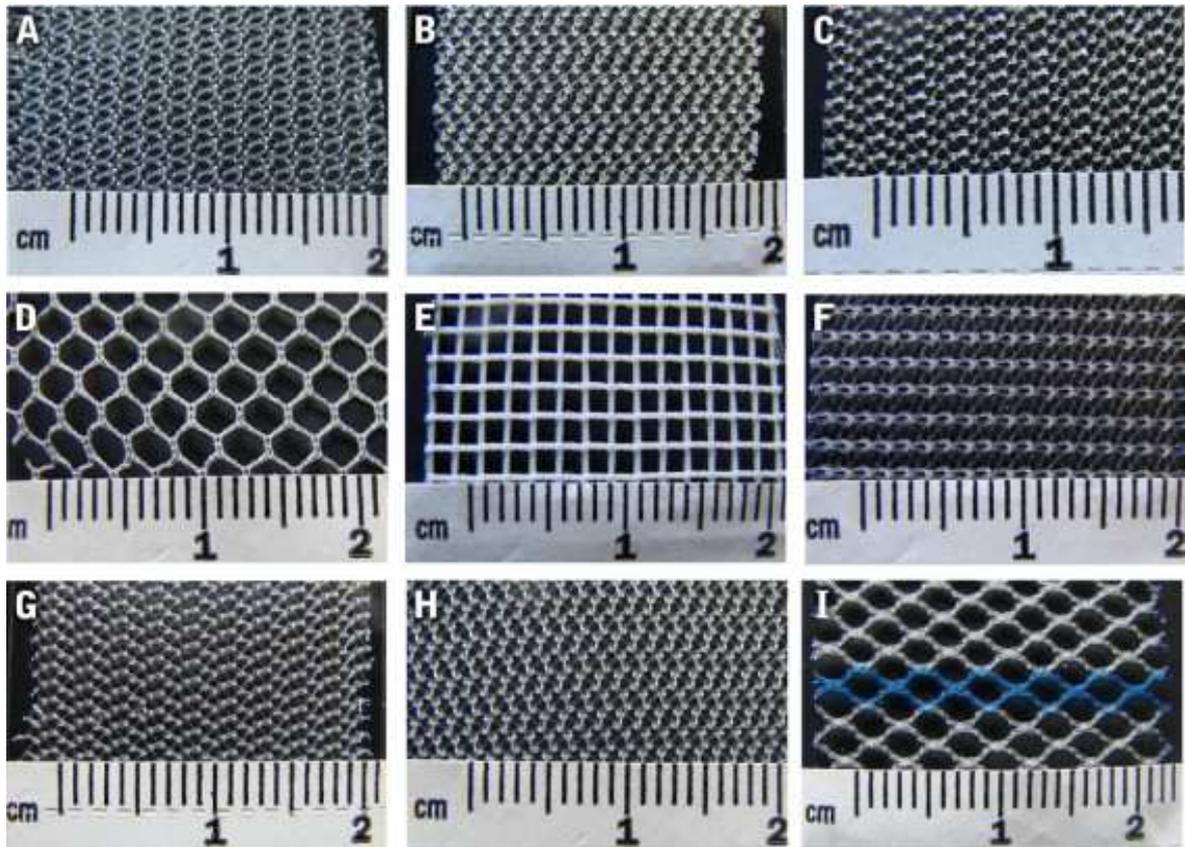


Figure 7 : Illustration de différents treillis de prothèses commerciales (fabricant et composition) : (A) Bard Mesh (Bard, PP), (B) C-QUR Lite Large (Atrium, PP), (C) C-QUR Lite Small (Atrium, PP), (D) INFINIT Mesh (Gore, PTFE), (E) Biomesh A2 (COUSIN BIOTECH, PET), (F) PROLENE (Ethicon, PP), (G) ProLite Ultra (Atrium, PP), (H) ProLite (Atrium PP), (I) ULTRAPRO (Ethicon, Polyglécaprone-25/PP) [56]

De récentes études ont montré que la densité, ou poids de la prothèse, a un impact sur la bioréactivité de l'implant sans que toutefois une valeur optimale ne soit définie [57]. Les implants semi-résorbables sont donc employés afin de prodiguer un bon soutien à la paroi le temps de l'intégration et ne laisser au final que très peu de matériau prothétique en place. C'est notamment le cas des produits comme le 4DDOME[®] ou le BIOMESH SR[®] de COUSIN BIOTECH qui ne conservent que 25% de leur masse 6 mois après implantation soit la structure en PP, 75% de la structure étant composée de PLLA [35].

Selon la classification proposée par Coda [58], les textiles PET et PLLA que nous emploierons dans le cadre de cette thèse, font partie des matériaux « standards » en poids (entre 70 et 140 g/m²).

1.4. Modes d'anesthésie

Trois modes d'anesthésie sont possibles lors de la cure de hernie inguinale et sont déclinés non seulement en fonction de la voie *d'abord* mais aussi de l'importance de l'intervention.

L'anesthésie générale était encore le mode le plus employé dans les années 2000 [59]. Bien qu'inhibant la douleur pendant l'intervention, elle comporte tout de même quelques complications (nausées, vomissements,...). Les techniques coelioscopiques sont le plus souvent effectuées sous anesthésie générale [60]. De même, l'anesthésie spinale ou épidurale comporte un risque de lésions de la moelle épinière, si elle n'est pas correctement pratiquée. Ces deux techniques présentent des effets secondaires (rétention urinaire, blocage du tractus gastro-intestinale, etc...) et nécessitent le passage par un service de réanimation post-opératoire. Paradoxalement, il ne semble pas y avoir de lien entre le mode d'anesthésie et la survenue de douleurs postopératoires [61]. En revanche, l'anesthésie locale offre la possibilité d'éviter les complications et effets secondaires tout en assurant un retour à une activité normale rapide [59]. Elle est principalement pratiquée lors de techniques de chirurgies ouvertes et dans le cas de « day-case surgery » ou chirurgie ambulatoire sur une journée.

Comme nous venons de le voir, le chirurgien a donc un large panel de techniques de réfection pariétale. Selon ses convictions, son niveau d'aptitude et la pathologie rencontrée, il peut s'orienter vers une méthode sans ou avec implantation de renforts prothétiques.

II. Les complications de la cure de hernie inguinale

En tant qu'acte chirurgical invasif, la chirurgie herniaire soumet le patient aux risques de développer des complications post-opératoires. Celles-ci affectent plus ou moins le rétablissement et donc le retour à une activité normale.

II.1. Douleurs chroniques

Bien que l'infection soit la plus commune complication suite à une cure de hernie, la douleur chronique post-chirurgicale, longtemps sous-estimée, est sans conteste la plus invalidante. Fort de ce constat, la gestion de cette douleur représente de nos jours un véritable enjeu socio-économique [62]. Elle conditionne une récupération facilitée et donc un retour rapide à une activité normale pour le patient. Elle peut causer des complications secondaires comme la dépression ou des dysfonctionnements sexuels [63].

II.1.1. Facteurs et mécanisme

Une douleur est définie comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion » [64].

A l'origine d'un signal douloureux, on trouve les nocicepteurs. Ces récepteurs sensoriels sont situés sous la peau (somatique) ou sur les organes (viscéraux) et sont chargés de détecter les stimuli étrangers nocifs (brûlure, pression, inflammation,...). Ils transmettent ensuite l'information perçue sous forme de signaux électriques transitant le long des axones. Ces fibres nerveuses sont les prolongations des neurones et sont réunies au sein des nerfs (**Figure 8**). Parmi ces axones, on trouve les fibres A responsables de la transmission des signaux mécano-sensitifs (toucher, pression) et les fibres C qui transfèrent les signaux douloureux (brûlures, substances algogènes,...).

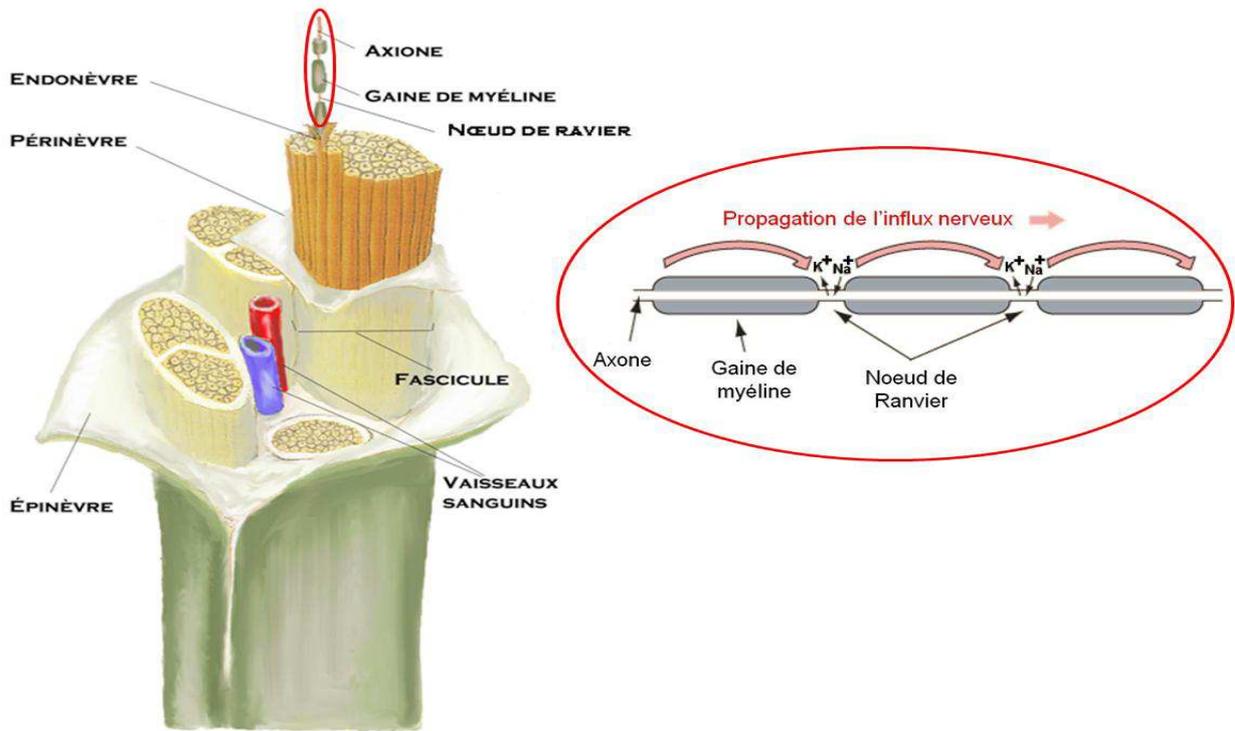


Figure 8 : Structure d'un nerf et schématisation de l'influx nociceptif [65]

Avant le transfert de l'influx au neurone de l'épine dorsale, un inter neurone régit la transmission. Celui-ci inhibe l'influx nerveux des fibres C, responsables de la douleur tout en étant lui-même excité par l'influx des fibres A. Ce phénomène, appelé « Gate control » conduit à un système de balance entre les influx nerveux et permet de mieux gérer l'influx nociceptif en agissant sur cet équilibre (Figure 9).

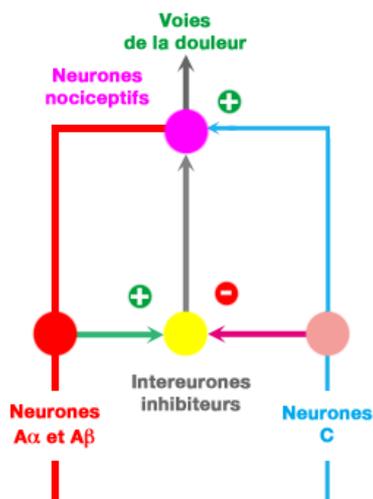


Figure 9 : Schématisation de la théorie du « Gate Control » [66]

Lorsque le système nerveux fonctionne correctement, l'influx nerveux transitant par les fibres nociceptives est atténué par l'action inhibitrice de l'interneurone, lui-même activé par l'action des fibres A, plus rapides et plus puissantes. Si le signal transmis par les fibres nociceptives est supérieur à celui des fibres inhibitrices, une douleur « somatique » ou « viscérale » est alors exprimée avant un retour à la normale.

Lorsque les fibres A sont lésées ou sectionnées, l'influx nerveux nociceptif provenant des fibres C n'est plus régulé et l'information douloureuse arrive en continu au système nerveux central. On parle alors de douleurs « neuropathiques » [2]. Dans certains cas, si l'influx nociceptif est trop fréquent, il submerge le signal inhibiteur et crée une sensibilisation, appelée hyperalgésie, et aura pour conséquence de diminuer l'intensité du stimulus nécessaire à l'expression de la douleur.

On estime à 12% le nombre de patients qui ressentent toujours des douleurs 3 mois après l'intervention [67]. Les critères définissant cette complication sont : une douleur apparue après l'acte chirurgical, qui dure depuis au moins 2 mois et dont d'autres sources que l'intervention ou une antériorité ont été exclues [68].

Plusieurs facteurs de risques pré- ou péropératoires, susceptibles de générer des douleurs après la cure de hernie, ont été identifiés [63, 67, 69, 70] parmi lesquels : le surpoids, l'âge inférieur à 40 ans, la récurrence de la hernie, le sexe féminin, la voie *d'abord* et la technique chirurgicale, l'infection et les douleurs pré- et postopératoires.

L'incidence de ces dernières sur la survenue de douleurs chroniques post-chirurgicales est depuis longtemps démontrée [2, 63, 68, 70, 71].

La compréhension des mécanismes d'expression mais surtout d'apparition de ces douleurs a permis de mettre en place un ensemble de protocoles et de techniques de prévention et de lutte contre ces dernières.

II.1.2. Prévention de la chronicisation de la douleur postopératoire

II.1.2.a. Evaluation de la douleur

La douleur étant une perception très subjective, diverses techniques plus ou moins efficaces ont été développées pour la quantifier [72]. La plus employée à l'heure actuelle est la mesure par un système d'échelle telle que l'échelle visuelle analogique EVA (**Figure 10**). Celle-ci se compose d'une réglette double face de 10 cm. Sur une face, le patient déplace un repère sur une ligne allant de « Pas de douleur » à « Douleur insupportable ». Sur le verso, le praticien peut évaluer

quantitativement (entre 0 et 10 ou 100 selon les modèles pour le maximum) la douleur exprimée [73].

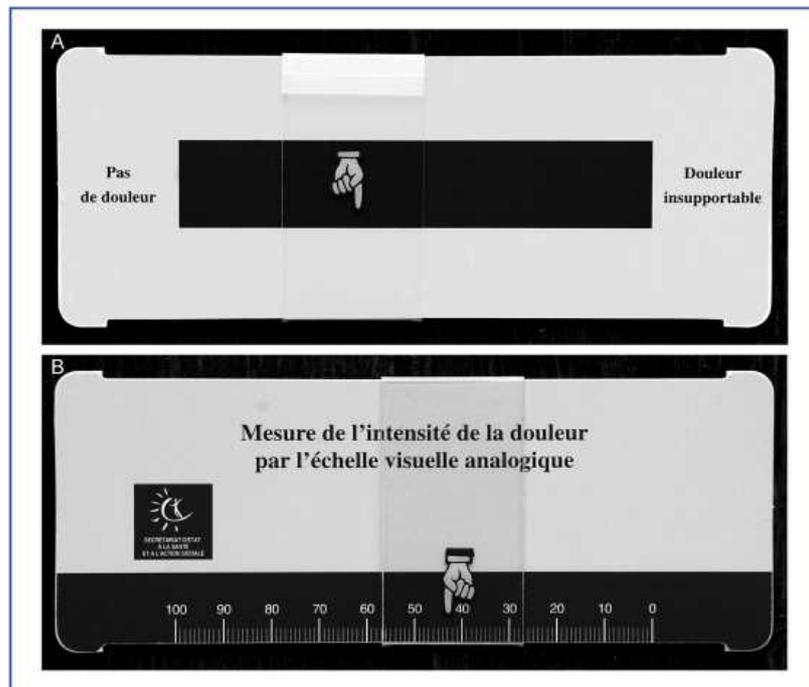


Figure 10 : Echelle Visuelle Analogique – A) Face patient – B) Face praticien

Cette échelle a fait l'objet d'une adaptation graphique pour son utilisation dans le domaine pédiatrique à travers des émoticônes caractérisant les différents niveaux de douleurs.

Des techniques simplifiées sont disponibles pour les cas où la compréhension est plus compliquée comme pour les aveugles ou les personnes âgées. Dès lors, l'évaluation s'effectue oralement soit par notation par le patient entre 0 et 10, 10 étant le maximum intolérable (échelle numérique) soit par qualification entre « absente, faible, modérée, intense et extrêmement intense » (échelle verbale simple) [72].

La douleur chronique n'étant détectée que 2 à 3 mois après l'intervention, des questionnaires ont été créés. Ceux-ci comportent des questions sur la qualité de vie, la nature et la qualification de leur douleur, le site concerné et la périodicité de cette douleur [74] [75].

D'un point de vue expérimental, il existe une dizaine de tests de routine sur animaux, principalement le rat et la souris, afin de tester l'activité analgésique d'un composé ou appareillage [76]. Parmi ceux-ci, on peut citer les tests par action mécanique comme le test de Randall-Selitto ou le test de Von Frey. Une pression croissante est appliquée uniformément (Randall-Selitto) ou par un filament (Von Frey) sur la patte de l'animal qui la retire lorsqu'il

seuil de douleur est atteint. Ce test est également pratiqué sur l'humain afin de tester la sensibilité dans les membres par exemple.

Un autre type de technique comme le test de retrait de la patte stimule les nocicepteurs thermiques par une plaque chauffante (test de Hargreaves) et permet d'évaluer le temps de latence entre le stimulus et la réaction de retrait qu'il engendre [77].

Un test spécifique (**Figure 11**) à la douleur viscérale, inhérente à la cure de hernie, a été développé par Ness en 1988 [78]. Un ballonnet introduit dans le rectum de l'animal est gonflé progressivement. Lorsque le seuil de douleur est atteint, on peut observer une contraction de l'abdomen, réaction caractéristique à la douleur [79] [80].

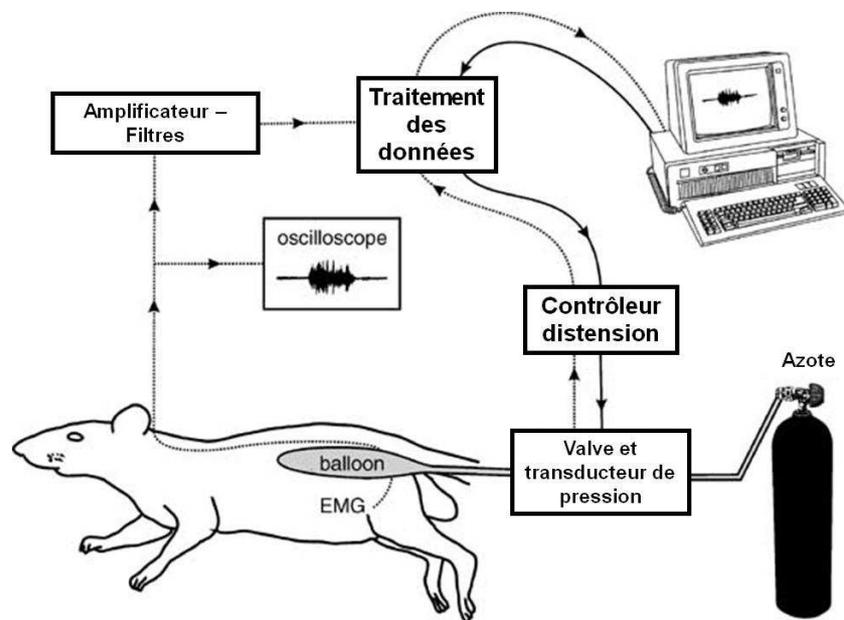


Figure 11 : Schéma de principe du test de distension colorectale sur le rat [81]

II.1.2.b. Techniques conventionnelles

Une douleur chronique postopératoire est une combinaison de ces deux types de processus, neuropathique et somatique/viscéral.

Les nerfs de la région inguinale, ilioinguinal ou iliohypogastrique, sont les cibles principales de dommages. La première mesure de prévention de lésions sera donc d'identifier et de préserver ces fibres nerveuses. En cela, la voie d'abord à son rôle à jouer dans la prévention de la douleur. En effet, il a été démontré que la chirurgie de type « open » (Shouldice ou Lichtenstein), comportant une dissection des plans aponévrotiques jusqu'à l'orifice inguinal profond, est plus algogène que la technique laparoscopique, moins invasive [63, 67, 70, 82]. De plus, les techniques « sans tension » diminuent l'incidence de douleurs postopératoires, même si la

réponse inflammatoire à l'implantation peut générer une sensibilisation des nocicepteurs. Enfin, l'utilisation d'une plaque non fixée ou fixée par des agrafes est un facteur d'apparition de douleur postopératoire, car générant des irritations voir des lésions nerveuses à terme [67].

Le concept d'analgésie préemptive, né à la fin des années 1980, propose d'anticiper les signaux de la douleur par un traitement analgésique préopératoire [83].

Le traitement médical des douleurs neuropathiques faibles à modérées peut s'effectuer par la prise de paracétamol et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Dans le cas de douleurs sévères, l'usage d'opioïdes ou d'antiépileptiques comme la gabapentine s'avère nécessaire [67, 84]. En dernier recours, les nerfs lésés peuvent être enlevés par neurectomie [85].

Les blocs analgésiques⁴ pré-ou postopératoires d'anesthésiques locaux (ALs) permettent d'atténuer la douleur aiguë avec donc une incidence sur la douleur post-chirurgicale chronique [86]. Ces molécules agissent en bloquant la conduction de l'influx nerveux le long de l'axone neuronal. Il s'agit donc d'une injection d'anesthésiques locaux à proximité des nerfs (**Figure 12**).

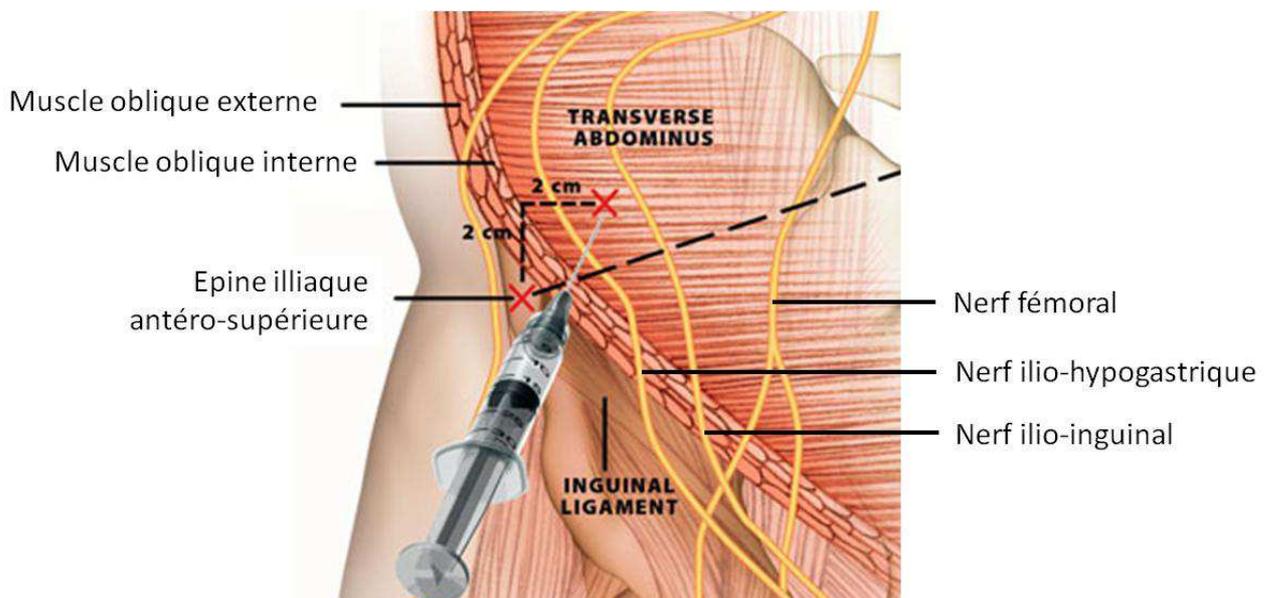


Figure 12 : Emplacements des injections pour l'analgésie locorégionale (bloc ilioinguinal) [87]

En combinaison avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens en prise parentérale afin d'optimiser l'effet analgésique, cette technique s'avère très efficace et répandue. Les risques de complications liés aux blocs anesthésiques sont la diffusion de l'anesthésie à la zone fémorale

⁴ Injection simple ou multiple directement sur un nerf visant à insensibiliser une zone

[86] et le passage dans le système sanguin, les ALs possédant une certaine cardiotoxicité. Enfin, l'injection elle-même peut causer une lésion nerveuse.

Les techniques d'infiltration ont également un effet important sur la douleur postopératoire [59, 88]. Certaines études proposent d'administrer directement les ALs sur les quatre plans (peau, tissu sous-cutané, espace aponévrotique entre les muscles obliques externe et interne et sac herniaire) lors de la fermeture de la plaie pour les techniques « open » [86, 89]. Des études ont été menées sur l'infiltration en injection simple des berges de la cicatrice [3]. Elles ont montré qu'il était plus efficace d'injecter en profondeur qu'au niveau cutané. Cette technique a malgré tout ses limites, l'analgésie consécutive aux infiltrations ne dure que le temps d'action des principes actifs (anesthésiques locaux) soit moins de 8 heures.

Une technique dérivée du protocole d'infiltration propose l'utilisation d'une pompe élastomérique de type ballonnet et un cathéter multiperforé [90-93]. Cette méthode consiste à insérer autour du site chirurgical un cathéter multiperforé relié à un système de diffusion lente comprenant un ballonnet rempli d'anesthésique local (ropivacaïne 0,75%, 0,2%, bupivacaïne 0,5% ou lidocaïne 1%). Celui-ci est instillé directement sur le site d'implantation pendant une durée de 48h. Il a été démontré une diminution de la douleur ressentie pendant cette instillation. Des dispositifs dédiés à l'infiltration continue post-opératoire ont déjà été commercialisés comme par exemple la société I Flow sous le nom de « On-Q Pain Buster[®] » (**Figure 13**) ou encore la société WYM France sous le nom de Accufuser[®] [94].



Figure 13 : Dispositif On-Q Pain Buster[®][95]

Néanmoins, ce type d'appareillage rallonge la durée d'intervention et nécessite des soins supplémentaires comme le retrait du cathéter. Le risque infectieux n'est pas exclu [96] ainsi que le risque d'obturation des pores de ce dernier.

Il a été établi qu'après injection d'une solution d'AL à proximité d'un nerf notamment lors de blocs périphériques, plus de 99% de la dose injectée est absorbée dans la circulation générale [97]. Ainsi seule une très faible fraction de principe actif parvient jusqu'à la fibre. L'avenir des techniques de prévention de la douleur pourra donc bénéficier des avancées technologiques dans le domaine des systèmes à libération prolongée de médicaments qui permettrait d'augmenter la durée d'activité analgésique tout en conservant une intervention chirurgicale simple et rapide [86, 98].

II.1.2.c. Techniques émergentes

Concernant la chirurgie par laparoscopie, une équipe italienne propose d'utiliser un appareil de nébulisation (Aeroneb Pro[®], Aerogen) afin d'insuffler avant la fermeture, à l'intérieur de la cavité péritonéale, un anesthésique local (lidocaïne, ropivacaïne, bupivacaïne) sous forme de fines gouttelettes [99]. Une étude antérieure présente une méthode d'insufflation par aérosol [100]. Bien que ces techniques permettent de diffuser de manière beaucoup plus homogène le principe actif dans la cavité péritonéale lors d'une intervention sous cœlioscopie, elles sont exclusivement réservées à ce type de voie d'abord et ne procurent qu'une analgésie postopératoire de 4h maximum.

Un brevet décrivant un système à libération prolongée d'anesthésiques locaux, a été proposé par le Dr Pelissier [101]. Celui-ci, sous forme de plaquettes à placer directement au niveau du site opéré, libère d'abord une forte dose (« burst-effect ») d'anesthésiques locaux puis des doses dégressives. L'implant se compose d'une matrice de PolyCaproLactone(PCL)/PolyLactique Acide-Glycolique Acide (PLAGA) dans laquelle est intégré un principe actif (bupivacaïne ou ropivacaïne). Ce dernier est libéré lors de la dégradation lente de la matrice polymère après implantation. Les quantités de principe actif sont basées sur les valeurs employées dans les études d'infiltration. Néanmoins, alors que la tendance actuelle vise à limiter la présence de matériaux prothétiques par des implants légers ou semi-résorbables.

Une autre matrice polymère composée d'un copolymère d'acide poly(sébacique-co-ricinoléique) a été chargée en bupivacaïne afin de pouvoir être injectée directement sur le site opératoire [102]. Alors que les études *in vitro* montrent une libération du principe actif jusqu'à 7 jours, l'efficacité

in vivo sur souris, par le test de Hargreaves (retrait de la patte sur une plaque chauffante) a été démontrée jusqu'à 30h après injection de la formulation sur le nerf sciatique et ceci, sans toxicité de cette dernière. Malgré ces bons résultats, le coût de production à grande échelle d'un tel système est rédhibitoire pour une application en chirurgie inguinale. Les auteurs ont depuis orienté son utilisation vers la délivrance de molécules antimitotiques, comme le paclitaxel pour le traitement anticancéreux [103].

Une voie envisageable serait l'utilisation de la fibre textile de la plaque d'événement en tant que système à libération prolongée par l'incorporation du principe actif directement lors de la production du fil. Une étude israélienne [104] décrit la synthèse d'un textile non-tissé composé d'un mélange de polycaprolactone et de polyuréthane dans lesquelles est inclus un anti-inflammatoire non-stéroïdien, le kétoprofène avant la production de fibres par électrospinning. La dégradation de la partie polycaprolactone des fibres permet la libération lente du kétoprofène au-delà de 14 jours. Néanmoins, la préparation du mélange polymère dans le chloroforme, le coût et la cadence des productions d'une telle structure sont autant d'éléments limitant l'utilisation de ce procédé à grande échelle.

Enfin, d'autres vecteurs d'anesthésiques locaux comme les micro- et nanoparticules ou les liposomes sont largement décrits dans la littérature [99, 105-108]. Parmi ces techniques, on peut citer les complexes anesthésiques locaux/cyclodextrines. Il a été démontré dans de nombreuses études que l'introduction de ces oligosaccharides permet, par le phénomène d'inclusion, d'augmenter la durée d'efficacité des principes actifs après injection mais également de diminuer leur toxicité systémique intrinsèque [109, 110].

Bien qu'aucun protocole universel ne soit encore établi [111], toutes les techniques citées ci-dessus s'inscrivent dans une démarche d'analgésie multimodale visant à réduire la douleur et la consommation d'opioïdes, limitant ainsi leurs effets secondaires et facilitant au final le retour rapide à une activité normale [60].

Il apparaît néanmoins que le meilleur compromis entre la diffusion lente du principe actif et une action *in situ* à la source de l'influx nerveux, implique des techniques de systèmes à libération prolongée directement disposés à la surface des implants de réfection de paroi abdominale.

De plus, les systèmes à libération prolongée comportant des cyclodextrines semblent très prometteurs pour cette application, notamment s'ils sont combinés à l'efficacité des anesthésiques locaux.

II.1.2.d. Les anesthésiques locaux

Ces dérivés de la cocaïne sont regroupés en deux familles de molécules, les aminoesters et les aminoamides [112] [113]. Leur structure peut être dissociée en 3 parties (**Figure 14**), dont vont dépendre étroitement leur puissance intrinsèque et leur demi-vie :

- La partie lipophile, constituée d'un cycle aromatique (benzène di- ou tri-substitué), qui permettra la pénétration de la molécule dans les couches phospholipidiques ainsi que sa fixation
- La chaîne intermédiaire (amide ou ester) dont l'allongement augmente la puissance et la liposolubilité mais également le risque d'effets indésirables
- La partie hydrophile (amine tertiaire) qui joue un rôle dans l'hydrosolubilité de la molécule et donc dans la répartition sanguine, dans la diffusion, ainsi que dans l'ionisation.

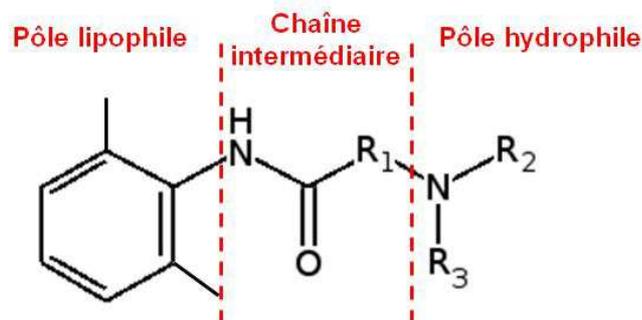


Figure 14 : Structure d'un anesthésique local de type aminoamide

Ils agissent directement au niveau de la paroi des fibres nerveuses en bloquant réversiblement les canaux sodiques, responsables de la conduction nerveuse (**Figure 15**) par échange cationique Na⁺.

Initialement, injectés sous forme ionisée à pH compris entre 4,4 et 5, ils pénètrent dans la cellule neuronale à travers la membrane phospholipidique, sous la forme neutre. Dans le milieu intracellulaire, ils sont ionisés de nouveau, puis se lient aux acides aminés de la paroi protéinique du canal sodique sur le versant intracellulaire afin d'en obturer l'accès.

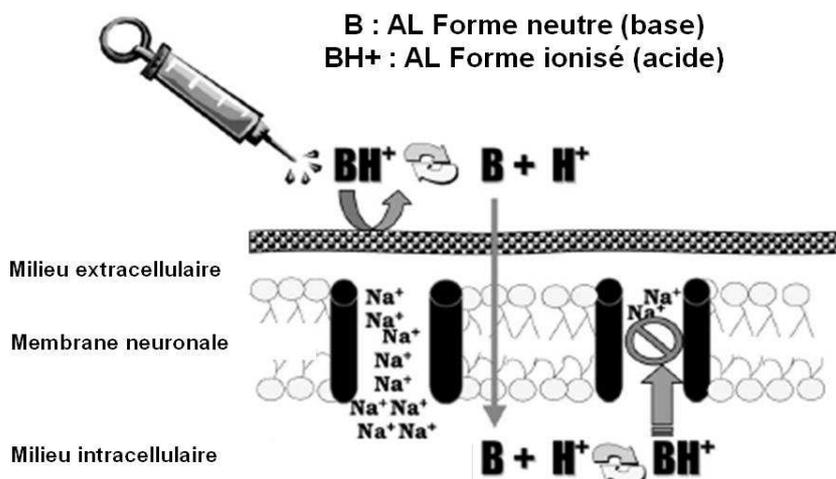


Figure 15 : Mécanismes d'action des anesthésiques locaux [114]

Le métabolisme de ces principes actifs s'effectue dans le foie [112] sans toutefois atteindre les concentrations toxiques de leurs métabolites à risques (mono-éthyl-glycine-xylide, pipéroxylidine,...).

Il a été démontré que leur effet ne se limite pas au seul contrôle de la douleur. Ils possèdent également une efficacité anti-inflammatoire intrinsèque [115], même si cet effet est complexe et reste à évaluer vis-à-vis d'autres principes actifs anti-inflammatoires [116] [117].

Deux anesthésiques locaux ont été sélectionnés sur conseils de praticiens pour ces travaux.

- La lidocaïne

Cet aminoamide est de nos jours l'AL le plus répandu (**Figure 16**). Commercialement, elle est également connue sous le nom de Xylocaine[®] ou lignocaïne. Les concentrations des solutions pour l'anesthésie locale présentes sur le marché sont : 2% (20 mg/mL), 1% (10 mg/mL) et 0,5% (5 mg/mL).

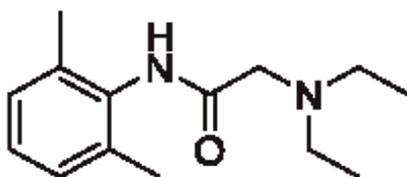


Figure 16 : Structure de la lidocaïne

Elle possède une durée d'efficacité de 1h30 à 2h, ce qui est considéré comme court pour un anesthésique local [112]. Elle est souvent utilisée comme un anesthésique local à délai d'action rapide et donc de ce fait en application topique (au niveau des muqueuses). Ainsi, on la retrouve sous forme de patch à 5% [118, 119], utilisé dans le traitement de la douleur post-herpétique.

Elle est également présente dans la crème EMLA (Eutectic Mixture of Local Anesthetics) qui est un mélange lidocaïne 2,5% - prilocaïne 2,5% [120] et dans des sprays et autres pastilles pour administration orale, comme par exemple les comprimés à sucer Strepsil®.

Elle est aussi employée en prophylaxie afin de prévenir l'arrhythmie cardiaque (anti-arythmique de classe Ib) [121] [122].

La concentration plasmatique correspondant à la fraction libre et considérée comme seuil toxique (cardiovasculaire et neurologique) de cet anesthésique local a été évaluée à 5 µg/mL. De même la dose maximale tolérée se situe autour de 7-8 mg/kg soit 500-600 mg, chez l'homme de 80 kg [123].

Toutefois, elle n'en reste pas moins employée comme anesthésique local dans le traitement des douleurs postopératoires. Ainsi le Pr Joris et son équipe démontrent l'efficacité de la lidocaïne par voie intraveineuse dans le cas d'une colectomie, sur la diminution du délai de sortie et la récupération postopératoire [124]. Les doses reçues par le patient étaient de 1,5 mg/kg en induction de l'anesthésie générale, 2 mg/kg/h pendant l'intervention puis 1,33 mg/kg/h pendant les 24h post-opératoires. Malgré de très bons résultats, une étude à plus grande échelle était envisagée afin d'identifier d'éventuelles complications dues à la perfusion intraveineuse, bien que les valeurs plasmatiques de lidocaïne se situent en dessous du seuil de toxicité.

Concernant la chirurgie abdominale, Chavez-Abraham démontre que l'analgésie par perfusion de lidocaïne au site chirurgical est efficace pour une infiltration post-opératoire de 50 mg suivie d'une infusion à 20 mg/h avec possibilité de bolus de 40 mg toutes les heures [93]. Ce protocole nécessite une quantité totale de lidocaïne de 960 mg pour un homme de poids standard (80 kg) en infusion.

- La ropivacaïne

Cette molécule est l'un des derniers anesthésiques locaux synthétisés vers la fin des années 90 [97]. C'est un analogue de la mépivacaine et de la bupivacaine. Cette dernière a été longtemps considérée comme l'anesthésique local de référence en matière de blocs et d'analgésie postopératoires. Des études ont démontré qu'elle comportait une toxicité systémique plus importante que les autres anesthésiques locaux, malgré sa puissance accrue [125]. Des molécules similaires en puissance mais moins dangereuses pour les systèmes cardiaque et nerveux centraux ont donc été investiguées. Ainsi la ropivacaïne s'est présentée comme le meilleur compromis actuellement, permettant d'utiliser des doses plus importantes car elle présente des seuils de toxicité plus élevés, pour une puissance comparable [125]. Sa demi-vie d'élimination après

injection intraveineuse est de $1,8 \pm 0,7$ h pour une durée d'action allant de 2h30 à 3h30. Elle se différencie de la bupivacaine par le substituant propyl du groupement pipéridine contre un butyl pour bupivacaine (**Figure 17**).

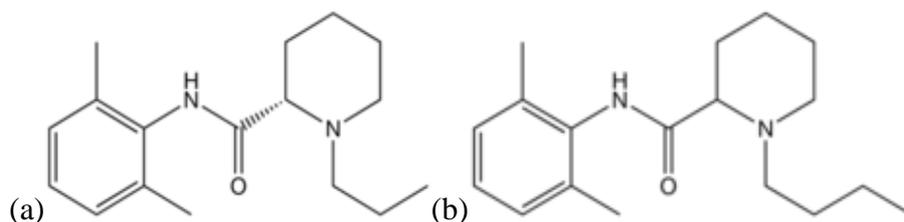


Figure 17 : Structures de la ropivacaine (a) et de la bupivacaine (b)

Elle est commercialisée principalement par Astra-Zeneca sous le nom de Naropeine[®]. Les concentrations des formes galéniques présentes sur le marché sont : 0,2% (2 mg/mL), 0,5% (5 mg/mL), 0,75% (7,5 mg/mL) et 1% (10 mg/mL).

La dose maximale sur 24h préconisée dans le cas de la ropivacaine est de 11 mg/kg ou 3 mg/kg en injection unique [123]. La concentration plasmatique toxique de la fraction libre de la ropivacaine (non-liée aux protéines) a été évaluée entre 0,34 and 0,85 $\mu\text{g/mL}$ avec une concentration médiane de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ [126].

Initialement, en tant que substitut à la bupivacaine dans le domaine de l'analgésie postopératoire, la ropivacaine a été employée principalement par voie péridurale [127, 128]. Par la suite, elle est associée aux techniques d'infiltration et d'infusion continue du site opératoire.

Ainsi, l'efficacité d'une infiltration simple de 225 mg de ropivacaine (30 mL de solution à 0,75%) a été démontrée sur la douleur postopératoire par échelle visuelle analogique [3]. De même, l'infiltration continue lors de chirurgie abdominale a été évaluée par diverses études [129-131], qui montrent un intérêt relatif de la technique pour des doses de 20 mg/h pendant 48h avec un bolus initial de 40 mg, soit une quantité totale de 960 mg pour un homme de poids standard (80kg) sur 48 heures.

II.2. Infections

II.2.1. Facteurs

L'infection du site opératoire (SSI) est une complication courante après une cure de hernie inguinale. Son incidence a été évaluée à 1%, toutes techniques confondues [132]. Elle reste plus simple à traiter qu'en chirurgie vasculaire ou orthopédique et moins fréquente (respectivement

6% et 2%). Néanmoins, un développement infectieux conduit à une inflammation de la zone contaminée, ce qui engendre de la douleur.

Paradoxalement à son utilité dans le renforcement de la paroi, l'utilisation d'un implant textile semble favoriser l'infection postopératoire [133]. Il a en effet été démontré qu'un élément étranger à l'organisme peut servir de point de départ à la prolifération bactérienne avec un nombre de bactéries nécessaire à l'infection moindre par rapport à la peau (de 10^6 à 10^2 dans le cas de *Staphylococcus epidermidis*) [134]. De plus, la présence de « niches » dans la structure de la prothèse permet un développement bactérien qui s'exprime en moyenne 6 mois après l'intervention [135]. Avec plus d'un million de plaques d'événement implantées chaque année dans le monde, la suppression du risque infectieux représente un bénéfice considérable [136].

II.2.2. Solutions préventives

Le traitement antibiotique prophylactique⁵, tout type de chirurgie herniaire confondu, reste controversé [137]. Le grand nombre d'études effectuées sur le sujet n'apporte pas de résultats concluants, du à l'hétérogénéité des méthodes [138]. Toutefois certaines études proposent l'injection pré- ou périopératoire de céfazoline 2g, un antibiotique à large spectre, en intraveineuse [139, 140] qui permet d'éviter le développement infectieux chez certains patients prétendus « à risques » [137].

Dans le cas de la herniorraphie, sans implantation de prothèses, le fil de suture peut être utilisé comme un système de libération prolongée d'antibiotiques. Une équipe israélienne propose par exemple, d'enrober directement ce dernier par un polymère d'origine naturelle, l'acide poly(D,L-lactique-co-glycolique) auquel a été rajouté un antibiotique à large spectre, la gentamicine par émulsion (PDLGA-gentamicine) [141]. Le procédé reprend le principe des microparticules, construites selon un schéma cœur/écorce. Les fils de sutures vierges en polyglyconate (Maxon™), qui forment le cœur, sont enduits de l'émulsion PDLGA-gentamicine par dip-coating⁶, puis le tout est lyophilisé afin de fixer le système (**Figure 18**). Les études de libération *in vitro* (PBS, 37°C) ont démontré une libération d'antibiotique à 60 jours.

⁵ Traitement préventif

⁶ trempage

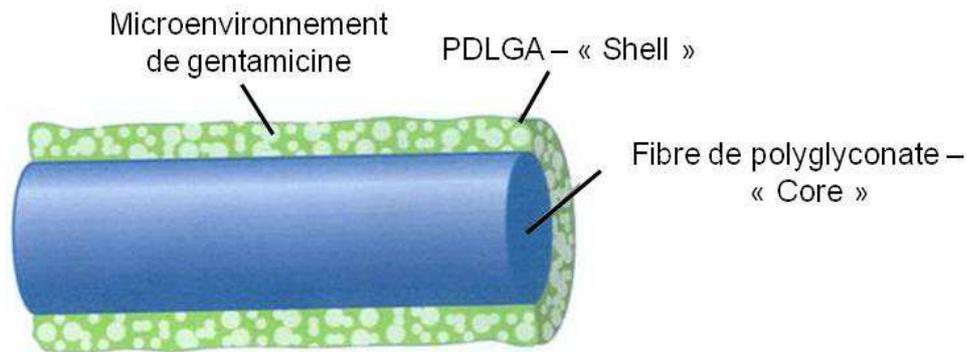


Figure 18 : Structure de la fibre Maxon™ enrobée [142]

Concernant les techniques sans tension, qui requièrent la pose d'un implant de réfection de paroi, les fibres peuvent servir de supports à des molécules antibactériennes, transformant ainsi la prothèse en système de libération contrôlée ou tout au moins en lui conférant une résistance au développement bactérien.

Ainsi, une équipe turque a enrobé une plaque d'événtration en polypropylène par un gel de chitosan contenant du triclosan, une molécule antibactérienne à large spectre [133]. Le biopolymère sert ici de facteur limitant à la libération de l'antibactérien. Les études *in vivo* ont été réalisées sur le rat par implantation en pré-péritonéal. Elles ont démontré l'activité de l'enrobage par l'absence d'infection 8 jours après implantation comparativement au témoin sans antibactérien ni chitosan, dont la plaie était infectée et nécrosée. Il apparaît également que l'adhérence bactérienne était 1000 fois moindre sur l'implant enrobé par le gel de chitosan contenant du triclosan que sur l'implant témoin vierge.

Des procédés de greffage de molécules bioactives comme des particules d'argent [143] ou plus récemment des enzymes [144] offrent une bonne protection contre l'adhésion du biofilm bactérien et donc la prolifération au niveau de l'implant. De plus, ils fournissent également une bonne alternative vis-à-vis des micro-organismes résistant aux antibiotiques (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline - SARM) [144]. Néanmoins, ces protocoles restent difficilement applicables industriellement par leur coût et leur faisabilité à grande échelle, et se limitent à une protection « par contact » avec le biofilm bactérien sans empêcher de développement infectieux dans l'environnement du site chirurgical.

Récemment, une équipe de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier a proposé un système d'enrobage d'une prothèse en polypropylène par spray-coating⁷ au moyen d'un aérographe [145]. La solution de polymère projetée est un mélange de polycaprolactone (PCL) ou d'acide poly(D,L-lactique). Le principe actif, un antibiotique à large spectre, l'ofloxacine, est incorporé à la solution de polymère juste avant la projection. La libération du principe actif dans un tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 s'effectue pendant 4 jours. L'activité antibactérienne testée sur une souche fluorescente génétiquement modifiée d'*Escherichia coli* est conservée pendant plus de 72 heures.

On peut enfin citer les travaux d'une équipe américaine qui propose l'utilisation d'un polymère de β -cyclodextrines sous forme d'hydrogel afin de servir de plateformes de délivrance d'antibiotiques (rifampicine, novobiocine et vancomicine) [146]. Les cyclodextrines, oligosacchariques cycliques, ont la capacité de former des complexes d'inclusion réversibles avec ces derniers, sans altérer leurs propriétés antibiotiques. Le polymère est préalablement réticulé par un agent réticulant de type diisocyanate afin de former un hydrogel. Celui-ci est ensuite appliqué sur des plaques d'événement en poly(éthylène téréphtalate) (Parietex TET[®], Covidien) puis l'ensemble est placé sous vide pendant 48h et enfin lavé à l'eau et au diméthylformamide. L'activité antibactérienne de ces implants enrobés de l'hydrogel de cyclodextrines a été évaluée à plus d'un mois pour tous les principes actifs (rifampicine, novobiocine et vancomicine) sur *S. aureus*. Le témoin à base de dextran présente une activité antibiotique de 10 jours seulement.

Ces résultats très prometteurs ne font pas état de la cytocompatibilité d'un tel dispositif, la synthèse de l'hydrogel nécessitant l'emploi de diméthylformamide, et de réticulants isocyanates, toxiques pour l'organisme. Toutefois, les cyclodextrines semblent être de bons vecteurs polyvalents.

La plupart des avancées citées précédemment n'en sont pour l'instant qu'au stade théorique.

Par manque de standards, actuellement, une administration systémique d'antibiotiques est réalisée au moment de l'infection afin de pallier un développement centré sur le site chirurgical [133]. Néanmoins, le corps médical est toujours ouvert à une alternative préventive qui pourrait harmoniser les pratiques actuelles en fournissant une protection efficace contre l'infection. Celle-

⁷ Dépose par vaporisation

ci, bien qu'ayant une incidence très faible, est considéré comme un facteur d'une autre complication de la chirurgie inguinale, les douleurs chroniques.

III. Les cyclodextrines, leurs dérivés et leurs polymères

Depuis leur découverte par Villiers en 1891 [147], les cyclodextrines n'ont cessé de susciter la curiosité de la communauté scientifique par leur capacité à former des complexes d'inclusion réversibles avec divers composés lipophiles. De nombreux dérivés ont également été synthétisés afin d'augmenter l'interaction vis-à-vis de certains composés ou bien encore la solubilité de ces molécules cages. En tant que biomolécules, leur biocompatibilité en fait des vecteurs très attractifs pour diverses industries et technologies innovantes.

III.1. Généralités

Ces oligosaccharides sont obtenus par la dégradation de l'amidon par l'enzyme Cyclodextrine GlycosylTransférase (CGTase) présente dans la bactérie *Bacillus macerans*.

Les polysaccharides linéaires sont formés d'unités glucopyranoses reliées entre elles par des liaisons α -1,4 et arrangées en hélices. La dégradation enzymatique effectue un découpe de fragments hélicoïdaux dont les extrémités s'assemblent, formant ainsi la structure en forme de cône tronqué de la cyclodextrine [148] (**Figure 19**).

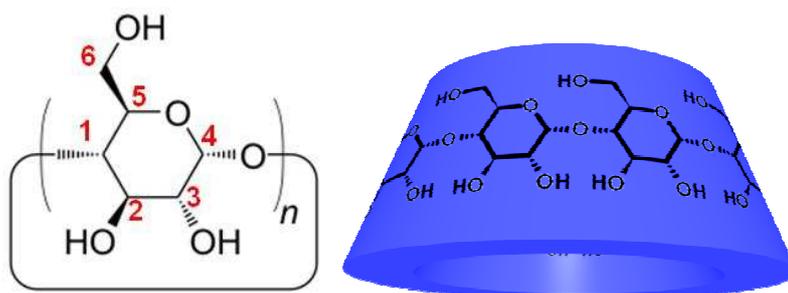


Figure 19 : Structure et forme conique de la cyclodextrine [149, 150]

De ce fait, ces molécules cages sont composées de 6 à 12 unités glucose. Néanmoins, les cycles comportant 9 motifs ou plus ont montrés des taux d'hydrolyses supérieurs aux cycles plus courts [151]. En effet, ils possèdent une moins bonne résistance à l'hydrolyse et ainsi que des propriétés d'inclusion affaiblies par la torsion du macrocycle. Les cyclodextrines les plus couramment rencontrées sont donc constituées de 6, 7 et 8 unités glucose (**Figure 20**). Afin de simplifier leur

identification en fonction de leur composition en unités, une lettre de l'alphabet grec leur est attribuée. Ainsi les α , β et γ -cyclodextrines (α , β et γ -CD) possèdent respectivement 6, 7 et 8 unités glucose (**Figure 20**). On appelle ces molécules « natives », pour les différencier des cyclodextrines dérivées, qui ont subi une substitution partielle ou totale de leurs fonctions hydroxyles par d'autres groupes chimiques.

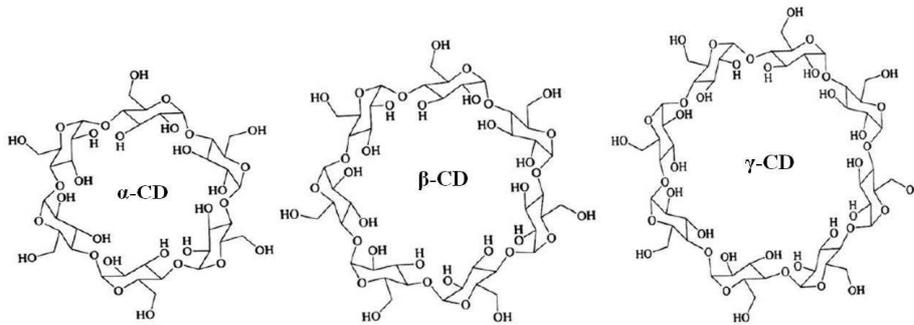


Figure 20 : Structure chimique des cyclodextrines natives

Plus de 1500 dérivés de cyclodextrines sont décrits dans la littérature dont une centaine sont disponibles commercialement [152]. La présence de groupements hydroxyles sur la surface du macrocycle permet en effet un large éventail de réactions comme l'amination, l'étherification, la méthylation ou encore l'estérification. L'un des principaux attraits de ces dérivés et notamment ceux de la β -cyclodextrine est l'augmentation notable de la solubilité, très recherchée dans le domaine de la vectorisation. On peut ainsi citer le dérivé méthylé partiellement, la CRYSMEB, dont la solubilité est largement accrue par rapport au macrocycle natif et ce malgré la substitution par des groupements méthoxy hydrophobes.

Dans ces travaux, nous utiliserons principalement la 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β -CD, **Figure 21**) obtenue par substitution des groupements hydroxyles par des groupements hydroxypropyl. Elle possède une solubilité 10 fois supérieure (**Tableau 1**) à la β -CD et est disponible en grade apyrogène pour une utilisation parentérale.

Les dérivés sont caractérisés par le degré de substitution molaire (MS), décrivant le nombre de groupements substitués par unités glucopyranoses.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des cyclodextrines natives et du dérivé HPβ-CD [149]

	α-CD	β-CD	γ-CD	HPβ-CD
Formule brute	$C_{36}H_{36}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$ (C_3H_6O) _n
Unités glucopyranoses	6	7	8	7
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297	1135 + (57*MS* 7)
Solubilité dans l'eau à 25°C	145	18,5	232	225,5
Diamètre interne de la cavité (Å)	5	6,3	7,9	6,3
Hauteur du tore (Å)	7,9	7,9	7,9	7,9
Volume de la cavité (Å ³)	174	262	427	262

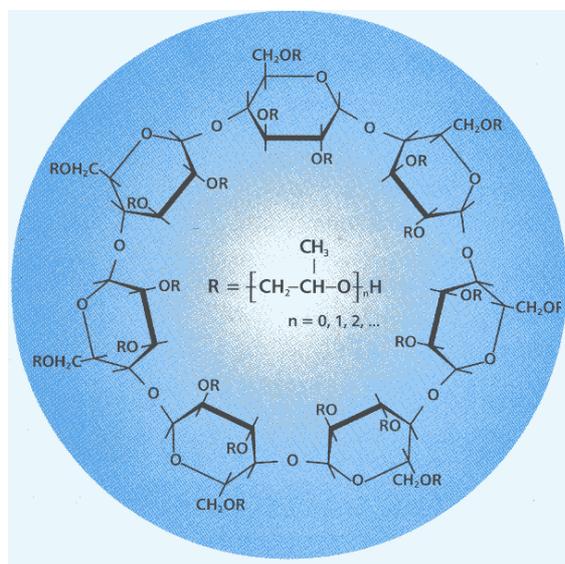


Figure 21 : Structure chimique de l' HPβ-CD [153]

De par leur utilisation reconnue en tant que vecteur de principes actifs, la toxicité des cyclodextrines a été largement étudiée notamment sur le chien et le rat. Ainsi, il a été démontré qu'une dose orale de 10,4 g/kg/jour d'α-CD [154] chez le chien ou de 10,8 g/kg/jour de γ-CD chez le rat [155], n'engendraient pas de toxicité.

La β -cyclodextrine administrée oralement à des rats et des chiens n'a pas démontré de toxicité pour des doses respectivement de 3,6 g/kg/jour et 1,9 mg/kg/jour. Toutefois, un rapport d'expert de l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a établi la dose journalière administrable de β -CD en tant qu'additif alimentaire à 5 mg/g/jour [156]. Une injection intrapéritonéale chez le rat a permis d'établir la DL50 à 700 mg/kg [157].

Concernant les dérivés hydroxyalkylés, seule l'HP β -CD a reçu l'agrément de la Pharmacopée Européenne à l'heure actuelle. Des injections intrapéritonéales de cette molécule jusqu'à 10 g/kg n'ont engendré aucune mortalité ou toxicité. Sur le singe, son administration intraveineuse jusque 10 g/kg ne s'est pas montré létale [158]. De même, sur des sujets humains volontaires, des injections de 3 g en intraveineux n'ont pas provoqué d'effets indésirables sur les reins.

III.2. Complexes d'inclusion par les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont principalement reconnues et employées pour leur capacité à former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de composés. Cette propriété s'explique par leur structure de cône tronqué dont la surface externe tapissée par les fonctions hydroxyles et des liaisons C-H, est hydrophile mais dont la cavité, riche en électrons de par la présence de liaisons éther-oxydes, est hydrophobe. De ce fait, des molécules apolaires dans un environnement défavorable, peuvent s'inclure préférentiellement dans cette cavité lipophile et former un complexe non-covalent et réversible (**Figure 22**).

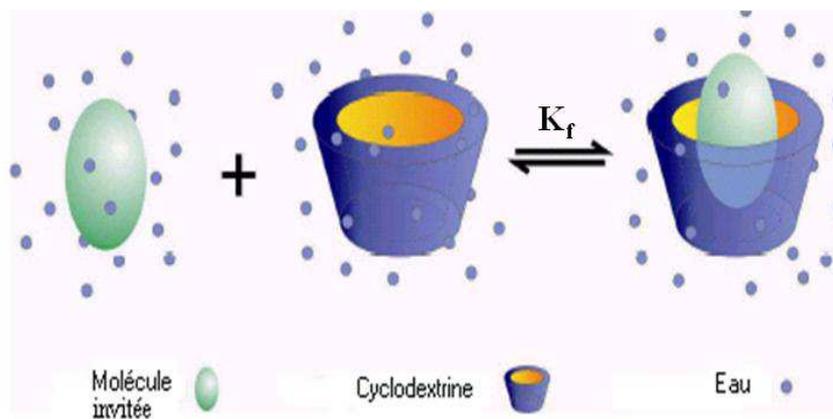


Figure 22 : Complexation par les cyclodextrines

Il s'agit en fait d'un équilibre constant entre l'association/dissociation de la molécule invitée. Celui-ci répond à deux facteurs clés [149] :

- Un facteur stérique qui nécessite une concordance entre le volume de la cavité et la taille du composé invité ou tout du moins de l'un de ces groupements. Par exemple un groupement phényl représente un bon invité pour la cavité de la β -CD.
- Le second est de nature thermodynamique. Le déplacement de la molécule hôte vers la cavité de la cyclodextrine est régi par la contribution énergétique d'interactions de type liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes ou Van der Waals.

Les substituants dans le cas des dérivés de cyclodextrines jouent également un rôle dans la formation et la stabilité du complexe, de par leur caractère électro-donneur [151].

Les complexes d'inclusion soluté/cyclodextrine sont caractérisés par la constante d'association K_f .

Pour un équilibre tel que :



La constante K_f sera déterminée par la relation :

$$K_f = \frac{[CD \cdot S]}{[CD][S]}$$

On peut établir cette constante de stabilité du complexe par différentes méthodes comme par exemple la spectrophotométrie UV-visible avec la relation de Benesi-Hildebrand ou encore la Résonance Magnétique Nucléaire selon la méthode de Scott ou la séquence DOSY. Dans les deux premières, la complexation est caractérisée par une variation du signal soit de la molécule invitée (spectrophotométrie UV-visible) soit de la cyclodextrine, comme la variation du signal des protons internes du macrocycle en RMN 1H . Dans la dernière (DOSY), les interactions sont caractérisées en observant le coefficient de diffusion des molécules en solution. Ces techniques permettent également de déterminer la stœchiométrie du complexe via la méthode dite de Job. Bien que le rapport 1 : 1 (soluté : cyclodextrine) soit le plus fréquent, il existe également des complexes de type 1 : 2 ou 2 : 1 (**Figure 23**).

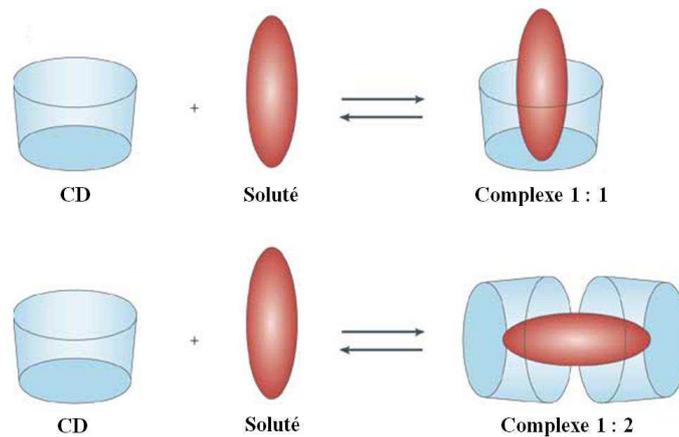


Figure 23 : Stoechiométries des complexes d'inclusion [159]

L'apport principal des cyclodextrines concernant leur application industrielle est donc leur capacité à former ces complexes d'inclusion. Outre l'accroissement de la solubilité des molécules peu hydrosolubles, ils apportent entre autre, une stabilisation des composés sensibles à la lumière, à l'oxydation, à la dégradation thermique et à la dégradation hydrolytique. Ces propriétés permettent leur utilisation dans des domaines variés allant des produits d'entretiens ménagers à l'alimentaire en passant par la catalyse.

Dans cette étude, l'inclusion des cyclodextrines sera employée vis-à-vis de trois molécules : un antibiotique, la ciprofloxacine (CFX,) et deux anesthésiques locaux, la lidocaïne (LDC) et la ropivacaïne (RVC).

Des travaux récents publiés par le laboratoire UMET et basés sur ceux de Chao et al., confirment la complexation de la CFX par les cyclodextrines et plus particulièrement dans l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine par l'intermédiaire du groupement pipérazine de l'antibiotique [160, 161].

Les interactions entre les anesthésiques locaux et les CDs ont été largement décrites et démontrées dans la littérature. Ainsi les travaux de Dollo et Le Corre ont permis d'établir l'inclusion de la lidocaïne et d'autres anesthésiques de type amide, par différentes techniques telles que la RMN du proton, la spectroscopie infrarouge et l'analyse enthalpique différentielle [162]. Les constantes d'association ont par la suite été déterminées par la méthode des variations de solubilité selon Higuchi et ce pour 3 macrocycles : la β -CD, l'HP β -CD et la DM β -CD [163]. Des valeurs de $25,8 \pm 0,6 \text{ M}^{-1}$ (25°C) et $23,8 \pm 1,2 \text{ M}^{-1}$ (37°C) ont été obtenues pour le complexe LDC/ β -CD et $19,9 \pm 0,30 \text{ M}^{-1}$ (25°C) et $23,1 \pm 0,4 \text{ M}^{-1}$ (37°C) dans le cas d'une complexation LDC/HP β -CD dans l'eau deutérée D_2O . Ces valeurs sont à considérer avec précautions car très faibles.

Fraceto a étudié les interactions RVC/ β -CD et caractérisé la stœchiométrie de ce complexe par la méthode de Job en RMN du proton, comme une complexe 1:2. Une constante de complexation à 25°C de 55,5 M⁻¹ a été déterminée [164].

Récemment, De Araujo a démontré que l'inclusion de la RVC dans la HP β -CD formait un complexe de type 1 :1 de constante de 9,41 M⁻¹ à 25°C [165]. Un modèle de topologie a été proposé par RMN ¹H ROESY sélective, mais reste contestable du fait de la faiblesse des signaux. Une étude de l'efficacité de ce complexe lors d'un bloc sensoriel sur le nerf sciatique de la souris, a mis en évidence un temps de latence (temps de mise en place) de la RVC réduit en présence de cyclodextrine, sans toutefois accroître la durée de recouvrement, temps nécessaire au retour de sensations.

III.3. Applications

Le premier brevet décrivant les cyclodextrines et leur complexe a été déposé en 1953 [149]. Dès lors, de nombreux secteurs les utilisent la plupart du temps en tant qu'additifs.

L'industrie pharmaceutique est la première consommatrice de cyclodextrines. Son principal défi est la solubilisation du principe actif et sa vectorisation jusqu'à la zone cible, particulièrement dans le cas de l'administration orale ou de la voie injectable. L'inclusion de molécules thérapeutiques vise à augmenter leur biodisponibilité mais également à diminuer les effets secondaires ainsi qu'à prévenir la dégradation par les défenses de l'organisme. On dénombre une quarantaine de formulations incluant les macrocycles à travers le monde [148]. La moitié d'entre elles emploient la β -CD. Parmi les composés complexés, on retrouve toutes les familles de principes actifs (prostaglandines, anti-inflammatoires, oestrogènes, antibiotiques,...). On peut citer l'association piroxicam/ β -CD (BREXIN[®], Pierre Fabre) qui est employée comme anti-inflammatoire sous forme de comprimés effervescents, dans les cas de la polyarthrite rhumatoïde ou d'arthrose [166]. Des composés plus importants en terme de poids moléculaire comme des facteurs de croissance ou des cytokines peuvent également être vectorisés [167].

La cosmétique, proche de l'industrie pharmaceutique, joue également un rôle dans l'utilisation quotidienne de cyclodextrines. Des complexes fragrance/cyclodextrine se retrouvent dans des gels bain-douche et autres crèmes de soin et déodorants. Dans des pâtes dentifrices, des agents antimicrobiens comme le triclosan sont libérés de manière prolongée par complexation avec la β -cyclodextrine [168].

La biocompatibilité et la non-toxicité des CDs ont également engendrées leur utilisation dans l'industrie alimentaire. Ainsi les cyclodextrines natives sont enregistrées dans le CODEX des additifs alimentaires sous les références E457 (α -CD), E458 (γ -CD) et E459 (β -CD). Elles sont principalement employées afin de masquer les goûts indésirables ou promouvoir les saveurs désirées par libération contrôlée. On les retrouve également en tant que agent protecteur de composés gras sensibles à la lumière, à l'oxydation ou à la chaleur lors du processus de fabrication [151]. Une des applications de ces macrocycles vise à décroître la teneur en cholestérol de produits de grande consommation comme le beurre [169] ou le fromage [170].

Le lien avec l'industrie chimique est rapidement établi. En effet, les propriétés de reconnaissance moléculaire des cyclodextrines permettent leur utilisation aussi bien en catalyse qu'en analyse. Dans le secteur analytique, elles sont largement employées à des fins de séparation énantiomérique dans des phases stationnaires de colonne notamment en chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou en tant que sélecteur chiral en électrophorèse capillaire (EC) [171].

Dans le domaine environnemental, les propriétés d'inclusion des cyclodextrines présentent un grand avantage vis-à-vis de composés indésirables. Elles permettent en effet, le piégeage de solvants ou de métaux lourds dans les effluents ou encore dans les boues [172]. Cette thématique a d'ailleurs fait l'objet de trois thèses au laboratoire UMET (deux soutenues en 2006 et 2007, une en cours).

Enfin l'application la plus connue des cyclodextrines dans le domaine des produits d'entretien reste le *Fébrèze*[®], un désodorisant textile qui contient des cyclodextrines ayant pour but le piégeage composés malodorants comme l'odeur de cigarette.

L'industrie textile utilise également les cyclodextrines en tant que stabilisant pour les colorations ou encore comme dans le cas cité ci-dessus de suppression des odeurs.

III.4. Les cyclodextrines dans l'ennoblissement textile

Afin d'apporter les capacités d'inclusion des cyclodextrines sur un support textile, de nombreuses techniques ont été développées. On peut dissocier deux types de fonctionnalisation des textiles par les cyclodextrines :

- le greffage qui induit une liaison covalente entre le support et les macrocycles (fibres naturelles)
- l'enrobage qui est basé sur des interactions non covalentes (fibres de synthèse).

La fonctionnalisation des fibres par greffage covalent de cyclodextrines nécessite l'utilisation d'un groupement de fixation à la surface du textile. Ainsi, cette technique peut être employée préférentiellement sur des fibres naturelles comme la cellulose, la laine ou la soie, beaucoup plus riches en fonctions de surface (hydroxyles, amines,...) contrairement aux fibres de synthèse.

L'une des premières méthodes de fixation de cyclodextrines a été décrite en 1982 par un brevet de Szejtli [173] qui propose d'utiliser un agent de greffage de type épichlorhydrine. Par substitution nucléophile entre l'épichlorhydrine et la cyclodextrine, on obtient un intermédiaire de type cyclodextrine monosubstitué. En présence d'un support cellulosique, le groupement époxy permet le greffage covalent de la cyclodextrine substituée. Néanmoins, même si elle reste très utilisée dans l'industrie chimique, l'épichlorhydrine n'est pas moins dangereuse pour l'environnement et potentiellement carcinogène [174], ce qui limite son utilisation dans le secteur médical. Sur le même principe, un brevet japonais propose la fixation de cyclodextrines, sur un support polyamide préalablement traité par un polymère polyamide/épichlorhydrine (Hercosett 57[®]) [175].

Deux autres méthodes proposent des dérivés de cyclodextrines comportant des groupements réactifs. Ainsi Lee et Buschmann décrivent la fonctionnalisation d'un support cellulosique par deux dérivés de la β -CD, respectivement l'acrylamidométhyl β -CD (NMA-CD) [176] et la monochlorotriazinyl- β -CD (MCT-CD) [177]. Dans le premier cas, l'application visée est la libération de fragrances et d'antiseptiques et dans le deuxième, un moyen de détection de molécules biologiques contenues dans la sueur humaine [177].

D'autres techniques de traitement de surface ont également été investiguées comme le traitement par plasma. Par exemple, Nada compare différentes techniques comme le traitement thermique

ainsi que 2 types d'appareillages plasma afin de greffer la per-(2,3,6-tri-O-allyl)- β -CD sur différents dérivés cellulosiques (iododésoxycellulose, cellulose peroxydée et cellulose diazonium) [178]. L'objectif visé est l'adsorption d'acides gras (acides linoléique, oléique et ricinoléique) en tant que cicatrisants pour une application du textile comme pansement.

Une alternative au greffage covalent est d'inclure les cyclodextrines au cœur de la fibre. Ainsi, une approche consiste à incorporer les complexes entre une molécule cible et les macrocycles pendant le processus de production de fibres par électrospinning sur différents matériaux tels que la PVP [179] ou le polychlorure de vinyl [180]. Uyar a prouvé la faisabilité de cette méthode notamment sur le polystyrène [181] et le polyoxyde d'éthylène (PEO) [182]. Ces structures présentent un intérêt certain dans le domaine de la filtration apportant une fonctionnalité supplémentaire comme par exemple la séparation par les cyclodextrines.

En vue de son industrialisation, un procédé de fixation de CDs sur un support textile se doit d'être économiquement viable et donc de ne pas impliquer de technologies trop sophistiquées, ni de nécessiter l'emploi de réactifs polluants ou toxiques (surtout pour des applications biomédicales).

La seconde contrainte provient de la nature des fibres employées dans la fabrication des implants médicaux. Leur biostabilité est synonyme d'une faible réactivité chimique, et constitue un verrou technologique vis-à-vis des leur fonctionnalisation.

Ainsi, le laboratoire UMET et plus particulièrement l'équipe des Prs Martel et Morcellet a déposé en 2000 un brevet proposant un procédé de fonctionnalisation d'une surface textile par un polymère de cyclodextrines (polyCD) réticulées. Cette solution consiste à former « in situ » le polyCD qui vient enrober les fibres et ceci en y adhèrent suffisamment pour que l'établissement de liaisons covalentes entre le support et ce polymère de CD ne soit pas nécessaire pour l'obtention d'un « greffage » résistant. De plus, les réactifs utilisés ne sont pas toxiques et seule l'eau est employée dans ce procédé de chimie verte. Par la suite, ce système a été optimisé afin de rendre le polymère de cyclodextrines biocompatible (par neutralisation) et de permettre son utilisation sur les biomatériaux [6].

III.5. La fonctionnalisation par les cyclodextrines réticulées

Depuis la parution de ces brevets [7], de nombreux dispositifs médicaux ont été traités comme des textiles [172, 183-185], des biocéramiques [186], des supports celluloseux ou bien encore des membranes PVDF [187].

Cette technique de fonctionnalisation par les cyclodextrines préconise l'emploi d'un acide polycarboxylique en tant qu'agent réticulant. Le mécanisme réactionnel (**Figure 24**) commence par une déshydratation de l'acide sous l'effet de la chaleur et d'un catalyseur, qui conduit à la formation d'un anhydride. Ce dernier réagit avec une fonction hydroxyle de la cyclodextrine par estérification. Les fonctions libres du même acide forment à leur tour un anhydride qui, en réagissant avec une autre cyclodextrine, engendre une réticulation. Cette polyesterification se propageant, on obtient un réseau polymérique tridimensionnel comportant à la fois les cavités des cyclodextrines et des fonctions carboxylates provenant de l'agent réticulant, qui peuvent intervenir *via* des liaisons ioniques.

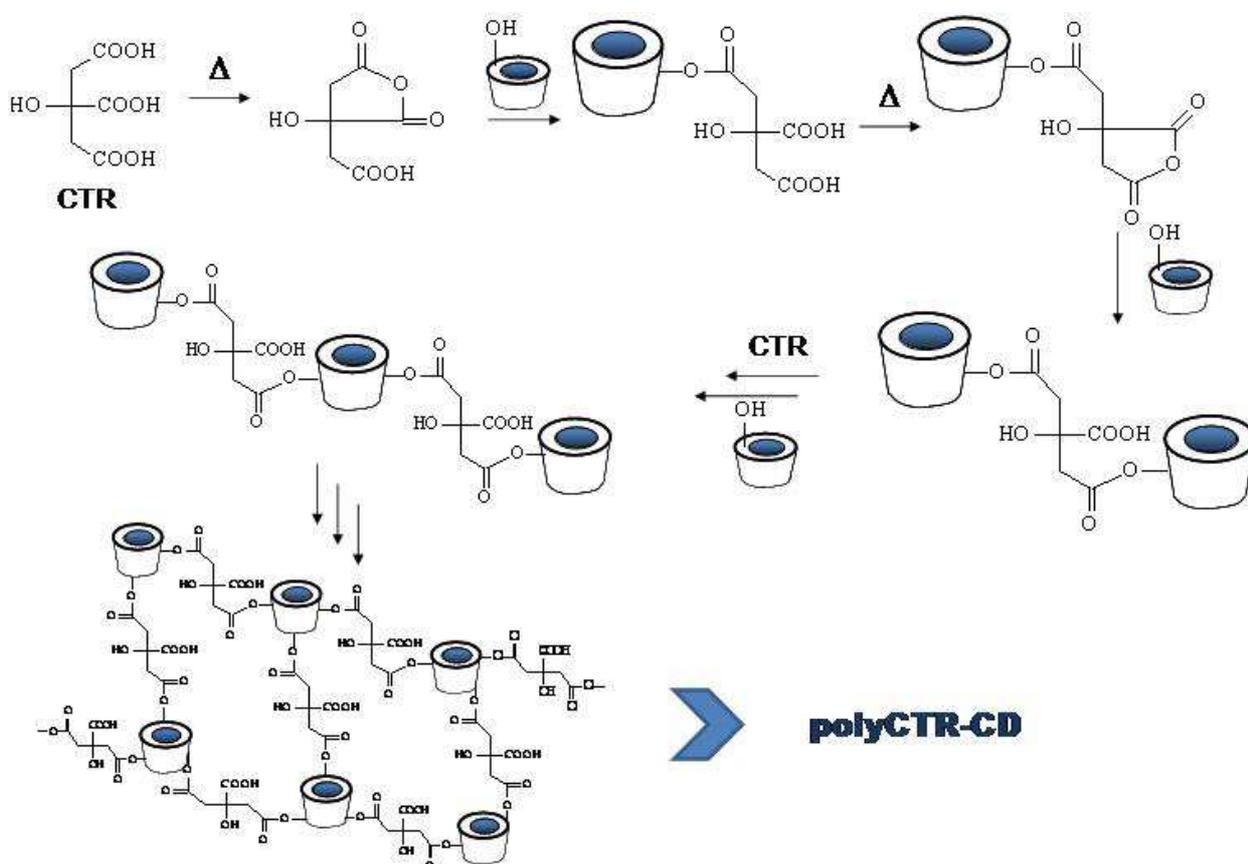


Figure 24 : Schéma réactionnel de réticulation des cyclodextrines par l'acide citrique (PCA)

Dans le cas d'un support comportant des fonctions hydroxyles (cellulose,...) ou amines, la polymérisation peut créer des liaisons covalentes avec la surface par l'intermédiaire de liaisons esters ou amides. Dans le cas de matériaux dépourvus de fonctions de surface, le réseau du polymère de cyclodextrines ne sera pas lié chimiquement à son support mais enrobera ce dernier. Dans ce projet, les textiles à fonctionnaliser ne possèdent pas ou très peu de fonctions en surface qui pourrait permettre un greffage covalent. Il ne s'agira donc que d'un enrobage physique qui reste néanmoins résistant notamment aux lavages [188].

L'agent réticulant acide polycarboxylique doit porter au moins 3 fonctions acides pour que le schéma de la **Figure 24** puisse se dérouler. La fonctionnalité du mélange CD+PCA étant largement supérieure à 2, la polycondensation conduit à un réseau polymère tridimensionnel. Des travaux antérieurs ont évalué divers polyacides potentiels tels que l'acide citrique, l'acide 1, 2, 3, 4-butane-tétracarboxylique ou encore l'acide polyacrylique [189]. Le choix entre les cyclodextrines, leurs dérivés et les acides carboxyliques s'effectue principalement en fonction du support mais également en fonction de la nature de la molécule à libérer. Parmi eux, le couple BTCA-HP β CD est celui qui offre le meilleur compromis entre une température et une cinétique d'ennoblissement et taux de fonctionnalisation fixé sur le support [190]. Ceci a permis de fonctionnaliser un masque respiratoire de type FFP2 en PP afin de lui conférer des propriétés antivirales.

Le catalyseur joue également un rôle dans l'adaptation du procédé au support [191] .

Dans le domaine viscéral, la fonctionnalisation a d'ores et déjà été démontrée sur des textiles de polyamide-6,6 (PA) et sur PP. Ainsi, El Ghoual a obtenu, sur un textile tissé en PA, des taux de polyCD allant jusqu'à 18% (en masse par rapport à la masse de support vierge) avec des cyclodextrines hydroxypropylées (14% pour des natives) [184]. Les supports ainsi fonctionnalisés par la HP γ -CD (140°C, 20 min) présentent une capacité d'adsorption de CFX 10 fois plus importante que les supports vierges. L'efficacité antibactérienne a été évaluée sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Elle est doublée pour des supports avec polymère de cyclodextrines et prolongée à plus de 24h sur *E.coli* quand un support sans enrobage, simplement imprégné de CFX ne sera plus actif au-delà.

Dans une étude plus récente, des implants viscéraux en PP ont été traités à la fois avec la HP γ -CD mais également avec la maltodextrine (MD), molécule similaire à la CD mais sous forme d'oligomères non cycliques, réticulés par le CTR [185]. La difficulté de la fonctionnalisation du

PP réside dans la gamme de température restreinte. En effet, le PP débute sa dégradation à 145°C et la réaction de réticulation des cyclodextrines par les acides polycarboxyliques intervient au delà de 130°C. De ce fait, le paramètre température a été fixé à 140°C. Des taux de polymère de CD ont été obtenus respectivement après 30 minutes pour la MD (25%) et 60 minutes pour la HP γ -CD (20%). Malgré cela, les capacités d'adsorption des supports comportant la HP γ -CD se sont avérées 2 fois plus importantes que celles des textiles comportant de la MD et 4 fois plus importantes par rapport à un PP vierge. L'apport des HP γ -CD a été confirmé par une étude d'activité antibactérienne toujours après activation par la CFX. L'effet antibactérien d'un implant enrobé par les CDs est doublé vis-à-vis d'un textile fonctionnalisé par la MD. Cette étude a donc démontré le rôle joué par les cavités des CDs dans le processus d'adsorption d'un composé bioactif.

IV. Cahier des charges

Comme nous venons de le voir, la réfection de paroi lors d'une cure de hernie inguinale, est majoritairement pratiquée par implantation d'une prothèse textile. Pour des raisons de tenue mécanique, l'implant comporte généralement une base en matériau non-résorbable (biostable), soit en PP soit en PET. Selon la voie *d'abord*, intra ou pré-péritonéale, le chirurgien préférera un support plus ou moins bioactif afin de faciliter ou non l'intégration tissulaire ou éviter les adhésions post-opératoires (PTFE). Les tendances actuelles vont vers la réduction des matières implantatoires *in situ*, ce qui a conduit au développement de prothèses semi-résorbables.

Toutefois, des complications telles que les infections du site implantatoire ou les douleurs post-opératoires restent possibles. Comme nous l'avons vu, dans les deux situations, les systèmes à libération prolongée restent le meilleur compromis afin de maintenir l'effet thérapeutique (antibactérien ou antalgique) désiré.

Pour ce projet, nous proposons de développer un dispositif polyvalent permettant à d'accroître la quantité de principe actif adsorbée et sa libération *in situ* de manière prolongée. Ainsi, il sera possible d'activer le support fonctionnalisé **juste avant** l'implantation par trempage dans une solution de principe actif. Cette approche de l'imprégnation pendant l'opération présente plusieurs avantages par rapport aux dispositifs pré-imprégnés. En premier lieu, ils sont moins contraignants à faire valider par les autorités (marquage CE). Ensuite, le clinicien est libre de choisir le type de principe actif parmi les antibiotiques et les antalgiques ou autres types de molécules thérapeutiques.

Un cahier des charges du futur implant fonctionnalisé a donc été établi par COUSIN BIOTECH, partenaire dans ce projet, qui apportera son expertise technique vis-à-vis du domaine de la chirurgie viscérale.

Ainsi, il a été décidé que la prothèse textile fonctionnalisée par les cyclodextrines devra nécessairement :

- assurer une adsorption accrue et une libération prolongée des principes actifs sélectionnés supérieure aux doses minimales effectives pendant une durée post-opératoire donnée
- assurer une bonne tenue mécanique, surtout dans le cas du matériau résorbable (PLLA)

- être maniable pour les implantations laparoscopiques
- démontrer une bonne cytocompatibilité
- conserver ses propriétés de libération prolongée après stérilisation et vieillissement
- être stérilisable par les techniques employées chez COUSIN BIOTECH (rayonnement gamma ou adsorption d'oxyde d'éthylène)

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels, Réactifs et principes actifs

I.1. Supports textiles

Il est à noter que pour les études d'adsorption d'un composé (TBO, CFX, anesthésiques locaux), ainsi que pour les tests d'efficacité antibactérienne et de libération, les échantillons ont été débités en pastilles de 11 mm de diamètre.

La masse d'une pastille de PET de 11 mm est en moyenne de $10,5 \text{ mg} \pm 1,5 \text{ mg}$ selon qu'elle est issue d'un support vierge ou enrobé et selon son taux de fonctionnalisation.

De même, la masse d'une pastille de PLLA de 11 mm est en moyenne de $15 \text{ mg} \pm 1,5 \text{ mg}$.

La structure des supports ne nous permet pas d'exprimer les quantités adsorbées en fonction de la surface. Il a donc été décidé de normaliser les valeurs en fonction de la masse de support initiale.

Deux types de types de supports ont été étudiés dans ce projet, un textile tricoté de PET et un tricot de PLLA. Ils ont été produits et fournis par COUSIN BIOTECH.

Il s'agit de fils déjà utilisés dans la gamme de produits COUSIN BIOTECH et donc validés en terme de biocompatibilité.

I.1.1. Polyéthylène téréphtalate (PET)

Il s'agit d'un tricot de polyéthylène téréphtalate multifilament à maille rectangulaire (type tulle) de 100 g/m^2 (**Figure 25**). Les mailles sont de dimensions $1,9 \times 2,3 \text{ mm}$ et sont constituées d'une section droite et d'une section tressée, composées par le même fil. Il est composé de deux fibres de 138 et 226 dTex (soit 13,8 et 22,6 mg/m). On retrouve ce support dans la gamme COUSIN BIOTECH sous le nom de Biomesh A2[®] pour lequel les fibres sont recouvertes de polydiméthylsiloxane [192]. Une variante, le Biomesh A2[®] COL, est disponible avec une enduction de collagène porcine supplémentaire.

L'observation par MEB du maillage du textile est composé de deux types de structures, une section droite et une fibre section tressée, toutes deux composées par le même fil (**Figure 25**).

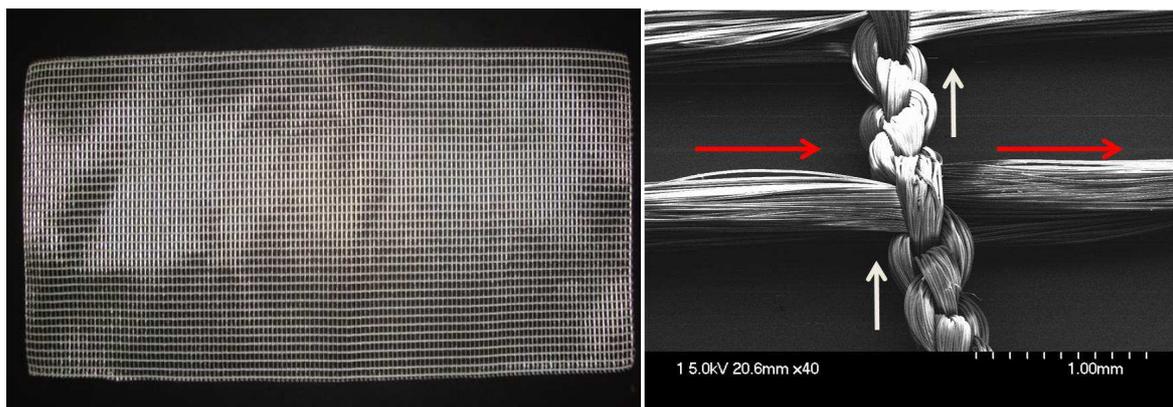


Figure 25 : Implant BIOMESH A2[®] en PET et grossissement par MEB (x40) du maillage et de ses parties tresses (flèche blanche) et droites (flèche rouge)

I.1.2. Acide poly-L-lactique (PLLA)

Le support de PLLA utilisé dans ces travaux est un tricot multifilament de 270 g/m² (Figure 26) qui entre dans la composition de certains produits semi-résorbables de la gamme COUSIN BIOTECH. Il est composé d'un fil de 560 dTex. Comme exposé précédemment (*1^{ère} Partie I.C.3*), ce fil est utilisé afin de réaliser des prothèses semi-résorbables. Dans la gamme de produit COUSIN BIOTECH, il rentre dans la composition du 4D Dome[®], structure de réparation herniaire en 3 dimensions (demi-sphère), qui est en fait un composite comportant 10% de PP pour 90% de PLLA [192]. Il est maintenu sur sa face antérieure par une prothèse plane de 75% PP et 25% PLLA.



Figure 26 : Tricot de PLLA et grossissement (x 30) d'une maille par MEB

Ce tricot permettra l'étude de faisabilité de l'application du procédé breveté par l'UMET sur un matériau résorbable. En effet, le laboratoire a jusqu'ici travaillé uniquement sur des textiles synthétiques à base de PET, PA, PP et sur des membranes de PVDF. Une fois, l'objectif atteint et les paramètres de fixation de la CD sur les fibres définies, on pourra travailler sur des

dispositifs « mixtes » (semi-résorbables) composés de fibres de PLLA résorbables et de fibres biostables de PET ou de PP.

1.2. Réactifs

La fonctionnalisation des implants est réalisée par réaction de polyestérification entre une cyclodextrine (polyol) et un agent réticulant (polyacide). Un catalyseur est également employé afin de diminuer la température de réaction.

1.2.1. Cyclodextrines

Deux cyclodextrines ont été employées dans cette étude, la cyclodextrine native β -cyclodextrine, Kleptose β CD[®] et son dérivé hydroxypropyl- β -cyclodextrine, Kleptose HPB[®] de degré de substitution MS=0,65, toutes deux produites par Roquette (Lestrem, France). Leurs caractéristiques physicochimiques sont résumées dans le **Tableau 2**.

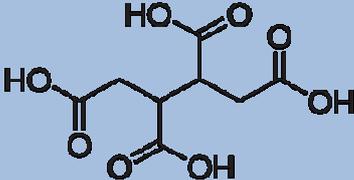
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des cyclodextrines

	β -cyclodextrine	Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
Formule	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$ $(C_3H_6O)_n$
Masse molaire (g/mol)	1135	1399
Point de fusion (°C)	255-265	278
Solubilité (g/L, 20°C, eau)	1,85	225,5
CAS	7585-39-9	128446-35-5

1.2.2. Acides carboxyliques

Deux acides polycarboxyliques ont été considérés dans cette étude, un triacide, l'acide citrique (CTR) et un tétraacide, l'acide 1,2,3,4-butanetétracarboxylique (BTCA). Tous deux proviennent de chez Sigma-Aldrich. Leurs caractéristiques physicochimiques sont résumées dans le **Tableau 3**.

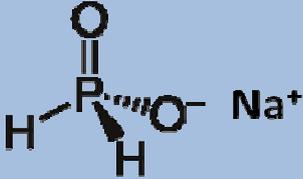
Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des polyacides carboxyliques

	Acide citrique	Acide 1, 2, 3, 4-butane-tétracarboxylique
Formule		
Masse molaire (g/mol)	192	234
Point de fusion (°C)	153-159	195-197
Solubilité (g/L, 20°C, eau)	592	100
CAS	5949-29-1	1703-58-8

I.2.3. Catalyseur

Un grand nombre de sels phosphorés ont été testés lors d'études antérieures afin de catalyser la réaction de réticulation du polymère de cyclodextrines [191, 193]. Parmi ceux-ci, l'hypophosphite de sodium a été retenu pour ce projet, fournis par Sigma-Aldrich. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le **Tableau 4** :

Tableau 4 : Structures et propriétés physico-chimiques du catalyseur phosphoré

Nom	Hypophosphite de sodium
Structure	
Masse molaire (g/mol)	88
Point de fusion (°C)	90
Solubilité (g/L, 20°C, eau)	592
CAS	12333-67-3

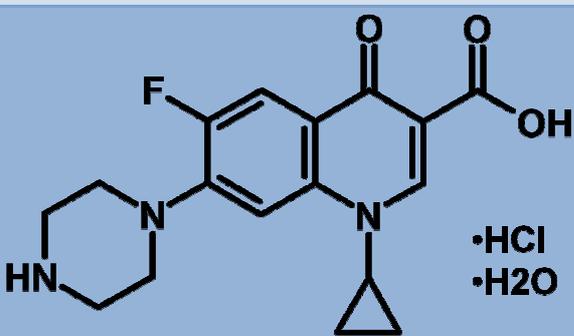
L'hypophosphite de sodium a déjà montré son efficacité et son innocuité lors de la fonctionnalisation de biomatériaux par des cyclodextrines [183, 185].

1.3. Principes actifs

1.3.1. Antibiotique

Le choix de l'antibiotique pour cette étude s'est porté sur la ciprofloxacine. Elle fait partie de la famille des fluoroquinones, molécules bactéricides à large spectre. Elle agit en modifiant l'ADN de la bactérie ce qui empêche la multiplication bactérienne (bactériostatique). Dans cette étude, il sera employé aussi bien de la ciprofloxacine sous forme de chlorhydrate (Aldrich) que sa forme galénique contenant des excipients (Ciprofloxacine 200 mg/mL, Panpharma). Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau 5** :

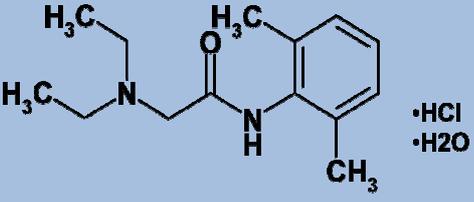
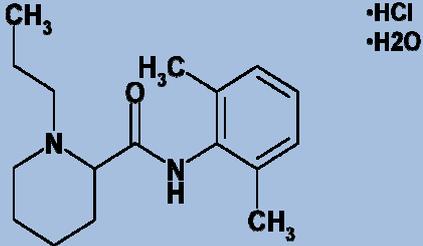
Tableau 5 : Structures et propriétés physico-chimiques de la ciprofloxacine

Nom	Ciprofloxacine
Structure	 <chem>CC1(C)N(C1)c2cc(F)c(cc2N3CCNCC3)C(=O)C(=O)O.[Cl-].[H2O]</chem>
Masse molaire (g/mol)	386
Point de fusion (°C)	310-312
Solubilité (g/L, 20°C, eau)	Très soluble
CAS	86393-32-0

1.3.2. Anesthésiques locaux

Deux anesthésiques locaux employés en chirurgie herniaire ont été sélectionnés pour cette étude : la lidocaïne et la ropivacaïne. Ces molécules seront employées sous forme de sels (chlorhydrate), correspondant au principe actif présent dans les formes galéniques. Leurs structures et propriétés physicochimiques sont résumées dans le **Tableau 6** :

Tableau 6 : Structures et propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux

Nom	Chlorhydrate de lidocaïne	Chlorhydrate de ropivacaïne
Structure		
Masse moléculaire (g/mol)	288	328
Point de fusion (°C)	74-79	267-269
Solubilité (g/L, 20°C, eau)	Très soluble	Très soluble
CAS	6108-05-0	132112-35-7

Les formes galéniques de ces molécules sont des solutions injectables couramment employées dans le domaine chirurgical:

- Lidocaïne 20 mg/mL, AGUETTANT, ampoule de 20 mL.
- Naropine[®] 2 mg/mL, ASTRA-ZENECA, poche de perfusion 200 mL.

Les principes actifs y sont stabilisés dans un milieu tamponné par NaOH et HCl.

II. Méthodes

II.1. Préparation des polymères de cyclodextrines et fonctionnalisation des supports

La première partie de l'étude a visé à quantifier le taux de polyCD immobilisé sur le textile en fonction des paramètres d'ennoblissement appliqués. Les méthodes de caractérisation (analyse thermogravimétrique, microscopie électronique à balayage, analyse enthalpique différentielle,...) ont permis de mettre en évidence la présence du polyCD à la surface des fibres des supports. Leur capacité d'adsorption a été quantifiée vis-à-vis d'un composé standard, facile à détecter, le TBO.

Puis, une étude des propriétés biologiques des supports textiles modifiés a été réalisée par des essais de cytocompatibilité sur des cellules fibroblastiques (NIH3T3).

Enfin, les performances d'adsorption et de libération d'un antibiotique et de deux anesthésiques locaux ont été évaluées par des tests en batch, en milieu dynamique ainsi que par l'établissement d'isothermes d'adsorption. L'efficacité antibactérienne des textiles fonctionnalisés et activés par l'antibiotique a été déterminée par une étude microbiologique sur deux souches bactériennes : *Escherichia coli* (Gram -) et *Staphylococcus aureus* (Gram +).

II.1.1. Synthèse du polymère de cyclodextrines

Le polymère de cyclodextrines a été synthétisé par la méthode développée au laboratoire [193].

On prépare une solution contenant 10 g d'acide polycarboxylique, de 10 g de cyclodextrines et de 3 g de catalyseur. Une fois un mélange homogène obtenu, le solvant (eau distillée) est éliminé à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'une pellicule translucide qui adhère au fond du ballon. Ce dernier est ensuite traité thermiquement à 140°C pendant 30 minutes dans un bain d'huile. Le solide blanc (ou jaune) alors obtenu est dissous dans l'eau et on sépare la phase soluble de la phase insoluble par filtration sur fritté. Le filtrat est finalement purifié par dialyse sur membrane (12000 – 14000 daltons) et lyophilisé pour obtenir une poudre blanche de polymère soluble de cyclodextrines.

Pour le test de vitalité cellulaire, on effectue une étape finale de neutralisation en ajustant une solution de polymère à pH 7 par la soude 0,1 N, afin de neutraliser l'acidité des fonctions acides.

II.1.2. Procédé d'ennoblissement

L'étude d'optimisation des paramètres de fonctionnalisation a été réalisée selon un protocole développé par le laboratoire [194]. Par la suite, ce procédé a été adapté à une production à grande échelle par COUSIN BIOTECH.

Préalablement à la fonctionnalisation, tous les supports sont lavés par soxhlet à l'éther diéthylique (24 cycles de 1 heure) selon le procédé appliqué chez COUSIN BIOTECH. Cette étape vise à éliminer les produits d'ensimage et autres composés résiduels du tissage.

Les supports en PET sont découpés en bandes de 9 x 25 cm.

Les supports de PLLA sont des échantillons de 8 x 10 cm, en double épaisseur de tricots.

Après une étape de séchage à 104°C pendant une heure puis passage au dessiccateur 30 minutes, les échantillons sont pesés. On relève leur masse initiale, *mi*.

Une solution d'imprégnation contenant l'acide polycarboxylique (X g/100 mL), le catalyseur (Y g/100 mL) et la cyclodextrine (Z g/100 mL), notée X/Y/Z, est préparée.

Les échantillons sont ensuite imprégnés et foulardés (2 m.min⁻¹, 2 bars, LAB-PRO, **Figure 27**) afin d'exprimer l'excédent de solution emportée.

Une pesée intermédiaire des échantillons permet de déterminer leur taux d'emport, quantité de solution emportée, par différence avec la masse initiale selon la relation :

Taux d'emport % = $\frac{m-mi}{mi} \times 100$ avec *m* = la masse de l'échantillon humide, et *mi* sa masse initiale

Les textiles sont ensuite placés en rame ventilée (Mini Thermo Roaches, **Figure 27**) à 90°C pendant 5 min puis thermofixés à température $\geq 130^\circ\text{C}$ pendant un temps déterminé, afin de réaliser la réticulation et l'enrobage des fibres par le polyCD.

Après une première série de lavages rapides (2 lavages de 3 minutes dans 1,5L d'eau distillée sous agitation manuelle), les échantillons sont neutralisés dans une solution de carbonate de sodium (Sigma-Aldrich) à 4 g/L afin de neutraliser l'acidité des fonctions acides.

Après un rinçage (2 fois 3 minutes dans 1,5 L d'eau distillée), les échantillons sont immédiatement lavés au soxhlet à l'eau distillée durant 3h (2 cycles).

Enfin, ils sont séchés à 104°C pendant une heure, puis refroidis dans un dessiccateur afin de déterminer la masse finale, *mf*.

Ce protocole sera appelé « protocole de laboratoire ». Pour la fonctionnalisation à l'échelle industrielle, quelques modifications ont été apportées à ce dernier. Ces deux procédés sont résumés dans le schéma suivant (Figure 27) :

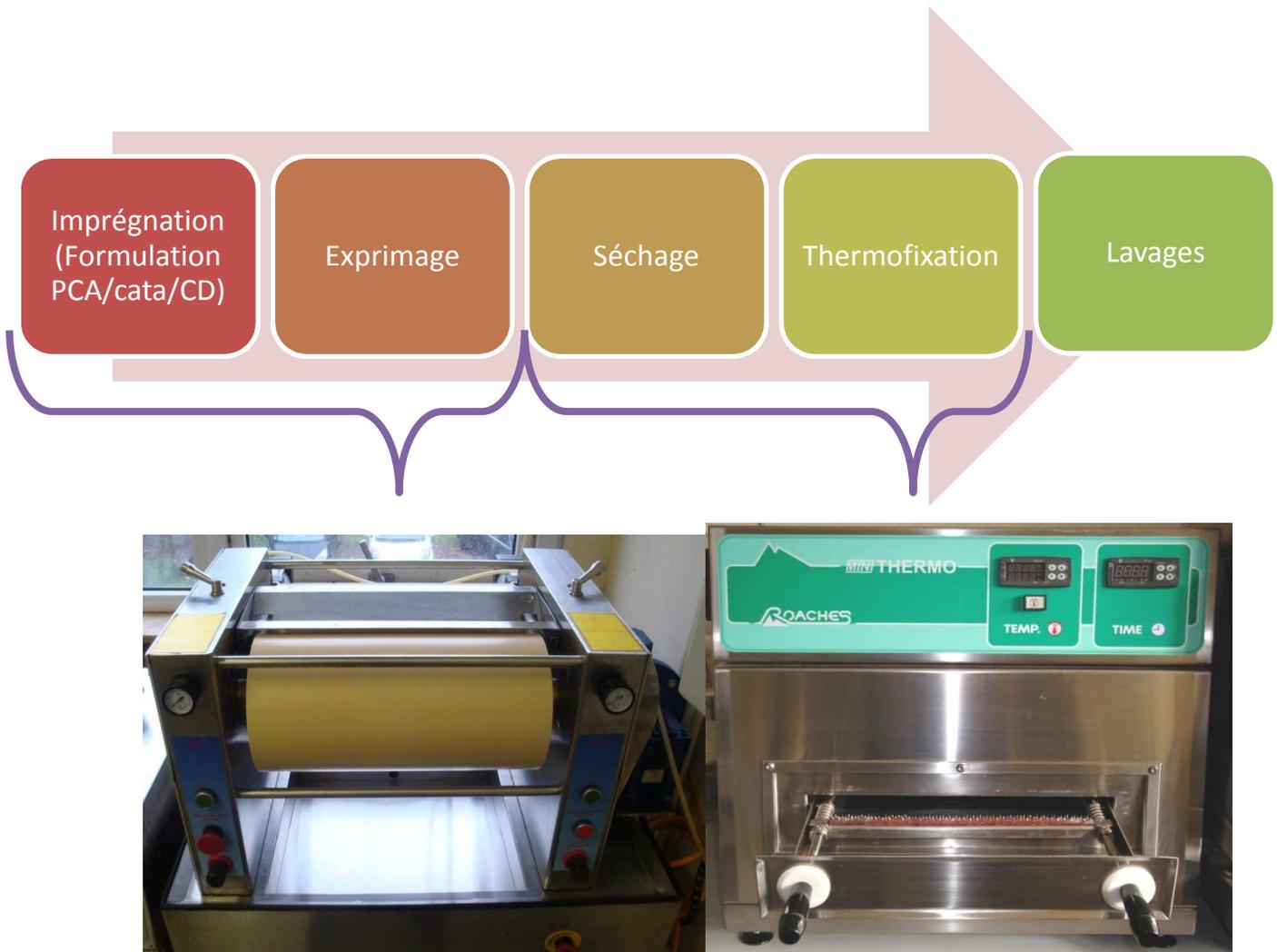


Figure 27 : Séquence d'ennoblissement, foulard (gauche) et rame textile (droite)

II.2. Caractérisations des supports

II.2.1. Taux de fonctionnalisation

Les supports fonctionnalisés sont caractérisés par leur taux de fonctionnalisation T%, qui représente le pourcentage de polymère de cyclodextrines par rapport à la masse totale de textiles après ennoblement. Il est calculé selon la relation :

$$\%CD = \frac{mf-mi}{mf} \times 100 \text{ avec } mf, \text{ la masse finale de l'échantillon et } mi, \text{ sa masse initiale}$$

II.2.2. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Le profil de décomposition thermique des supports vierges et fonctionnalisés a été déterminé par analyse thermogravimétrique (TGA 50, TA instruments) avec une précision au microgramme. La gamme de températures étudiée s'étend de l'ambiante à 550°C pour le PET (à 450°C pour le PLLA), à une vitesse de 10°C/min sous pression constante en O₂ (90 mL/min) et en N₂ (10 mL/min).

Cette technique permettra de mettre en évidence l'enrobage des fibres des supports par les cyclodextrines en détectant sa dégradation et de mesurer leur taux par une technique autre que la pesée.

II.2.3. Analyse enthalpique différentielle (DSC)

Le profil thermique des échantillons a été déterminé par analyse enthalpique différentielle (DSC Q100, TA Instruments) sous azote (50 mL/min). Ces mesures sur les échantillons vierges ont été menées en suivant le cycle suivant : 10°C/min jusque 300°C pour le PET (200°C pour le PLLA) puis refroidissement à 5°C/min jusque 50°C puis de nouveau une chauffe à 10°C/min jusque 300°C pour le PET, 200°C pour le PLLA.

Concernant les échantillons fonctionnalisés, le cycle a été adapté à la température de dégradation du polymère de cyclodextrine, à partir de 180°C.

Ces analyses permettront de mettre en évidence une éventuelle influence de la fonctionnalisation sur les propriétés mécaniques et sur la structure du support.

II.2.4. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'observation des textiles vierges et enrobés par le polymère de cyclodextrine a été réalisée par observations sur un microscope HITACHI S4700. Les échantillons ont été au préalable métallisés par dépôt de carbone. La tension appliquée est comprise entre 5 et 25 kV pour des grossissements allant de 25 à 10 000.

II.2.5. Adsorption du bleu de o-toluidine

Les fonctions acides carboxyliques du polyCD sont dosées au moyen d'un colorant, le bleu d'ortho-toluidine (TBO, Sigma-Aldrich, **Figure 28**). La méthode employée a été adaptée à partir de celle décrite par Baquey *et al.* [195].

Toutefois, cette méthode est considérée comme semi-quantitative car la molécule interagit aussi bien avec les fonctions acides carboxyliques qu'avec les cavités des cyclodextrines [196].

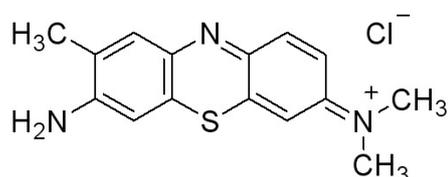


Figure 28 : Structure chimique du TBO

Les échantillons sont imprégnés dans 10 mL de solution de TBO à 0,5 mM pendant 4h à 30°C. L'excédent de TBO est éliminé par 2 rinçages successifs dans 20 mL de soude à 10^{-4} M. La désorption s'effectue dans 10 mL d'acide acétique 50% pendant 20 minutes (**Figure 29**). Si nécessaire, une deuxième désorption dans l'acide acétique est réalisée.

La quantité de TBO libérée est dosée par spectrophotométrie UV-Visible (Shimadzu UV-1800) à $\lambda=654$ nm.

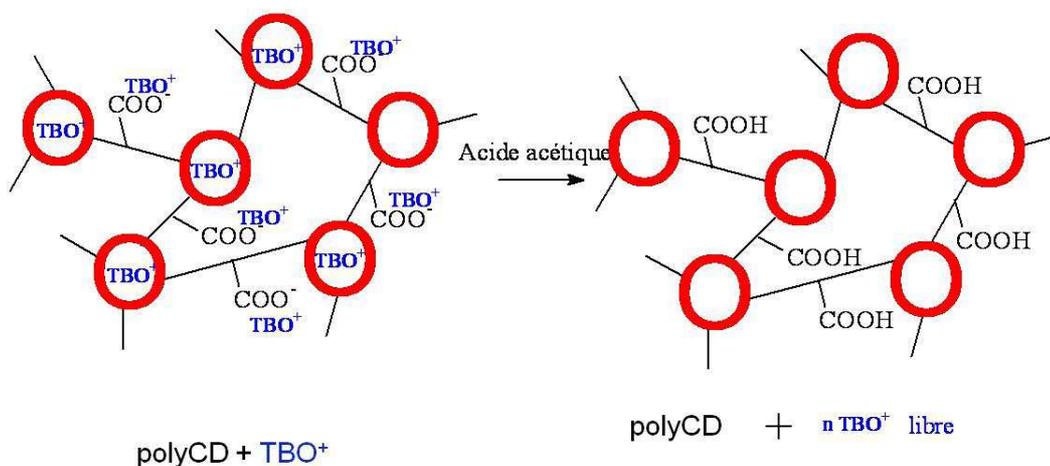


Figure 29 : Principe du dosage TBO

II.2.6. Essais mécaniques

Les essais mécaniques ont été effectués par COUSIN BIOTECH sur un appareil LRX Plus (LLOYD Instruments). Les tests réalisés visent principalement à déterminer l'allongement à la rupture. Classiquement, en chirurgie viscérale, on considère que la contrainte subie par un implant sur un défaut de diamètre inférieur à un centimètre est de 16 N/cm contre 32 N/cm pour un défaut plus important [197]. On applique donc une force d'élongation de 16 N/cm aux échantillons étudiés découpés sous forme de bandelettes de 5 x 20 cm. Ceux-ci seront validés si leur valeur d'allongement à la rupture est supérieure à 11%. L'implant en PET commercialisé par COUSIN BIOTECH présente un allongement à la rupture de $27\% \pm 3\%$ dans le sens tresse et $47 \pm 4\%$ dans le sens droit.

En revanche, pour le PLLA, il n'existe pas de valeurs références, ce matériau n'étant jamais employé seul, mais toujours tissé ou tricoté avec une fibre en matériau non-résorbable le PP.

II.2.7. Résonance magnétique nucléaire du solide

La caractérisation par RMN ^{13}C du solide du PET fonctionnalisé a été effectuée sur un spectromètre Advance Bruker 400 MHz avec une séquence de type CP-MAS (Cross Polarisation Magic Angle Spinning). Les échantillons ont été placés dans une sonde rotor de 4 mm, soumis à une fréquence de rotation de 10 kHz sous un angle de $54,74^\circ$, dit « angle magique ». En effet, avec cet angle, les interactions dipolaires ainsi que l'anisotropie des déplacements chimiques sont nulles. On obtient un spectre semblable à un spectre du carbone en milieu liquide.

Cette technique a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de polyCD sur le PET-CD par comparaison entre les spectres du support vierge et fonctionnalisé.

II.3. Etudes des interactions ALs/CDs et ALs/polymère de CDs

II.3.1. Résonance Magnétique Nucléaire

Les analyses par RMN ont été effectuées sur un appareil AVANCE BRUKER 400 Mhz (soit 9,4 T) du centre commun de mesure RMN de l'Université Lille 1. Les spectres ^1H de la β -CD, de son dérivé hydroxypropyl HP β CD, du polymère de cette dernière ainsi que de la ropivacaine, ont été établis. Des mélanges équimolaires de CDs (5 mmol) et de ropivacaine (5 mmol) ont été

préparés et laissés toute une nuit sous agitation à l'ambiante, puis analysés par RMN du proton 1D.

Afin d'affiner cette étude, une technique particulière dérivée de cette dernière a été employée, la 1D sel-NOE [198] (pour NOESY sélective), également appelée DPFGE-NOE (Double Pulsed Field Gradient Spin-Echo-NOE). Cette séquence propose d'irradier préférentiellement un proton (ou un groupe de proton) cible afin de mettre en évidence ses interactions dipolaires qui apparaissent par un signal négatif sur un spectre 1D du soluté étudié. Cette technique permet de faire apparaître les proximités spatiales entre les protons comme par exemple dans le cas d'un complexe d'affinités faibles entre une molécule invitée et une cyclodextrine comme c'est le cas ici.

II.3.2. Electrophorèse-capillaire

Cette technique séparative est basée sur la migration des espèces porteuses d'une charge électrique globale, en solution, sous l'effet d'un champ électrique dans un tube capillaire (**Figure 30**).

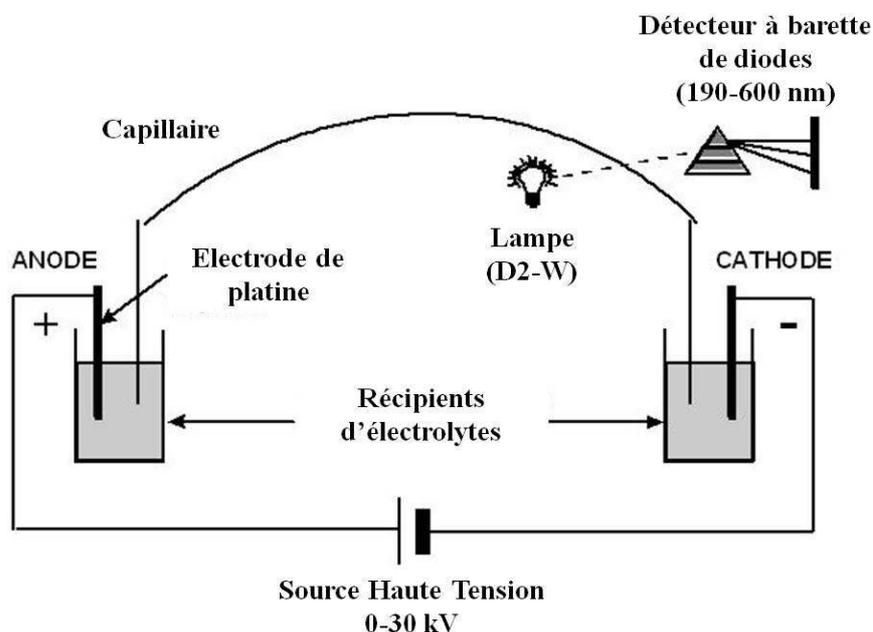


Figure 30 : Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire

Elle est principalement employée dans la séparation chirale, d'isomères optiques ou de structure mais également en biochimie dans la séparation de protéines. Elle permet de détecter d'autres types de composés beaucoup moins importants en termes de tailles comme les anesthésiques locaux [199] ou encore intervient dans les études de complexes d'inclusion avec les CDs [200].

Le soluté est ici transporté par capillarité entre deux solutions d'électrolytes. Selon sa taille et sa charge globale, celui-ci est soumis à 2 types de déplacement :

- Le flux électroosmotique (μ_{feo}), qui est commun à tous les solutés en présence et qui est défini par l'écoulement de l'électrolyte
- Le flux électrophorétique (μ_e), qui est propre à chaque soluté et qui est en rapport avec la taille et la charge globale de ce dernier.

La somme de ces deux facteurs donne la mobilité apparente (μ_{app}) qui est défini par la relation :

$$\mu_{app} = \mu_{feo} + \mu_e = \frac{l \cdot L}{t \cdot U}$$

Avec l, la longueur du capillaire jusqu'au détecteur, L, la longueur totale du capillaire, t, le temps de migration (en minutes) du soluté et U, la tension appliquée (en volt).

Ainsi, un soluté chargé positivement, migrera plus aisément vers la cathode (-) et sera donc détecté avec des temps de migration plus court qu'une molécule chargée négativement ou neutre (**Figure 31**).

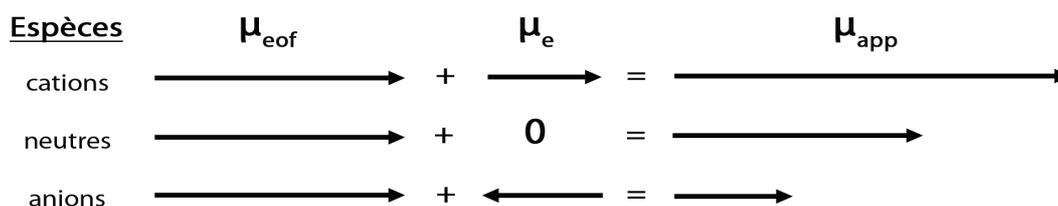


Figure 31 : Représentation de la mobilité apparente en fonction de la charge de la molécule étudiée

Dans ce projet, cette technique a été employée afin de mettre en évidence les interactions entre les ALs et le polymère de CDs. Ce dernier est un polyanion composé d'un grand nombre de charges négatives qui ont pour conséquence, par un flux électroosmotique, de ralentir le temps de migration. La ropivacaïne en revanche à un temps de migration plus court de par sa charge cationique. Dès lors, s'il y a interactions entre les deux composés, le temps de migration de la ropivacaïne s'en trouvera allonger et donc sa détection sera retardée.

Il est d'ailleurs possible de déterminer la constante apparente d'association par cette technique, en supposant que la stœchiométrie des complexes soit de type 1:1, par le modèle de Wren et Rowe [201] (dérivé du modèle de Benesi et Hildebrand).

Soit un composé R en présence d'un sélecteur chiral C. L'équilibre de complexation du composé R avec le sélecteur chiral C est caractérisé par la constante K suivante :



Lors de la séparation, la mobilité du soluté R en présence du sélecteur chiral C est fonction des fractions des mobilités du soluté sous forme libre (μ_l) et complexée (μ_c), pondérées par la fraction qui se trouvent sous ces deux formes.

$$\mu_i = \frac{[R]}{[R] + [RC]} \mu_l + \frac{[RC]}{[R] + [RC]} \mu_c$$

Par combinaison de ces 2 équations, la mobilité de l'espèce peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\mu_i = \frac{\mu_l + \mu_c K [C]}{1 + K [C]} \text{ soit } (\mu_i - \mu_l) = \frac{(\mu_c - \mu_l) K [C]}{1 + K [C]}$$

La détermination expérimentale de μ_c étant fastidieuse, voire impossible, par réarrangement mathématique de cette équation (linéarisation), les expressions suivantes sont alors obtenues. Elles sont respectivement appelées les formes double-réciproque, y-réciproque et x-réciproque. Les paramètres μ_i , μ_l et $[C]$ étant connus, l'étude des variations des fonctions (**Tableau 7**), doit conduire à l'obtention de droites (si le modèle est vérifié) dont l'équation permet de déterminer les valeurs de la constante de complexation K et de la mobilité μ_c .

Tableau 7 : Etude de variations des fonctions

Equation	Graphique	K	μ_c
<u>y-réciproque :</u> $\frac{[C]}{(\mu_i - \mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)} \times [C] + \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)K}$	$\frac{[C]}{(\mu_i - \mu_l)} = f([C])$	$\frac{\text{pente}}{\text{ordonnée}}$	$\frac{1}{\text{pente}} + \mu_l$
<u>Double-réciproque:</u> $\frac{1}{(\mu_i - \mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)K} \times \frac{1}{[C]} + \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)}$	$\frac{1}{(\mu_i - \mu_l)} = f\left(\frac{1}{[C]}\right)$	$\frac{\text{ordonnée}}{\text{pente}}$	$\frac{1}{\text{ordonnée}} + \mu_l$
<u>x-réciproque :</u> $\frac{(\mu_i - \mu_l)}{[C]} = -K(\mu_i - \mu_l) + K(\mu_c - \mu_l)$	$\frac{(\mu_i - \mu_l)}{[C]} = f((\mu_i - \mu_l))$	- pente	$\frac{\text{ordonnée}}{K} + \mu_l$

Expérimentalement, on étudie donc l'évolution de la mobilité en fonction de la concentration en sélecteur chiral.

Les analyses ont été effectuées sur un appareil de type Beckman P/ACE MDQ du laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Lille. Le capillaire employé a une longueur de 30,2 cm (20 cm jusqu'au détecteur) pour un diamètre de 50 μm et est maintenu à 25°C. Afin de supprimer le flux électroosmotique et d'éviter l'adsorption du polymère de cyclodextrines sur la paroi du capillaire, elles ont été préalablement enrobées d'hydroxypropylcellulose selon la méthode décrite par Girardot [202]. La solution d'électrolytes est un tampon phosphate 50 mM à pH 7. La détection est effectuée par un détecteur UV à barrette de diodes. Enfin, la tension appliquée est de 15 kV.

II.4. Etudes d'adsorption/libération des principes actifs par les supports vierges et fonctionnalisés

Comme décrit précédemment, les études d'adsorption et de libération de principes actifs sur les supports fonctionnalisés, ont été effectuées à partir de pastilles de diamètre 11 mm mises en présence des différentes molécules testées en solution.

II.4.1. Techniques analytiques

II.4.1.a. Spectrophotométrie UV-Visible

La quantification par spectrophotométrie UV-visible a été effectuée sur Shimadzu UV-1800 et Thermo-Electron Nicolet Evolution 300.

Le Bleu d'o-Toluidine présente un pic d'absorbance à 654 nm dans l'acide acétique 50%.

De même, la Ciprofloxacine est détectée à 280 nm dans le méthanol et à 275 nm dans la soude.

II.4.1.b. Chromatographie Liquide Haute Performance

Les anesthésiques locaux lidocaïne et ropivacaïne ont été quantifiés par HPLC selon la méthode récemment décrite par Qin [203]. L'appareil est un modèle Varian ProStar. La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/tampon phosphate pH=7,4. La colonne utilisée est une colonne à phase inverse thermostatée à 40°C. La détection est effectuée par spectrométrie UV à 210 nm.

Les temps de rétention de la lidocaïne et de la ropivacaïne sont respectivement de 4,5 et 5,5 minutes.

La loi de BEER LAMBERT est respectée à 210 nm pour la lidocaïne pour des concentrations comprises entre 7,5 mg/L < [C] < 1 g/L dans l'eau avec $\epsilon = 0,9074$ et entre 0,6 mg/L < [C] < 600 mg/L dans la soude 0,05N avec $\epsilon = 0,904$.

La loi de BEER LAMBERT est respectée à 210 nm pour la ropivacaïne pour des concentrations comprises entre 5 mg/L < [C] < 2 g/L avec $\epsilon = 0,7297$ dans l'eau et entre 4 mg/L < [C] < 34 mg/L dans la soude 0,05N avec $\epsilon = 0,8453$.

II.4.2. Cinétiques d'adsorption de principe actif

Les échantillons (n=3) sont imprégnés dans 20 mL de solution de principe actif de concentration fixe pendant une durée déterminée, comprise entre 5 minutes et 24 heures. Après un rinçage d'une minute dans 10 mL d'eau distillée, les échantillons sont placés dans 10 mL de soude à 0,05N pendant 4h afin d'hydrolyser le polyCD et de libérer la totalité du principe actif. Celui-ci est dosé par spectrophotométrie UV ou par HPLC.

II.4.3. Cinétiques de libération de principe actif

Les tissus du corps humain sont parcourus par des fluides biologiques qui se renouvellent en permanence. Ainsi dans nos études de libération, nous avons tenu compte de ce paramètre en imposant un flux semi-continu (batch) ou continu (système USP4) dans les cellules.

Ce renouvellement des fluides (système dynamique) évite le phénomène de saturation et permet de travailler dans des conditions hors-équilibre. Ceci permet d'atteindre un degré de libération total du principe actif par l'échantillon en fin de manipulation.

II.4.3.a. Système « batch » semi-dynamique

Les échantillons (n=3) sont imprégnés dans 20 mL de solution de principe actif de concentration fixe pendant 20 minutes et 24 heures. Après un rinçage individuel de l'excédent de solution emportée 1 minute dans 5 mL d'eau distillée, les échantillons sont placés dans 5 mL du milieu de libération (eau distillée, tampon phosphate PBS pH = 7,4). Le principe actif est dosé par spectrophotométrie UV-visible ou par HPLC. Le premier jour, les mesures sont effectuées 30 minutes puis toutes les heures jusqu'à 6 h après le début de la libération. La quantité de médicament libérée est ensuite déterminée toutes les 24 h jusqu'à l'apparition d'un plateau.

Afin d'éviter la saturation en principe actif du milieu, ce qui pourrait gêner la libération, celui-ci est partiellement (10%) ou intégralement (100%) remplacé par du milieu « frais » à chaque mesure. Ces deux variantes permettent aussi d'étudier l'influence du renouvellement sur les cinétiques de libération.

II.4.3.b. Système dynamique USP4 dynamique

Les cinétiques de libération des principes actifs et plus particulièrement de la ciprofloxacine ont également été déterminées par la méthode du système dynamique développé dans la pharmacopée USP4. Celle-ci propose d'utiliser une cellule dans laquelle est placé l'échantillon à étudier dont le milieu est constamment renouvelé à débit constant de 1 mL/min, par une pompe péristaltique (système dynamique) (**Figure 32**). Le milieu est collecté et régulièrement (toutes les 10 minutes).

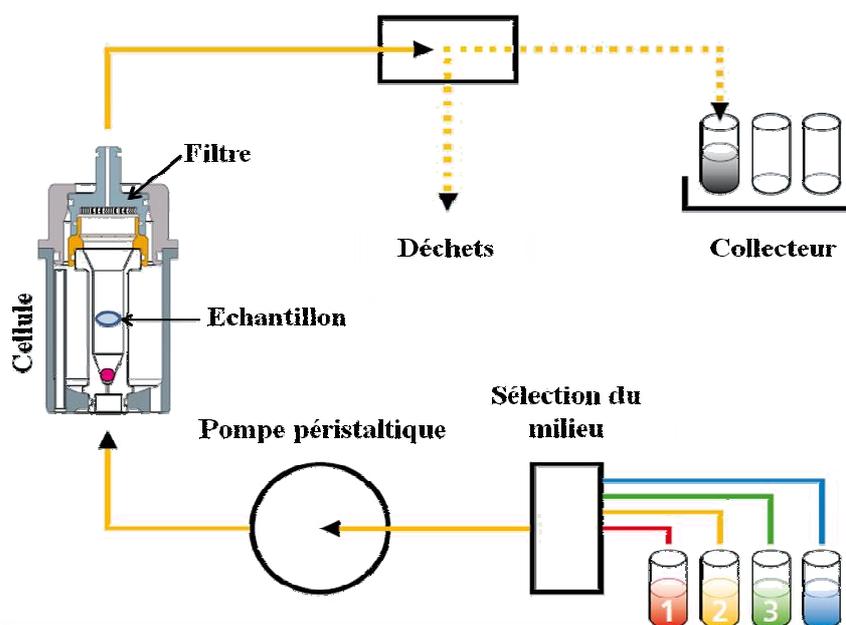


Figure 32 : Schéma de principe du système USP4

Les cinétiques de libération par le système USP4 ont été réalisées sur un appareil SOTAX de l'unité INSERM U1008 de l'université de Lille 2.

Les échantillons (n=3) sont imprégnés dans 20 mL de solution de principe actif de concentration fixe pendant 20 minutes et 24 heures. Après un rinçage individuel de l'excédent de solution emportée 1 minute dans 5 mL d'eau distillée, les pastilles activées sont directement placées dans les cellules de libération. Le débit a été préalablement réglé à 1 mL/min. Toutes les 10 minutes, les tubes de collecte sont remplacés, pesés afin d'évaluer le volume exact. A la fin de l'expérience, les échantillons sont récupérés et placés dans la soude à 0,05N (10 mL) afin d'hydrolyser le polymère de cyclodextrines et de libérer le principe actif restant (**Figure 33**).

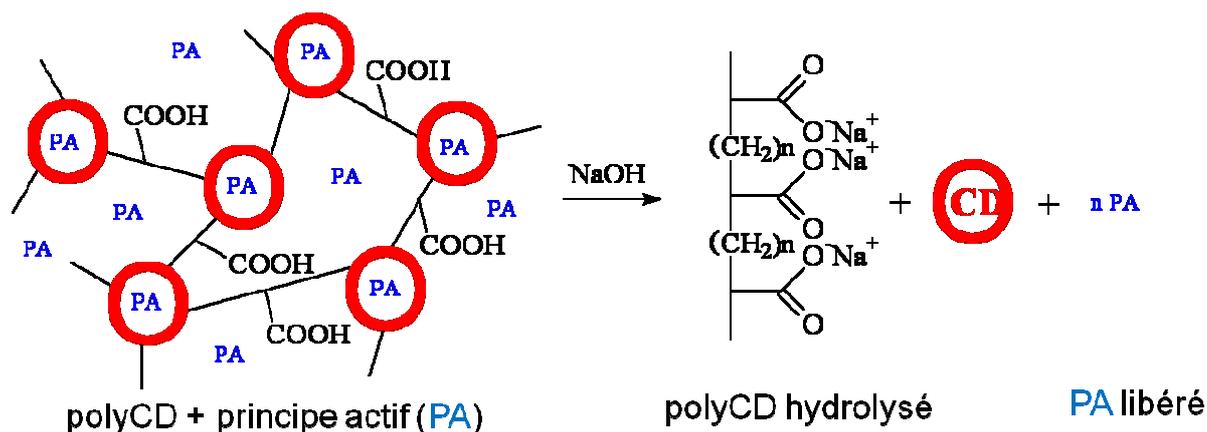


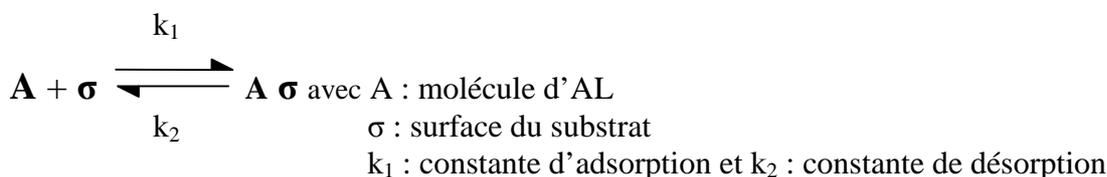
Figure 33 : Principe de la désorption par hydrolyse du polymère

Les profils cinétiques obtenus par cette technique sont beaucoup plus rapides que dans un système « batch » mais ils traduisent mieux les conditions réelles après l'implantation.

II.4.4. Isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption permettent d'étudier les quantités d'anesthésiques locaux (lidocaïne ou ropivacaïne) adsorbées par les supports fonctionnalisés en fonction de la concentration de la solution d'imprégnation. Pour cela, des échantillons (n=3) sont imprégnés dans une 18 mL de solution d'ALs de concentration variable pendant 24 heures à 20°C dans un agitateur thermostaté. Après un rinçage individuel de l'excédent de solution emportée 1 minute dans 10 mL d'eau distillée, les échantillons sont placés dans 10 mL de soude à 0,05N pendant 4h. Le principe actif est dosé par HPLC. Les valeurs ainsi obtenues sont traitées mathématiquement suivant deux modèles d'adsorption, Langmuir et Freundlich.

L'adsorption peut être considérée comme une réaction d'équilibre de type :



A partir de ce postulat, plusieurs modèles d'adsorption ont été proposés pour décrire les mécanismes d'adsorption :

- L'isotherme de Langmuir qui correspond à l'adsorption d'une molécule d'AL sur un site d'adsorption, soit des interactions spécifiques sur un seul type de site et sans interactions entre molécules adsorbées. On aboutit donc à la formation d'une monocouche ().

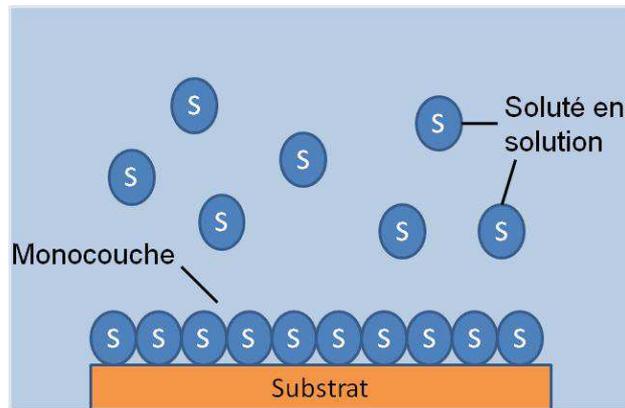


Figure 34 : Illustration de l'adsorption selon le modèle de Langmuir

Ce mécanisme est décrit par la relation :

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

Avec :

- q_e = quantité de molécule active d'adsorbée à l'équilibre par gramme de substrat (mg/g)
- C_e = concentration en molécule active à l'équilibre de la solution d'imprégnation (g/L)
- q_m = quantité d'adsorption à saturation du substrat (caractéristique de la formation d'une monocouche) (mg/g)
- b : constante liée à l'énergie d'adsorption (ml/ μ g)
- $K_L = q_m \cdot b$: constante d'équilibre de Langmuir (ml/mg) liée à l'enthalpie d'adsorption

Cette relation linéarisée conduit à l'équation : $\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} \cdot b + \frac{C_e}{q_m}$

A partir de la droite obtenue et de son équation, il est possible de remonter à la quantité maximale adsorbée à saturation q_m , inverse de la pente.

- L'isotherme de Freundlich qui caractérise l'adsorption d'une molécule sur plusieurs sites d'adsorption d'énergies différentes et la possibilité d'interactions entre les molécules adsorbées et donc la formation d'un système multicouche.

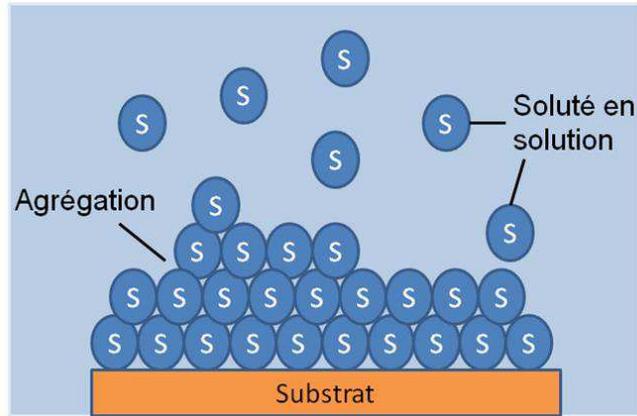


Figure 35 : Illustration du mécanisme d'adsorption selon Freundlich

Ce mécanisme est décrit par la relation :

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

Avec :

- q_e = quantité de molécule active d'adsorbée à l'équilibre par gramme de substrat (mg/g)
- C_e = concentration en molécule active à l'équilibre de la solution d'imprégnation (g/L)
- K_f = constante d'équilibre de Freundlich liée à la capacité d'adsorption relative
- $1/n$ = constante indiquant l'intensité de la réaction

Cette relation linéarisée conduit à l'équation : $\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e$ $\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e$

Cette méthode permettra d'établir par traitement mathématique, les modèles d'adsorption des molécules actives sur les sites d'adsorption du polyCD. Ceux-ci correspondent aux fonctions carboxylates ou aux cavités des cyclodextrines.

II.5. Evaluation biologique

L'évaluation biologique a été réalisée en collaboration avec l'unité INSERM U1008, de l'université Lille 2, partenaire de ce projet.

II.5.1. Les cellules

L'évaluation biologique des prothèses a nécessité l'utilisation de cellules NIH3T3 qui sont des fibroblastes embryonnaires de souris (**Figure 36**). Il s'agit d'une lignée cellulaire immortalisée. Les fibroblastes sont des cellules présentes dans les tissus conjonctifs qui entourent et protègent les organes. Ces cellules seront en contact direct des implants viscéraux après leur implantation.



Figure 36 : Cellules fibroblastiques NIH3T3 observées au microscope optique

II.5.2. Vitalité cellulaire

Ce test consiste à quantifier la vitalité des cellules ayant proliférées sur le support par dosage fluorométrique. Le réactif Bleu d'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 Bleu Alamar dans le milieu de culture, cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes et l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à l'activité cellulaire [204].

Des pastilles (\varnothing 15 mm) découpées dans des échantillons stérilisés vierges et fonctionnalisés sont disposées dans des boîtes 24 puits (Costar, **Figure 37**). Les supports PLLA ayant tendance à « vriller », ils sont maintenus au fond par un anneau en caoutchouc (Viton[®]). Du milieu de culture (1 mL) contenant 10 000 cellules NIH3T3 est ajouté à des puits contenant les pastilles ainsi qu'à des puits vides servant de témoins. Les boîtes sont ensuite mises en incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours.

A la fin de cette période d'incubation, le milieu de chaque puits est remplacé par une solution à 10% de Bleu Alamar dans le milieu de culture à 5%. Après une seconde incubation à 37°C

pendant de 3 heures, 200 μ L sont prélevés dans chaque puits, répartis dans une boîte de 96 puits. La fluorescence est alors mesurée à 560 nm au moyen d'un spectrofluorimètre Twinkle LB970 (Berthold). Le taux de vitalité relatif est exprimé en « pourcentage \pm écart type » de l'échantillon vierge.

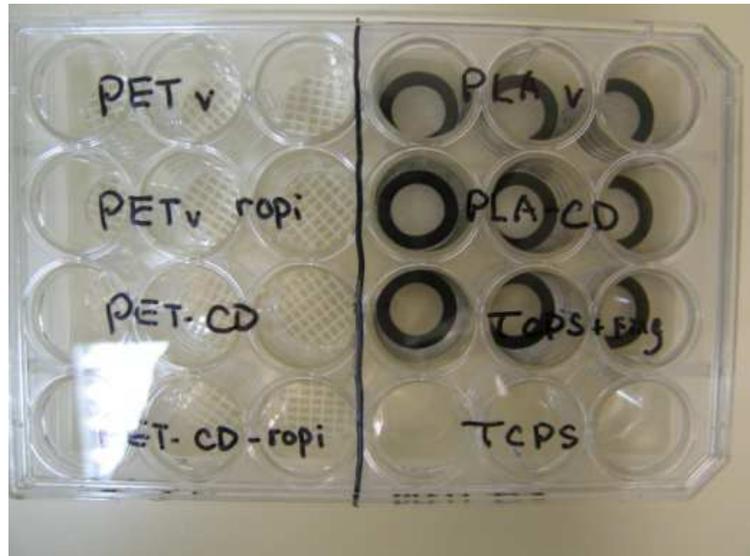


Figure 37 : Boîte de prolifération 24 puits Costar® avec échantillons de PET (gauche) et de PLLA + anneau caoutchouc (droite)

Un second protocole a été développé à partir de cette méthode afin de mesurer la vitalité cellulaire de cellules fibroblastiques NIH3T3 après dépôt d'un échantillon sur le milieu contenant les cellules. Les fibroblastes ont été déposés dans une boîte 24 puits à une densité de 150 000 cellules/puits (1 mL/puits) pendant 24 heures à 37°C sous atmosphère CO₂ (5%) et humidité relative (100%). Passé ce délai, les pastilles (\varnothing 15 mm) stérilisées, vierges et fonctionnalisés ont été imprégnées ou non dans une solution contenant le principe actif pendant une durée définie, puis déposés délicatement sur le tapis cellulaire. L'objectif étant ici de mimer au mieux l'implantation d'un textile fonctionnalisé (et éventuellement chargé de principe actif). Après 2 jours d'incubation, les cellules vivantes sont comptabilisées par la méthode du bleu d'Alamar, énoncée ci-dessus.

II.5.3. Efficacité antibactérienne - Test de Kirby-Bauer (diffusion sur gélose)

La méthode employée afin de tester l'activité antibactérienne des supports fonctionnalisés ou non et chargé d'un principe actif antibactérien est adaptée de celle décrite par Kirby-Bauer [184].

Cette étude bactériologique permet de vérifier la persistance de l'activité antibactérienne d'un implant préalablement imprégné dans la ciprofloxacine qui a été mise en présence de plasma sanguin pendant une certaine durée. Au cours du temps, le principe actif est progressivement libéré par la prothèse textile dans le plasma humain et celle-ci perd son efficacité. Le but est donc ici, d'évaluer l'apport de la fonctionnalisation dans les propriétés antibactériennes de l'implant dans un milieu proche de l'environnement corporel.

Préalablement, les échantillons (n=3) sont imprégnés dans 20 mL de solution injectable de CFX (2 g/L, Panpharma) pendant 20 minutes, durée maximale acceptable lors d'une intervention chirurgicale. Après un rinçage d'une minute dans 10 mL d'eau distillée, les échantillons sont placés dans 1 mL de plasma humain (plasma issu de sang total humain, Etablissement Français du Sang), dans lequel la CFX sera progressivement libérée.

A intervalles de temps déterminés compris entre 2 et 72 h, des échantillons (n=3) sont prélevés puis déposés sur une gélose de type Mueller Hinton Agard (MHA) préalablementensemencée par une culture bactérienne. Après 24 heures d'incubation à 37°C, un halo d'inhibition apparaît autour de la pastille. Celui-ci correspond à une zone de non-prolifération bactérienne, due à la présence d'antibiotiques sur l'échantillon (**Figure 38**).

A chaque retrait d'échantillons, le milieu de libération (plasma) de tous les puits est renouvelé, afin d'éviter la saturation en antibiotique.

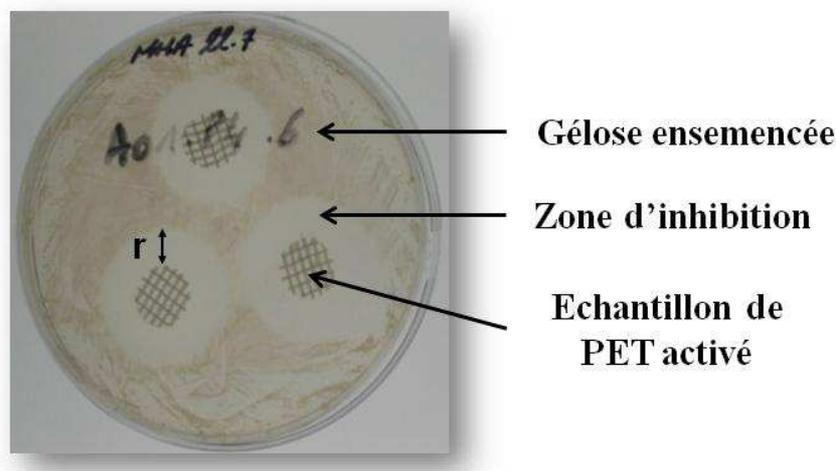


Figure 38 : Exemple de boîte de Pétri (9 cm) avec échantillons de PET chargé d'antibiotiques après 24h d'incubation (*E. coli*)

Cette évaluation microbiologique a été réalisée en étudiant l'activité des prothèses textiles sur deux bactéries figurant parmi les causes d'infections les plus fréquentes (**Figure 39**):

- un coque à Gram positif, *Staphylococcus aureus* (souche CIP224) que l'on retrouve fréquemment dans le cas d'infections nosocomiales

- un bacille à Gram négatif, *Escherichia coli* (souche L70A4) présent dans la flore intestinale et qui peut survenir lors de complications comme l'étranglement herniaire

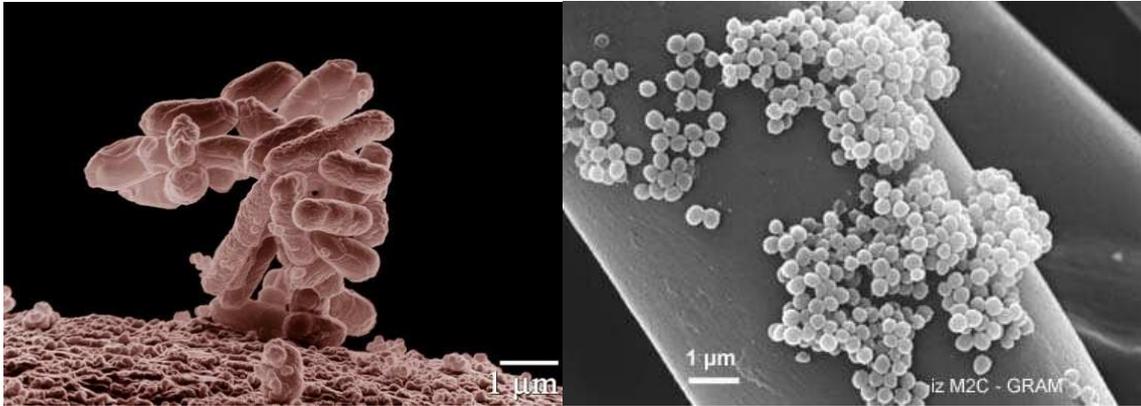


Figure 39 : Clichés MEB d'*Escherichia coli* (gauche) et *Staphylococcus aureus* (droite) [205, 206]

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

La mise au point d'un matériel prothétique est un compromis constant entre les contraintes intrinsèques au domaine des biomatériaux (flexibilité par exemple) et les performances du produit final.

La première partie des travaux a consisté à définir les paramètres d'ennoblissement textile par le polymère de cyclodextrines et à caractériser les implants ainsi fonctionnalisés (ATG, DSC, MEB,...) ainsi qu'à évaluer leur cytocompatibilité.

Dans un second temps, l'affinité entre un antibiotique sélectionné pour son large spectre d'activité antibactérienne, la ciprofloxacine et les textiles fonctionnalisés sera évaluée par des cinétiques d'adsorption/libération dans différents milieux (eau ultrapure, tampon phosphate) et sous différentes dynamique de milieu. L'efficacité antibactérienne des supports activés sera déterminée sur deux souches couramment observées lors d'infections en chirurgie viscérale, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, respectivement bactéries à Gram négative et Gram positive, et ce, après un temps de séjour croissant dans le plasma humain.

Une autre finalité de ce projet est de développer un implant textile capable de libérer *in situ* des anesthésiques locaux afin de lutter contre la douleur post-opératoire et à plus long terme, la douleur chronique. Les interactions de l'un de ces principes actifs, la ropivacaïne, avec le polymère de cyclodextrines seront tout d'abord étudiées sous une approche fondamentale par spectroscopie RMN et électrophorèse capillaire. Ensuite, les cinétiques et les isothermes d'adsorption de cette molécule ainsi qu'une molécule analogue, la lidocaïne, seront établis afin d'étudier leur comportement vis-à-vis des implants fonctionnalisés.

Les perspectives à moyen et long terme seront évoquées après la synthèse et la discussion des résultats.

I. Fonctionnalisation et caractérisations

La fonctionnalisation d'un textile par les cyclodextrines telle qu'elle a été décrite par Martel et *al.*, repose sur 3 paramètres principaux influant directement sur la quantité de polyCD enrobée autour des fibres textiles: la température et la durée de thermofixation ainsi que la concentration des réactifs (cyclodextrines/acide polycarboxylique) dans le bain d'imprégnation [7].

Le procédé proposé permet la fonctionnalisation d'un grand nombre de supports textile mais nécessite néanmoins une étape d'optimisation de ces 3 paramètres en fonction de la nature de ce dernier tant dans sa composition (PET, PP, PLA,...) que dans sa forme (tissé, non tissé, tulle,...), ici le PET et le PLLA.

1.1. Caractérisations des supports vierges

Dans cette étude deux textiles vont être étudiés : un tulle en polyéthylène téréphtalate et un tricot en acide poly-L- lactique.

1.1.1. Taux d'emport

La première étape du procédé de fonctionnalisation est le dépôt des réactifs (CD+PCA) sur le textile. Pour ce faire, ces derniers sont solubilisés dans l'eau, et la solution obtenue est imprégnée sur le textile, puis l'eau est évaporée avant l'étape de thermofixation où la réticulation se produit. Le taux de polymère sur le support dépend donc de la quantité de solution qu'il a adsorbée.

Ce paramètre est appelé taux d'emport, quantité de solution maximale adsorbable par le textile.

$$T_{\text{emport}} = \frac{m_{\text{humide}} - m_{\text{sec}}}{m_{\text{sec}}} \times 100$$

L'imprégnation a été effectuée par foulardage, étape qui requiert un certain nombre de passages afin d'imprégner totalement le textile, généralement hydrophobe.

Le taux d'emport correspond donc au gain de masse du textile imprégné dans la solution. Il est déterminé par pesée après chaque passage au foulard.

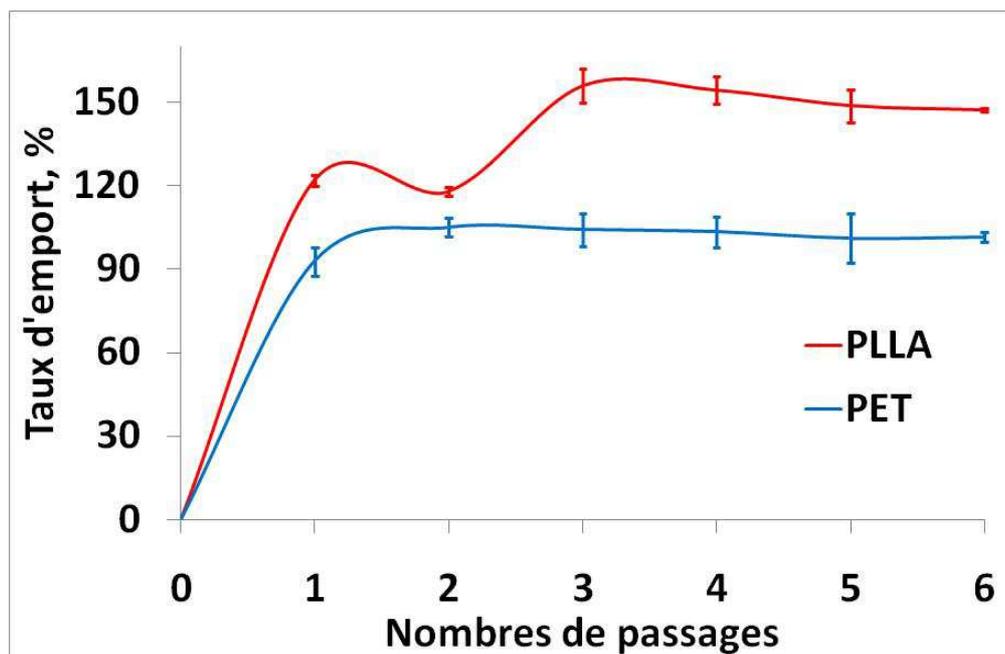


Figure 40 : Taux d'empport du support PET et du PLLA dans l'eau en fonction du nombre de passages – 2 m/min, 2 bars

Dans le cas du PET, le taux d'empport moyen est de $103\% \pm 5\%$ (Figure 40). Le PLLA présente la capacité d'adsorber $151\% \pm 4\%$ de sa masse en solution. De par son hydrophilie plus importante, l'imprégnation du PLLA engendre un taux d'empport plus important. L'écart-type est élevé du fait de la structure de tricot qui engendre l'apparition aléatoire de gouttelettes d'eau piégées dans ses mailles. Le PET est saturé après 2 passages dans le foulard, 3 passages sont nécessaires pour le PLLA. Néanmoins, et afin d'obtenir une répartition la plus homogène possible dans les 4 directions, il a été convenu que le textile doit subir 4 passages en prenant soin de pivoter le support de 90° à chaque passage.

En théorie, on pourrait atteindre des taux de fonctionnalisation plus élevés sur le PLLA que sur le PET. En effet, ce dernier est plus hydrophobe que le PLLA, ce qui empêche la bonne adsorption de la solution. De plus, les tricots employés ici possèdent des grammages différents de respectivement 270 g/m^2 pour le PLLA et 100 g/m^2 pour le PET, ce qui influence également l'adsorption, un tissu plus « lourd » aura un taux d'empport plus important, ce qui est confirmé ici.

I.1.2. Analyse thermogravimétrique des supports vierges

L'analyse thermogravimétrique des supports vierges permet mesurer la température à laquelle commence leur dégradation thermique. Cette donnée permettra éventuellement de fixer les

températures limites pour le traitement thermique de la fonctionnalisation, afin de ne pas endommager le textile.

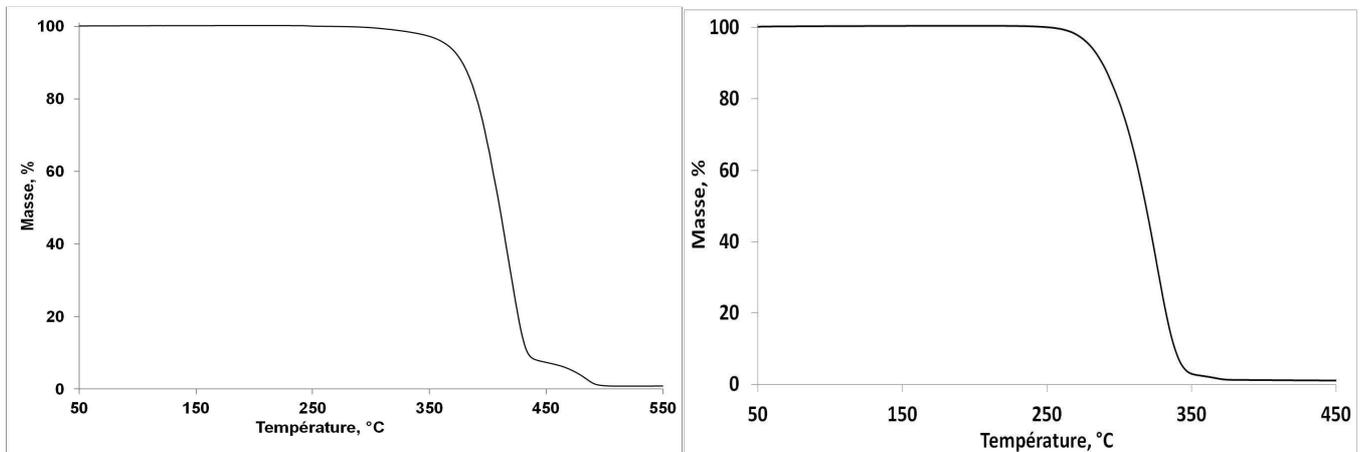


Figure 41 : Thermogramme du PET et du PLLA

Le thermogramme du PET vierge affiche une dégradation thermique qui débute vers 310°C (**Figure 41**). Cette valeur est très nettement supérieure aux plus hautes températures de fonctionnalisation (170°C – 180°C). Le PET ne sera donc pas dégradé thermiquement lors de la thermofixation.

En revanche, le PLLA commence à se dégrader à partir de 220°C, ce qui traduit une moins bonne stabilité à la chaleur par rapport au PET (**Figure 41**). Cette température n'est pas très éloignée de la plage de température utilisée couramment dans la fonctionnalisation. On peut donc prévoir que ceci constituera une contrainte à prendre en compte

Au-delà de 500°C pour le PET et de 400°C pour le PLLA, on observe une absence de résidus comme les produits d'ensimage employés souvent lors du tissage. Cette étude a également permis d'évaluer les températures à ne pas dépasser lors de l'analyse enthalpique différentielle afin de ne pas atteindre la dégradation du support, soit 300°C dans le cas du PET et 200°C pour le PLLA.

I.1.3. Analyse enthalpique différentielle

L'analyse DSC du PET vierge n'a pas permis de détecter de transition vitreuse, ce qui signifie que le matériau est très majoritairement cristallin (**Figure 42**). De plus, aucune température de cristallisation n'est visible lors de la montée en températures. Le matériau présente donc une

crystallinité maximale, ce qui est caractéristique d'un filament étiré en sortie de filière. De plus, cette étude a mis en évidence la présence de deux pics de fusion intervenant respectivement à 255°C et 260°C ($T^{\circ}_{\text{onset}} = 250,4^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_f = 56,21 \text{ J/g}$). Il semblerait donc que le matériau soit composé de deux types de cristallites.

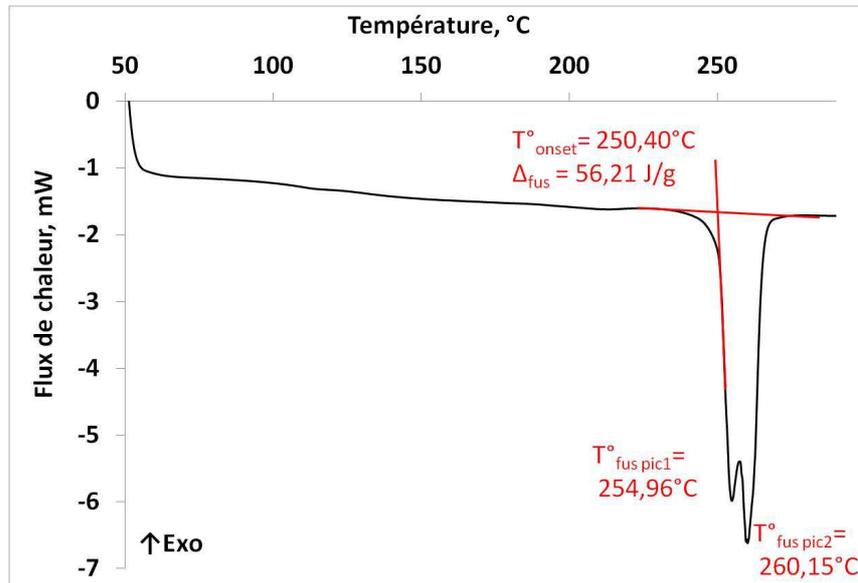


Figure 42 : Analyse enthalpique différentielle du PET vierge

Il est possible de déterminer le taux de cristallinité χ_c^{PET} du matériau par la relation : $\chi_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{f0}}$

Avec ΔH_f , l'enthalpie de fusion relevée et $\Delta H_{f0}^{\text{PET}}$, l'enthalpie de fusion théorique du PET 100% cristallin, soit 138 J/g [207]. Le taux de cristallinité du PET étudié est donc de $\chi_c^{\text{PET}} = 40,7\%$.

L'observation par MEB du tulle PET avait révélé la présence de deux types de sections de structures différentes, l'une droite, l'autre tressée.

L'analyse DSC de ces deux parties a été effectuée et comparée à celle du tricot (Figure 43).

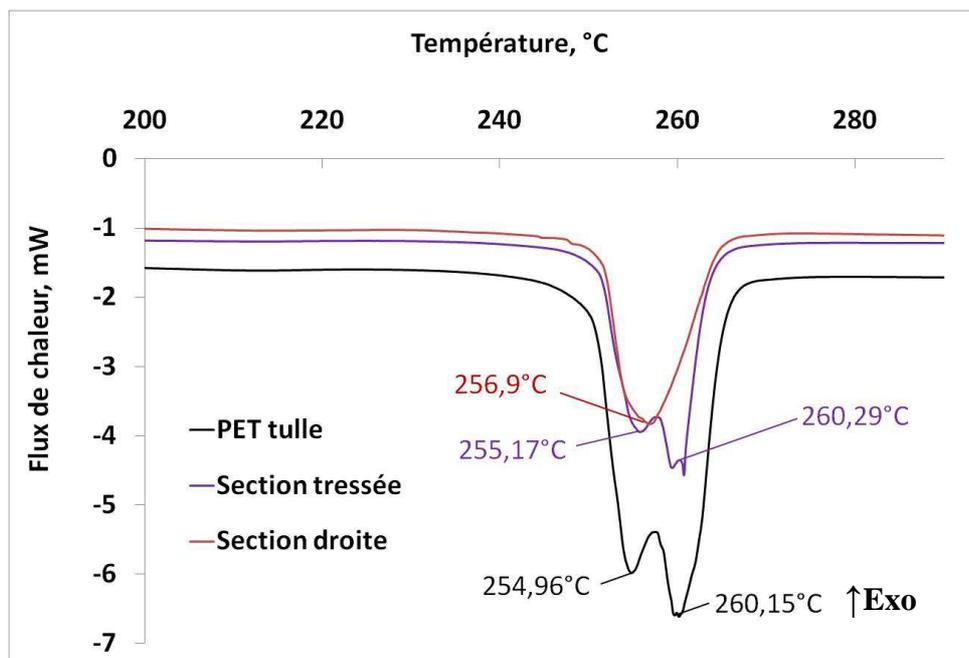


Figure 43 : Grossissement des pics de fusion des thermogrammes DSC du PET vierge, de sa section tressée et de sa section droite

La fusion de la section droite induit un pic endothermique caractéristique vers 256,9°C. La partie tressée présente deux pics de fusion, avec néanmoins deux pics de fusion à 255,17°C et 260,29°C. Il semblerait donc que lors du tricotage de l'implant, les sections de fils tressés ne présentent pas les mêmes caractéristiques de cristallinité que les sections droites. Ceci provient probablement de la contrainte que subit le fil dans les sections tressées. Qui conduit à une modification de la structure des cristallites dont le signal se dédouble et fait apparaître un second pic de fusion à 260°C.

Le PLLA vierge a également été analysé par DSC (**Figure 44**). Aucune température de transition vitreuse n'est observable. En revanche, un pic de fusion apparaît vers 160°C ($T_{\text{onset}} = 157,14^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 49,38 \text{ J/g}$). Dès lors, la thermofixation lors de la fonctionnalisation ne devra pas dépasser des températures supérieures à 160°C.

Comme dans le cas du PET, il a été possible de déterminer le taux de cristallinité du PLLA étudié (χ_c^{PLLA} ,) partir de l'enthalpie de fusion théorique du PLLA 100% cristallin $\Delta H_f^{\text{PLLA}} = 93,6 \text{ J/g}$ [208]. On obtient donc un taux de cristallinité pour le textile PLLA considéré de $\chi_c^{\text{PLLA}} = 52,8\%$.

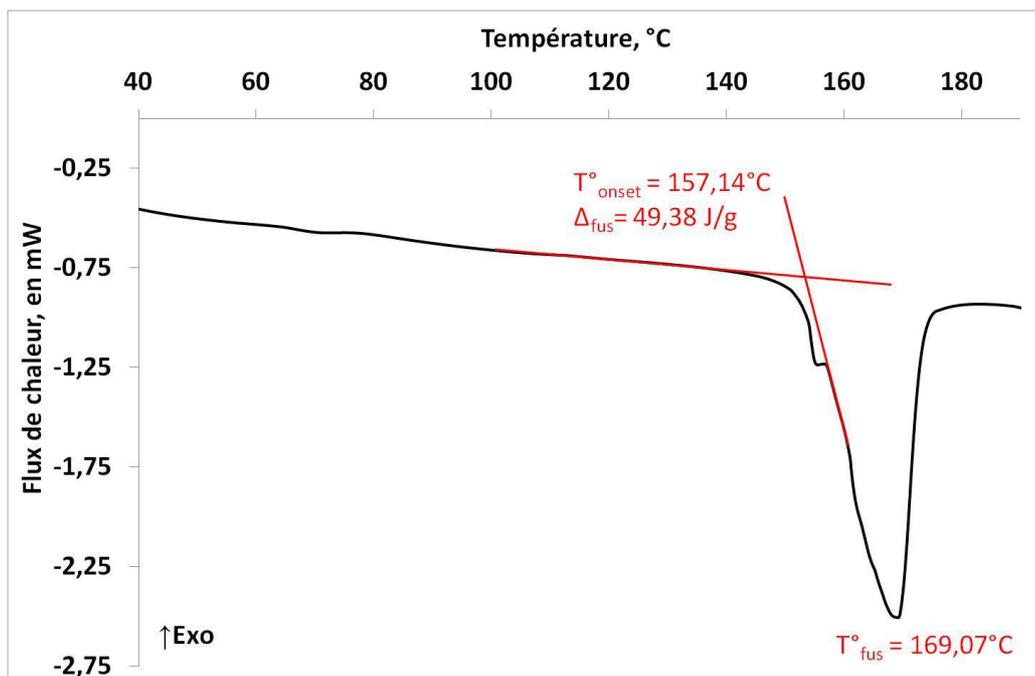


Figure 44 : Analyse enthalpique différentielle du PLLA vierge

Cette étude montre que le procédé de fonctionnalisation peut être appliqué pour le PET sans modifier sa structure cristalline jusqu'à 250°C et 160°C pour le PLLA.

1.2. Paramètres de la thermofixation

Afin d'étudier l'influence de la température et de la durée du traitement thermique sur le taux de fonctionnalisation des textiles, les échantillons ont été fonctionnalisés avec une solution contenant les réactifs en concentration fixe. La solution d'imprégnation a été préparée dans les proportions 8/1/10 (pour 100 mL), soit 8 g de CTR, 1 g de catalyseur NaH_2PO_2 et 10 g de $\text{HP}\beta\text{-CD}$ pour 100 mL de solution. Cette formulation est basée sur des études précédentes du laboratoire [188]. Les échantillons ont été imprégnés par 4 passages au foulard comme défini précédemment, puis séchés à 90°C et fixés thermiquement.

Pour le PET, on réalise ce « screening » pour une gamme de températures allant de 130°C à 160°C de 0 à 60 minutes (Figure 45).

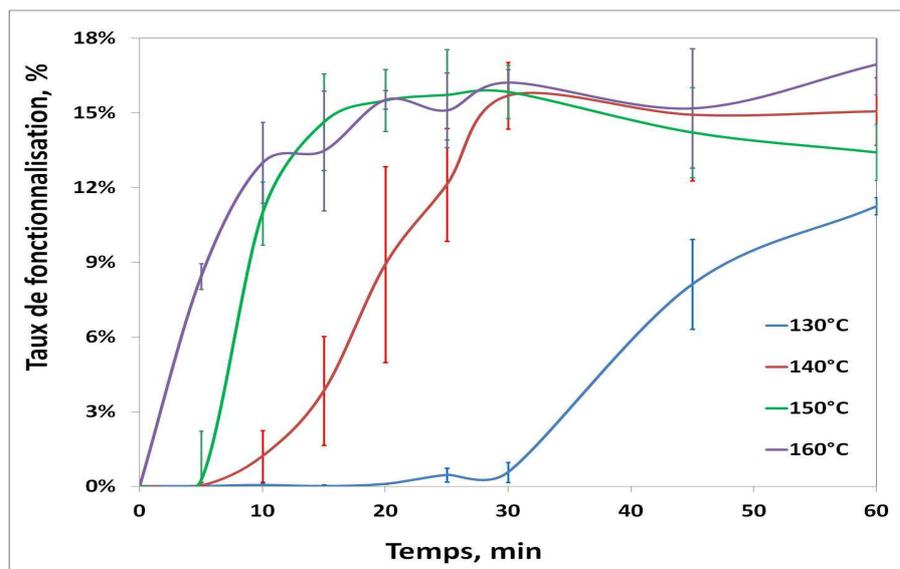


Figure 45 : Etude de la cinétique de fonctionnalisation du PET – Formulation 8/1/10 (CTR/NaH₂PO₂/HPβ-CD)

Un accroissement du taux de fonctionnalisation avec la durée du traitement thermique est observable et ce, quelles que soient les températures étudiées. Néanmoins, pour des températures supérieures à 140°C, une valeur plafond de fonctionnalisation de 15% ± 1,5%-wt est atteinte après 30 minutes de traitement (15 minutes à 150°C). Les températures inférieures à 140°C sont insuffisantes pour obtenir cette valeur plateau en moins de 60 minutes. A cette température (140°C) on n’observe de fixation de cyclodextrines qu’à partir de 30 minutes de thermofixation. La température de fusion du PLLA intervenant à partir à 157°C, la fonctionnalisation de ce support a été tout d’abord étudiée entre 130°C et 160°C pour une durée de 60 minutes (**Figure 48**), afin de voir l’impact de la température de fonctionnalisation sur le textile et sur le taux de fonctionnalisation.

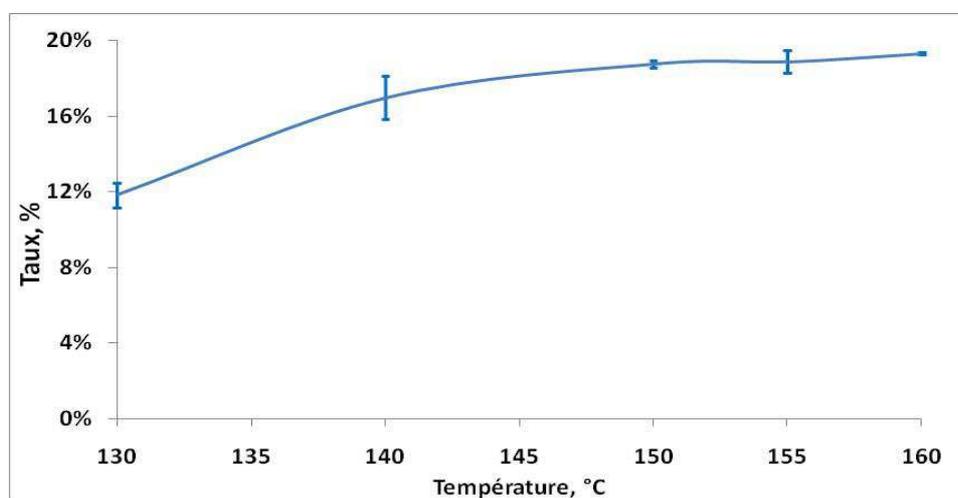


Figure 46 : Taux de fonctionnalisation du PLLA en fonction de la température de traitement thermique durant 60 minutes – Formulation 8/1/10 (CTR/NaH₂PO₂/HPβ-CD)

La **Figure 46** montre un accroissement du taux de fonctionnalisation avec la température de thermofixation de 130°C à 160°C. Un plateau est atteint à un taux de 18,5% ± 1% pour des températures supérieures à 150°C. Néanmoins, une importante déformation du support en PLLA (**Figure 47**) a pu être observée avec l'augmentation de la température de thermofixation. Ce phénomène est lié à la rétractation des fibres sous l'effet de la chaleur, la température de fusion du matériau se situant autour de 157°C.

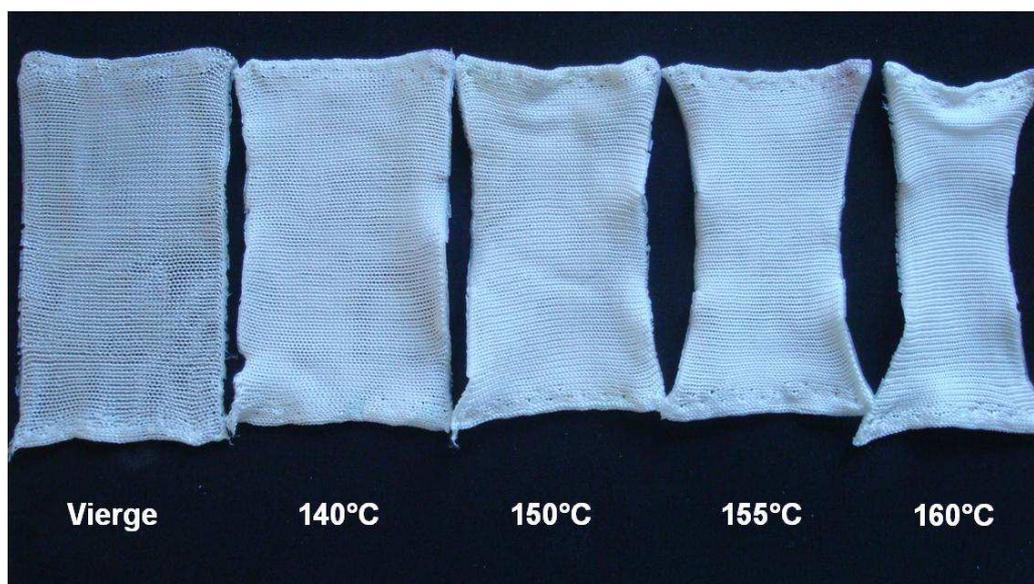
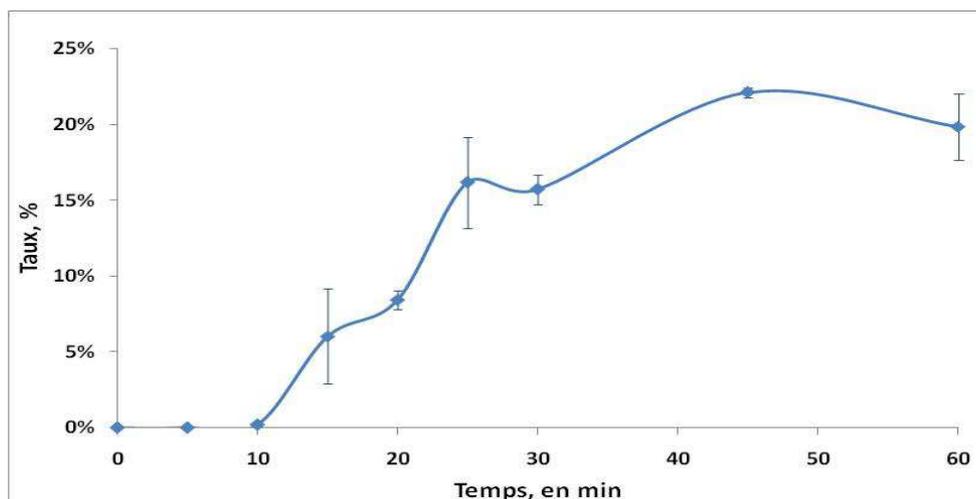


Figure 47 : Déformation du PLLA en fonction de la température de la rame

Afin de pallier cette altération du PLLA, les températures supérieures à 150°C permettant d'obtenir le taux de fonctionnalisation le plus élevé, ont été exclues au profit de celle qui préserve au maximum les paramètres dimensionnels du textile, **140°C**. En faisant varier les durées de traitement thermique entre 5 et 60 minutes à cette température, on obtient la cinétique de fonctionnalisation du PLLA, présentée dans la **Figure 48**.



**Figure 48 : Cinétique de fonctionnalisation du PLLA à 140°C –
Formulation 8/1/10 (CTR/NaH₂PO₂/HPβ-CD)**

Le taux de fonctionnalisation augmente avec la durée de traitement thermique, à partir de 10 minutes de traitement. En deçà, aucune fonctionnalisation n'est observée. Un plateau est atteint à un taux de 20% ± 2%-wt après 45 minutes de thermofixation.

Comme il a été démontré précédemment, même à des températures élevées (> 140°C) et des durées de traitement importantes (> 60 minutes), le taux de fonctionnalisation est limité à une valeur plateau. De plus, ces conditions trop drastiques altèrent le PLLA.

Le cahier des charges du produit (tulle en PET ou PLLA) stipulant le développement d'un procédé simple et polyvalent, et n'altérant pas les propriétés initiales du textile (paramètres dimensionnels et résistance mécanique) le choix du couple température/temps a été arrêté sur **140°C pendant 60 minutes** pour les deux textiles.

Il reste néanmoins un paramètre à étudier, qui est la concentration des réactifs dans le bain d'imprégnation.

1.3. Influence de la concentration et du couple de réactifs

Afin d'étudier l'influence de la concentration en réactifs, des échantillons de PET et de PLLA ont été fonctionnalisés à 140°C pendant une heure, en faisant varier la concentration de la solution d'imprégnation de composition **CTR/NaH₂PO₂/HPβ-CD**.

Une formulation alternative contenant la β-CD a également été testée. Des études précédentes du laboratoire ont montré que la β-CD était difficilement polymérisable en dessous de 160°C en

utilisant l'acide citrique. Afin de remédier à ce problème, nous avons choisi un autre polyacide, l'acide 1,2,3,4-butanetétracarboxylique (BTCA), dont la fonctionnalité supérieure (4 fonctions carboxyliques) accroît la réactivité.

Les proportions optimales PCA/cata/CD dans la solution d'imprégnation ont été fixées à un ratio de 8/1/10 grammes par 100 mL de solution dans des travaux antérieurs du laboratoire [188, 189, 193], on obtient donc une solution de concentration pondérale globale ([PCA]+[CD]) 180 g/L, soit 100 g/L de CD et 80 g/L de PCA. A partir de cette dernière, des dilutions ont été réalisés aboutissant à des solutions de concentrations variables (45, 90, 270, 360g/L) (Tableau 8).

Tableau 8 : Récapitulatif des solutions de réactifs étudiées et nomenclature des échantillons

	Formulation	Ratio PCA/NaH ₂ PO ₂ /CD (en g pour 100 mL)	Concentration pondérale de la solution [PCA]+[CD] (en g/L)	Dilution par rapport à C = 180 g/L	[CD] (en g/L)	Nomenclature
PET	CTR/NaH ₂ PO ₂ /HPβCD	2/0,25/2,5	45	C/4	25	PET-CD ₂₅
		4/0,5/5	90	C/2	50	PET-CD ₅₀
		8/1/10	180	C	100	PET-CD ₁₀₀
		16/2/20	360	2C	200	PET-CD ₂₀₀
	BTCA/NaH ₂ PO ₂ /βCD	2/0,25/2,5	45	C/4	25	-
		4/0,5/5	90	C/2	50	-
		8/1/10	180	C	100	-
		12/1,5/15	270	3C/2	150	-
PLLA	CTR/NaH ₂ PO ₂ /HPβCD	2/0,25/2,5	45	C/4	25	PLLA-CD ₂₅
		4/0,5/5	90	C/2	50	PLLA-CD ₅₀
		8/1/10	180	C	100	PLLA-CD ₁₀₀
		16/2/20	360	2C	200	PLLA-CD ₂₀₀

De par la solubilité limitée de la cyclodextrine native, il n'a pas été possible de réaliser une solution d'imprégnation à 360 g/L comme il avait été fait dans le cas du couple CTR/HPβ-CD. De ce fait, la concentration maximale d'une solution de BTCA/βCD étudiée ici sera de 270 g/L ([BTCA]=120 g/L et [βCD]=150 g/L).

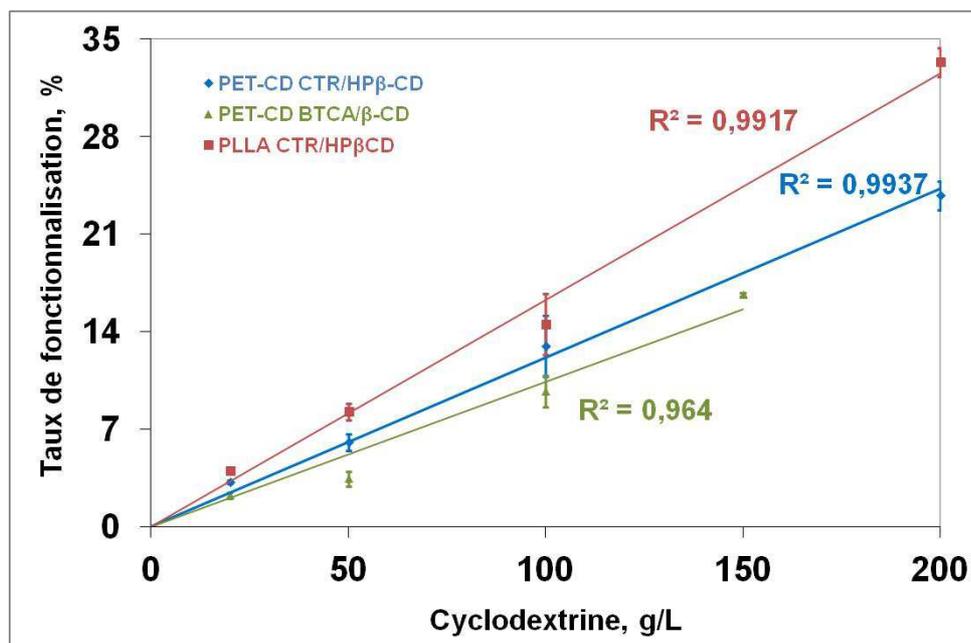


Figure 49 : Taux de fonctionnalisation moyens sur PET fonctionnalisé par CTR/HPβCD et BTCA/βCD et sur PLLA fonctionnalisé CTR/HPβCD par en fonction de la concentration en CD – 140°C, 1h

La Figure 49 montre une excellente linéarité entre le taux de fonctionnalisation et la concentration de CD dans le bain d'imprégnation quel que soit le support ou le couple de réactifs employés. Ces résultats confirment qu'il est possible d'obtenir des taux de fonctionnalisation plus élevés par l'utilisation d'un bain d'imprégnation plus concentré. Cependant, un fort taux de polymères de cyclodextrines qui enrobe les fibres de l'implant aura pour conséquence d'accroître la rigidité de ce dernier. Dès lors, le textile ne sera plus compatible avec des techniques d'implantation nécessitant son enroulement comme la laparoscopie. Une autre difficulté viendra de la solubilité des réactifs pour la préparation de solution à forte concentration.

Les taux de fonctionnalisation obtenus sont résumés dans le **Tableau 9**:

Tableau 9 : Taux de fonctionnalisation du PET-CD fonctionnalisé par CTR/HPβCD et BTCA/βCD et sur PLLA fonctionnalisé par CTR/HPβCD en fonction de la concentration en CD

[CD], g/L	25	50	100	150	200
PET (CTR/HPβCD)	3,2 ± 0,3%	6 ± 0,5%	13 ± 1%	-	23,8 ± 1%
PET (BTCA/βCD)	2,3 ± 0,2%	3,4 ± 0,5%	9,7 ± 1,1%	16,7 ± 0,1%	-
PLLA (CTR/HPβCD)	4 ± 0,1%	8,2 ± 0,6%	14,6 ± 2%	-	33,3 ± 1%

La quantité de polyCTR-HP β -CD déposée sur les fibres du textile augmente avec la concentration des réactifs sans pour autant atteindre de valeur plateau jusqu'à 200 g/L de cyclodextrines dans le bain d'imprégnation. Il est donc possible d'augmenter le taux de fonctionnalisation en faisant varier ce paramètre.

La fonctionnalisation du PET par le couple BTCA/ β -CD ne permet pas d'atteindre des taux aussi importants qu'avec les réactifs CTR/HP β -CD (respectivement 9,7% contre 13% dans le cas d'un bain de réactifs à 100 g/L en CD) dans la gamme de concentrations étudiés. Néanmoins, on n'observe pas de saturation des supports dans cette même gamme.

Cela est probablement dû à une température de thermofixation insuffisante pour polymériser la β -CD. Néanmoins comme nous l'avons vu précédemment, il serait inapproprié d'augmenter cette température, afin de ne pas modifier les paramètres dimensionnels du support notamment dans le cas du PLLA.

Cette étude nous a permis de démontrer que la fonctionnalisation des supports par le polymère de cyclodextrines, est un procédé parfaitement maîtrisable. En effet, il nous est possible d'obtenir le taux de fonctionnalisation souhaité en influant sur les 3 paramètres que sont la température et la durée de la thermofixation et la concentration des réactifs du bain d'imprégnation.

A ce stade, il n'était pas possible de déterminer le taux de fonctionnalisation qui représente le meilleur compromis entre des performances d'adsorption/libération accrues, une bonne biocompatibilité et le respect du cahier des charges.

1.4. Caractérisations des supports fonctionnalisés

1.4.1. Analyse thermogravimétrique

Les supports ont été caractérisés par ATG, afin d'évaluer le taux de polymère de cyclodextrine présent sur les fibres.

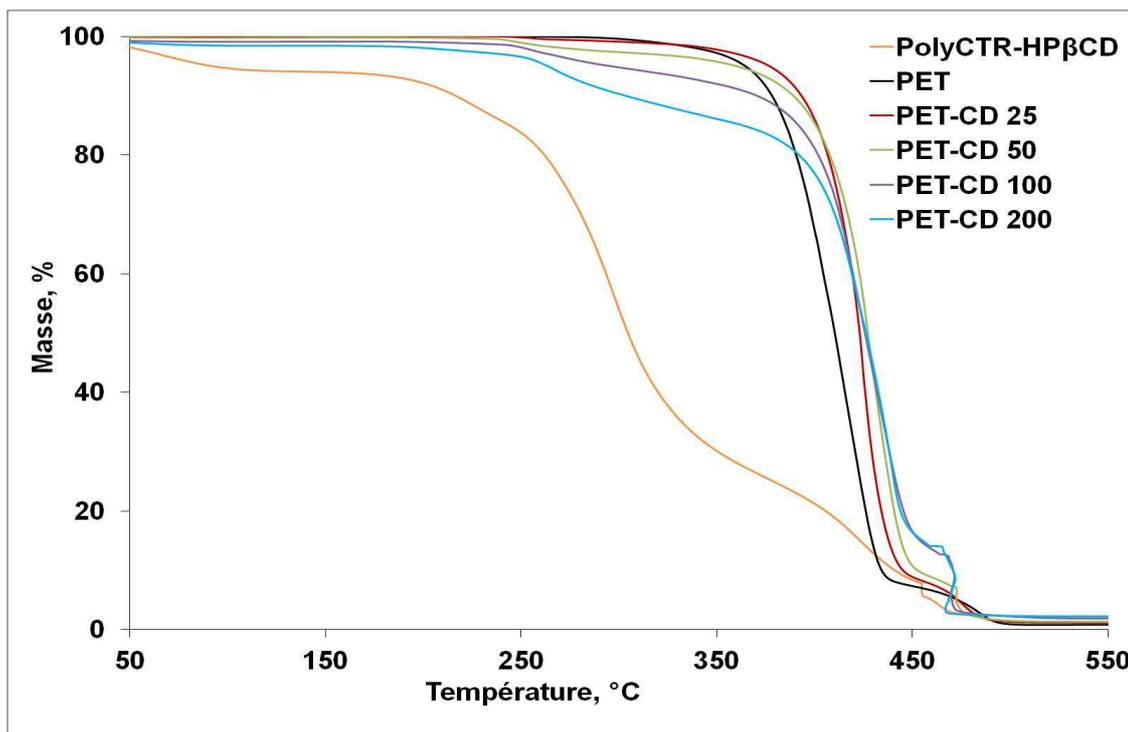


Figure 50 : Thermogrammes du polyCTR-HP β CD et des supports PET à différents taux de fonctionnalisation

La **Figure 50** montre que le polyCTR-HP β CD se dégrade à partir de 150°C et que le PET se dégrade à partir de 350°C. Les thermogrammes PET_{25→200} présentent un début de dégradation autour de 180°C et un palier correspondant à la dégradation du polyCTR-HP β CD apparaît de plus en plus visiblement lorsque la concentration du bain d'imprégnation augmente.

Bien que la dégradation thermique du polyCTR-HP β CD intervienne à une température inférieure à celle du support textile, elle se poursuit jusqu'à 450°C, comme ce dernier. Il est néanmoins possible de calculer le taux de fonctionnalisation des échantillons. Pour cela, un facteur correctif est déterminé à une température donnée située entre le début de dégradation du polymère de cyclodextrines et le début de la dégradation du PET. Ainsi, à 325°C par exemple, 60% du polyCTR-HP β CD pur est dégradé. Les pertes de masses des supports fonctionnalisés sont évaluées à cette température et les taux de fonctionnalisation calculés par correction sont présentés dans la **Figure 51** en comparaison avec les résultats obtenus par pesée.

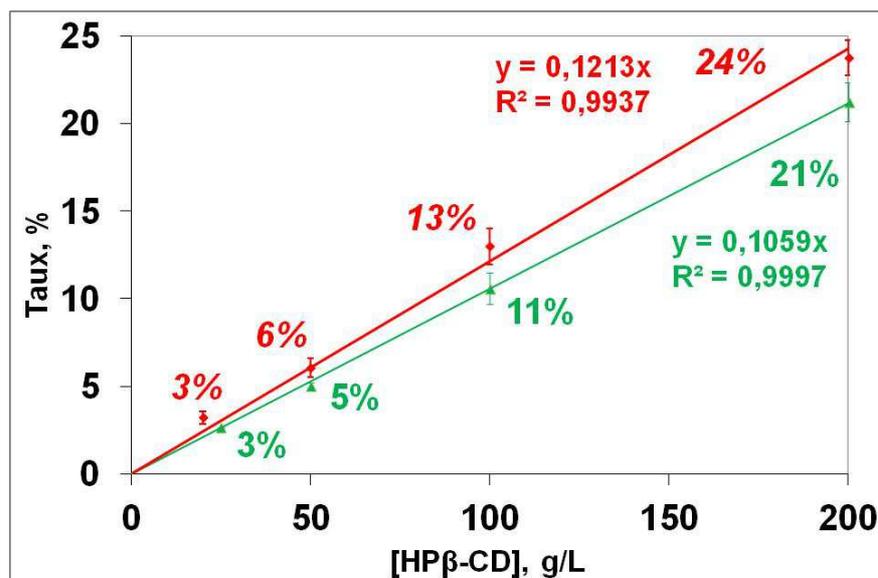


Figure 51 : Taux de fonctionnalisation des supports PET en fonction de la concentration en CD du bain d'imprégnation, déterminés par pesée (rouge) et par ATG (vert)

Les taux obtenus sont similaires qu'ils soient déterminés par pesée ou ATG. Cette dernière technique permet donc de déterminer le taux de fonctionnalisation des supports.

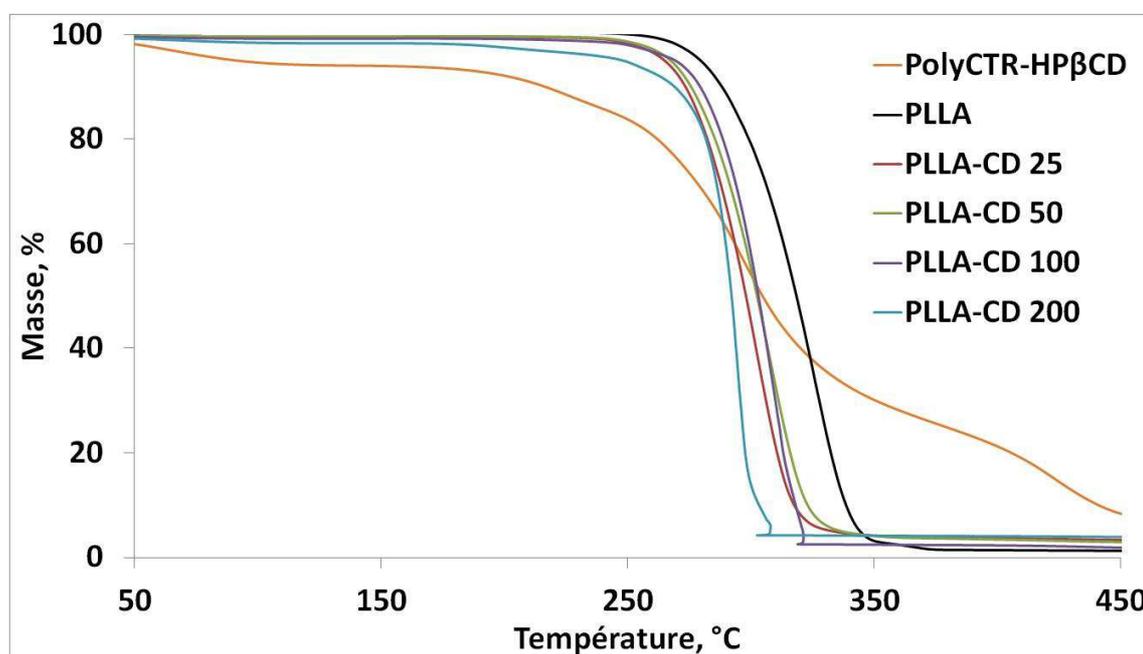


Figure 52 : Thermogrammes du polyCTR-HPβCD et des supports PLLA à différents taux de fonctionnalisation

Dans le cas du PLLA, les plages de températures de dégradation du PLLA et du polyCD se superposent (Figure 52). La dégradation du textile se produit à partir de 250°C soit 100°C de

moins que celle du PET. Les dégradations respectives du support et du polyCTR-HP β CD se produisent à des températures trop rapprochées pour observer un palier intermédiaire du à la dégradation de l'enrobage de cyclodextrines. On peut tout de même observer que la perte de masse de l'échantillon intervient à des températures de plus en plus basses. Ainsi, un support PLLA fonctionnalisé à 33% (PLLA₂₀₀) commencera à se dégrader à partir de 170°C contre 250°C pour le PLLA.

I.4.2. Analyse enthalpique différentielle - DSC

Les supports fonctionnalisés ont été caractérisés par DSC afin d'établir leurs températures caractéristiques, telles que la température de transition vitreuse T_g , ou la température de fusion T_f , voire la température de cristallisation T_c . L'objectif est ici d'observer une éventuelle variation des transitions d'état entre les supports vierges et fonctionnalisés, ce qui traduirait une incidence du procédé de fonctionnalisation sur la structure des matériaux en PET ou en PLLA.

Les températures de début de dégradation déterminés par d'ATG ont permis d'établir les températures limites à appliquer en analyse enthalpique différentielle (DSC).

L'analyse DSC des échantillons de PET fonctionnalisés n'a pu donner les résultats escomptés. En effet, l'appareil DSC utilisé à l'UMET n'est pas conçu pour étudier la dégradation des matériaux sous peine d'endommager le four et les résistances par les produits de dégradation. C'est pourquoi la température maximale programmée était de 180°C, afin d'éviter la dégradation totale du polyCTR-HP β CD. Or dans cette plage de température, aucune transition d'état caractéristique n'a pu être observée.

L'analyse des échantillons de PLLA-CD à différents taux de fonctionnalisation a mis en évidence la présence d'un dédoublement du pic de fusion du support (**Figure 53**).

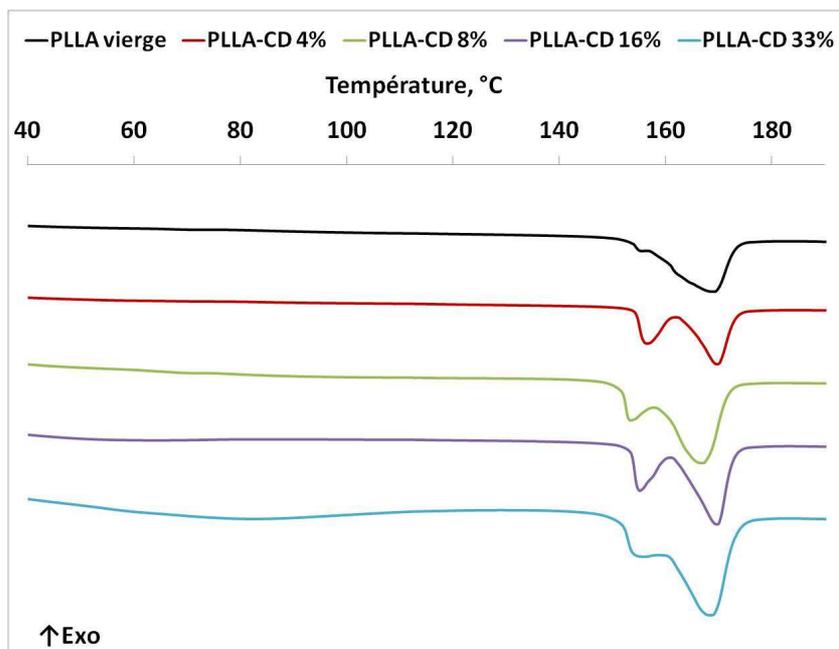


Figure 53 : Comparaison des thermogrammes DSC des supports PLLA de différents taux de fonctionnalisation

Tableau 10 : T_{fus} et Enthalpies de fusion des pics de fusion des supports PLLA à différents taux de fonctionnalisation

Echantillon	T_{fus} (°C) pic 1	Enthalpie de fusion Pic 1 (J/g)	T_{fus} (°C) pic 2	Enthalpie de fusion 2 (J/g)
PLLA	-	-	$169,2 \pm 1,2$	$49,95 \pm 0,12$
PLLA-CD25	$156,5 \pm 0,1$	$11,67 \pm 0,72$	$170,3 \pm 0,5$	$25,77 \pm 2,35$
PLLA-CD50	$153,2 \pm 0,3$	$5,57 \pm 1,51$	$167,7 \pm 0,6$	$27,87 \pm 1,36$
PLLA-CD100	$155,1 \pm 0,1$	$9,83 \pm 0,72$	$169,9 \pm 0,3$	$28,9 \pm 1,37$
PLLA-CD200	$154,1 \pm 0,3$	$4,43 \pm 1,53$	$167,5 \pm 1,1$	$20,33 \pm 1,95$

Les températures de fusion de chaque pic ont été relevées à 155°C et 169°C (Tableau 10). Les enthalpies de fusion de ces 2 pics n'évoluent pas avec le taux de fonctionnalisation des textiles. Le polymère de cyclodextrines ne présente pas de pic de fusion, ce dédoublement ne résulte donc pas de l'enrobage par le polyCD mais du procédé en lui-même qui modifie la structure cristalline des fibres de PLLA.

Afin de vérifier cette hypothèse, des échantillons de PLLA ont subi les étapes de la fonctionnalisation « à blanc », sans incorporer les réactifs (CD, catalyseur, CTR) dans la solution d'eau distillée lors de l'imprégnation. Seules les étapes susceptibles de modifier la cristallinité du PLLA ont été appliquées, soit l'imprégnation, le foulardage, le séchage à 90°C et le traitement thermique à 140°C durant 1 heure. Enfin, les échantillons ont été placés dans un soxhlet à l'eau

pendant 3 heures. Ces supports ont été analysés par DSC et comparés au PLLA non traité (**Figure 54**).

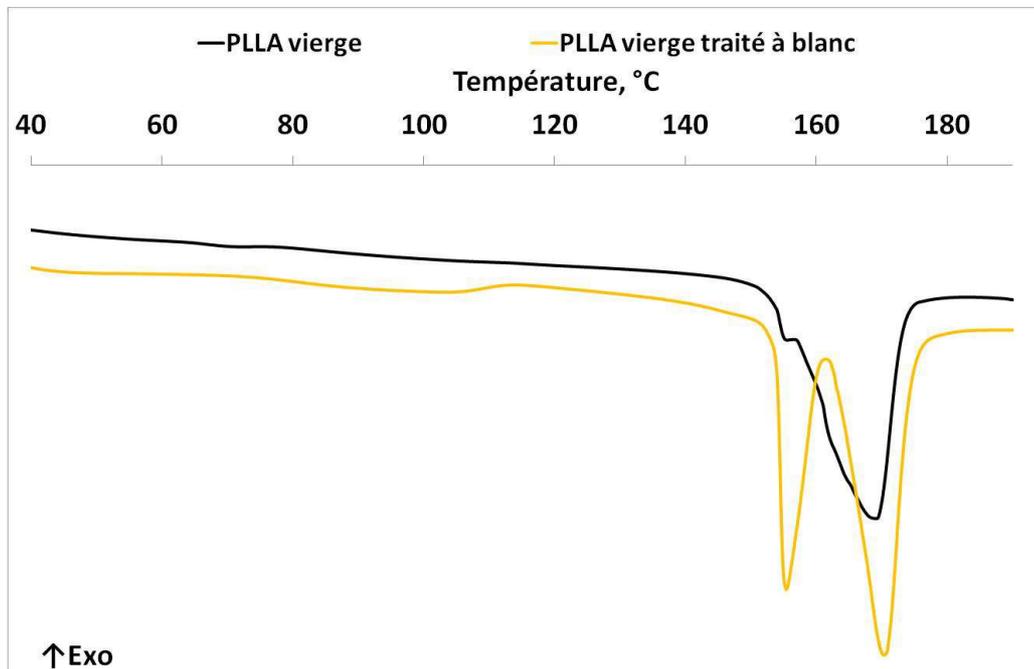


Figure 54 : Comparaison des thermogrammes DSC du PLLA et du PLLA traité « à blanc »

Comme dans le cas des supports PLLA-CD, un textile PLLA vierge qui a subi le procédé de fonctionnalisation présente deux types de cristallinité caractérisées par un dédoublement du pic de fusion. Les températures relevées sont de 155°C et 170°C, ce qui correspond aux résultats obtenus par l'analyse DSC des échantillons PLLA-CD. Il semblerait que les divers traitements appliqués sur le textile modifient la structure cristalline du matériau. Il est à souligner que sur le thermogramme du PLLA vierge, on peut observer un épaulement à 155°C qui correspondrait à une phase cristalline embryonnaire qui se serait développée lors de ces traitements.

Pour résumer, le polymère de cyclodextrine lui-même n'influe pas sur les températures caractéristiques et donc sur la structure du matériau, PET comme PLLA. Néanmoins, les différentes étapes du procédé comme le traitement thermique peuvent modifier la cristallinité du matériau PLLA.

I.4.3. Essais mécaniques

Le rôle premier d'un implant de réfection pariétale est le renforcement de la paroi après l'intervention. Cela implique que le support doive présenter une certaine tenue mécanique. Les échantillons de PET fonctionnalisés selon le protocole industriel, ont été testés sur banc de

traction selon la méthode de contrôle qualité de COUSIN BIOTECH. Les mesures sont réalisées selon les deux sens du textile, trame et chaîne. Les résultats moyens ont été comparés avec les valeurs de résistance obtenues sur des échantillons de PET vierges (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Allongement à la rupture du PET vierge et fonctionné

Textile	Allongement section tressée	Allongement section droite
PET	27% ± 3%	47% ± 4%
PET-CD	25% ± 1%	32% ± 1%

Une baisse de l'allongement à la rupture (-15%) de la trame apparaît après la fonctionnalisation, due à l'augmentation de la rigidité du support. En revanche, la partie tressée ne semble pas perdre en tenue mécanique par enrobage des fibres avec le polyCD.

Ces valeurs sont suffisantes pour assurer une bonne tenue mécanique de la paroi après implantation. La norme employée par COUSIN BIOTECH ne considère que la partie tressée. Les implants testés doivent posséder un allongement à la rupture sous une force de 16 N/cm compris entre $4\% < A\%_{16N} < 35\%$.

Dans le cas du PLLA, la résistance de l'implant est assurée par la structure textile biostable (généralement en PP), qui est appelé à rester dans l'organisme dans le long terme. Dès lors, aucun test n'a été effectué sur le PLLA car ce n'est pas lui qui assure le rôle de soutien à long terme.

I.4.4. Microscopie électronique à balayage

Les observations par MEB ont permis de démontrer la présence du polymère de cyclodextrine, mais également d'évaluer l'homogénéité de cet enrobage.

Seuls des échantillons de PET et de PLLA à très haut taux de fonctionnalisation, respectivement 24% (PET₂₀₀) et 33% (PLLA₂₀₀), ont été observés en microscopie électronique à balayage. Des clichés des supports vierges ont également été réalisés afin d'observer d'éventuels changements de structures comme par exemple la rugosité de surface.

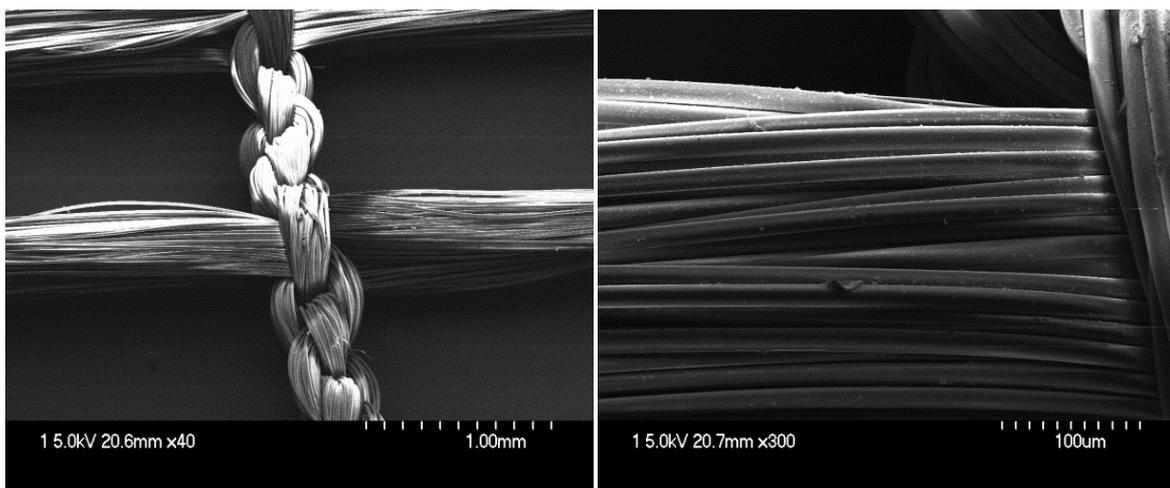


Figure 55 : Clichés MEB du support PET – Grossissement x40 (gauche) et x300 (droite)

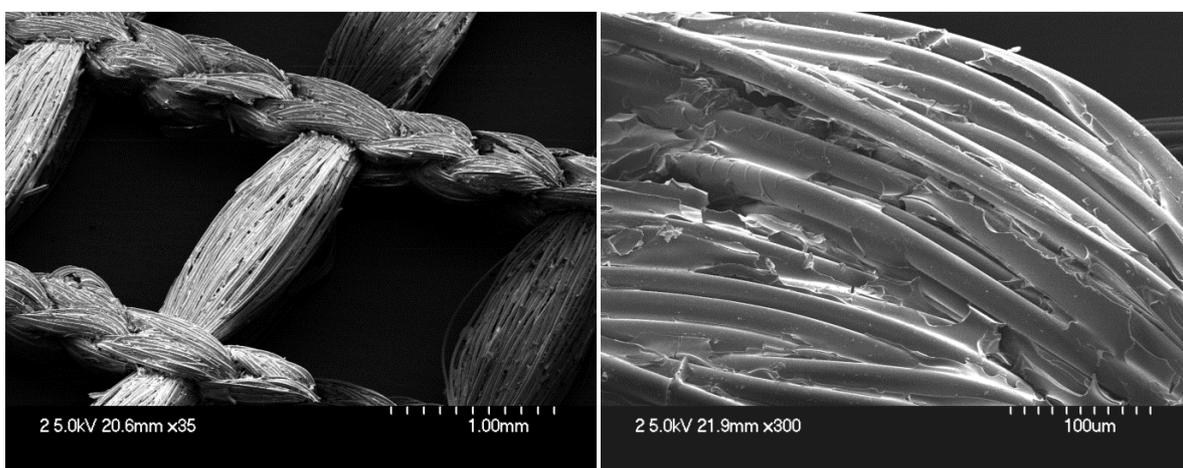


Figure 56 : Clichés MEB du support PET-CD 24% – Grossissement x35 (gauche) et x300 (droite)

Sur le textile PET vierge (**Figure 55**), les fibres sont bien définies.

En revanche, les observations sur le PET-CD₂₀₀ (**Figure 56**) montrent la présence de polymère sur les sections droites et tressées non seulement autour mais également entre les fibres en surface de l'échantillon. Les interstices entre les fibres sont remplis par du polyCD, qui peut également formées par endroit des amas. Une dilatation du diamètre du fil est observable sur l'échantillon fonctionnalisé.

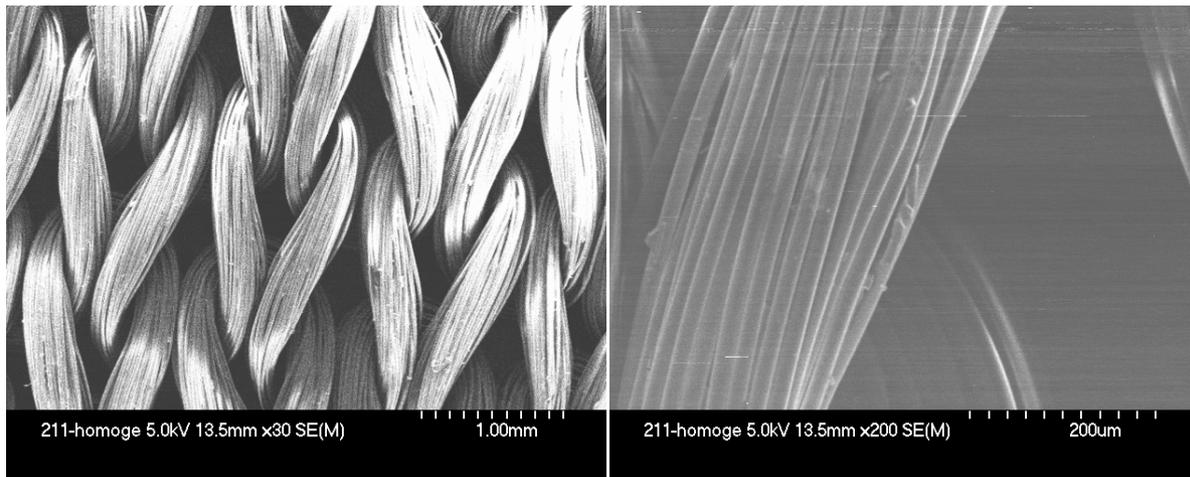


Figure 57 : Clichés MEB du support PLLA vierge – Grossissement x30 (gauche) et x200 (droite)

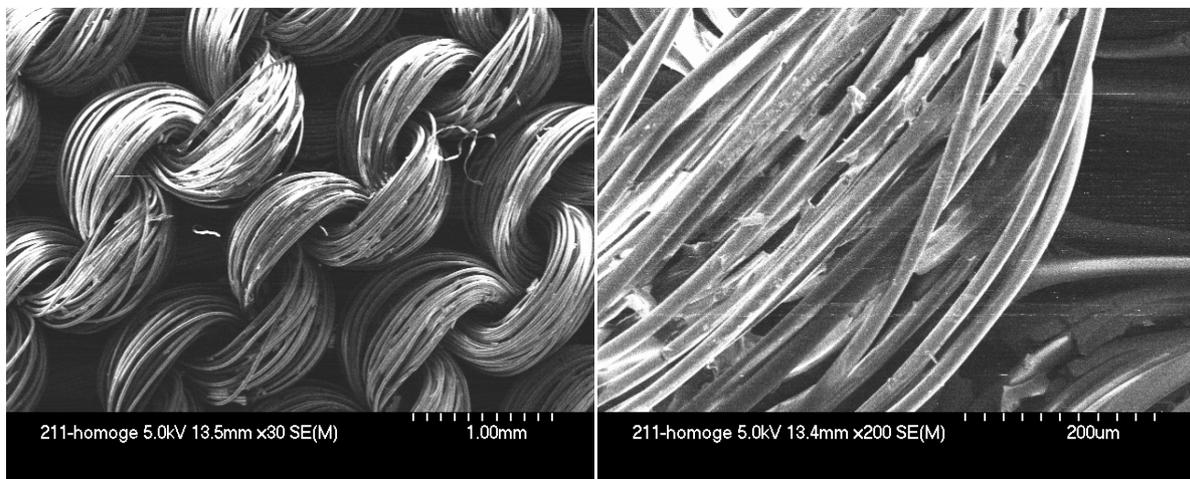


Figure 58 : Clichés MEB du support PLLA-CD 33% – Grossissement x30 (gauche) et x200 (droite)

La même étude réalisée sur le PLLA et le PLLA-CD 33% (**Figure 57** et **Figure 58**). Comme précédemment, les interstices entre les filaments révèlent la présence de polyCD. Ce phénomène est principalement dû à une réponse du PLLA au traitement mais est accentué par un effet du polyCD qui provoque la rétraction de la structure lors de la réticulation.

Il est à noter que les clichés du PLLA et PLLA-CD à un grossissement x30 ont été effectués sur des faces différentes du textile ce qui engendre une différence de structure visible (**Figure 58**).

1.4.5. Résonance magnétique du solide

Une mise en évidence supplémentaire de la fonctionnalisation a été apportée par la résonance magnétique nucléaire du solide.

Dans un premier temps, l'analyse du textile vierge a permis de définir les signaux correspondant aux différents atomes de carbones rencontrés dans la macromolécule de PET. La numérotation

des carbones magnétiquement équivalents du PET est présentée dans la **Figure 59** et apparaît en bleu sur les spectres, pour plus de lisibilité.

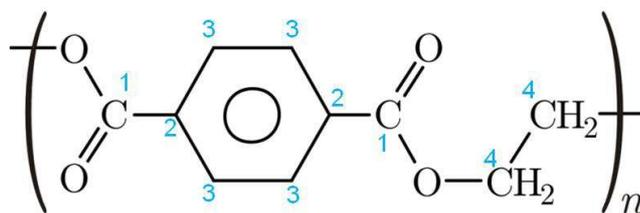


Figure 59 : Numérotation des carbones du PET

Sur le spectre CPMAS de la **Figure 60**, on dénombre quatre types de carbones chimiquement magnétiquement équivalents, dont l'attribution a été reportée dans le **Tableau 12 [209]**. Les deux doublets identiques apparaissant vers 30 et 230 ppm sont des artefacts (marqués par des astérisques) résultant de la rotation et ne sont donc pas pris en compte dans l'attribution.

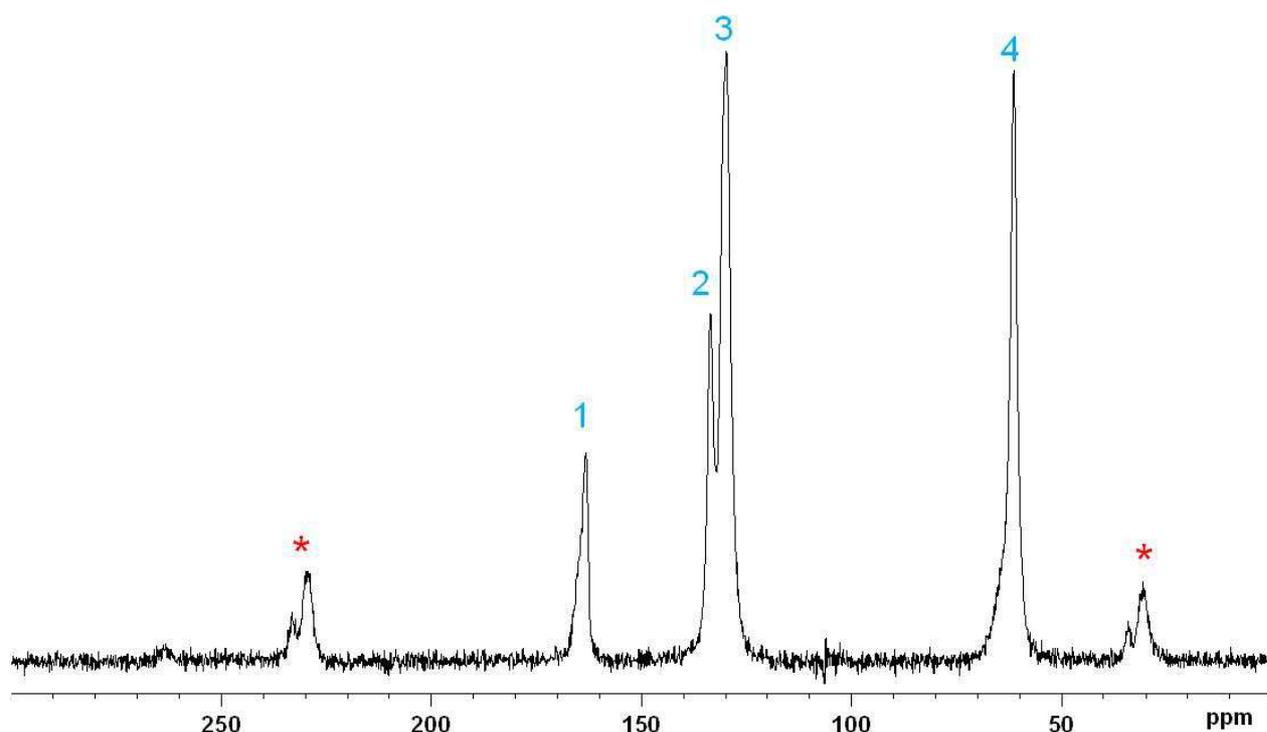


Figure 60 : Spectre RMN CPMAS ¹³C du PET

Tableau 12 : Attribution des signaux ¹³C CPMAS du PET

Carbones	1	2	3	4
Δ (ppm)	163.23	133.61	129.82	61.40
Fonctions	C=O	Aromatique =C- 	Aliphatique =C-H 	CH ₂

Dans un second temps, après avoir analysé le support PET fonctionnalisé à 24%-wt (**Figure 62**), il est possible d'identifier les signaux correspondant au polymère de cyclodextrine (**Figure 61**, en rouge sur le spectre). L'attribution de ses groupements est reportée dans le **Tableau 13**.

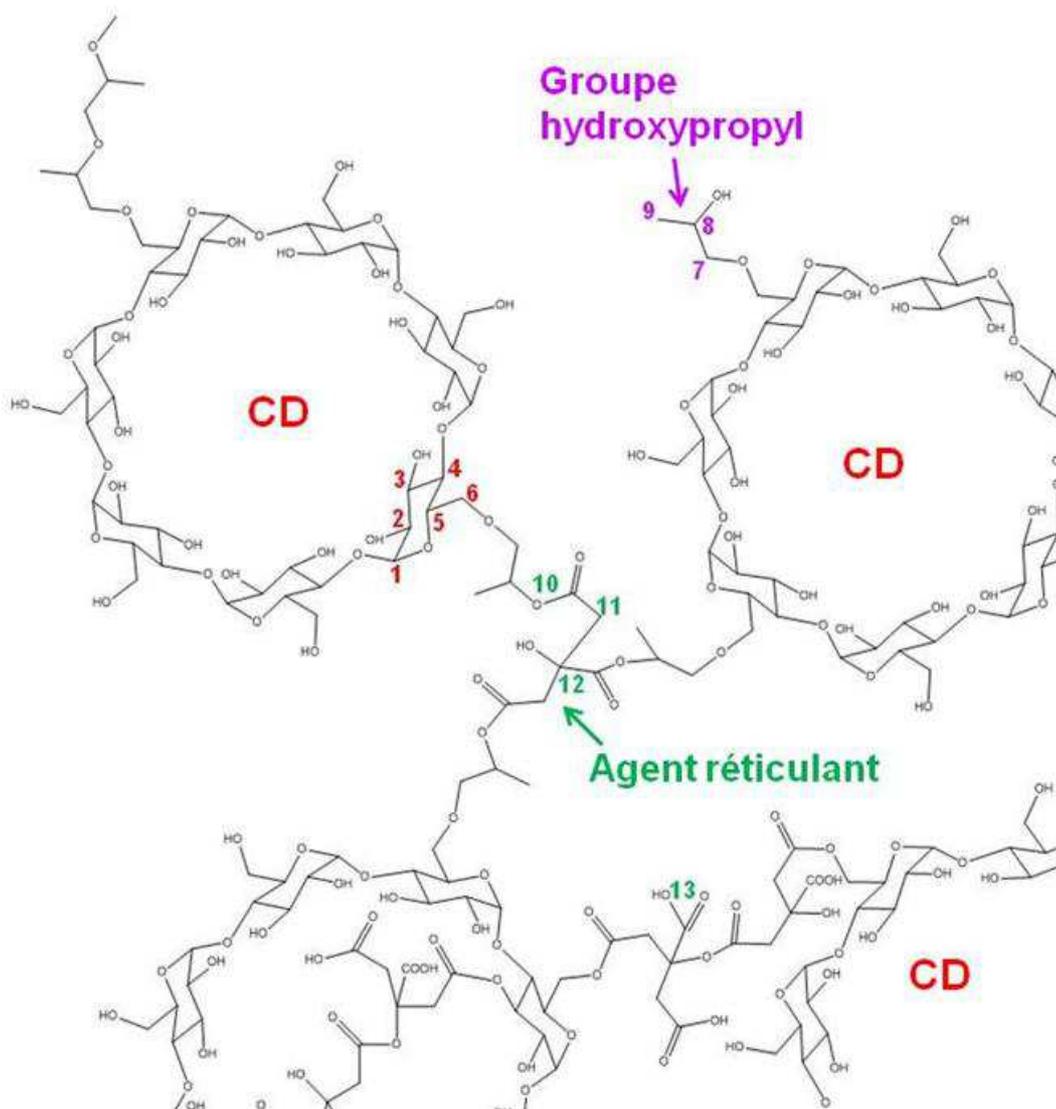


Figure 61 : Structure chimique du polymère polyCTR-HPβCD et numérotation des carbones

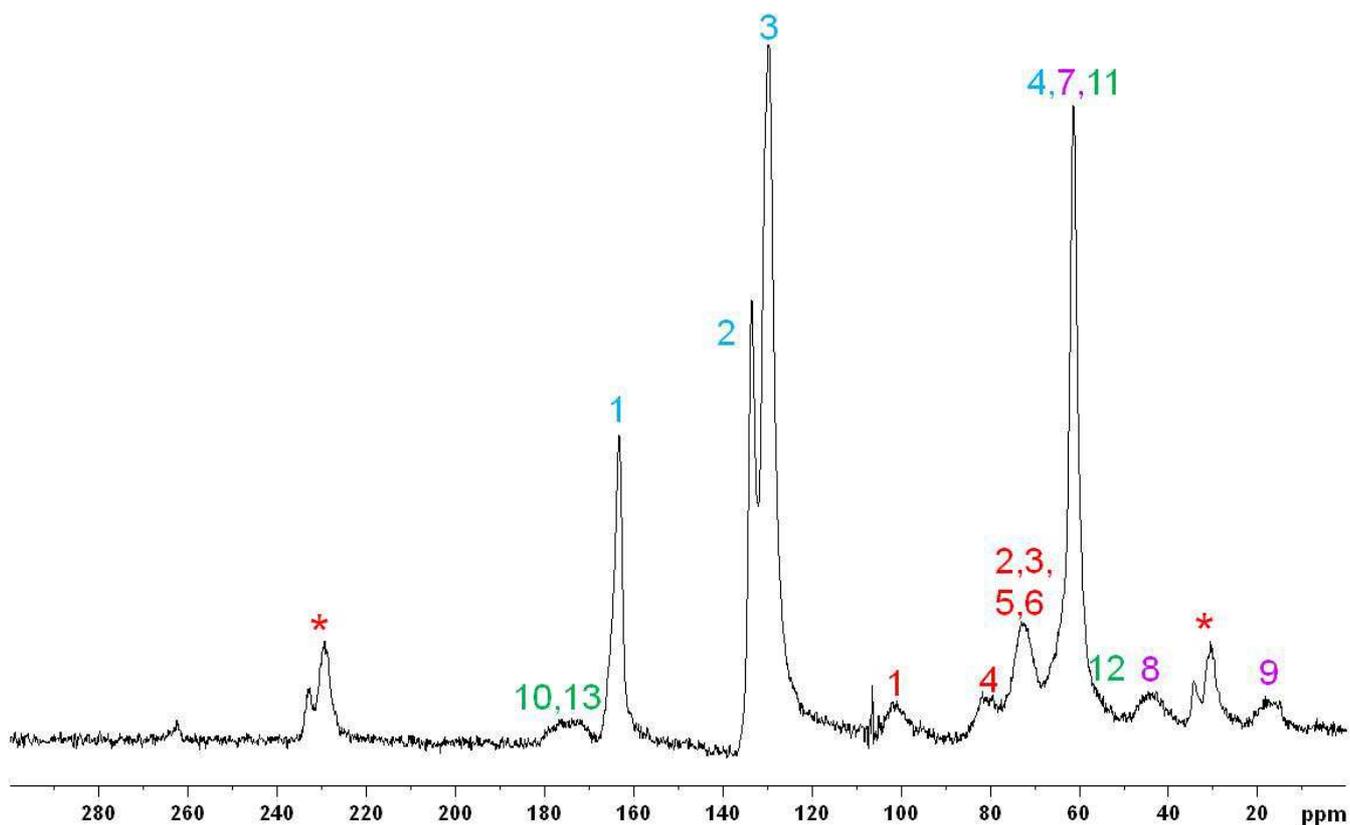


Figure 62 : Spectre RMN CPMAS ^{13}C du PET-CD 24% (CTR/ NaH_2PO_2 /HP β -CD, 8/1/10, 140°C, 1h)

Tableau 13 : Attribution des signaux ^{13}C CPMAS du polyCTR-HP β CD sur PET

Carbones	1	2	3	4	5	6
Δ (ppm)	100	73	73	80	73	73
Fonctions	O-CH-O C	C-CH-C O	C-CH-C O	C-CH-O C	C-CH-C O	C-CH ₂ -O

Carbones	7	8	9	10	11	12	13
Δ (ppm)	60	43	17	175	60	57	175
Fonctions	O-CH ₂ -C hydroxypropyl	C-CH-C O hydroxypropyl	-CH ₃ hydroxypropyl	-COO- réticulant	C-CH ₂ -C réticulant	C-C-OH C réticulant	-COOR réticulant

Les pics attribués au support PET sont visibles sur ce spectre (en bleu), sans modifications des déplacements chimiques.

Des massifs apparaissent, attribuables à la présence de l'enrobage de polyCD. L'attribution des signaux de la cyclodextrine a déjà été publiée lors de travaux précédent du laboratoire [210] (carbones **1** à **6**). Dès lors, il est possible d'attribuer les signaux restants.

A 20 ppm, un massif traduit la présence des groupements méthyl (9) des substituants hydroxypropyl de la CD. Le signal suivant, à 45 ppm est également issu de ces substituants car attribuable à leur carbone trisubstitué (8). Le calcul théorique des déplacements chimiques a permis de situer les signaux correspondant aux carbones de l'agent réticulant, porteurs de l'hydroxyle (12) comme apparaissant à 56 ppm soit confondus avec le pic à 60 ppm. Enfin le massif localisé à 175 ppm, juste après le pic des fonctions ester peut être attribué aux carbones des groupements carboxylates ou carboxyliques (13) résiduels portés par l'agent réticulant. Les carbones des liaisons esters HPβCD/CTR (10) et leurs voisins CH2 (11) sont similaires à ceux du support PET, ce qui implique que leurs déplacements chimiques se confondent avec ces derniers, respectivement à 163 ppm et 60 ppm.

La résonance magnétique nucléaire a donc permis d'attester de la présence du polymère de cyclodextrines sur le textile PET.

I.4.6. Adsorption du bleu de o-toluidine

Les échantillons des deux supports vierges et fonctionnalisés ont été caractérisés par la méthode d'adsorption du TBO, en tant que molécule modèle (2^{ème} partie II.B.5). Ce dosage nous a permis d'évaluer la disponibilité du polyCD en déterminant la quantité de molécules adsorbées (rapportée à la masse des échantillons) en fonction du taux de fonctionnalisation des supports PET et PLLA.

De visu, après rinçage dans la soude 0,05N, on observe que l'échantillon fonctionnalisé adsorbe davantage de colorant que l'échantillon vierge (**Figure 63**).

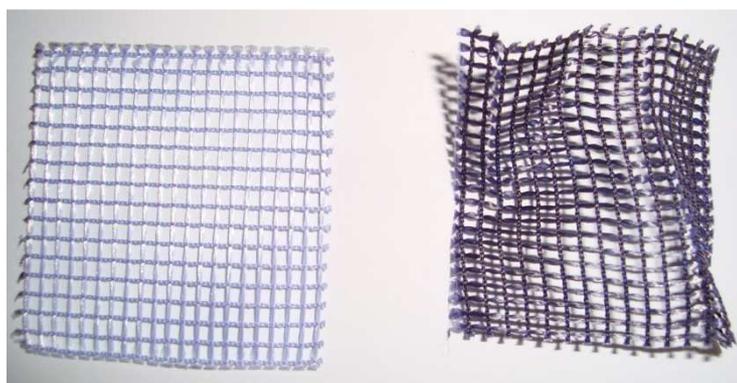


Figure 63 : Observation comparative d'un échantillon de PET vierge (gauche) et fonctionnalisé (droite) après imprégnation dans le TBO et rinçage simple dans la soude 10^{-4} M.

La **Figure 64** rapporte la quantité de TBO adsorbée (après rinçage) sur PET et PLLA présentant des taux de fonctionnalisation croissants. Les supports vierges n'adsorbent quasiment pas de TBO ($> 1\ \mu\text{mol/g}$) par rapport aux supports fonctionnalisés (jusqu'à 55 et 90 $\mu\text{mol/g}$ respectivement).

En termes de capacité d'adsorption, les échantillons les moins fonctionnalisés (PET-CD₂₅ et PLLA-CD₂₅) adsorbent déjà près de 60 fois (PET) à 100 fois (PLLA) plus de TBO que les supports vierges (**Figure 64**).

Malgré cela, une valeur palier est atteinte à partir d'une fonctionnalisation par une solution à une concentration de 50 g/L de cyclodextrines, à 80 $\mu\text{mol/g}$ de support pour le PET-CD, 50 $\mu\text{mol/g}$ pour le PLLA-CD.

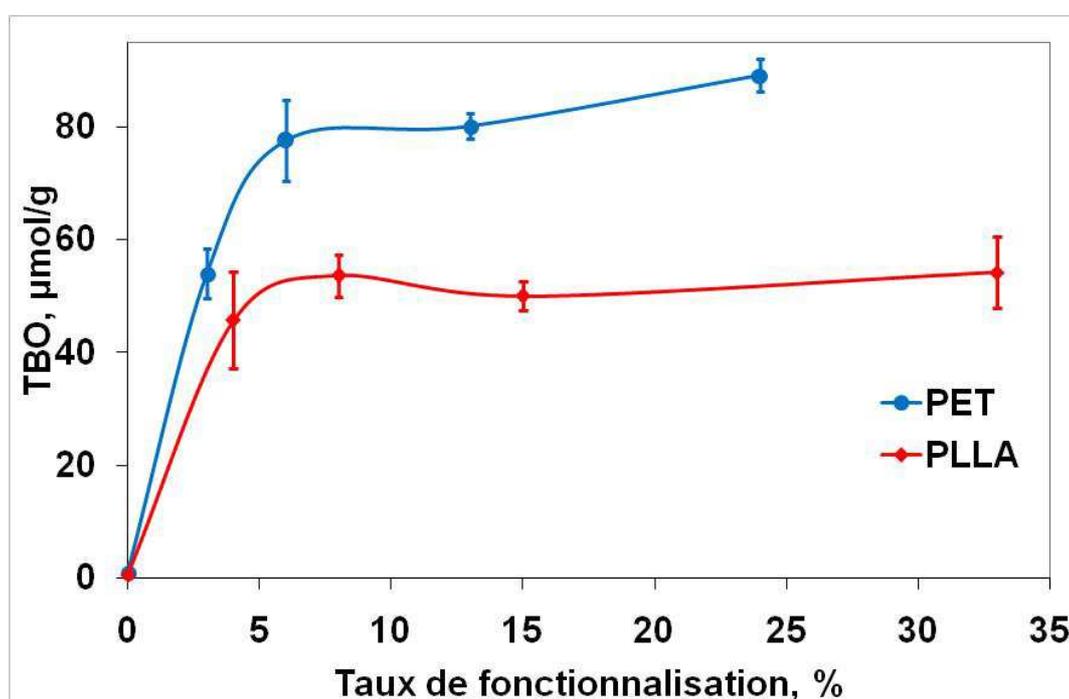


Figure 64 : Quantités de TBO adsorbées par les supports PET et PLLA en fonction du taux de fonctionnalisation des supports

Une théorie qui pourrait expliquer ce phénomène, constaté pour les deux types de supports, repose sur la formation d'une monocouche de TBO à la surface. Des travaux récents du laboratoire ont mis en évidence l'adsorption du bleu de méthylène (BM) sur le polyCD répondant au modèle de Langmuir, soit la formation d'une monocouche de BM à la surface du polyCD. Or le TBO est une molécule analogue au BM, dont elle ne diffère que par la présence d'une amine et d'un méthyle. Dès lors, à partir d'un certain taux de fonctionnalisation en polyCD, ceci formerait une monocouche de TBO à la surface, empêchant sa pénétration dans la totalité du revêtement. Ainsi la totalité du polyCD ne serait pas accessible au TBO.

Bien que couramment employée en tant qu'analyse semi-quantitative, la méthode du TBO semble ici présenter ses limites.

I.4.7. Influence de la méthode de stérilisation

Dans le domaine des Dispositifs Médicaux Implantables (DMI), la stérilisation est une étape du procédé. En effet, les matériaux employés peuvent s'avérer incompatibles avec certains types de stérilisation, comme par exemple, le PP qui se dégrade par scission de chaînes après une stérilisation au rayonnement β ou γ . De même certaines méthodes de stérilisation peuvent éventuellement engendrer une toxicité due à la présence de composés résiduels comme l'oxyde d'éthylène. Dans le cas des DMI actifs (DMIA), à libération de principes actifs, il convient, si le dispositif est activé préalablement, de vérifier si les propriétés de la substance active qu'il contient, ne sont pas dégradées par la stérilisation.

La société COUSIN BIOTECH applique sur ces dispositifs deux techniques de stérilisation, la stérilisation par absorption/désorption d'oxyde d'éthylène (EtO) et par irradiation aux rayons gamma (γ). Afin de vérifier si le revêtement de cyclodextrines et ses propriétés d'adsorption ne sont pas altérées par le mode de stérilisation, des échantillons de PET ont été fonctionnalisés (CTR/ NaH_2PO_2 /HP β -CD, 8/1/10, 140°C, 1h, %CD = 13%) pour ensuite être répartis en 3 groupes :

- fonctionnalisés sans stérilisation (témoins)
- fonctionnalisés et stérilisés par rayonnement γ
- échantillons fonctionnalisés et stérilisés par l'EtO

Les capacités d'adsorption de ces 3 types d'échantillons ont ensuite été évaluées par la méthode du TBO et seront confirmées par une étude d'adsorption de la CFX.

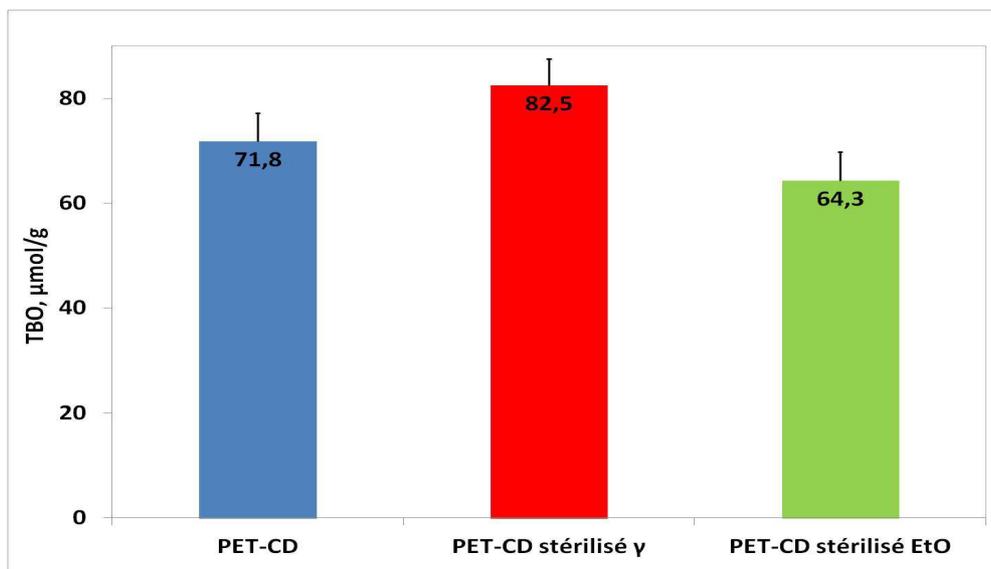


Figure 65 : Quantités de TBO adsorbées sur PET en fonction du traitement des fibres

La stérilisation par rayonnement γ ou par adsorption/désorption d'oxyde d'éthylène n'affecte pas (à l'erreur expérimentale près) la capacité d'adsorption du PET-CD vis-à-vis du TBO (Figure 65). Néanmoins, comme le textile PLLA est destiné à former un implant avec une structure en PP qui est incompatible avec la stérilisation γ , le choix s'est porté sur l'adsorption/désorption d'EtO.

I.4.8. Evaluation biologique des supports fonctionnalisés

En tant que DMI, il est important que la fonctionnalisation d'un implant de réfection pariétale n'affecte pas sa biocompatibilité. Un test de vitalité cellulaire sur cellules fibroblastiques NIH3T3, a été réalisé sur les textiles PET et PLLA, présentant différents taux de polyCTR-HP β CD.

Les échantillons de PET et PET-CD, stérilisés par adsorption d'EtO et découpés sous forme de pastilles de 15 mm de diamètre, ont été mis en contact avec des cellules selon la méthode décrite précédemment (Figure 66) (2^{ème} partie II.5.2).

Une étude comparative de la vitalité cellulaire a été menée sur un PET vierge (ramenée à 100%) et sur des supports PET-CD_{25→50}.

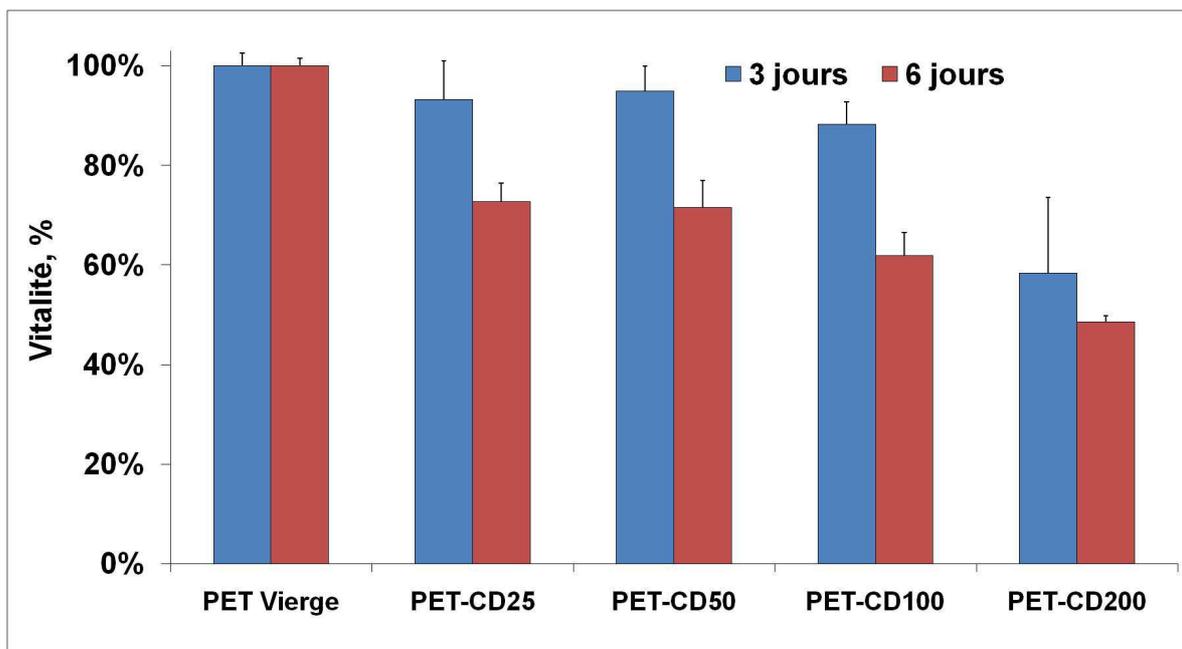


Figure 66 : Vitalité cellulaire de fibroblastes NIH3T3 (ratio au PET) en fonction du taux de fonctionnalisation des supports PET-CTR/HPβCD, 140°C, 1h

La **Figure 66** montre qu'après 3 jours d'incubation, la vitalité des cellules ayant proliféré sur les supports fonctionnalisés reste supérieure à 80% lorsque la concentration en CDs ne dépasse pas 100 g/L (PET-CD₂₅₋₅₀₋₁₀₀) et supérieurs à 60% pour un échantillon PET-CD₂₀₀, présentant le plus fort taux de fonctionnalisation (24%). La vitalité décroît avec le taux de fonctionnalisation.

Après 6 jours d'incubation, en revanche, la vitalité cellulaire chute de 20% pour les 3 premiers PET-CD₂₅₋₅₀₋₁₀₀, de 10% pour le PET-CD₂₀₀. Cette variation est principalement due à une légère hydrolyse du polyCTR-HPβBD qui libère des fonctions carboxyliques, qui accroissent l'acidité du milieu. Dans les 3 premiers cas, les valeurs restent néanmoins acceptables, ne dépassant pas les 60%. Le PET-CD₂₀₀ présente toutefois une vitalité cellulaire proche de 49% et donc à la limite d'une cytotoxicité.

Même si ces tests *in vitro* permettent d'évaluer au mieux la cytocompatibilité des textiles avec ou sans enrobage de cyclodextrines, ces résultats ne prennent pas en compte certaines variables de l'environnement *in vitro* comme le renouvellement du milieu (fluides, sérum,...) qui contribuent à atténuer l'effet d'acidité du support.

Une étude identique a été pratiquée sur les supports en PLLA vierge et fonctionnalisés. Comme dans le cas précédent, toutes les valeurs de vitalité sont rapportées à celles du textile vierge (**Figure 67**).

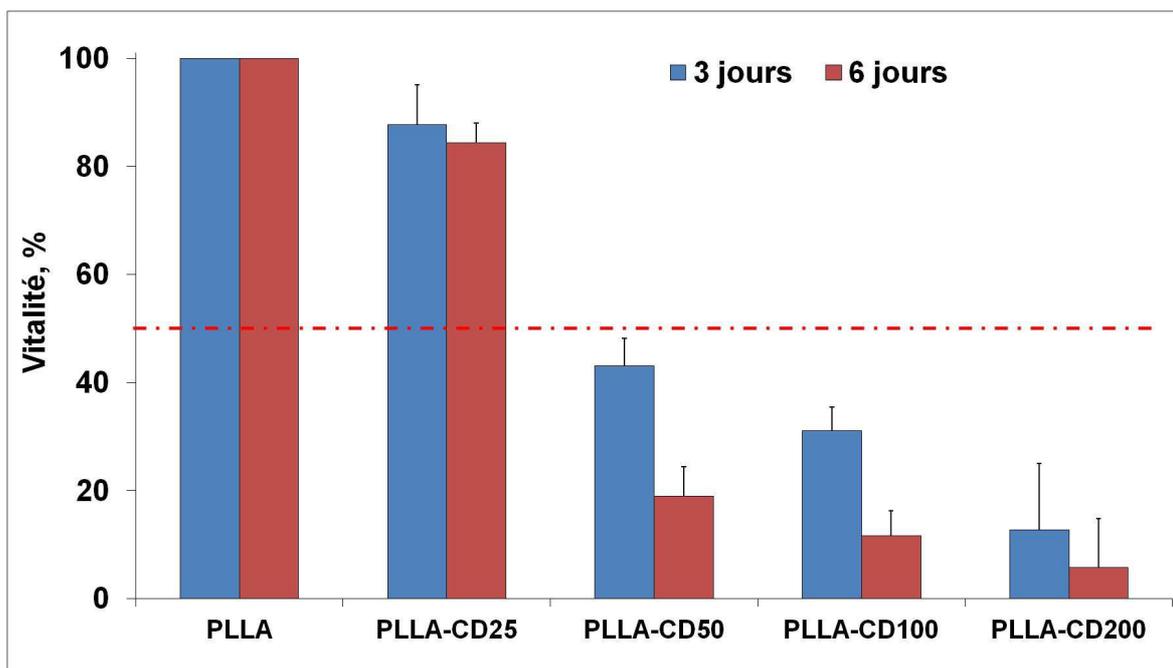


Figure 67 : Vitalité cellulaire des fibroblastes NIH3T3 (ratio au PLLA) en fonction du taux de fonctionnalisation des supports PLLA – CTR/HP β CD, 140°C, 1h

Après 3 jours d'incubation, la cytocompatibilité des supports fonctionnalisés décroît brusquement avec le taux de fonctionnalisation pour les textiles PLLA fonctionnalisés avec une solution de CD supérieure à 50 g/L. Elle passe ainsi sous la barre discriminante des 50% de vitalité (43% pour PLLA-CD₅₀, 31% pour PLLA-CD₁₀₀ et 8% pour le PLLA-CD₂₀₀).

De plus, après 6 jours, elle est encore diminuée de plus de moitié pour 3 trois types d'échantillons (12% dans le cas du PLLA-CD₁₀₀ par exemple).

Seul le PLLA-CD₂₅ ne montre pas de toxicité en permettant une vitalité cellulaire supérieure à 84% après 6 jours.

La toxicité des supports fonctionnalisés avec une solution de cyclodextrines de concentration supérieure à 50 g/L est en partie imputable à la structure du support, comme pour le PLLA. Cependant, il semblerait que cela soit davantage lié à l'accroissement de l'acidité du milieu. Cette fois-ci, à la dégradation du polymère de cyclodextrines et la régénération des fonctions carboxyliques viendrait s'ajouter un défaut de neutralisation des supports lors du procédé de fonctionnalisation. Cette étape permet par un échange H⁺/Na⁺, de former des fonctions carboxylates mais également de diminuer fortement l'acidité du revêtement vers un matériau neutre, plus favorable aux milieux biologiques. Par défaut, la durée de la neutralisation, basée sur le PET, a été fixée à 15 minutes dans une solution à 4 g/L de Na₂CO₃. Il conviendra par la suite

d'optimiser dans le cas du PLLA cette durée, afin d'établir un compromis entre une neutralisation suffisante et une durée de séjour dans la solution de carbonate, la plus courte possible. Avec un pH de 11, il est probable qu'une partie du revêtement de cyclodextrines soit dégradé.

1.5. Biodégradation du polyCD

La fonctionnalisation du PLLA par le polyCD nous a mené à conduire une étude de la résorption du dispositif. En effet, intégrer une structure PLLA dans un DMI permet d'obtenir un implant présentant des propriétés mécaniques adéquates tout au long de la cicatrisation. Une fois ce rôle accompli le PLLA se résorbe pour laisser uniquement la partie biostable de l'implant en place. Toutefois, en enrobant la surface des fibres avec un polymère de cyclodextrines, lui-même résorbable, il convient de déterminer que la dégradation de ce dernier n'altère la résorption du textile. L'étude qui suit a consisté à suivre la perte de masse d'un implant 100% PLLA fonctionnalisé plongé dans un batch de PBS.

Pour ce faire, deux séries (n=3) d'échantillons de PLLA vierge et fonctionnalisés à un taux moyen de 26% ont été immergées dans 100 mL de tampon phosphate pH=7,4 et placés à 37°C sous agitation. A intervalles de temps réguliers, les supports sont rincés séchés et pesés et le milieu est remplacé par du PBS « frais ». L'évolution de la masse moyenne des deux séries d'échantillons est exprimée en fonction du temps de séjour dans la solution de PBS (**Figure 68**).

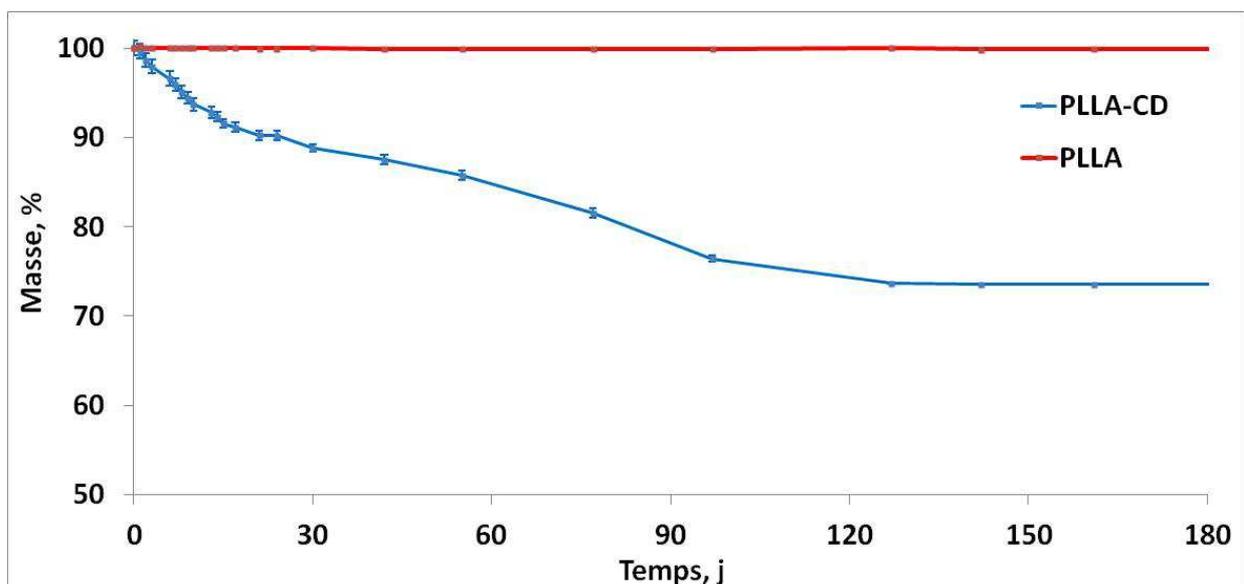


Figure 68 : Evolution de la masse d'échantillons PLLA vierges et fonctionnalisés en fonction de la durée d'immersion dans une solution de PBS

Une perte de masse d'environ 26% des échantillons fonctionnalisés est observable au bout de 120 jours dans le PBS. Cette variation correspond à la dégradation de l'enrobage de polyCD. La masse des échantillons de PLLA vierges reste constante jusqu'à 180 jours après le début de l'expérience.

Le revêtement de cyclodextrines semble se dégrader sans observer de dégradation du support, en 120 jours. Comme le PLLA, le polyCTR-HP β CD est également biorésorbable mais sur une échelle de temps apparemment beaucoup plus courte.

II. Interactions support fonctionnalisé/antibiotique

L'objectif de cette étude est d'établir les capacités d'adsorption/libération des supports à différents taux de polyCD.

Dans un premier temps, les cinétiques d'adsorption ont permis d'évaluer le taux de chargement des échantillons en fonction du temps de séjour dans les solutions de principes actifs. Le taux de chargement en principe actif atteint en 20 minutes, temps maximal acceptable lors d'une intervention en chirurgie herniaire, a été comparé à la quantité maximale obtenue en 24 h d'imprégnation, définie comme la durée conduisant à la saturation du support.

Différentes méthodes (statiques, dynamique) ainsi que divers composition de milieux de libération ont été employés afin de définir les cinétiques de libération des supports fonctionnalisés.

Enfin, dans le cas de la CFX, une étude d'efficacité antibactérienne par antibiogrammes, a permis d'évaluer l'activité des échantillons imprégnés d'antibiotiques et après un séjour dans du plasma sanguin humain.

II.1. Influence de la méthode de stérilisation

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'étude d'adsorption du TBO par les échantillons de PET fonctionnalisés puis stérilisés par EtO ou rayonnement gamma γ , une étude similaire a été menée sur les mêmes échantillons en évaluant l'adsorption de CFX. L'objectif est de mettre en évidence une éventuelle dégradation de la capacité d'adsorption du polymère de CD après stérilisation.

Les quantités d'agent actif adsorbées par les échantillons fonctionnalisés sont largement accrues par la fonctionnalisation, passant de 4 mg/g pour le support vierge à 15,9 mg/g de CFX par le PET fonctionnalisé (**Figure 69**). Il est à souligner que les échantillons n'ont pas été rincés après leur immersion dans la solution de CFX, ce qui explique une quantité non négligeable de CFX mesurée pour le PET vierge. Dans ce cas, la CFX a été emportée dans la solution imprégnant le textile, sans interagir spécifiquement avec le support contrairement aux échantillons modifiés par les CDs.

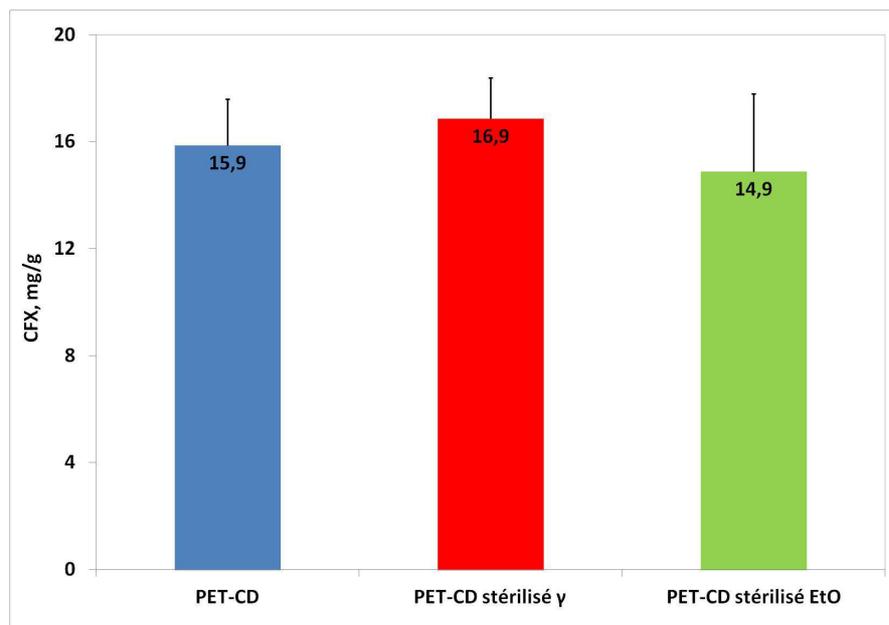


Figure 69 : Quantités de ciprofloxacine adsorbées sur PET en fonction du traitement des fibres

La comparaison de quantités de CFX adsorbées par les échantillons fonctionnalisés et stérilisés ou non, ne permettent pas d'écarter l'une ou l'autre de ces techniques de stérilisation, puisque chacune permet de préserver les propriétés d'adsorption de la CFX ($15,9 \pm 1$ mg de CFX) (**Figure 69**). En effet, ni le rayonnement gamma ni l'adsorption d'oxyde d'éthylène ne semblent altérer la capacité d'adsorption des supports.

Le choix de la méthode de stérilisation a été arrêté sur l'oxyde d'éthylène. Comme il a été précisé auparavant, le PLLA est destiné au développement d'une structure semi-résorbable le combinant avec des fibres de PP lors du tissage. Or le polypropylène est lui altéré par le rayonnement gamma. Dès lors, et dans une volonté d'uniformisation des procédés, il a été convenu de stériliser les échantillons par adsorption/désorption à l'oxyde d'éthylène (EtO).

La quantification de l'EtO résiduel, sur les échantillons fonctionnalisés et stérilisés, n'a pas montrée de résidus supérieurs aux seuils limites.

II.2. Choix de la CD et de l'agent réticulant

Malgré l'obtention de meilleurs taux de fonctionnalisation par l'utilisation du couple de réactifs CTR/HP β -CD, il est apparu important d'évaluer la capacité d'adsorption des supports fonctionnalisés par BTCA/ β -CD (noté PET- BTCA/ β -CD). Des échantillons découpés dans ces 2 types de textiles à des taux de fonctionnalisation identiques de 11%-wt ainsi que dans le PET vierge, ont été imprégnés durant 20 minutes ou 24 h dans des solutions de CFX à 2 g/L (voir 2^{ème}

partie II.D.2). Comme indiqué précédemment, 20 minutes représente la limite de temps acceptable lors d'une intervention chirurgicale et 24 h est considéré comme la durée d'imprégnation à saturation du support. Les quantités adsorbées ont été déterminées et comparées afin d'établir le couple de réactifs qui permettra d'obtenir les meilleures performances en termes de capacité d'adsorption (**Figure 70**).

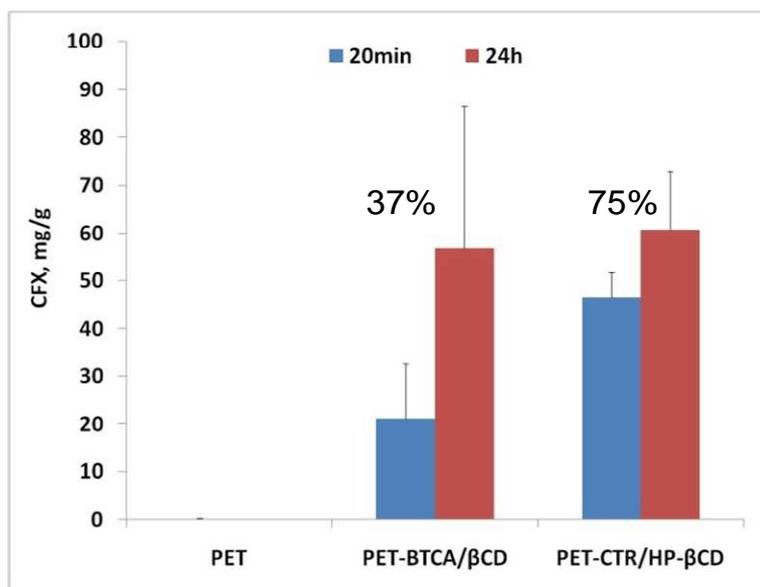


Figure 70 : Comparaison des quantités adsorbées par grammes de supports PET vierges et fonctionnalisés à 11% par BTCA/β-CD et CTR/HPβ-CD- 140°C, 1 h, n=3 – Imprégnation dans la solution de CFX pendant 20 minutes ou 24 heures.

Les échantillons PET vierge, après imprégnation et rinçage, ne libèrent qu'une quantité quasi nulle de CFX (< à 1 mg/g) et ce, quelque soit la durée d'imprégnation (20 minutes et 24 h). Si les supports fonctionnalisés adsorbent tous deux environ 60 mg/g de CFX au bout de 24 h, ils se distinguent lorsque la durée d'imprégnation est réduite à 20 minutes. En effet, le PET-BTCA/βCD n'atteint que 37% de la capacité maximale (20 mg/g) alors que le PET-CTR/HPβCD atteint 75% de son chargement.

II.3. Cinétique d'adsorption de la CFX

L'efficacité clinique des supports fonctionnalisés implique des quantités suffisantes de principe actif disponibles sur le dispositif. Celles-ci dépendent de la quantité de polymère de cyclodextrine fixé sur les fibres et au temps d'imprégnation du support dans la solution de PA.

Néanmoins, cette dernière est directement liée à la capacité d'adsorption du textile mais également au temps de séjour dans une solution du principe actif visé.

Cette étude a donc consisté à déterminer la quantité adsorbée par les échantillons de PET et de PLLA fonctionnalisés à différents taux de CD et ce, en fonction de la durée d'imprégnation dans une solution de CFX 2 g/L (2^{ème} Partie II.D.2). Les durées de contact sont de 5 minutes à 24 h. Dans un souci de clarté, les résultats présentés se limiteront à 120 minutes d'imprégnation car le système n'évolue plus jusqu'à 24 heures, considérée comme la durée d'adsorption à saturation du support.

II.3.1. PET

Dans un premier temps, des échantillons issus des supports PET vierge et fonctionnalisés ont été imprégnés pendant une durée variable dans la CFX (**Figure 71**).

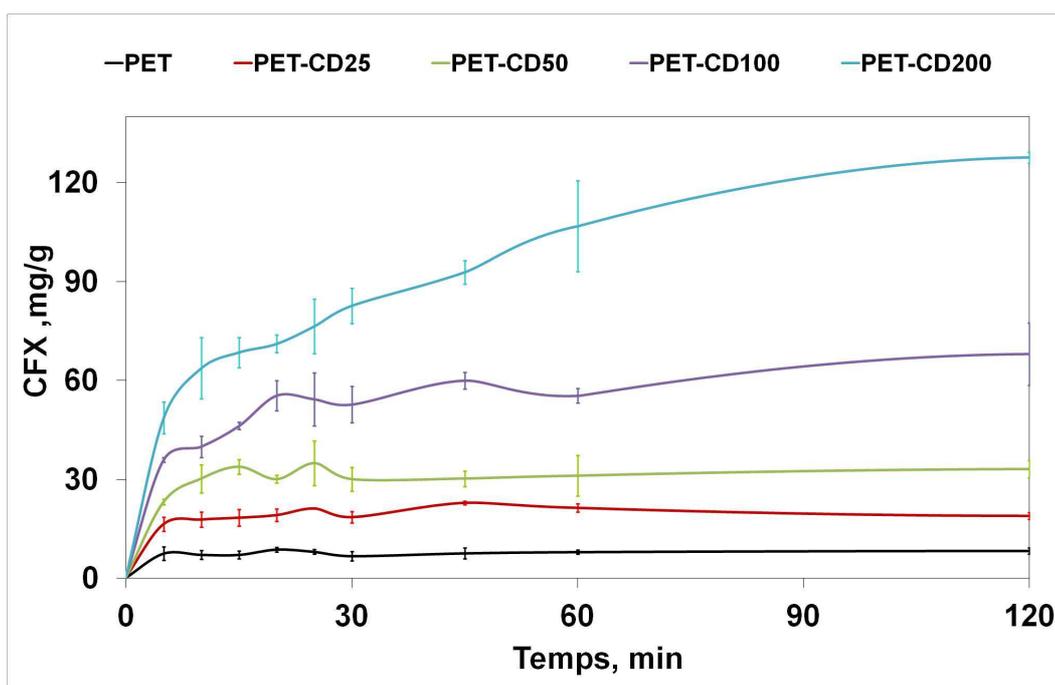


Figure 71 : Quantités adsorbées par les supports PET à différents taux de fonctionnalisation en fonction de la durée d'imprégnation dans une solution de CFX à 2 g/L

Il apparaît sur la **Figure 71** que la quantité maximale de CFX chargée sur les textiles PET-CD est directement liée au taux de fonctionnalisation, à l'instar du TBO car un plateau était atteint à partir de PET-CD₅₀.

La durée d'imprégnation utile pour atteindre le plateau de saturation varie avec le taux de polyCD, comme par exemple 5 minutes pour le PET-CD₂₅ et plus de 120 minutes pour le PET-CD₂₀₀.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la cure de hernie inguinale par pose d'implants est un acte chirurgical accompli sur un laps de temps assez court, qui n'excède pas les 20 minutes. Au bloc, la durée d'imprégnation de l'implant dans la solution d'AB est donc limitée. Nous avons comparé la quantité de CFX chargée sur le dispositif en 20 minutes à celle chargée en 24 heures, temps estimée pour atteindre la saturation du support (**Figure 72**).

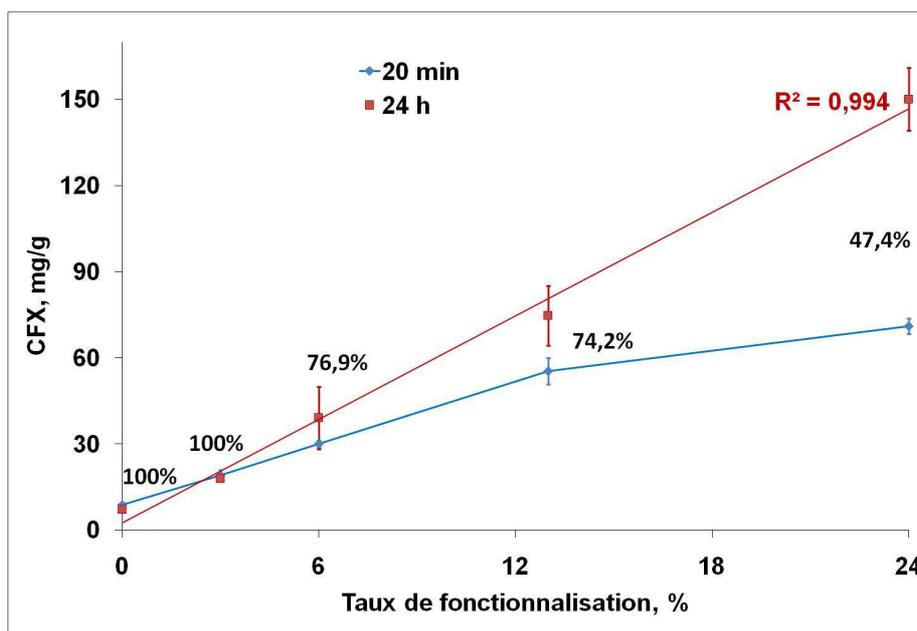


Figure 72 : Quantités de CFX adsorbées après 20 minutes et 24 heures d'imprégnation en fonction du taux de fonctionnalisation des textiles PET-CD

Le taux de chargement en CFX des supports augmentent avec le taux de cyclodextrines notamment après 24 heures d'imprégnation. Pour le PET-CD₂₅ (3%), on atteint la saturation de l'échantillon après 20 minutes d'immersion dans la solution de CFX. En revanche, pour les textiles à degrés de fonctionnalisation supérieurs, on n'atteint pas la saturation. En particulier le support PET-CD₂₀₀ qui n'est chargé qu'à 47,4% par rapport à sa capacité maximale d'adsorption en CFX. Ceci peut être attribué à l'épaisseur de la couche d'enrobage polymère et donc à une diffusion lente du principe actif dans le cœur du réseau de polyCD

II.3.2. PLLA

Les cinétiques d'adsorption des échantillons de PLLA vierges et fonctionnalisés ont été établies dans les mêmes conditions.

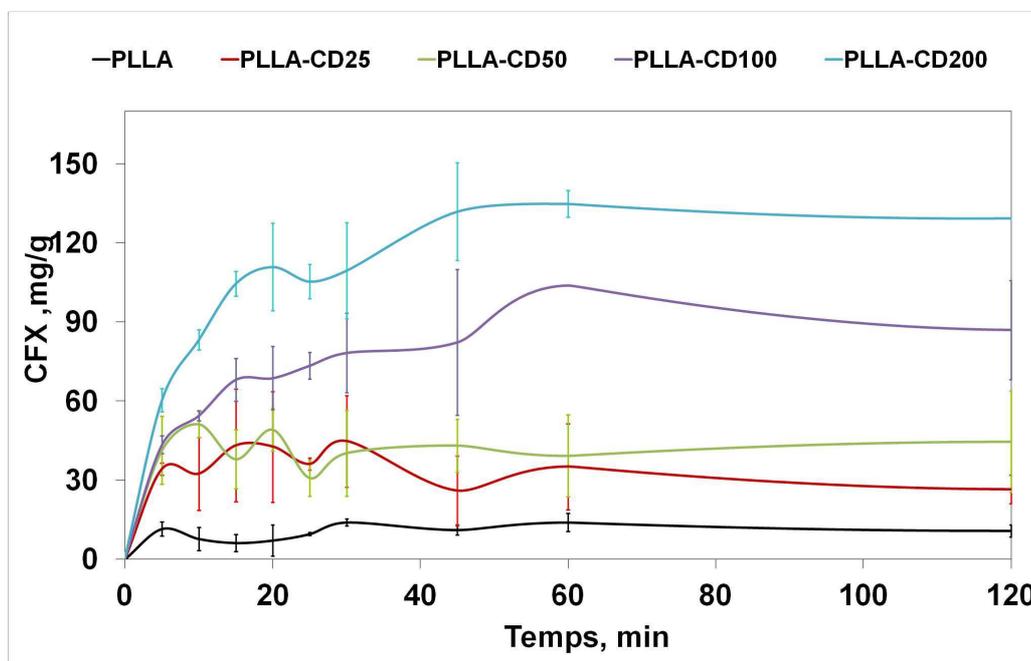


Figure 73 : Quantités adsorbées par les supports PLLA à différents taux de fonctionnalisation en fonction de la durée d'imprégnation dans une solution de CFX à 2 g/L

Les cinétiques d'adsorption de la CFX par les échantillons en PLLA apparaissent moins lisses que celles obtenus pour le PET, l'erreur est due au degré de fonctionnalisation moins constant d'une pastille à l'autre. Comme dans le cas du PET, les quantités de CFX adsorbées augmentent avec le taux de polyCD présent sur les supports (**Figure 73**).

Néanmoins, la quantité de CFX adsorbée par les supports croît avec le taux de fonctionnalisation. Le PLLA vierge atteint une valeur stable après 5 minutes dans la solution de CFX contre 60 minutes pour les échantillons fonctionnalisés.

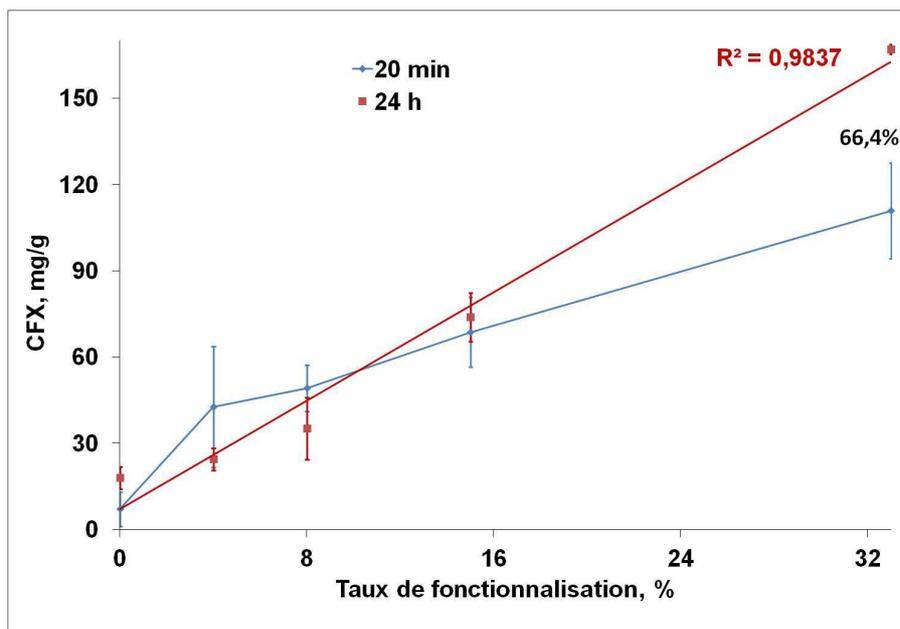


Figure 74 : Quantités de CFX adsorbées après 20 minutes et 24 heures d'imprégnation en fonction du taux de fonctionnalisation des supports PLLA

Nous avons comparé les quantités adsorbées par les différents types d'échantillons PLLA en 20 minutes et 24 heures d'imprégnation dans la CFX à 2 g/L (**Figure 74**).

Pour les supports de degré de fonctionnalisation inférieur ou égal à 15%, la saturation est obtenue dès 20 minutes. Les quantités de CFX chargées en 20 minutes sur les supports PLLA-CD₂₅ et PLLA-CD₅₀ sont supérieures à celles adsorbées après 24 heures d'imprégnation. Seul le textile PLLA-CD₂₀₀ qui possède le plus haut taux de fonctionnalisation (33%-wt), présente une différence suffisamment importante pour pouvoir conclure qu'il n'adsorbe que 66,4% de la quantité maximale de CFX après 20 minutes d'imprégnation.

II.4. Cinétiques de libération

Les performances en termes d'activité prolongée des supports vierges et fonctionnalisés ont été comparées dans un premier temps dans l'eau pure, puis dans le PBS.

Dans le corps, les fluides biologiques sont renouvelés en permanence, c'est pourquoi le facteur de renouvellement du milieu a été introduit dans les paramètres de l'étude. Ainsi, pour les systèmes semi-dynamique « batch », deux expériences ont été menées en parallèle pour les 2 types de milieu en remplaçant soit la totalité du milieu à chaque mesure (renouvellement total), soit uniquement 10% (renouvellement partiel). De plus, un système dynamique de type USP-IV a également été utilisé à un débit de 1 mL/min de PBS, assurant un renouvellement continu du milieu de libération.

Dans chaque cas, on mesurera le temps nécessaire à la libération de 100% de la CFX préalablement chargée sur le dispositif ; lorsque les incertitudes sur ces valeurs seront trop importantes, nous prendrons plutôt en compte la durée nécessaire à la libération de 80% de PA.

II.4.1. Libération en système semi-dynamique « batch »

II.4.1.a. Libération dans l'eau pure

Les cinétiques de libération de la CFX dans l'eau par les échantillons de PET-CD à différents taux de fonctionnalisation et en appliquant deux types de renouvellement de milieu (10% et 100%) sont présentées dans la **Figure 75**. Les durées nécessaires à la libération de la totalité ou de 80% de la CFX adsorbée sont résumées dans le **Tableau 14**.

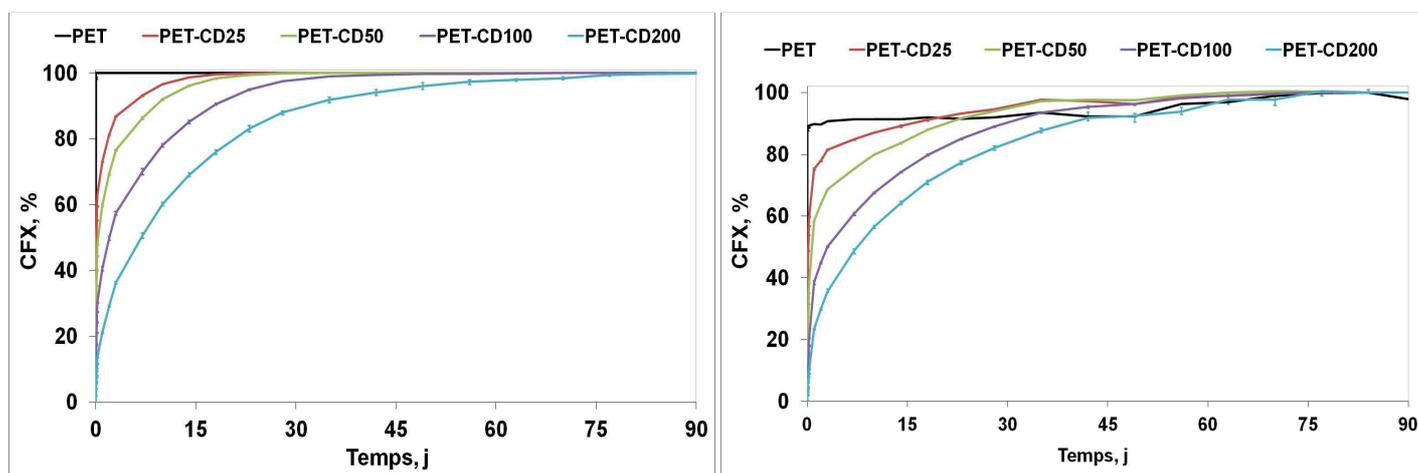


Figure 75 : Cinétiques de libération de CFX par les supports PET à différents taux de fonctionnalisation en fonction du temps de séjour dans l'eau pure – Renouvellement 100% (gauche) et 10% (droite) – Imprégnation 20 minutes dans une solution de CFX à 2 g/L, n=3

Tableau 14 : Récapitulatif des durées de libération dans l'eau pure de 100% et 80% de la CFX adsorbée par les PET-CD – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3- Renouvellement 100% et 10%

	CFX libérée	PET-CD ₂₅ 3% - wt	PET-CD ₅₀ 6%-wt	PET-CD ₁₀₀ 13%-wt	PET-CD ₂₀₀ 24%-wt
Renouvellement 100%	100%	14 j	23 j	35 j	70 j
	80%	2 j	4 j	12 j	20 j
Renouvellement 10%	100%	28j	49 j	63 j	77 j
	80%	3	10 j	18 j	25 j

Les courbes présentées dans la **Figure 75** montrent que les cinétiques de libération dépendent du taux de fonctionnalisation des supports ; plus celui-ci est élevé, plus le temps de libération de la CFX augmente. Pour un taux nul, on observe une libération immédiate de la totalité de la CFX.

Les cinétiques sont plus rapides dans le milieu renouvelé à 100% que dans celui renouvelé partiellement (10%), comme on peut l'observer dans le **Tableau 14**, que l'on considère 100% ou 80% de la libération de CFX adsorbée sur le dispositif.

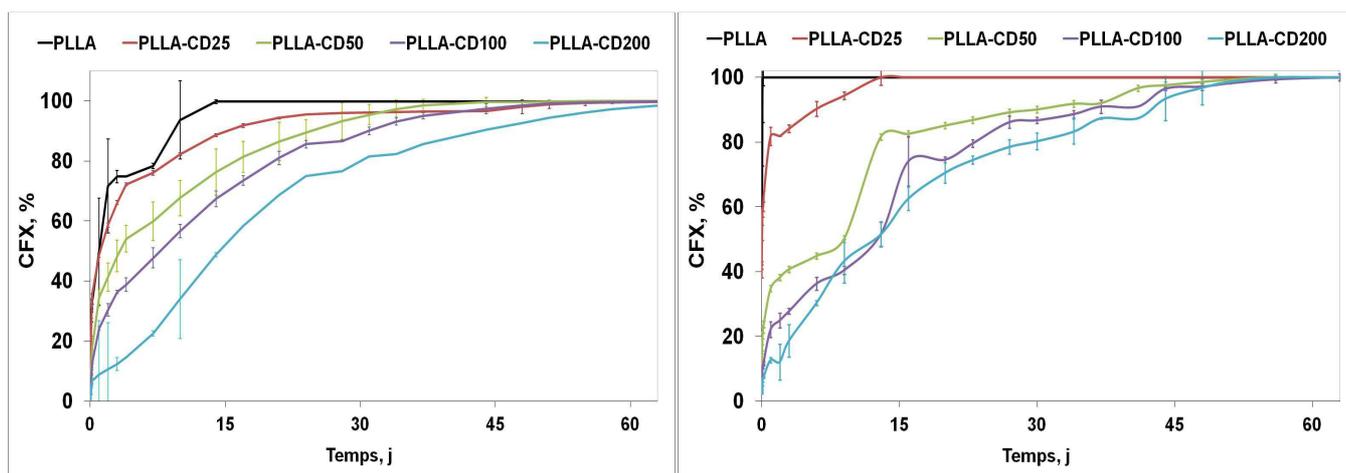


Figure 76 : Cinétiques de libération de CFX par les supports PLLA à différents taux de fonctionnalisation en fonction du temps de séjour dans l'eau pure – Renouvellement 100% (gauche) et 10% (droite) – Imprégnation 20 minutes dans une solution de CFX à 2 g/L, n=3

Tableau 15 : Récapitulatif des durées de libération dans l'eau pure de 100% et 80% de la CFX adsorbée par les PLLA-CD – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3- Renouvellement 100% et 10%

	CFX libérée	PLLA-CD ₂₅ 4% - wt	PLLA-CD ₅₀ 8%-wt	PLLA-CD ₁₀₀ 15%-wt	PLLA-CD ₂₀₀ 33%-wt
Renouvellement 100%	100%	65 j	55 j	65 j	78 j
	80%	8 j	8 j	15 j	20 j
Renouvellement 10%	100%	4 j	13 j	63 j	56 j
	80%	2 j	22 j	23 j	30 j

Les supports en PLLA fournissent des profils de courbes moins lisses que ceux obtenus avec les textiles PET (**Figure 76**). Cette différence résulte du taux de polyCD des échantillons de PLLA-CD présentant une marge d'erreur supérieure (écarts-types importants) ainsi que de l'absence de rinçage des pastilles de textiles après imprégnation dans la solution de CFX 2g/L.

Malgré cela, la tendance reste similaire avec un accroissement des durées de libération avec le taux de fonctionnalisation des supports (**Tableau 15**). De même, le dispositif est plus rapidement

épuisé en CFX lorsque le renouvellement du milieu est de 100% en raison du déplacement de l'équilibre qui favorise la désorption du PA. Un support PLLA-CD₂₀₀ libéré 80% de son chargement de CFX en 20 jours si le milieu est intégralement renouvelé à chaque mesure. Cette durée est prolongée à 30 jours si l'eau n'est que partiellement remplacée.

II.4.1.b. Libération dans le PBS

Une étude similaire à celle de libération dans l'eau pure a été réalisée dans un tampon phosphate, le PBS.

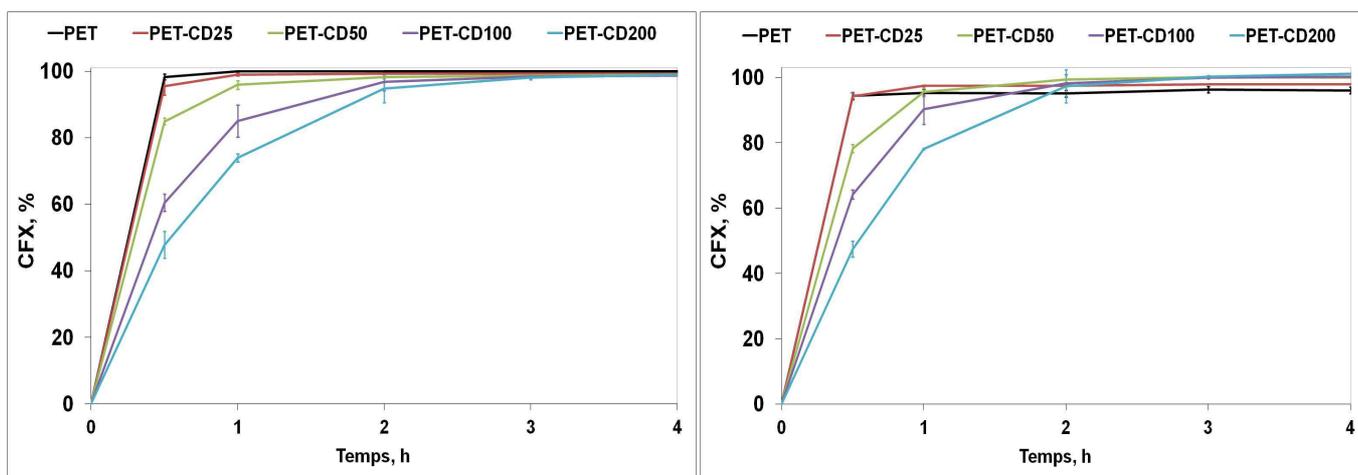


Figure 77 : Cinétiques de libération de CFX par les supports PET à différents taux de fonctionnalisation en fonction du temps de séjour dans le PBS – Renouvellement 100% (gauche) et 10% (droite) – Imprégnation 20 minutes dans une solution de CFX à 2 g/L, n=3

Tableau 16 : Récapitulatif des durées de libération dans le PBS de 100% et 80% de la CFX adsorbée par les PET-CD – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3- Renouvellement 100% et 10%

	CFX libérée	PET-CD ₂₅ 3% - wt	PET-CD ₅₀ 6%-wt	PET-CD ₁₀₀ 13%-wt	PET-CD ₂₀₀ 24%-wt
Renouvellement 100%	100%	1 h	2 h	4 h	4 h
	80%	0 h 20	0 h 30	1 h 45	2 h 30
Renouvellement 10%	100%	1 h	2 h	3 h	3 h
	80%	0 h 20	0 h 30	0 h 45	1 h

La Figure 77 montre que les échelles de temps entre les libérations dans l'eau et dans le PBS sont très raccourcies. Les durées de libérations des supports PET-CD se chiffrent en quelques heures alors qu'elles s'étalent sur plusieurs semaines dans l'eau. Cette libération rapide engendre des marges d'erreurs importantes et ne permet pas de retrouver la tendance observée pour l'eau, soit

un renouvellement important (100%) qui épuise la prothèse plus vite (**Tableau 16**) que lors d'un renouvellement de 10%.

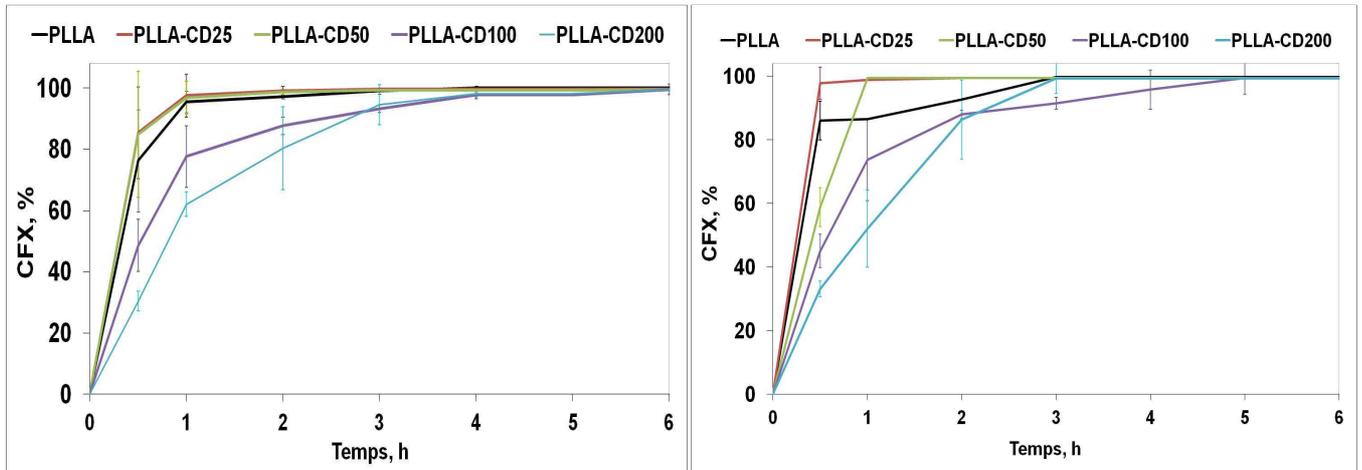


Figure 78 : Cinétiques de libération de CFX par les supports PLLA à différents taux de fonctionnalisation en fonction du temps de séjour dans le PBS– Renouvellement 100% (gauche) et 10% (droite) – Imprégnation 20 minutes dans une solution de CFX à 2 g/L, n=3

Tableau 17 : Récapitulatif des durées de libération dans le PBS de 100% et 80% de la CFX adsorbée par les PLLA-CD – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3- Renouvellement 100% et 10%

	CFX libérée	PLLA-CD ₂₅ 4% - wt	PLLA-CD ₅₀ 8%-wt	PLLA-CD ₁₀₀ 15%-wt	PLLA-CD ₂₀₀ 33%-wt
Renouvellement 100%	100%	3 h	6 h	6 h	6 h
	80%	0 h 30	0 h 30	1 h 30	2 h
Renouvellement 10%	100%	1 h 15	1 h	3 h	4 h 45
	80%	0 h 20	0 h 45	1 h 45	1 h30

La **Figure 78** montre que la cinétique de libération des supports PLLA-CD dans des milieux renouvelés à 10 et 100% ne répond pas à la logique observée dans l'eau, puisque la tendance opposée est observée : les supports s'épuisent plus rapidement dans le milieu dont la dynamique de renouvellement est la plus faible (10%) (**Tableau 17**). On ne peut expliquer ces résultats plutôt surprenants par l'incertitude constamment observée sur les supports en PLLA.

II.4.2. Système dynamique USP-IV

Les renouvellements de milieu appliqués lors des études précédentes représentent des flux lents (de l'ordre de 2 µL/min dans le cas d'un renouvellement 100% tous les 24 heures). Il est malheureusement difficile de déterminer le flux des fluides biologiques qui entoureront la

prothèse après l'implantation. Il a néanmoins été convenu d'étudier le comportement de l'enrobage de cyclodextrines par libération de CFX soumis à un milieu dit dynamique de PBS à un débit important de 1 mL/min. Cette étude a été réalisée avec des échantillons de PET à différents taux de fonctionnalisation.

Il est à souligner que les échantillons ont ici été rincés 1 minute dans l'eau distillée et que la CFX dosée à cette occasion a été considéré comme libérée au temps t=0.

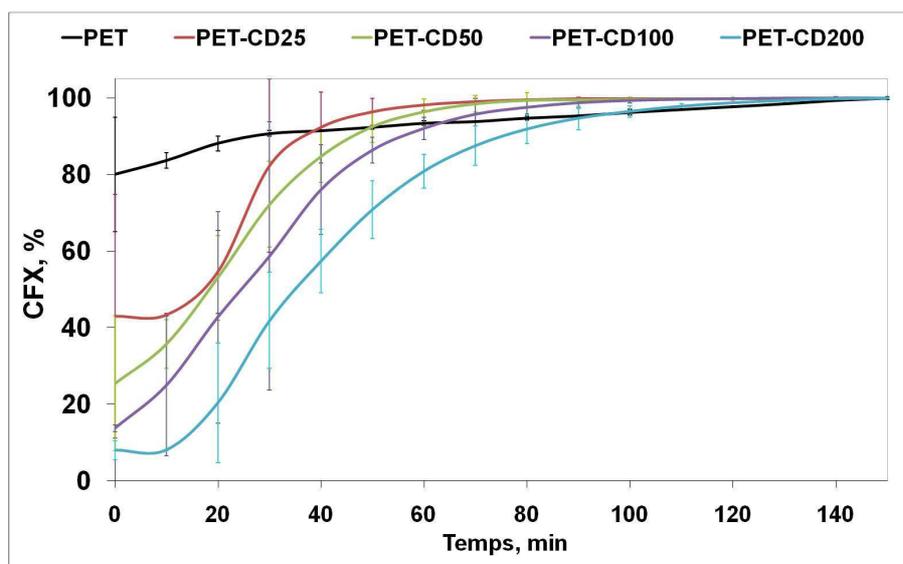


Figure 79 : Cinétiques de libération de CFX par les supports PET à différents taux de fonctionnalisation dans le PBS– Débit 1ml/min – Imprégnation 20 minutes dans une solution de CFX à 2 g/L, n=3

Tableau 18 : Récapitulatif des durées de libération dans le PBS de 100% et 80% de la CFX adsorbée par les PET-CD – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3- Débit 1 mL/min

	CFX libérée	PET-CD ₂₅ 3% - wt	PET-CD ₅₀ 6%-wt	PET-CD ₁₀₀ 13%-wt	PET-CD ₂₀₀ 24%-wt
Renouvellement	100%	90 minutes	110 minutes	140 minutes	150 minutes
100%	80%	30 minutes	35 minutes	45 minutes	60 minutes

Les durées de libération de CFX augmentent avec le taux de fonctionnalisation (**Figure 79**). Celles-ci passent, pour une libération totale, de 30 minutes pour un échantillon vierge à plus de 140 minutes dans le cas des taux importants de polyCD (PET-CD₁₀₀ et PET-CD₂₀₀) (**Tableau 18**).

Même dans des conditions dynamiques, le système présente des durées de libération prolongée vis-à-vis d'un textile vierge sans dégradation de l'enrobage de polyCD.

II.4.3. Etude de l'activité microbiologique

Afin de valider l'efficacité antibactérienne des implants fonctionnalisés, les échantillons de PET et PET-CD ont été activés par imprégnation dans une solution de CFX 2g/L pendant 20 minutes puis placés dans du plasma humain issu de sang total. Les échantillons sont extraits régulièrement et placés sur une gélose Mueller Hintonensemencée par une souche bactérienne. Après 24 heures d'incubation, l'activité antibactérienne des implants est déterminée par la mesure du rayon d'inhibition. La CFX étant un antibiotique à large spectre, deux souches bactériennes ont été testés, *Escherichia coli* (*E.coli*, Gram -) et *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*, Gram +)

II.4.4. Efficacité antibactérienne sur *E.coli*

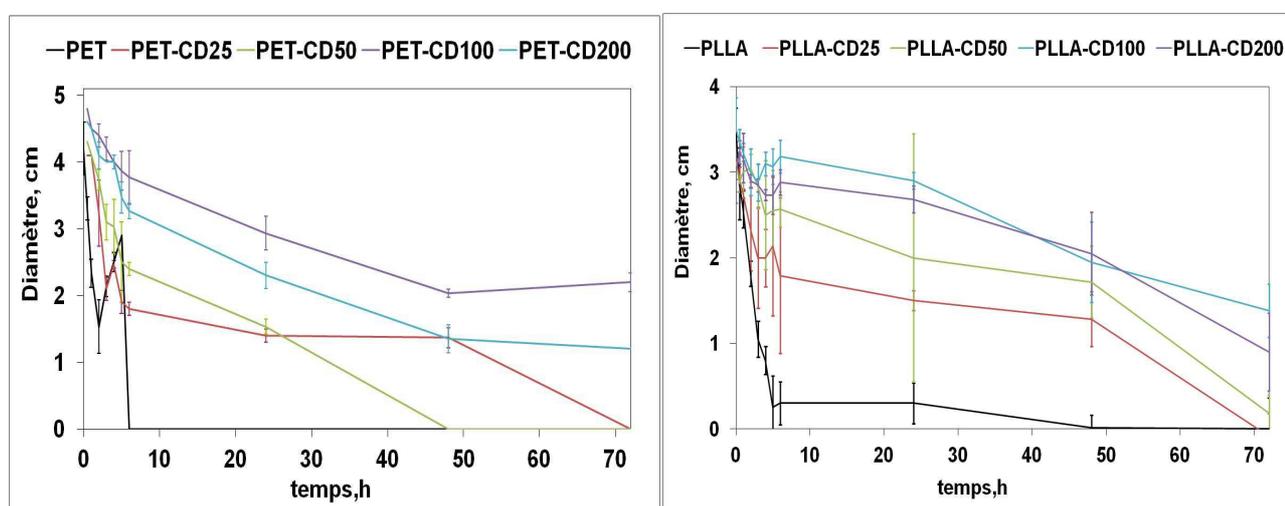


Figure 80 : Diamètre du halo d'inhibition en fonction du temps de séjour dans le plasma des supports PET et PLLA – *E.coli* – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3

Pour les 2 supports, la durée d'efficacité des supports fonctionnalisés (> 48h) est très supérieure à celle d'un échantillon vierge (6h). L'évolution des courbes d'activité antibactérienne dépend du degré de fonctionnalisation des échantillons de PET et de PLLA. Pour les échantillons à très fort taux de fonctionnalisation (CD₁₀₀ et CD₂₀₀), l'efficacité antibactérienne se prolonge au-delà de 72 h après le début de la libération.

Ces résultats montrent que même en milieu plasma, très riche en composés susceptibles de forcer la libération de la CFX par le polyCD, le système permet une libération et donc une efficacité prolongée.

II.4.5. Efficacité antibactérienne sur *S.aureus*

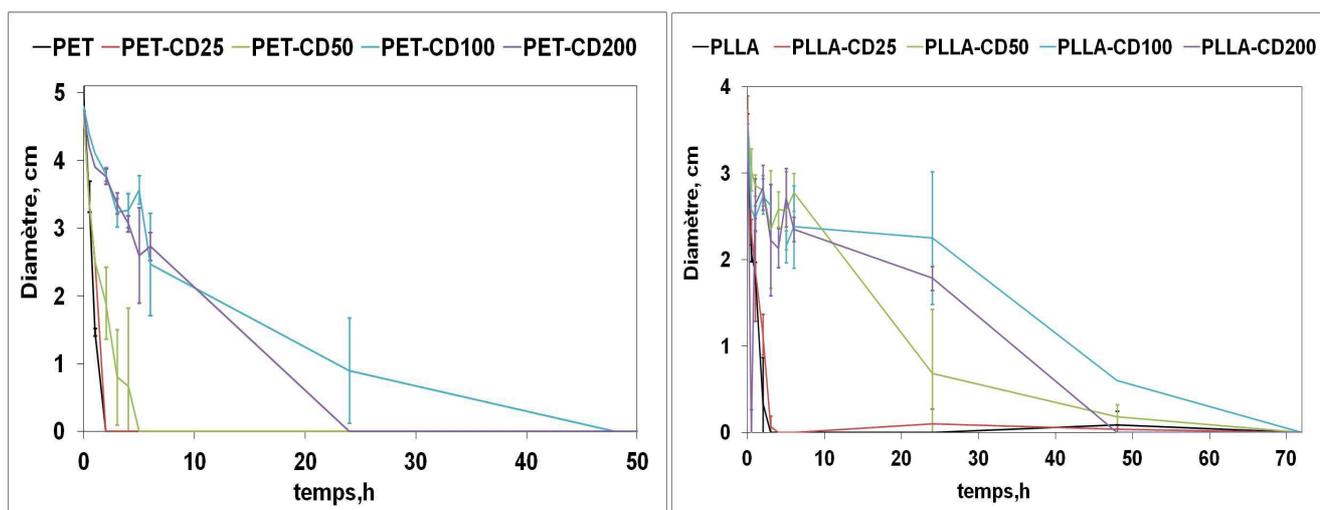


Figure 81 : Diamètre du halo d'inhibition en fonction du temps de séjour dans le plasma des supports PET et PLLA – *S.aureus* – Imprégnation 20 minutes, CFX 2 g/L, n=3

La Figure 81 montre que, quelque soit le textile PET ou PLLA, les échantillons à faibles taux de fonctionnalisation CD₂₅₋₅₀ présentent une activité sans intérêt car similaire au support vierge. Seuls les échantillons CD₁₀₀ et CD₂₀₀ présentent une activité prolongée. Il apparaît néanmoins que l'activité des supports CD₁₀₀ soit plus prononcée que celle des textiles CD₂₀₀. Ce phénomène confirme les résultats observés lors de l'étude des cinétiques d'adsorption et qui démontrait un chargement incomplet des échantillons à forts taux de fonctionnalisation après 20 minutes d'imprégnation dans une solution de CFX.

III. Interactions support fonctionnalisé/anesthésique local

La ciprofloxacine et ses interactions avec le revêtement de cyclodextrines seul et sur support, ont déjà fait l'objet de travaux publiés du laboratoire [161, 183, 194, 211]. Ces résultats ont toutefois montré la formation de complexe d'inclusion 1 :1, de constante d'association faible.

Ce projet introduit l'utilisation du polyCD pour la libération prolongée d'anesthésiques locaux, plus particulièrement la lidocaïne et la ropivacaïne. Comme il a été précisé dans la littérature, des études d'inclusion de ces deux molécules avec différentes cyclodextrines ont abouti à des constantes d'inclusion très faibles et des complexes de type 1 :1.

Dans cette étude, deux techniques classiquement employées pour caractériser les interactions moléculaires, comme la RMN du proton ou l'électrophorèse capillaire, seront employés.

Afin de fournir une étude fondamentale claire et complète des interactions, seule la ropivacaïne a été étudiée en RMN et électrophorèse capillaire.

III.1. Etude de la formation du complexe d'inclusion par RMN

Les propriétés d'adsorption/libération du principe actif par le dispositif sont avant tout issues de ses interactions avec la cyclodextrine, voir même avec la cyclodextrine polymérisée. Cette étude a donc débuté par une investigation de ces interactions en solution. En effet, il est impossible selon les techniques actuelles d'observer de façon directe la formation d'un complexe d'inclusion sur une phase solide. Dans ce dernier cas, les preuves de l'inclusion sont souvent indirectes, et cette approche peut donc être admise avec certaines réserves.

Ainsi une étude par RMN en solution permet d'observer directement l'existence du complexe d'inclusion, voir éventuellement d'autres types d'interactions.

Cette étude a été menée dans un premier temps avec la β CD, puis le dérivé hydroxypropyl HP β CD et enfin avec le polymère polyCTR-HP β CD. Le choix de la β CD s'explique par son

spectre en RMN du proton ^1H mieux défini que celui de la HP β CD dont les substituants démultiplient les signaux qui sortent sous forme de pics moins bien résolus.

Lors de l'inclusion d'une molécule invitée dans la cavité du macrocycle, le changement d'environnement chimique des protons internes (H3 et H5) modifie leur déplacement chimique sur le spectre RMN, ce qui permet de caractériser la complexation.

La numérotation des protons de la β CD ainsi qu'une représentation de leur position sont présentées dans la **Figure 82**.

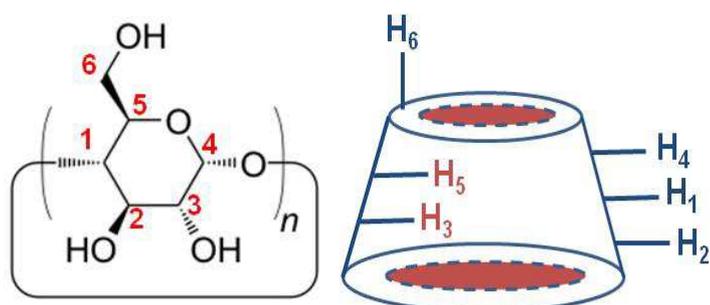


Figure 82 : Numérotation des protons de la β CD et représentation schématique de leur position sur le macrocycle

Le spectre RMN ^1H de la β CD ainsi que l'attribution des pics sont présentés sur la **Figure 83** et dans le **Tableau 19**.

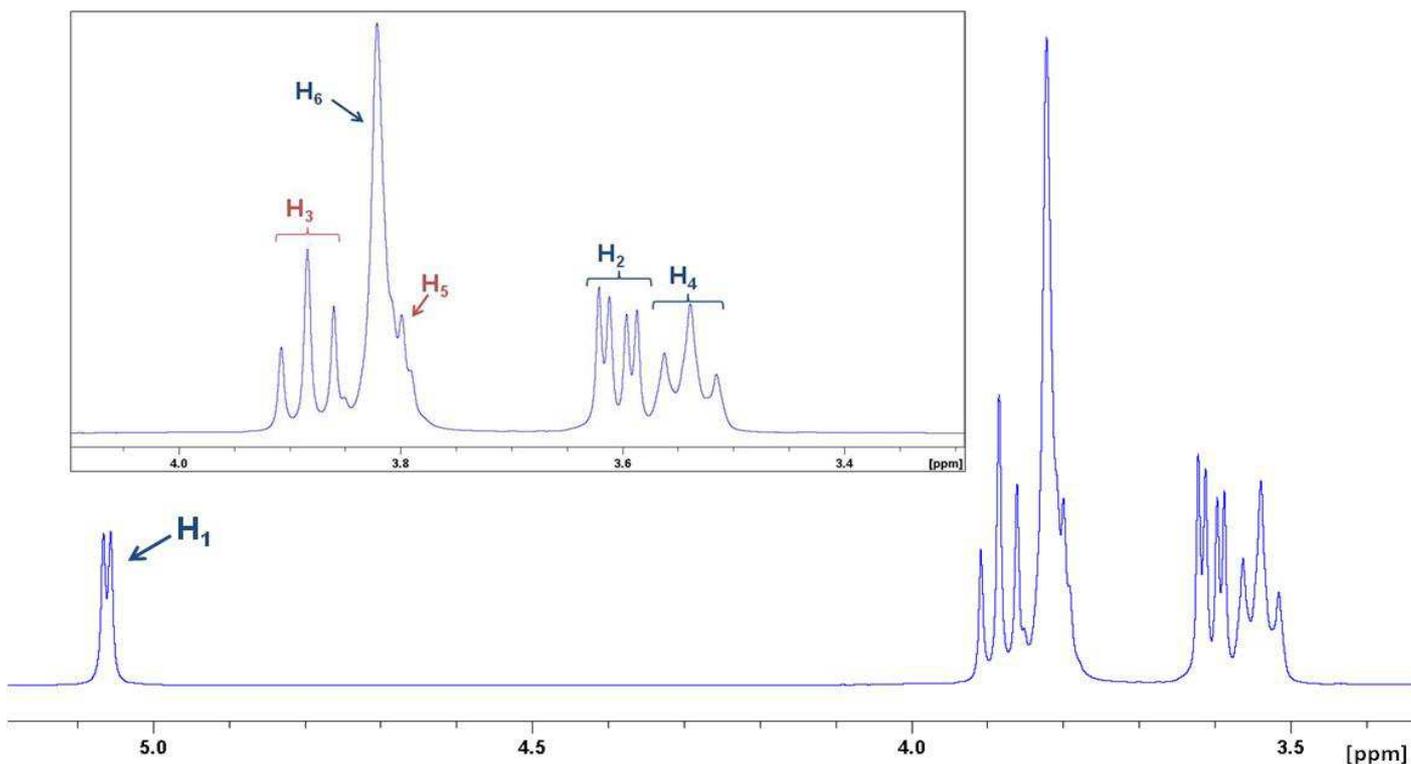


Figure 83 : Spectre RMN ^1H de la βCD dans la D_2O

Tableau 19 : Attribution des signaux du spectre RMN ^1H de la βCD dans le D_2O (10 mM)

Protons	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6
δ (ppm)	5,06	3,61	3,88	3,52	3,8	3,82
Multiplicité	Doublet	Doublet de doublet	Triplet	Triplet	Multiplet	Multiplet

La numérotation des protons de l'HP βCD est décrite dans la Figure 84.

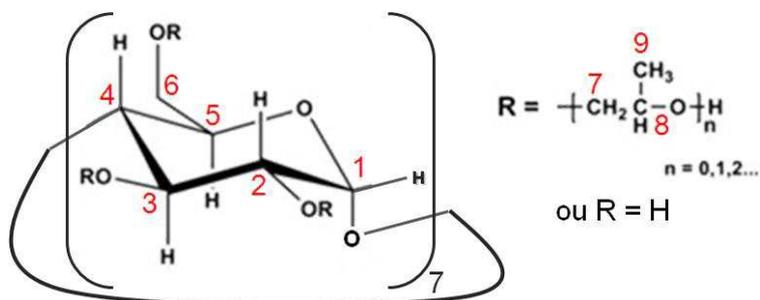


Figure 84 : Numérotation des protons de l'HP βCD

Le spectre RMN ^1H et l'attribution des pics de ce spectre sont présentés dans la Figure 84 et le Tableau 20.

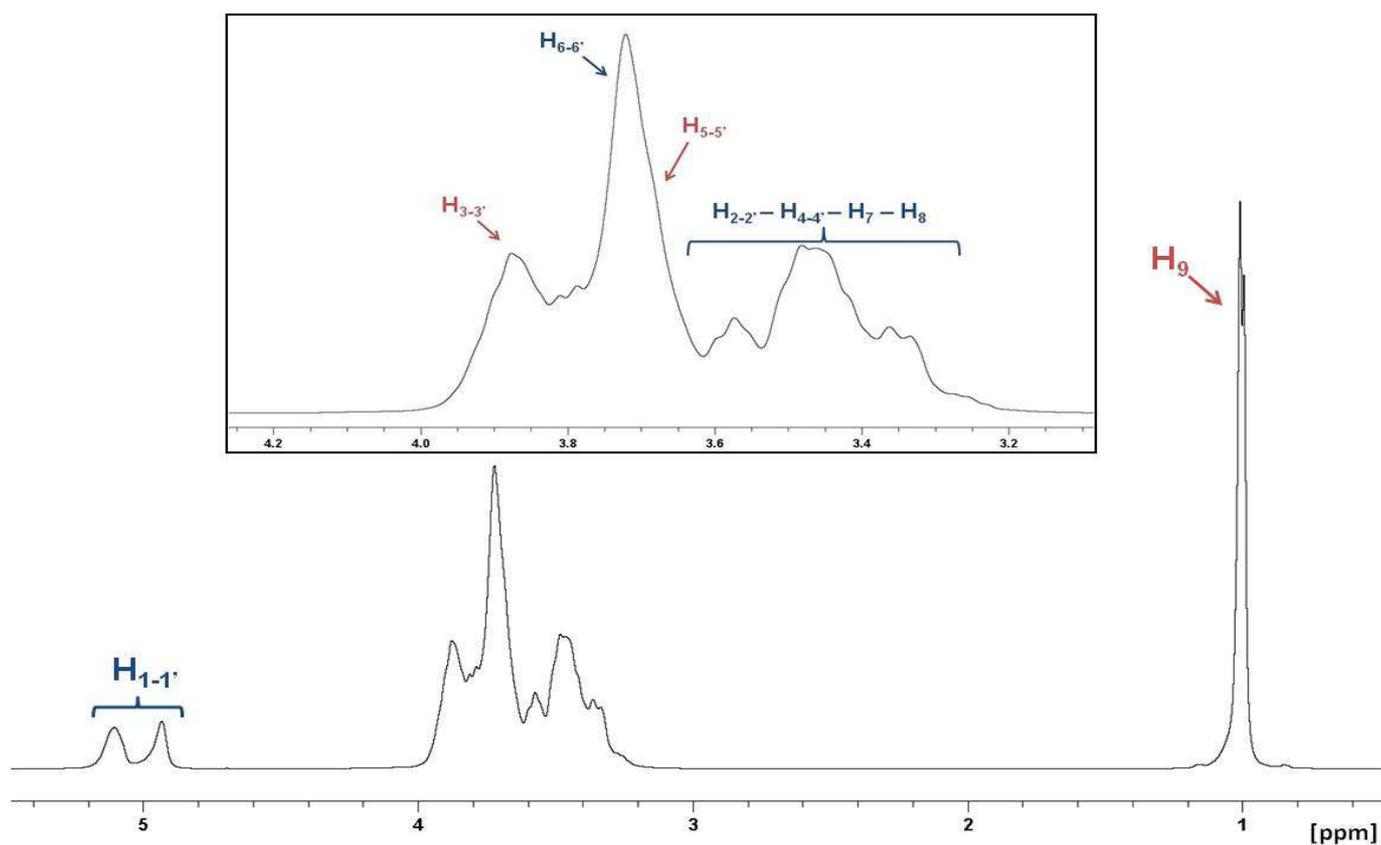


Figure 85 : Spectre RMN ^1H de l'HP β CD dans le D_2O

Tableau 20 : Attribution des pics du spectre RMN ^1H de la HP β CD dans le D_2O (10 mM)

Protons	$\text{H}_{1-1'}$	$\text{H}_{2-4-7-9}$	H_3	H_5	$\text{H}_{6-6'}$	H_9
δ (ppm)	4,96-5,05	3,2-3,62	3,87	3,68	3,71	1,01
Multiplicité	Doublet de doublet	Multiplet	Multiplet	Multiplet	Multiplet	Multiplet

Le spectre de l'HP β CD est moins bien défini que celui de la β CD du fait de sa substitution partielle ($MS = 0,65$), qui dédouble la majorité des pics des protons du macrocycle.

La numérotation des carbones et donc des protons correspondants du polyCTR-HP β CD est présentée par la Figure 86.

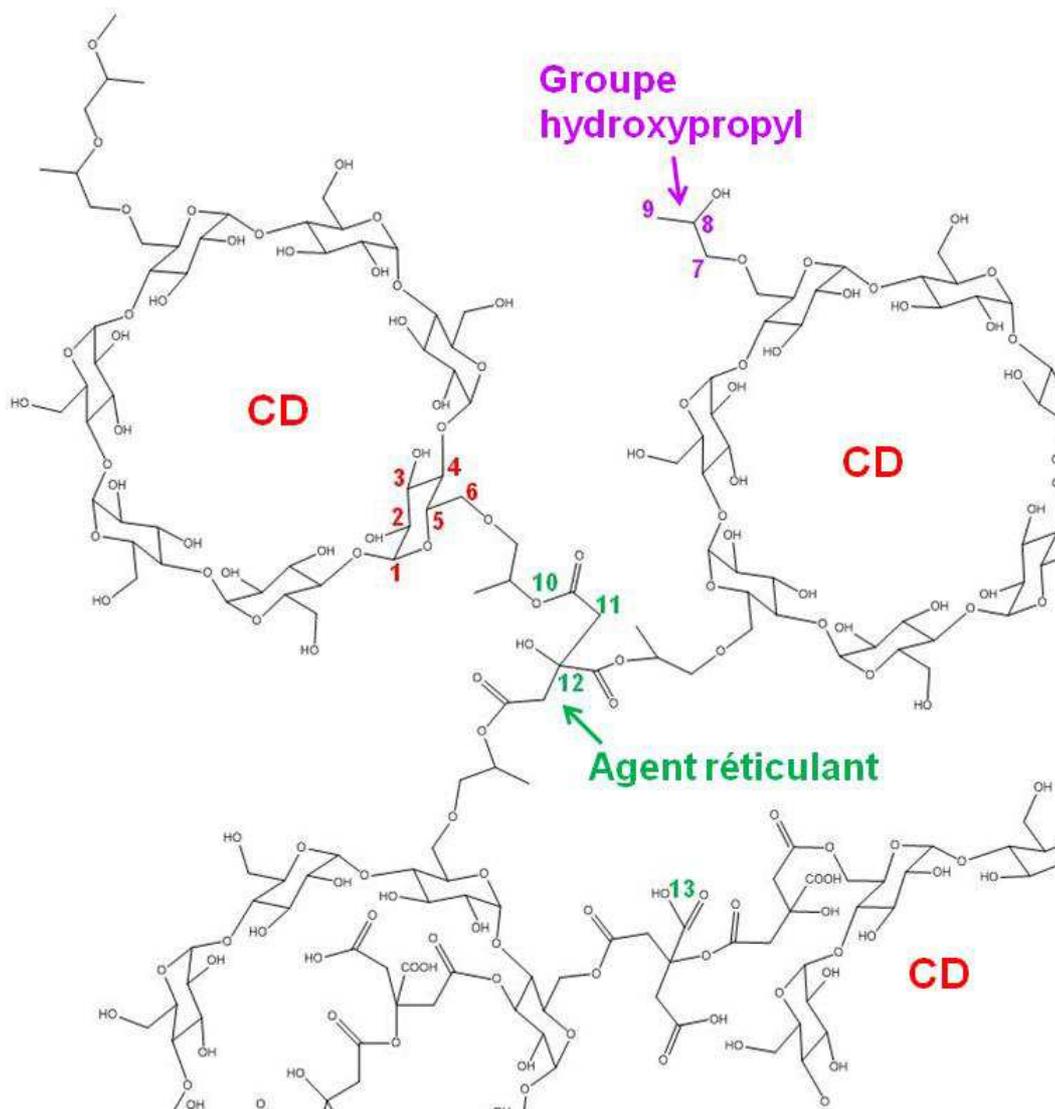


Figure 86 : Numérotation des carbones du polyCTR-HPβCD

Le spectre RMN 1H du polyCTR-HPCD est présenté dans la Figure 87.

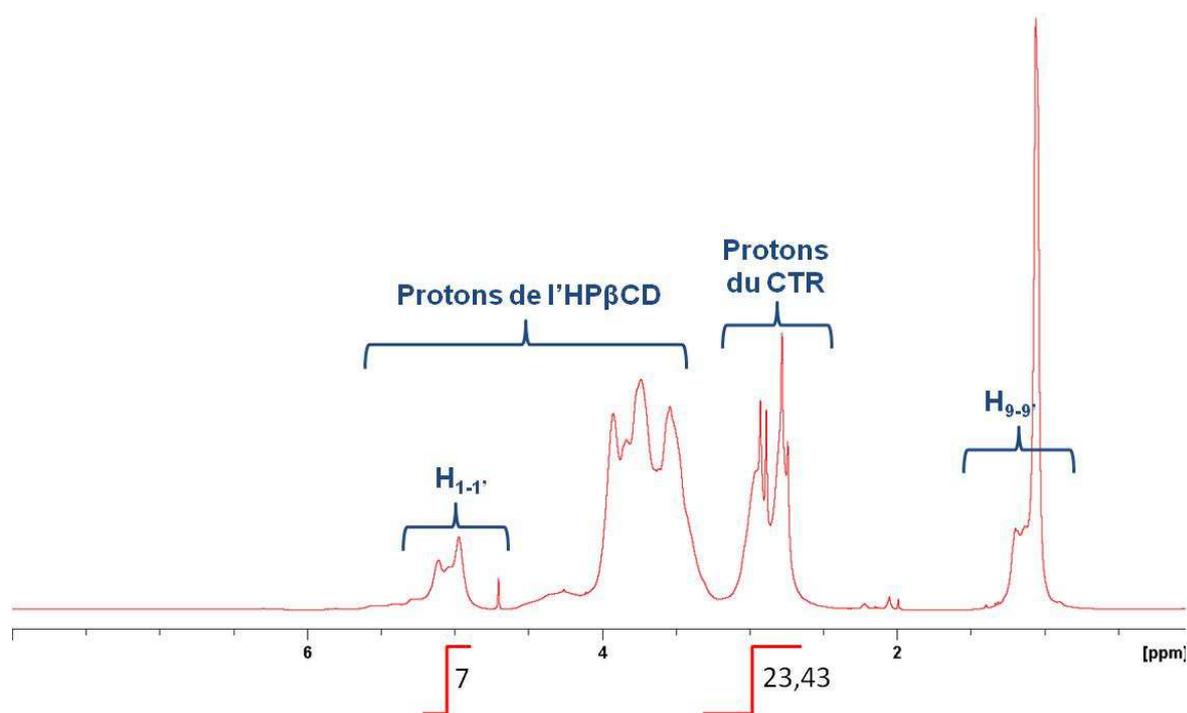


Figure 87 : Spectre RMN 1H du polyCTR-HPβCD dans le D₂O (10mM)

L'attribution des pics du spectre du polymère CTR-HPβCD est compliqué de par la multiplication des signaux du à la multitude d'environnements chimiques différents de chaque type de proton. Il est néanmoins possible d'identifier les massifs correspondant à la cyclodextrine (1-1,4 ppm et 3,2-5,5 ppm) et à l'agent réticulant (2,5-3,2 ppm).

Bakkour propose une méthode pour déterminer le taux de réticulation à partir du spectre du polyCD [212]. Le taux de réticulation correspond aux nombres de substitutions d'une cyclodextrine par des chaînes d'acides citriques. En déterminant l'intégration des protons de l'acide citrique H₁₁ (2 CH₂ soit 4 protons par réticulant) en fonction de celle des protons H₁ de la cyclodextrine (7H par unité cyclodextrines), on obtient un rapport d'intégrations de 7 : 23,43 soit une cyclodextrine substituée par 5,85 molécules d'acide citrique. Le rapport initial lors de la préparation du polyCD est de 5,91 molécules d'acide pour une cyclodextrine. La stœchiométrie initiale est donc bien respectée dans le polymère final.

La numérotation des carbones et donc des protons correspondant de la ropivacaïne est présentée par la **Figure 88**.

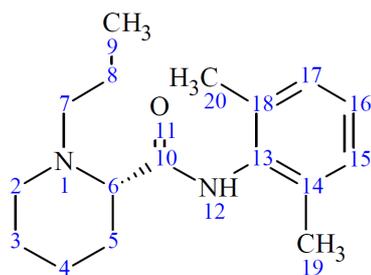


Figure 88 : Numérotation des carbones de la ropivacaïne

Le spectre RMN 1H et l'attribution de ses pics aux protons correspondant sont présentés dans la Figure 89 et le Tableau 21.

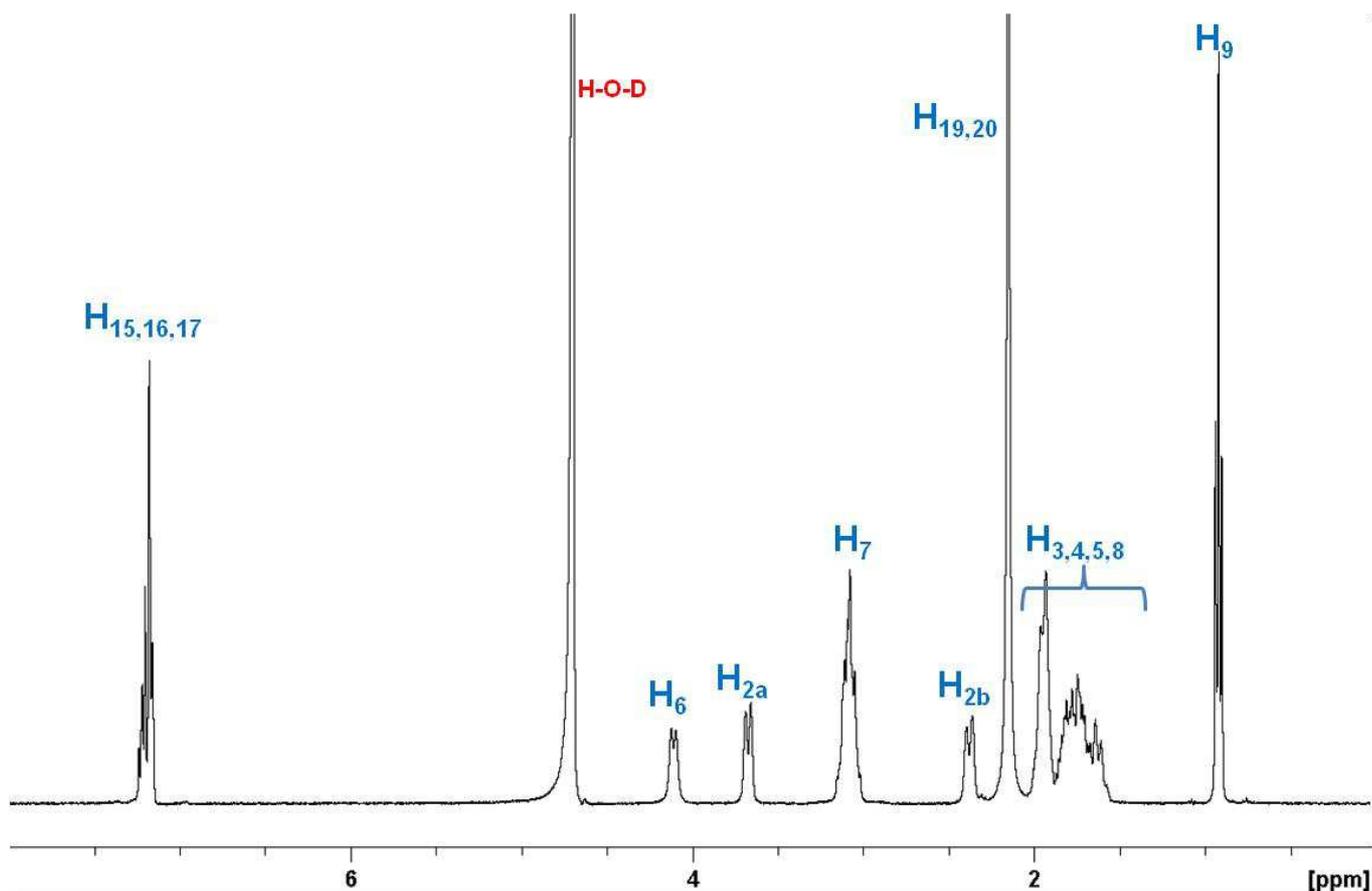


Figure 89 : Spectre RMN ^1H de la ropivacaïne dans le D $_2\text{O}$ (10 mM)

Tableau 21 : Attribution des pics du spectre RMN 1H du polyCTR-HP β CD (10 mM)

Protons	H _{2a-2b}	H ₃₋₄₋₅₋₈	H ₆	H ₇	H ₉	H ₁₅₋₁₆₋₁₇	H ₁₉₋₂₀
δ (ppm)	2,4 et 3,7	1,6-2,05	4,2	3,1	0,9	7,2	2,1
Multiplicité	Doublet de Doublet	Multiplet	Doublet	Multiplet	Multiplet	Multiplet	Singlet

Après avoir attribué les signaux des spectres de chaque composé seul, les spectres des mélanges équimolaires (5 mM : 5 mM) entre la ropivacaïne et les 3 autres composé (β CD, HP β CD, polyCTR-HP β CD) ont également été établis.

Dans un souci de clarté, les protons de la ropivacaïne seront toujours signalés en **bleu** sur les spectres. Ceux du composé hôte (CD) seront indiqués en **rouge**.

Dans un premier temps, le spectre RMN ^1H du mélange ropivacaïne/ β CD est représenté par la **Figure 90**.

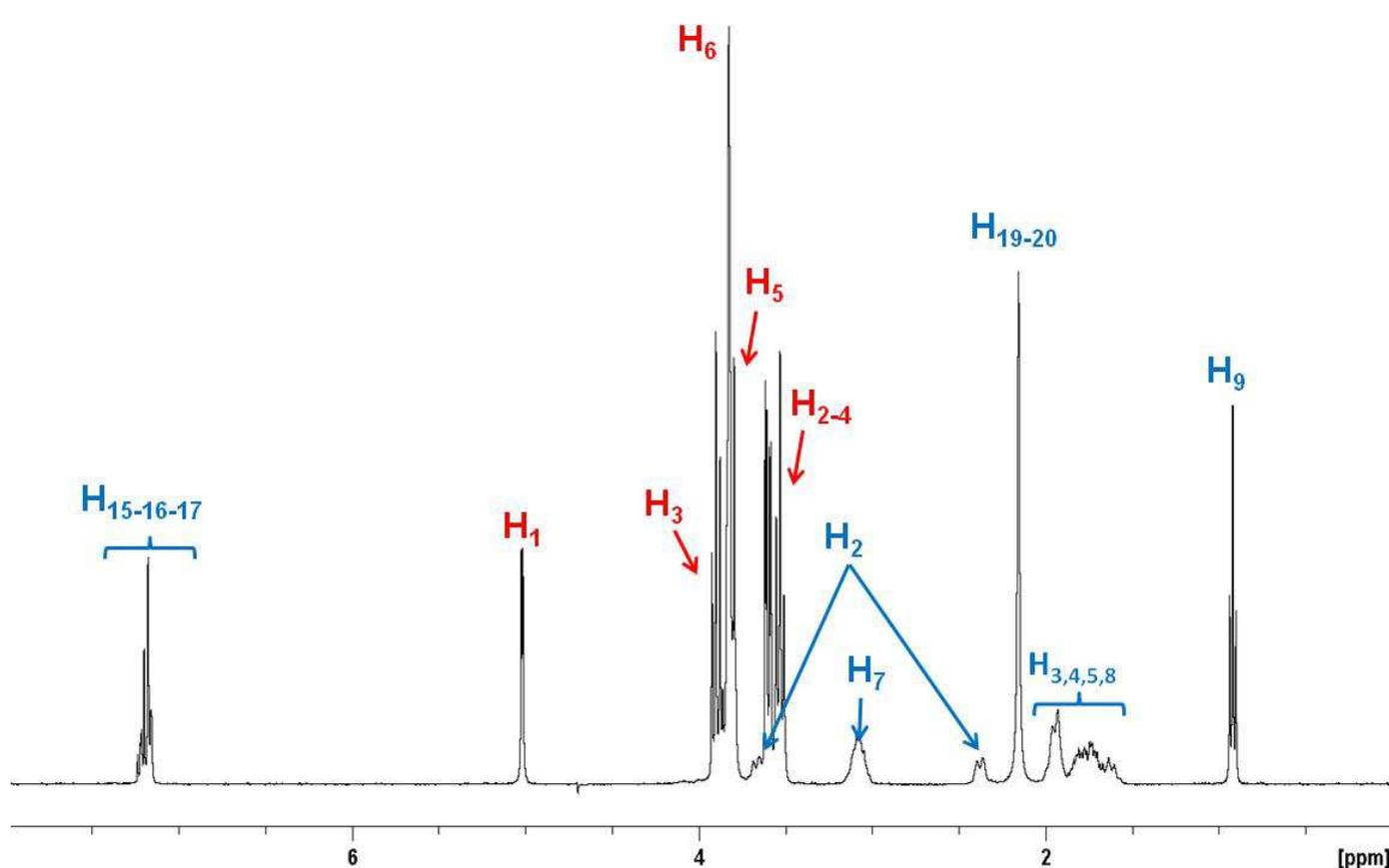


Figure 90 : Spectre RMN ^1H du mélange équimolaire ropivacaïne/ β CD dans le D_2O (5 mM)

Tous les signaux correspondant aux deux composés sont identifiables.

A première vue, le spectre du mélange ropivacaïne/ β CD ne permet pas d'observer une inclusion de la molécule invitée.

Dès lors, il convient d'effectuer une superposition du spectre avec celui de la β CD (**bleu**) seule et un agrandissement des signaux situés entre 3,5 et 4 ppm de ce spectre (**rouge**).

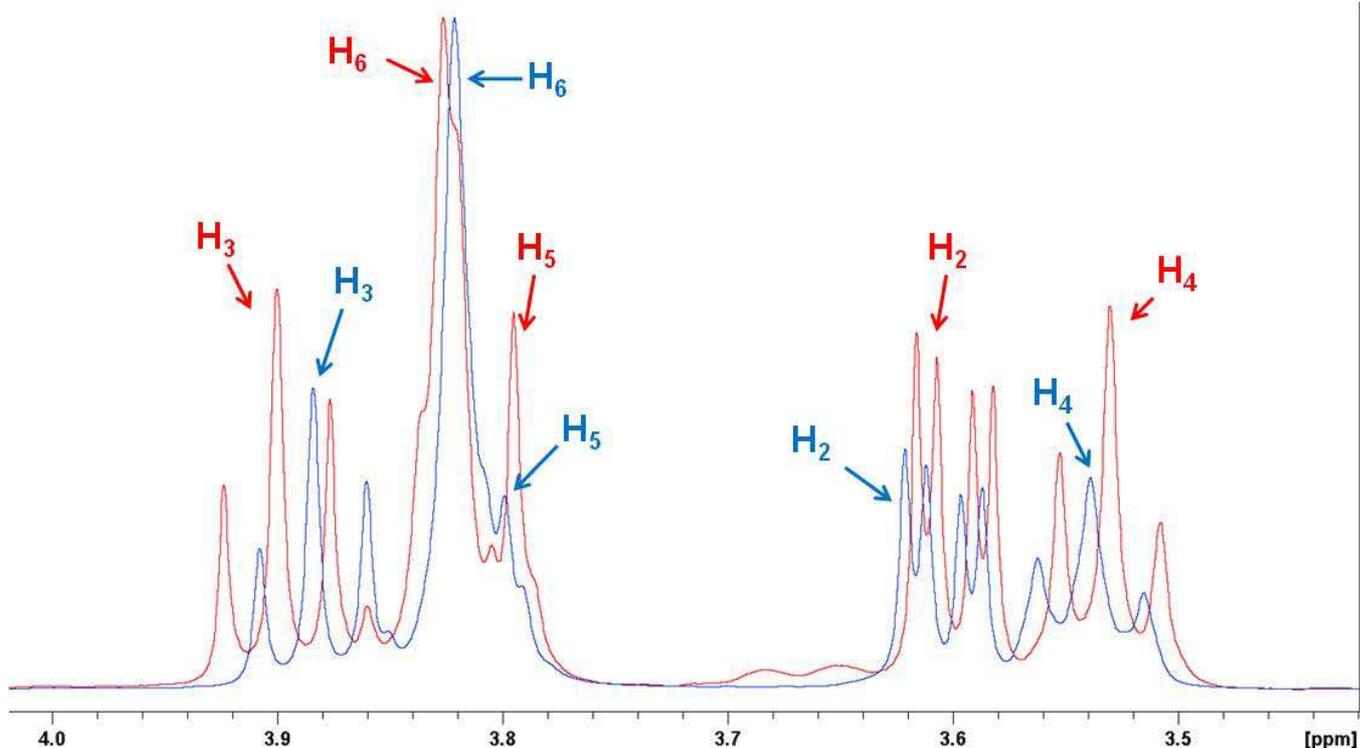


Figure 91 : Grossissement et superposition des spectres RMN ^1H du mélange ropivacaïne/ β CD (rouge) et de la β CD (bleu) entre 3 et 4 ppm et attribution des pics

Une variation des déplacements chimiques apparaît entre les signaux du composé seul (bleu) et du mélange avec l'AL. Cet écart entre les déplacements chimiques est particulièrement visible pour les protons H_3 et H_5 , qui sont les protons internes de la β CD. On observe ainsi un effet de déblindage sur H_3 de 0,09 ppm ainsi qu'une apparition flagrante du pic de H_5 . Néanmoins, on ne peut exclure les interactions avec les protons externes H_2 , H_4 et H_6 du macrocycle. Un décalage des signaux des protons H_2 , H_4 et H_6 est également visible, ce qui traduit des interactions faibles avec la surface du macrocycle.

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de la séquence RMN SELNOE, qui permet en irradiant sélectivement un groupe de pics, de faire apparaître (en négatif) les interactions dues à la proximité spatiale entre les protons correspondant aux signaux irradiés et d'autres protons du mélange.

La superposition du spectre RMN ^1H du mélange (rouge) et du spectre SELNOE correspondant à l'irradiation des signaux à 7,2 ppm (noir) des protons $\text{H}_{15,16,17}$ aromatiques de la ropivacaïne.

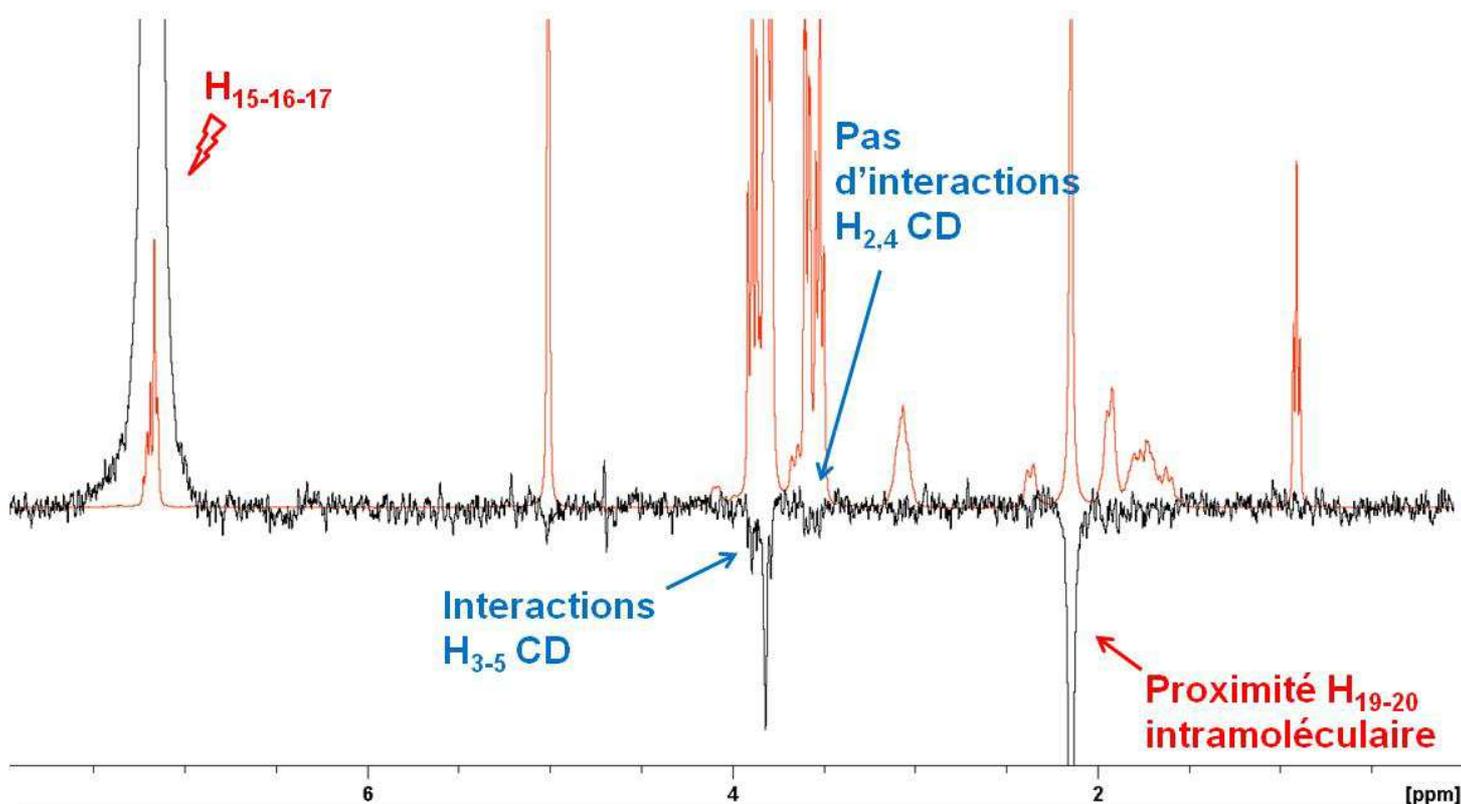


Figure 92 : Spectre RMN ^1H du mélange ropivacaïne/ β CD (rouge) et spectre SELNOE de l'irradiation des signaux vers 7,2 ppm

Ainsi, l'irradiation des protons aromatiques de la ropivacaïne a mis en évidence des proximités spatiales de ces derniers avec les protons H_3 , H_5 de la cavité interne de la CD. On observe également la proximité intramoléculaire entre les protons des groupements méthyl $\text{H}_{19,20}$ et ces protons du noyau benzénique.

Sans toutefois démontrer une inclusion forte de l'anesthésique local dans la cavité du macrocycle, ces résultats prouvent une interaction, qui traduit une constante d'association du complexe très faible. La topologie supposée par les résultats précédents du ropivacaïne/ β CD est illustrée sur la **Figure 93** :

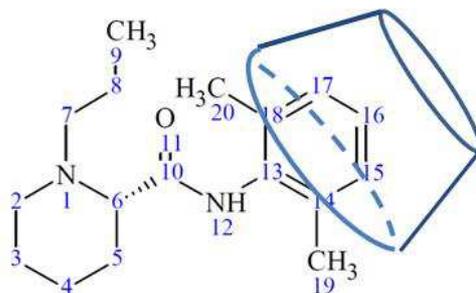


Figure 93 : Illustration de la topologie du complexe ropivacaïne/ β CD

L'étude par RMN SELNOE a été poursuivie sur le dérivé hydroxypropyl l'HPβCD. La présence des substituants hydroxypropyl sur le macrocycle est susceptible d'influencer la formation d'un complexe avec la ropivacaïne.

Le spectre RMN ^1H du mélange équimolaire ropivacaïne/HPβCD est présenté par la **Figure 94**. Les signaux attribués à la ropivacaïne sont présentés en **bleu**, ceux de l'HPβCD en **rouge**.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec la βCD, les signaux correspondant aux protons aromatiques $\text{H}_{15-16-17}$ (7,2 ppm) de l'anesthésique local ont été irradiés. La superposition des 2 spectres RMN ^1H du mélange et RMN SELNOE est présentée sur la **Figure 94**.

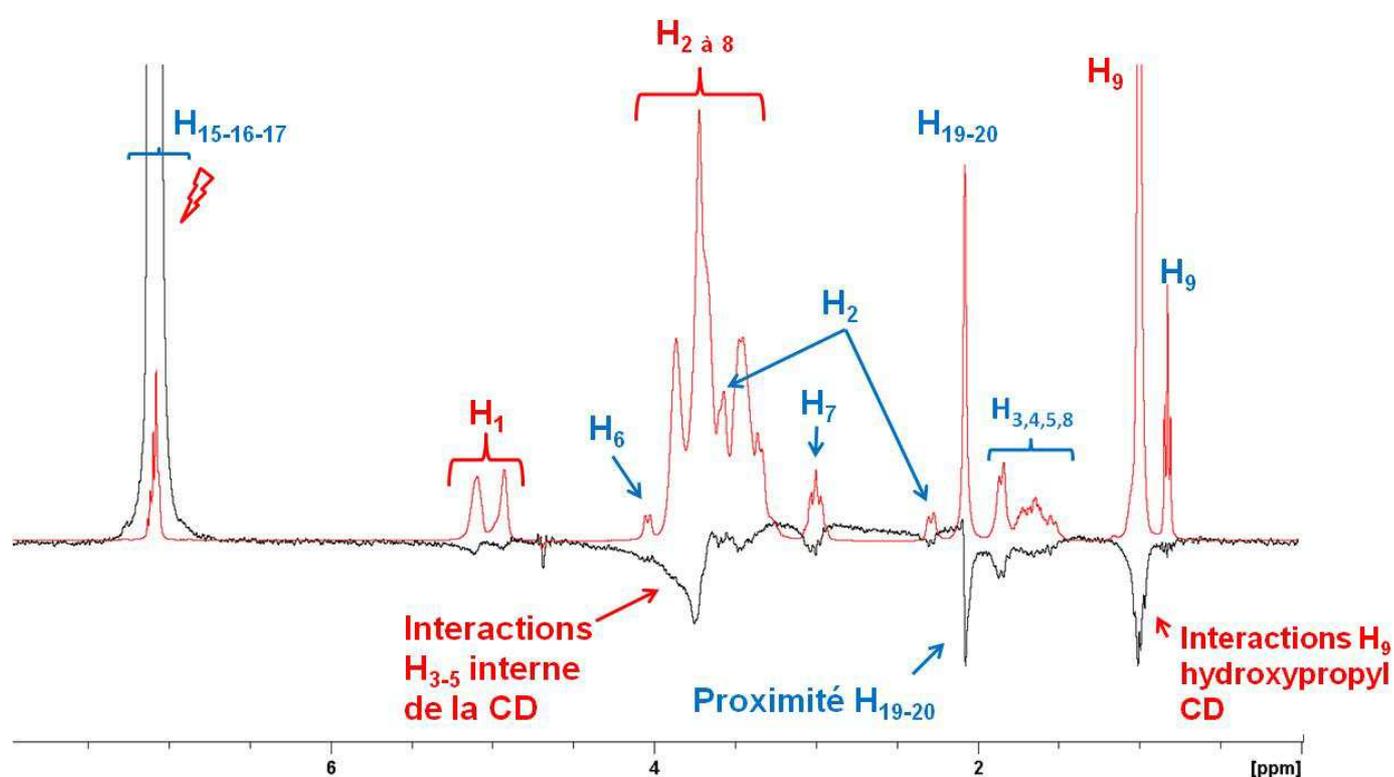


Figure 94 : Spectre RMN ^1H du mélange ropivacaïne/HPβCD (rouge) et spectre SELNOE de l'irradiation des signaux vers 7,2 ppm (noir)

Une proximité spatiale entre les protons aromatiques et ceux de la cavité de l'HPβCD ainsi qu'avec les protons H_9 du groupement méthyl des substituants de la cyclodextrine. La molécule antalgique interagirait donc à la fois avec la cavité mais également avec les protons externes du macrocycle.

Enfin et en vue de traduire au mieux les phénomènes qui prendront place au niveau du textile fonctionnalisé, les interactions entre la ropivacaïne et le polyCTR-HP β CD ont également été observé par RMN SELNOE en solution. Les pics du spectre RMN ^1H du mélange des deux composés dans le D_2O ont été attribués (**Figure 95**).

L'irradiation de la séquence SELNOE a comme précédemment été orientée vers les signaux à 7,2 ppm. De par leur isolement sur le spectre, l'irradiation ne risque pas de toucher des pics voisins qui gêneraient l'interprétation des résultats.

Le spectre RMN SELNOE ainsi réalisé est comparé à la RMN ^1H du mélange dans la **Figure 95**.

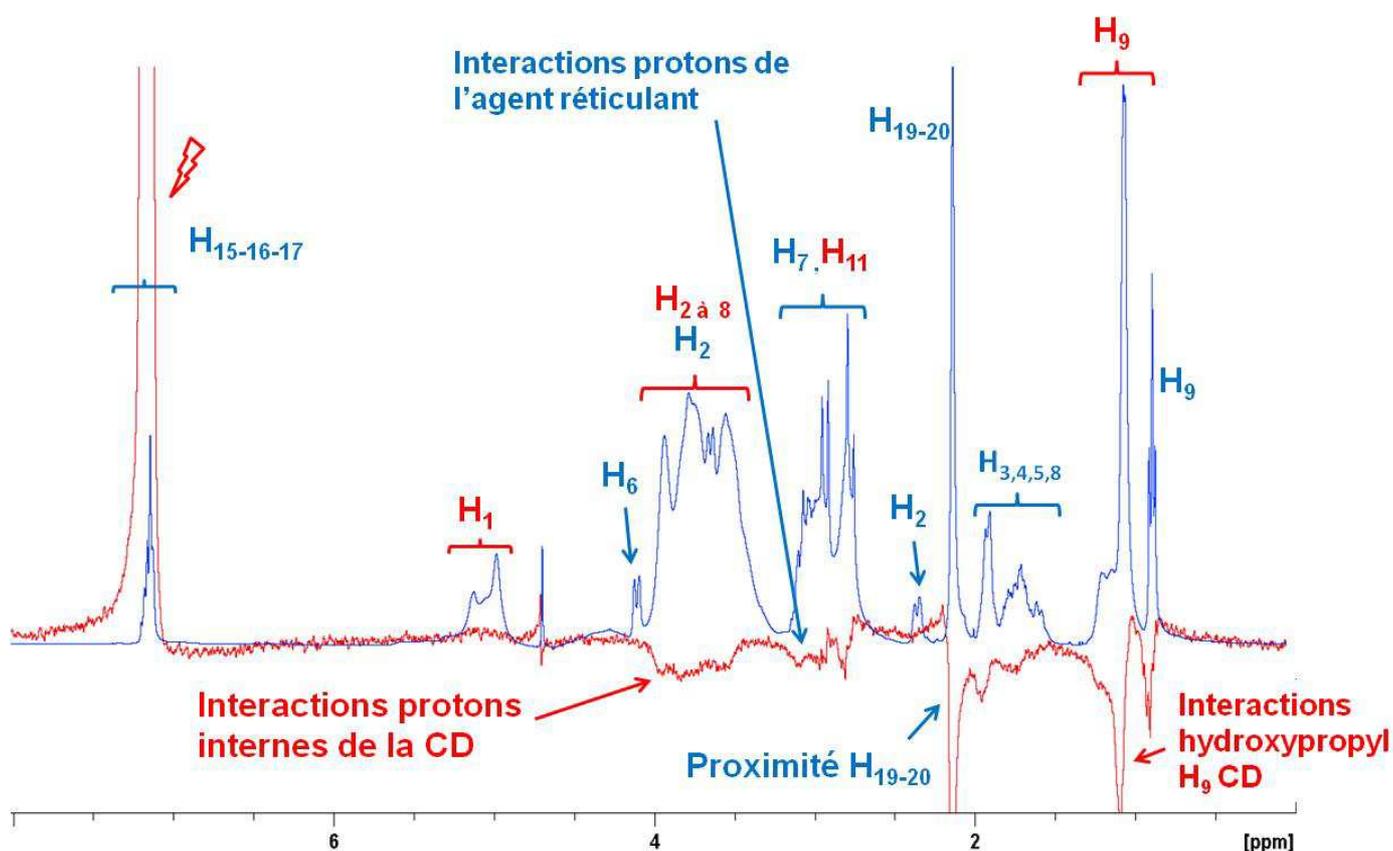


Figure 95 : Spectre RMN ^1H du mélange ropivacaïne/HP β CD (bleu) et spectre SELNOE de l'irradiation des signaux vers 7,2 ppm (rouge)

Les signaux caractérisant la proximité spatiale sur le spectre SELNOE entre les protons irradiés ($\text{H}_{15-16-17}$) et les ceux de la cyclodextrine (multiplet entre 3,2 et 4 ppm) semblent moins importants que sur ceux observés avec les cyclodextrines non polymérisées. Cela peut être expliqué par une accessibilité réduite des cavités par la réticulation. Il apparaît néanmoins une proximité de ces protons aromatiques de l'AL avec ceux de l'agent réticulant et des substituants H_9 de l'HP β CD, ce qui laisse à penser le piégeage de la ropivacaïne dans le réseau polymère.

Il est à souligner que les interactions intramoléculaires apparaissent également par la technique SELNOE. Ainsi, la proximité spatiale de H_{15,16,17} avec les protons des groupements méthyl H_{19,20}, substituants en méta du noyau benzénique se distingue par une bande négative très intense à 2,1 ppm.

Cette étude par RMN a mis en évidence l'existence de proximités spatiales entre les protons de la molécule active (ropivacaïne) et ceux du polyCTR-HPβCD. On observe des interactions de type hôte/invitée, mais également d'autres moins spécifiques qui indiquent que l'AL est également piégé dans le réseau tridimensionnel du polyCTR-HPβCD.

III.2. Electrophorèse capillaire

En complément de cette étude par RMN, l'électrophorèse capillaire a été exploitée afin de mettre en évidence les interactions polyCD/AL.

Initialement employées pour la séparation de protéines, les méthodes électrophorétiques sont basées sur la migration d'une espèce sous l'influence d'un courant électrique à travers un électrolyte (2^{ème} partie II.3.2).

Une solution de ropivacaïne à 100 mg/L a été analysée par cette technique. Le polyCTR-HPβCD est ajouté au tampon phosphate à pH=7 à des concentrations comprises entre 0 mmol/L et 7 mmol/L (. La détection est effectuée à 210 nm. L'évolution du temps de migration de la ropivacaïne en fonction de la concentration en polyCTR-HPβCD dans le tampon phosphate permet de mettre en évidence des interactions AL/polyCD (**Figure 96** et **Figure 97**).

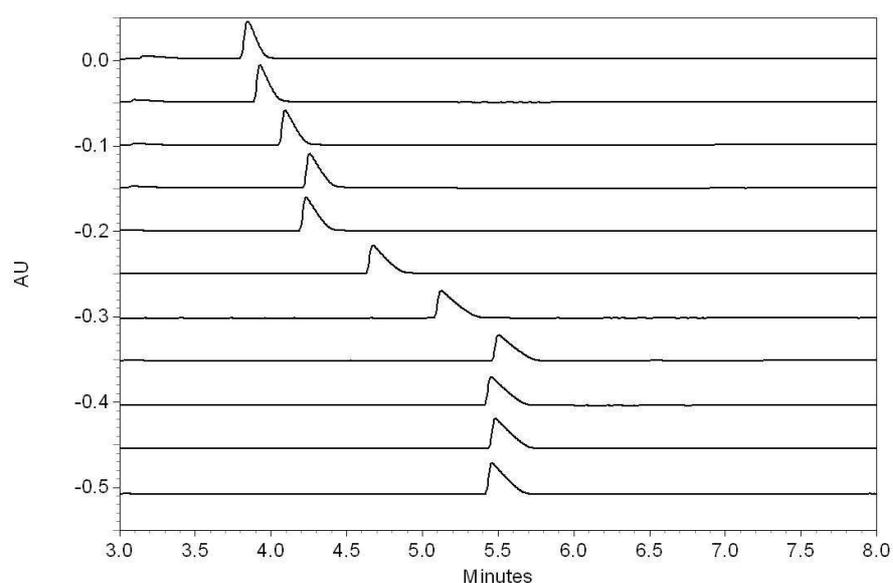


Figure 96 : Superposition des électrophérogrammes de la ropivacaïne en présence de concentrations croissantes de polyCTR-HPβCD

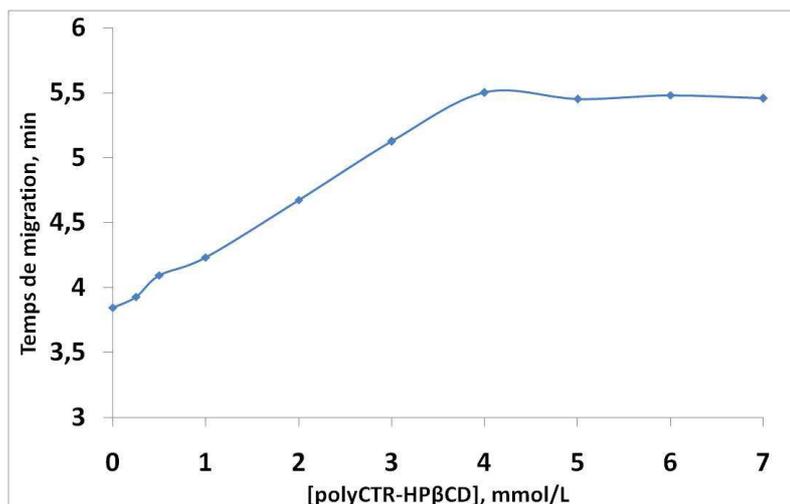


Figure 97 : Evolution du temps de migration de la ropivacaïne en fonction de la concentration en polyCTR-HPβCD dans l'électrolyte

Le temps de migration de la ropivacaïne dans le tampon phosphate 50 mM est de 3,85 minutes. Il apparaît un accroissement de ce temps avec l'augmentation de la concentration de polyCD dans l'électrolyte entre 0 et 4 mmol/L (de 3,85 minutes à 5,47 minutes). On peut donc en déduire l'existence d'interactions entre le polymère de HPβCD et l'analyte. Néanmoins, les concentrations supérieures à 4 mmol/L en polyCTR-HPβCD dans l'électrolyte ne semblent plus affecter le temps de migration qui se stabilise à 5,47 minutes ce qui traduit un excès de polyCTR-HPβCD.

L'application des modèles de Wren et Lowe (2^{ème} Partie II.C.b) sur une gamme de concentration en polyCTR-HPβCD de 1 à 4 mmol/L a permis l'obtention de trois droites (**Figure 98**).

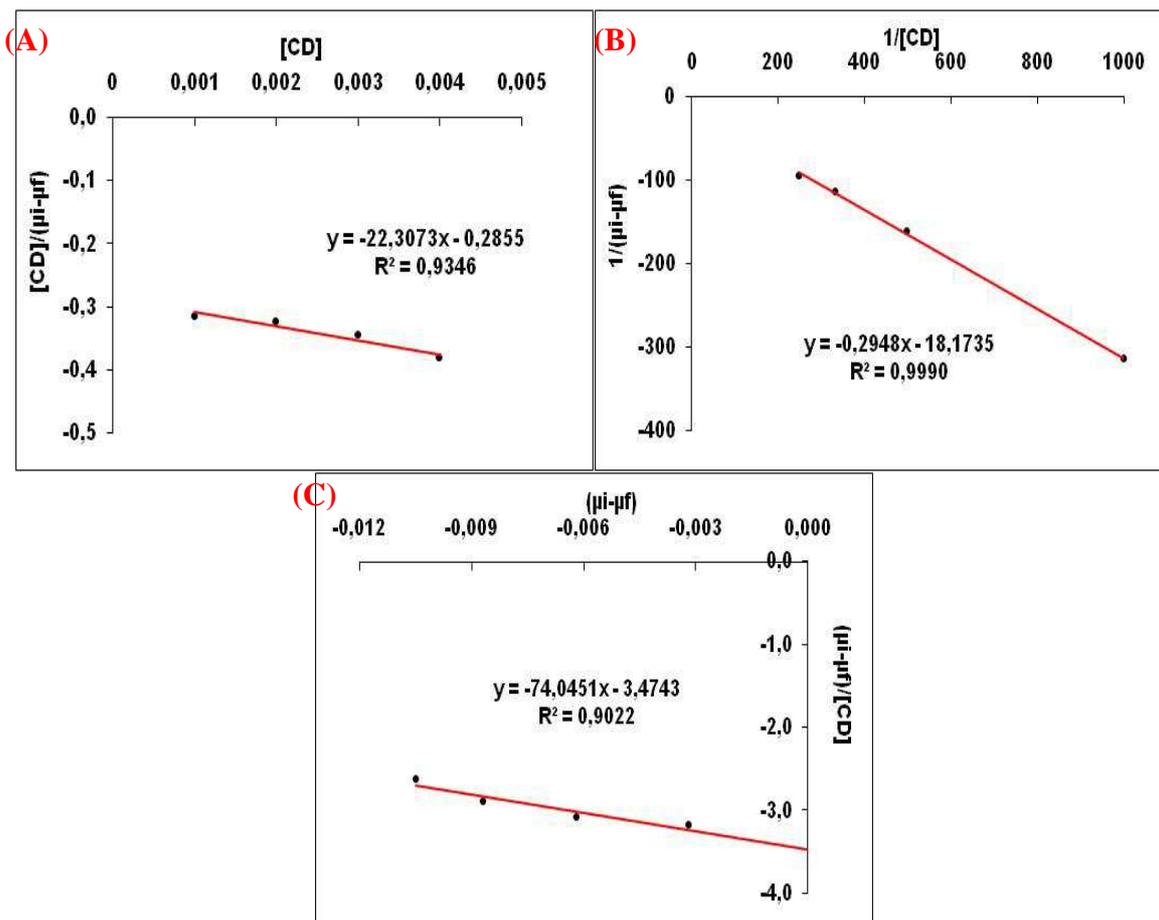


Figure 98 : Méthodes de double-réiproque (A), y-réiproque (B) et x-réiproque (C) pour une gamme de concentrations en polyCTR-HPβCD comprises entre 1 mmol/L et 4 mmol/L

Les trois modèles donnent des linéarités satisfaisantes dont les coefficients R^2 supérieurs à 0,9. A partir des équations de droite obtenues par ces 3 méthodes, il est possible de déterminer une constante d'association du polyCTR-HPβCD et la ropivacaine, résumés dans le **Tableau 22**.

Tableau 22 : Constantes d'association K_s en fonction du traitement mathématique

Méthode	Double-réiproque	y-réiproque	x-réiproque
Constante d'association apparente K_s	78 M-1	62 M-1	74 M-1

Ces valeurs de constantes d'association apparentes sont faibles. Il s'agit d'interactions par inclusion mais également d'interactions physiques entre l'AL et le polyCD. Ces résultats confirment les observations faites lors de l'étude des interactions par RMN.

Des résultats similaires de 78 M^{-1} et 74 M^{-1} sont obtenus par les méthodes double-réciproque et x-réciproque. Des travaux de Rundlett ont montré que la méthode y-réciproque est source d'erreurs car elle donne systématiquement un coefficient de corrélation de 0,999 et ce même quand les deux autres relations montrent des résultats incohérents [213].

Il est donc possible d'établir la constante d'association apparente K_s entre le polyCTR-HP β CD à environ 76 M^{-1} . Cette valeur est supérieure à celles mentionnées dans la littérature qui faisait état d'une constante d'association de $55,5 \text{ M}^{-1}$ entre la ropivacaïne et la β CD et de $9,41 \text{ M}^{-1}$ entre l'AL et l'HP β CD, ce qui prouve l'intérêt de la polymérisation vis-à-vis de ce principe actif.

III.3. Cinétiques d'adsorption

L'étude des cinétiques d'adsorption des supports PET et PLLA a été réalisée avec des solutions de lidocaïne à 50 g/L et ropivacaïne à 2 g/L , correspondant à des concentrations présentes dans les formes galéniques commercialisées.

Comme indiqué précédemment, à terme, le PLLA sera tissé avec un matériau biostable afin d'assurer la tenue mécanique de la réfection dans le temps. Les échantillons employés au long de cette étude sont donc loin du support final semi-résorbable. Partant de ce constat, il a été convenu de réaliser cette étude uniquement sur les textiles en PET fonctionnalisés. En effet, ce sont les supports les plus aboutis et les plus proche du produit fini.

Les textiles ont été rincés après imprégnation afin de ne doser que la quantité adsorbée par le polyCD, et d'éliminer l'excès adsorbé uniquement par phénomène de capillarité.

Dans un premier temps, les durées de séjour dans la solution de principe actif ont été fixées entre 5 minutes et 60 minutes et 24 heures considéré comme la durée d'imprégnation à saturation.

Dans un souci de lisibilité, les durées d'imprégnation présentées dans la Figure 99 sont comprises entre 0 et 60 minutes. Les quantités de lidocaïne et de ropivacaïne adsorbées par les PET-CD après un temps de contact de 24 heures sont respectivement de $34,1 \pm 2,5 \text{ mg/g}$ et de $27,3 \pm 4,4 \text{ mg/g}$.

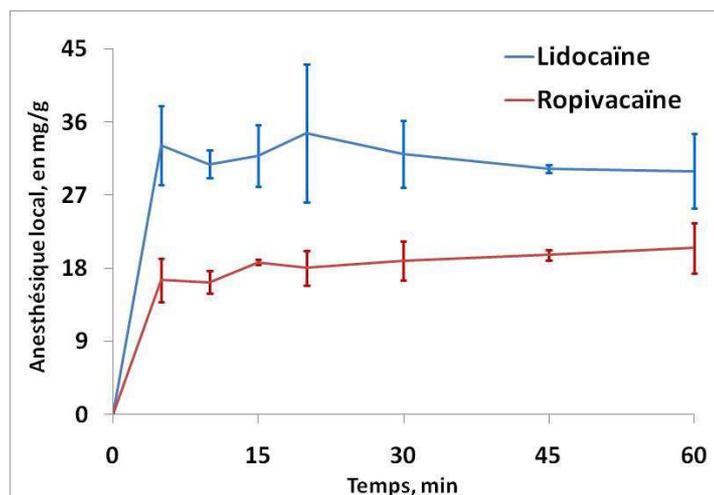


Figure 99 : Cinétiques d'adsorption de la lidocaïne 50 g/L et de la ropivacaïne 2 g/L sur les supports PET-CD – 5 à 60 minutes

Les quantités de lidocaïne captées par les implants PET-CD après 5 minutes d'adsorption atteignent directement une valeur plateau de 35 mg/g soit la capacité d'adsorption maximale en lidocaïne des supports (**Figure 99**). Une imprégnation de 5 minutes dans une solution à 50 g/L de lidocaïne est suffisante pour charger les textiles PET-CD au maximum.

Dans le cas de la ropivacaïne en revanche, des durées inférieures à 60 minutes ne permettent pas de charger totalement le textile fonctionnalisé. En effet, un temps de contact de 60 minutes génère un chargement de 75% en ropivacaïne.

Une étude similaire a été réalisée sur des échantillons de PET-CD avec une solution de lidocaïne à 50 g/L pour des durées de séjour entre 30 secondes et 5 minutes (**Figure 100**).

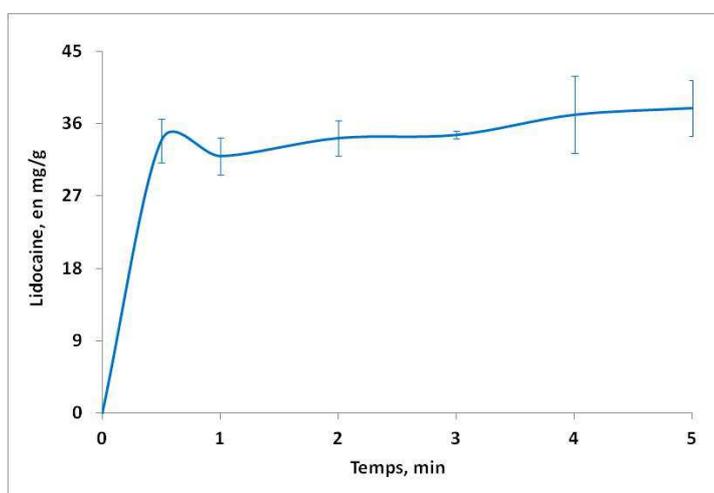


Figure 100 : Cinétiques d'adsorption de la lidocaïne 50 g/L sur les supports PET-CD – 30 secondes à 5 minutes

Les supports sont totalement chargés en lidocaïne après 30 secondes d'immersion dans la solution de principe actif à une dose d'environ 35 mg/g de PET, soit la quantité maximale adsorbable.

Ce résultat est très prometteur car il démontre que les implants PET fonctionnalisés sont très rapidement (30 secondes) chargés en lidocaïne. En revanche, la ropivacaïne nécessitera des temps plus longues d'imprégnation (> 20 minutes) afin d'atteindre des taux raisonnables (80%) de chargement.

III.4. Isotherme d'adsorption –Etude en concentrations

Les études théoriques par RMN et électrophorèse capillaire ont permis de caractériser les interactions entre la ropivacaïne et le polymère de cyclodextrines en solution. Les isothermes d'adsorption ont été réalisées afin de mettre en évidence le mode d'adsorption liquide/solide de la lidocaïne et de la ropivacaïne sur un support fonctionnalisé par ce même polymère.

Ces molécules sont produites et utilisées sous différentes formes galéniques. Lors de l'implantation future des supports fonctionnalisés, les concentrations en principe actif pourront varier en fonction de la forme galénique choisie par le chirurgien. La dose d'AL adsorbée sur le dispositif dépendra donc de la concentration de ladite solution. Dès lors, il convient d'établir les isothermes d'adsorption, qui mettent en relation la concentration en principe actif de la solution d'imprégnation avec la quantité adsorbée à l'équilibre q_e .

Afin d'anticiper les étapes prochaines de validation du procédé, cette étude d'adsorption a été menée conjointement sur des supports fonctionnalisés, stérilisés et pour la moitié « vieillis » artificiellement par stockage 50 jours dans une étuve ventilée à 60°C. Cette technique, employée par l'industriel pour vieillir artificiellement les supports dans des conditions équivalentes à un stockage de 3 ans, est basée sur la loi d'Arrhénius et est régie par la relation :

$$AAR = Q_{10}^{\left(\frac{T_e - T_a}{10}\right)}$$

Avec : AAR = Taux de vieillissement accéléré

Q_{10} = Taux de la réaction, ici égale à 2

T_e = Température de l'étuve

Ta = Température ambiante du stockage

Il est possible de déterminer la durée de séjour en étuve pour simuler une année de stockage

$$t = 365/AAR$$

Par l'étude des isothermes d'adsorption sur ces 2 types de supports, il a été possible d'étudier l'influence du vieillissement sur la capacité d'adsorption du textile fonctionnalisé.

Dans le cas du PET, des échantillons grand format (30 x 30 cm) ont été fonctionnalisés sur la ligne de fabrication industrielle (formulation 8/1/10, 140°C, 1h, 13 ± 1%). Ils ont également été stérilisés à l'oxyde d'éthylène (EtO) afin de respecter au maximum le procédé qui sera appliqué en industrie. Par la suite, les supports ont été répartis en deux groupes, l'un conservé au dessiccateur qui servira de témoins non-vieillis et l'autre placé en vieillissement accéléré durant 50 jours. A la fin de cette période, les deux types d'échantillons ont été débités en pastilles afin de réaliser les isothermes d'adsorption.

Les textiles en PLLA ont été fonctionnalisés au laboratoire (en rame, formulation 8/1/10, 140°C, 2h, 15 ± 1%). Comme précédemment, les échantillons sont divisés en deux groupes : « non-vieillis » et « vieillis ».

L'imprégnation des échantillons dans la solution de principe actif a été réalisée sur un banc d'agitation thermostaté à 20°C. Pour des raisons techniques, le rapport de bain employé tout au long de cette étude a été de 10:6, soit un échantillon de 10 mg pour 6 mL de solution, 3 pastilles étant imprégnées dans 18 mL de solution.

Le protocole d'étude est décrit dans la 2^{ème} partie II.4.4.

Il existe 3 concentrations de lidocaïne présentes dans les différentes formes galéniques employées en chirurgie (ampoule, poche de perfusion,...) : 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L. Il a été convenu d'étudier l'influence de la concentration de cette AL de la solution d'imprégnation dans une gamme de 0,1 g/L à 100 g/L.

La ropivacaïne est présente sous forme galénique à des concentrations de 2 à 10 g/L. Il a donc été convenu de se placer dans une gamme de 0,02 et 10 g/L de solutions pures de ropivacaïne. Pour des raisons de solubilité, il n'a pas été possible d'investiguer des concentrations supérieures à 10 g/L.

Les solutions sont préparées à partir du composé pur dans l'eau distillée. Dans chaque cas, les échantillons sont imprégnés 24 heures dans ces solutions puis rincés 1 minute dans l'eau avant

désorption dans la soude 0,05N afin de limiter l'incertitude liée à la solution emportée (physisorbée).

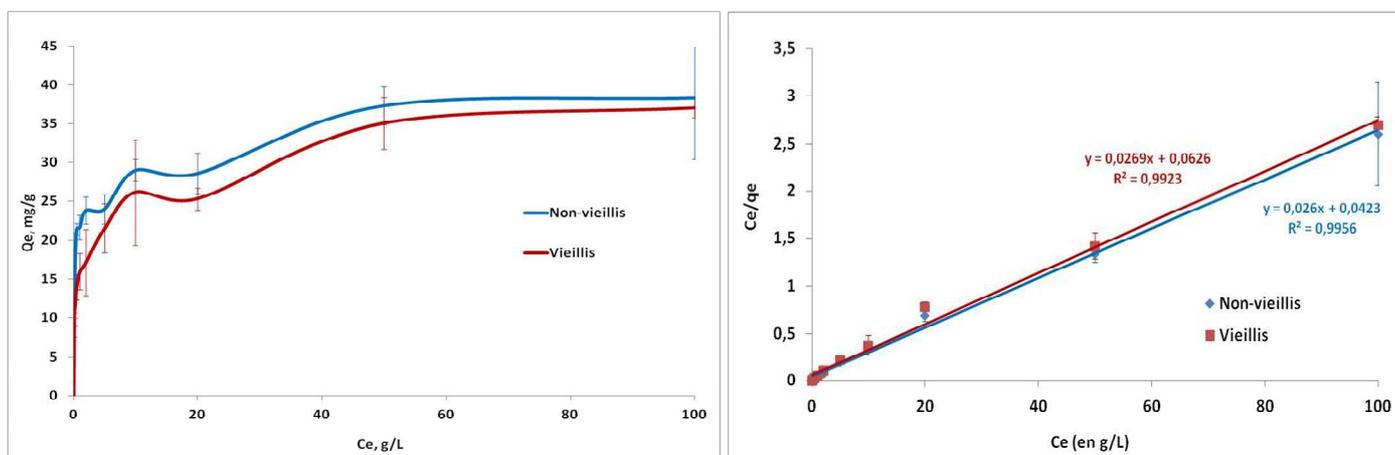


Figure 101 : Isothermes d'adsorption (gauche) et modèle de Langmuir (droite) appliqué pour une gamme de concentration de lidocaïne à l'équilibre C_e entre 0,1g/L et 100 g/L sur des supports PET-CD, stérilisés, vieillis et non-vieillis

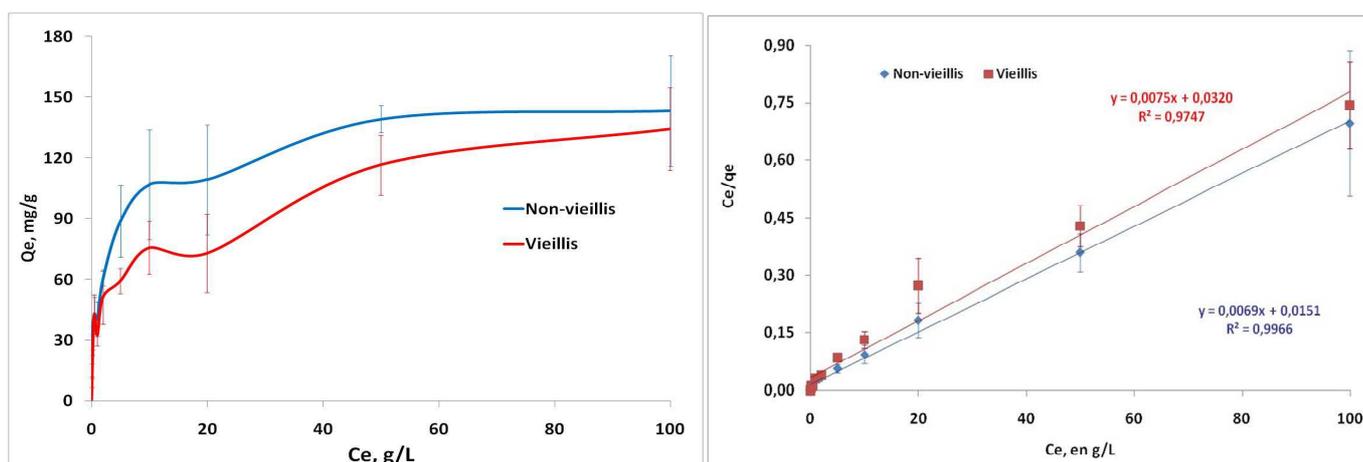


Figure 102 : Isothermes d'adsorption (gauche) et modèle de Langmuir (droite) appliqué pour une gamme de concentration de lidocaïne à l'équilibre C_e entre 0,1g/L et 100 g/L sur des supports PLLA-CD, stérilisés, vieillis et non-vieillis

Concernant la lidocaïne, les isothermes réalisés à partir de ces supports PET-CD et PLLA-CD avant et après vieillissement présentent des profils similaires (Figure 101 et Figure 102). Une valeur plateau est atteinte pour une concentration de la solution de lidocaïne de 50 g/L et ce quelque soit le textile (PET et PLLA) et le traitement subi. Néanmoins, une légère baisse de la capacité d'adsorption est remarquable sur le PLLA-CD pour les échantillons vieillis.

Le modèle d'adsorption selon Langmuir de la lidocaïne présente, pour les supports vieillis et non-vieillis, des droites de linéarité respectives de $R^2=0,9956$ et $R^2=0,9923$ (Figure 101). Le

modèle de Langmuir est validé dans le cas de cet AL. Une molécule de lidocaïne s'adsorbe spécifiquement sur un site d'adsorption, cavités de cyclodextrines ou fonctions carboxylates.

Il est possible à partir des équations de ces droites de déterminer les capacités d'adsorption à saturation des supports. Un implant en PET fonctionnalisé et stérilisé est saturé à $q_m = 38,46$ mg/g de lidocaïne. Après 50 jours à 60°C, ce même implant est saturé après avoir adsorbé $q_m = 37,17$ mg/g de ce principe actif soit une différence négligeable de 1mg/g (**Tableau 23**).

Il n'y a donc pas de perte de la capacité d'adsorption des textiles en PET fonctionnalisés après un stockage « simulé » de 3 ans. L'enrobage de cyclodextrine ne semble pas être altéré pendant cette période.

L'application de ce modèle au PLLA-CD a également permis d'obtenir deux droites pour chacun des supports à des coefficients de corrélation de $R^2 = 0,9966$ pour des échantillons non-vieillis et de $R^2 = 0,9747$ pour le PLLA-CD vieilli 50 jours à 60°C (**Figure 102**). Comme pour le PET, le modèle de Langmuir est validé dans le cas de supports PLLA, soit une molécule de lidocaïne qui s'adsorbe sur un site spécifique. Les capacités d'adsorption à saturation ont été déterminées à $q_m = 144,93$ mg/g de support PLLA dans le cas d'un textile fonctionnalisé non-vieilli et $q_m = 133,33$ mg/g après un séjour de 50 jours en étuve 60°C. Il y a donc bien une légère baisse de la capacité d'adsorption après vieillissement.

Le modèle de Freundlich a été appliqué aux valeurs obtenues à la lidocaïne pour le PET-CD et le PLLA-CD. Le traitement des données obtenues par le modèle de Freundlich permet d'obtenir pour des droites de linéarité $R^2 = 0,9633$ et $0,9849$ respectivement pour des supports PET-CD vieillis artificiellement ou non ($R^2 = 0,888$ et $0,917$ pour le PLLA-CD) (**Tableau 23**). Une molécule de lidocaïne interagit avec les deux types de sites non spécifiquement. Les différentes combinaisons d'adsorption possibles incluent soit l'adsorption sur une fonction carboxylate ou dans la cavité d'une CD (Langmuir) soit l'adsorption sur deux fonctions carboxylates simultanément, une fonction carboxylate et dans une CD.

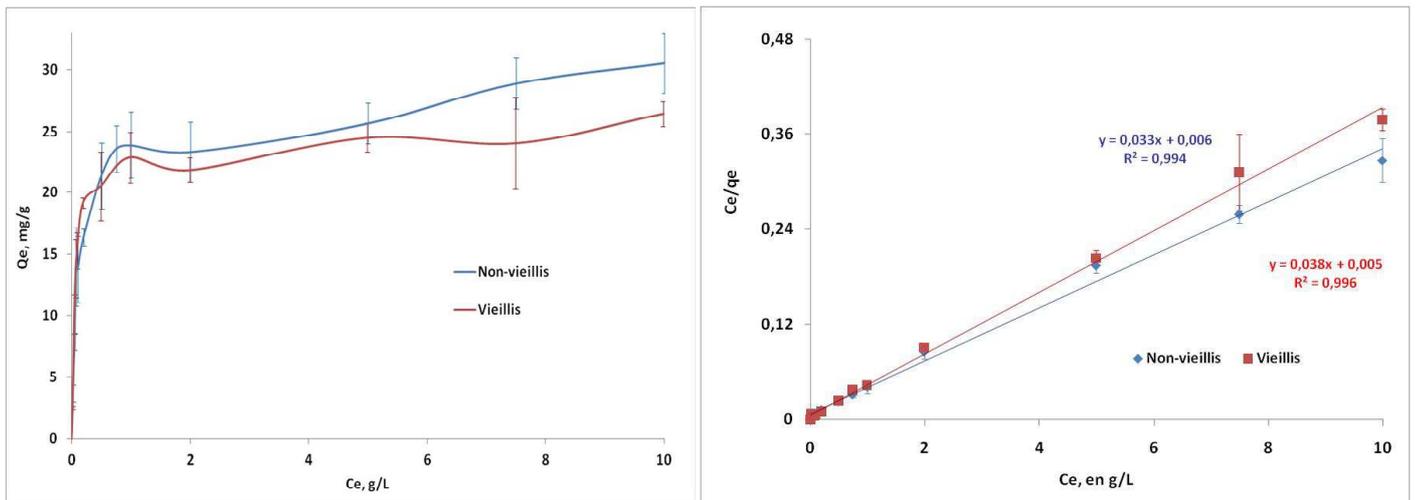


Figure 103 : Isothermes d'adsorption (gauche) et modèle de Langmuir (droite) appliqué pour une gamme de concentration de ropivacaïne à l'équilibre C_e entre 0,1g/L et 100 g/L sur des supports PET-CD, stérilisés, vieillis et non-vieillis

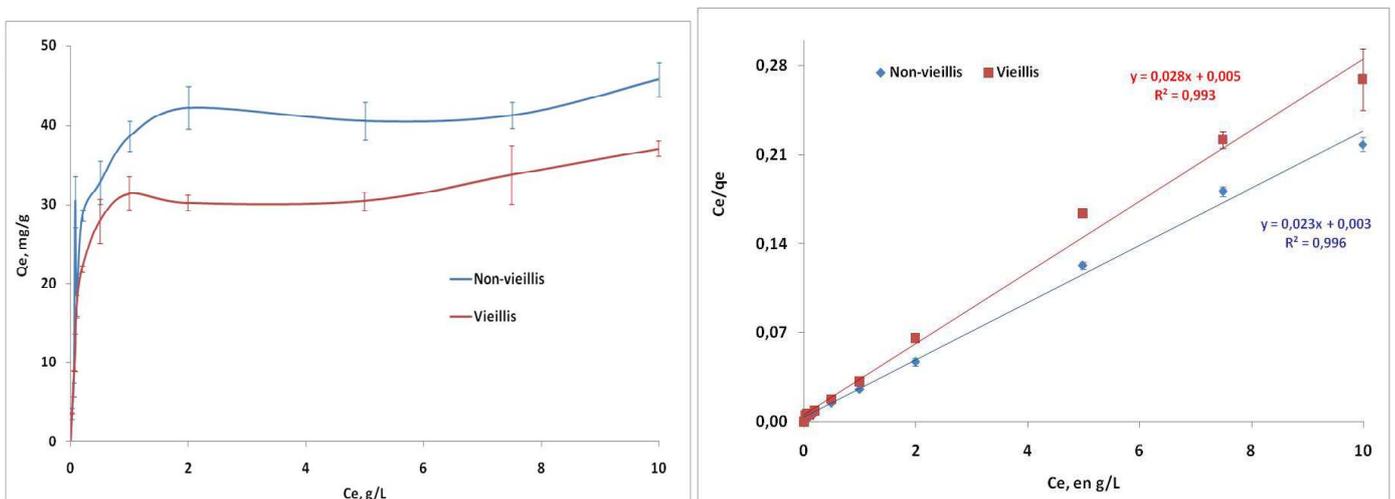


Figure 104 : Isothermes d'adsorption (gauche) et modèle de Langmuir (droite) appliqué pour une gamme de concentration de ropivacaïne à l'équilibre C_e entre 0,1g/L et 100 g/L sur des supports PLLA-CD, stérilisés, vieillis et non-vieillis

Dans le cas d'une imprégnation dans la ropivacaïne, les isothermes d'adsorption sur PET-CD et PLLA-CD non-vieillis et vieillis ont montré des profils de courbes similaires (**Figure 103**). Un effet de saturation est observable à partir de concentrations supérieures à 2 g/L et ce pour les deux types de supports.

Il est néanmoins à noter une légère baisse des quantités captées aux fortes concentrations de la solution de ropivacaïne pour les échantillons ayant subi un vieillissement accéléré. De même, les textiles non-vieillis semblent continuer d'adsorber des molécules actives même à de très fortes concentrations comme 10 g/L.

Le modèle d'isotherme selon Langmuir appliqué au PET-CD, a abouti à une bonne linéarité des résultats pour les implants vieillis ou non, avec des coefficients respectifs de $R^2=0,9968$ et $0,9942$ ($R^2 = 0,993$ et $0,996$ pour le PLLA-CD) (**Figure 103**). Ce schéma correspondant à une molécule active par site d'adsorption, est donc vérifié.

Il a également été possible de déterminer par traitement mathématique, la capacité d'adsorption à saturation en ropivacaïne de ces supports. Ainsi, le PET-CD non-vieilli est saturé pour une dose q_m de $29,85$ mg/g alors qu'après vieillissement ce valeur seuil atteint $q_m= 25,7$ mg/g. Cet écart d'environ 4 mg/g reste cependant négligeable (**Tableau 23**).

Une très nette diminution de la capacité d'adsorption est observable pour les échantillons vieillis artificiellement passant de 42 mg/g pour un PLLA-CD non-vieilli imprégné dans une solution à 5 g/L de ropivacaïne contre 30 mg/g après vieillissement. Les capacités d'adsorption à saturation confirment cette observation des performances après vieillissement avec $q_m= 44,84$ mg/g pour un échantillon PLLA-CD non-vieilli contre $35,71$ mg/g pour un homologue vieilli à 60°C durant 50 jours.

En revanche, l'adsorption isotherme selon Freundlich n'est pas vérifiée car après application du modèle mathématique aux données, les coefficients de corrélation obtenus restent inférieurs à $R^2= 0,8$ quelque soit le traitement subi par les supports PET-CD comme PLLA-CD. La ropivacaïne s'adsorbe donc de façon spécifique à la surface du polyCD, soit en interagissant avec les fonctions carboxyliques soit avec les cavités des cyclodextrines, formant ainsi une monocouche sans agrégation de molécules à la surface.

L'ensemble des résultats obtenus (coefficient de corrélation R^2 et q_m) en fonction de la molécule étudiée, du textile et de son traitement, sont résumés dans le **Tableau 23** :

Tableau 23 : Récapitulatif des résultats des isothermes d'adsorption de la lidocaïne et de la ropivacaïne sur PET-CD et PLLA-CD

		Lidocaïne			Ropivacaïne		
		Langmuir R ²	qm (en mg/g)	Freundlich R ²	Langmuir R ²	qm (en mg/g)	Freundlich R ²
PET	Non- vieilli	0,9956	38,46	0,9849	0,9942	29,85	0,787
	Vieilli	0,9923	37,17	0,9633	0,9968	25,7	0,6187
PLLA	Non- vieilli	0,9966	144,93	0,917	0,993	44,84	0,656
	Vieilli	0,9747	133,33	0,888	0,996	35,71	0,777

Bien qu'analogues dans leur structure, les deux anesthésiques locaux, la lidocaïne et la ropivacaïne présentent un comportement différent face au polymère de cyclodextrines qui enrobe les fibres des textiles.

III.5. Evaluation biologique du dispositif implantable fonctionnalisé et activé

En tant que dispositif « frontière » alliant un implant et un principe actif, il est important de démontrer la biocompatibilité de l'ensemble afin de mettre en évidence un éventuel effet toxique résultant de cette combinaison. Pour cela, des implants PET-CD fonctionnalisés ont été activés par imprégnation dans une solution de ropivacaïne issue d'une poche de perfusion (Naropeine 2 g/L – 200 mL) durant 5 minutes. Par la suite deux méthodes ont été employées pour évaluer la vitalité cellulaire de cellules fibroblastiques NIH3T3 en présence des dispositifs (2^{ème} partie II.E.3). La première a été une étude de vitalité cellulaire par le Bleu Alamar à 3 et 6 jours, comme pratiqué précédemment sur les supports fonctionnalisés seuls. La seconde, adaptée d'une expérience de vitalité classique, a visé à consister à simuler au mieux l'implantation en plaçant l'échantillon activé sur un tapis de cellules.

Afin d'isoler l'effet de l'activation dans l'anesthésique local et de la fonctionnalisation par les cyclodextrines, l'étude a été étendue au PET vierge imprégné dans la ropivacaïne (PET vierge Ropi) et au support PET-CD sans principe actif (PET-CD).

Dans les deux protocoles, il a été convenu de rapporter les résultats à ceux du PET vierge défini comme témoin positif, celui-ci étant employé comme biomatériau donc parfaitement biocompatible (**Figure 105**).

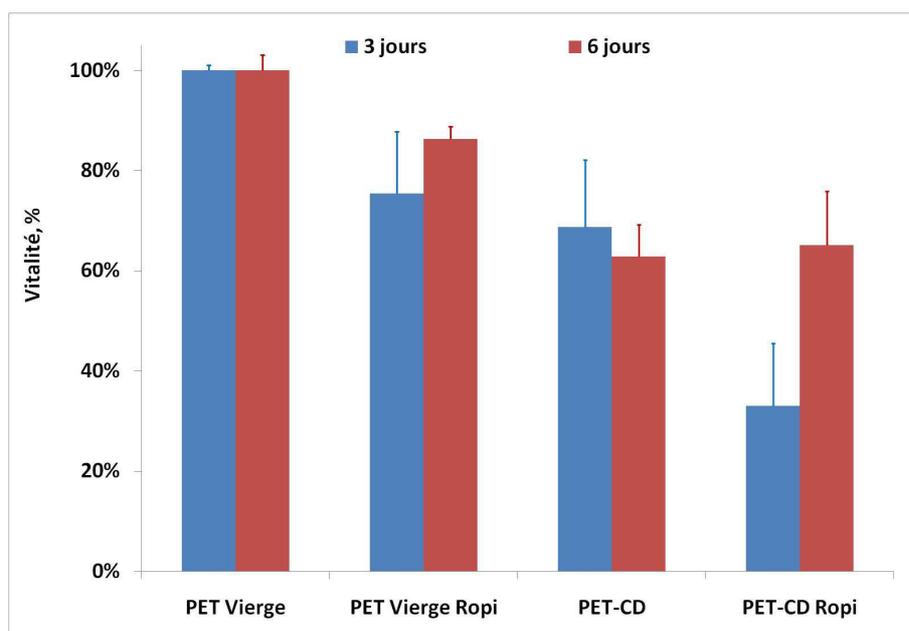


Figure 105 : Vitalité cellulaire de fibroblastes NIH3T3 par rapport au PET vierge et pour des supports vierges et fonctionnalisés activés par la ropivacaïne

La hausse de vitalité observée sur le PET-CD activé (+ ropivacaïne) entre 3 et 6 jours, peut être expliquée par un certain temps d'adaptation des cellules au milieu, qui se mettent à proliférer tardivement. Ainsi, le taux de vitalité à 6 jours rejoint celui observé pour le PET-CD.

Le deuxième protocole a permis de se rapprocher au maximum des conditions finales d'utilisation. Ici, la vitalité n'est pas évaluée à 3 et 6 jours mais au bout de 2 jours (**Figure 106**).

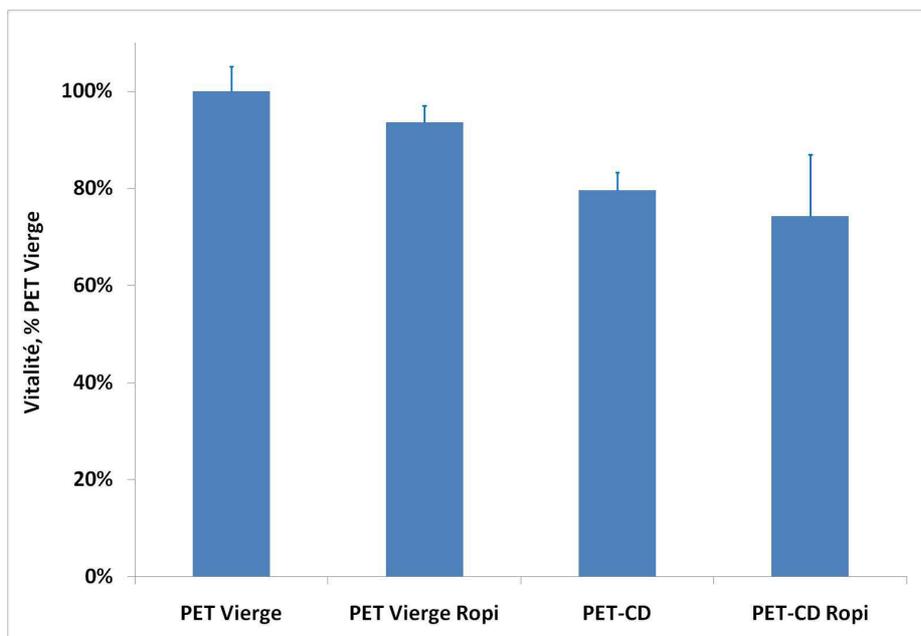


Figure 106 : Vitalité cellulaire de fibroblastes NIH3T3 par rapport au PET vierge et par dépôt des supports vierges et fonctionnalisés activés par la ropivacaïne

L'imprégnation dans la solution de principe actif provoque une très légère diminution de la vitalité. Cela s'explique par la certaine cytotoxicité de la ropivacaïne [214]. De même, l'apport du polyCD génère une diminution de la vitalité à 80%, traduisant un défaut de neutralisation, ce qui accroît légèrement l'acidité du milieu. L'effet combiné de ces deux éléments (PET-CD + Ropivacaïne) engendre une baisse de 74%, ce qui reste cependant au-dessus de la limite rédhibitoire des 50%.

Cette expérience a donc permis d'observer l'absence de toxicité aiguë du dispositif sur 2 jours. Il conviendrait d'étendre la durée de séjour des échantillons dans le milieu cellulaire afin d'évaluer l'influence de la dégradation du polymère de cyclodextrines sur la vitalité cellulaire qui avait été mise en évidence précédemment par l'étude sur les supports PET-CD seul.

DISCUSSION

Des travaux antérieurs du laboratoire ont déjà démontré la faisabilité de fonctionnaliser des biomatériaux à base de textiles PET par un polymère de cyclodextrines notamment sur des prothèses vasculaires [183, 215, 216]. En revanche, aucune étude n'avait encore été menée sur l'ennoblissement par les cyclodextrines d'un textile résorbable comme le PLLA. Ces travaux ont permis de montrer l'applicabilité du procédé sur ce matériau. Aucune dégradation chimique des fils de PLLA par hydrolyse n'a été constatée lors de l'imprégnation dans la solution de réactifs ; aucune dégradation n'a été visible lors de la thermofixation tant que la température employée ne dépasse pas les 140°C. Les taux de fonctionnalisation obtenus sur ce textile peuvent atteindre des valeurs très élevées (> 30%).

L'ennoblissement par les cyclodextrines est maîtrisable à travers 3 paramètres principaux que sont la température et la durée de thermofixation et la dilution du bain d'imprégnation des réactifs.

Concernant les deux premières variables, un taux de fonctionnalisation maximal est atteint notamment pour des valeurs supérieures à 140°C et pour des durées de traitement de plus de 30 minutes. Dès lors la détermination précise de ces deux paramètres s'effectue principalement en fonction de la nature du support traité. Un textile en PET résistera mieux à des températures élevées que le PLLA, dont la fusion intervient à 157°C. En accord avec le cahier des charges émis par le partenaire industriel, il a été convenu d'employer une température « faible », **140°C**, mais suffisante pour atteindre le maximum de fonctionnalisation en traitant pendant une durée de **60 minutes**. Cette durée est non rédhibitoire dans le cadre de la fabrication à l'échelle industrielle des futurs implants de réfection pariétale.

Deux couples polyacide/cyclodextrine BTCA/ β CD et CTR/HP β CD ont été employés. L'acide citrique associé à la HP β -cyclodextrine apparaît comme la formulation la plus adaptée à cette étude vis-à-vis de l'application visée.

La variation du taux de dilution du bain d'imprégnation a permis de réaliser une gamme d'échantillons à différents taux de polymères de CDs, démontrant également une proportionnalité entre ces deux paramètres.

Les échantillons fonctionnalisés ont été caractérisés selon diverses techniques afin de mettre en évidence et de quantifier le polymère de cyclodextrine sur le support PET ou PLLA. Ainsi, l'analyse thermogravimétrique a permis d'observer une diminution de la température de dégradation thermique pour des taux de polyCD croissants. La quantification du taux de fonctionnalisation sur des échantillons de PET fonctionnalisés est possible par cette technique

appliquant un facteur correctif, la dégradation du polyCD étant en partie masquée par la dégradation du PET à partir de 300°C.

L'analyse enthalpique différentielle a mis en évidence sur les textiles PLLA une influence des étapes de traitements (thermofixation, foulardage,...) lors du procédé de fonctionnalisation. En effet, l'apparition d'un deuxième pic de fusion à 155°C souligne la propagation d'une nouvelle phase cristalline dans le matériau.

Les essais mécaniques pratiqués sur des textiles PET et PET-CD₁₀₀ n'ont pas montré de fragilisation du textile par la fonctionnalisation, hormis une légère perte de résistance non rédhibitoire (-15%) de la section droite du fil.

Des échantillons de PET-CD₂₀₀ (24%-wt) ont été analysés par RMN du solide (séquence CPMAS) afin de mettre en évidence la présence de polyCD sur le support fonctionnalisé. Cette technique s'est avérée intéressante car elle a permis de détecter le polyCD sur les supports. Une étude similaire sur le PLLA est envisageable.

L'étude d'adsorption du bleu d'o-toluidine (TBO) a démontré l'apport de la fonctionnalisation sur les capacités d'adsorption des implants PET et PLLA. La saturation du support pour les échantillons à des taux supérieurs de 6% pour le PET (8% pour le PLLA) est attribuable au mécanisme d'adsorption de ce composé qui forme une monocouche à la surface du polymère de cyclodextrine, empêchant de ce fait l'accession du colorant au cœur du réseau.

Ces résultats ont été corrélés à l'étude des cinétiques d'adsorption d'un antibiotique, la ciprofloxacine, dont les quantités adsorbées sont directement liées au taux de polyCD présent sur les supports. Cette étude a toutefois démontré qu'un temps de contact de 20 minutes, maximum acceptable lors d'une intervention chirurgicale, ne permet pas le chargement total des échantillons à fort taux de fonctionnalisation (CD₂₀₀) en comparaison d'une imprégnation jusqu'à saturation de 24 h.

Les cinétiques de libération de la CFX ont été établies dans deux milieux l'eau ultrapure et le PBS, tampon phosphate à pH=7,4. Dans le premier, des durées de libérations sur plusieurs semaines ont été observées. *A contrario*, un effet spectaculaire est observable dans le PBS où la totalité de la CFX adsorbée est libérée en seulement quelques heures. Cette différence peut s'expliquer par la force ionique du milieu PBS qui déplace l'équilibre en favorisant la désorption du principe actif.

En système « batch », la dynamique de milieu semble également avoir une influence sur les durées de libération ; plus le renouvellement du milieu est important plus les durées de libération sont courtes. Ces résultats ont été confirmés par la cinétique de libération de la CFX dans le PBS

en utilisation un système dynamique de type USP-IV qui permet un renouvellement constant (1 mL/min) du milieu. Ici également, les durées de libération sont liées à la quantité adsorbée par les supports et donc à leur taux de fonctionnalisation.

Il est à souligner que tout au long de l'étude, les pastilles de PLLA ont présenté des écarts-type importants ce qui impose d'analyser les résultats obtenus pour ce support avec une certaine retenue. Néanmoins, ces échantillons ne représentent qu'une faible surface ($\varnothing=11\text{mm}$) de l'implant. Il est probable que cette inhomogénéité des valeurs s'atténue pour des surfaces plus importantes (5 x 5 cm).

Enfin, la persistance antibactérienne des supports PET-CD et PLLA-CD activés par imprégnation dans une solution de CFX, a été évalué par une étude microbiologique sur deux souches bactériennes couramment observées dans les cas d'infections nosocomiales : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, respectivement bactéries à Gram négatif et à Gram positif. La ciprofloxacine possède une concentration minimale inhibitrice CMI différente selon le type de bactérie étudié. Elle s'avère plus efficace contre les souches à Gram – comme *E.coli* que sur les souches à Gram + comme *S.aureus*. Les supports fonctionnalisés PET et PLLA présentent tout de même une activité antibactérienne au-delà de 72 h de contact avec le plasma sanguin sur *E.coli* et pendant 48 h sur *S.aureus*, ce qui conviendrait pour la lutte contre les infections dans les premières heures après l'intervention.

Les données recueillies sur les supports de différents taux de fonctionnalisation ont été corrélés aux résultats de l'évaluation biologique et résumés dans les **Tableau 24** et **Tableau 25** :

Tableau 24 : Récapitulatif des données recueillis sur les supports PET-CD à différents taux de fonctionnalisation

PET	Taux de fonctionnalisation (%)	Adsorption CFX (20 min) (mg/g)	Libération CFX eau (j) Renouv. 100%	Libération CFX (PBS) (h) Renouv. 100%	Activité microbiologique		Cytotoxicité (en%)	
					<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	3j	6j
CD25	3	19,2 (100%)	15	1	48 h	2h	90	70
CD50	6	30,1 (76,2%)	23	2	72h	6h	90	70
CD100	13	55,4 (74,9%)	33	4	>72h	24h	85	60
CD200	24	71,1 (47,4%)	70	4	>72h	48h	59	50

Le **Tableau 24** a permis d'identifier le taux de fonctionnalisation qui représente le meilleur compromis entre une bonne cytocompatibilité et des capacités d'adsorption/libération optimales. Dès lors, notre choix s'est arrêté dans le cas du PET sur un taux de fonctionnalisation de **13%** correspondant à une concentration pondérale globale de **180 g/L (80/10/100 g** par litre de solution, **CTR/NaH₂PO₂/HP β CD)**

Tableau 25 : Récapitulatif des données recueillis sur les supports PLLA-CD à différents taux de fonctionnalisation

PLLA	Taux de fonctionnalisation (%)	Adsorption CFX (20 min) (mg/g)	Libération CFX eau (j) Renouv. 100%	Libération CFX (PBS) (h) Renouv. 100%	Activité microbiologique		Cytotoxicité (en%)	
					<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	3j	6j
CD25	4	7,10 (100%)	65	1	48 h	48h	90	85
CD50	8	42.7 (100%)	55	3	>72h	72h	45	19
CD100	15	49,2 (93%)	65	6	>72h	72h	30	10
CD200	33	68,7 (66%)	78	6	>72h	48h	12	8

Il n'est pas possible à partir des données recueillis pour le PLLA dans le **Tableau 25** d'élire un taux de fonctionnalisation. Les échantillons PLLA-CD₅₀ (8%, 90 g/L) et PLLA-CD₁₀₀ (15%, 180g/L) semblent toutefois présenter de bonnes capacités d'adsorption ainsi que des durées de libération acceptables. Néanmoins, les médiocres valeurs de l'évaluation biologique (cytotoxicité) révèlent une neutralisation insuffisante. Il conviendra donc de revoir les résultats une fois cette étape optimisée.

Dans des travaux récents, Guillaume *et al.* proposent un implant de réfection de paroi en PP enrobé par un polymère à base polycaprolactone renfermant un antibiotique, analogue de la ciprofloxacine, l'ofloxacine [145]. Ces travaux ont montré qu'un échantillon de 9 cm² contenant 1 mg d'ofloxacine, déposé sur une géloseensemencée par *E.coli* présentait un halo d'inhibition de 3,9 mm de diamètre après 72h d'incubation. Dans notre projet, les pastilles PET-CD₁₀₀ ($\phi=11$ mm) représentent une surface spécifique de 1 cm², adsorbent 0,55 mg de ciprofloxacine et

présente un halo d'inhibition de 20 mm de diamètre après 72h de libération dans le plasma sanguin. Néanmoins, il n'est pas envisageable de comparer les performances de ce dispositif avec celles que nous avons obtenues et mesurées. En effet, la ciprofloxacine présente une concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de *E.coli* 10 fois inférieure à celle de l'oxoflacine, donc une efficacité supérieure. De plus, dans notre étude de la persistance microbiologique, les échantillons activés par l'antibiotique subissent un vieillissement par contact avec une solution de plasma sanguin issu de sang total humain. Seule une étude *in vivo* permettrait d'évaluer le dispositif le plus performant.

Enfin, l'affinité des supports fonctionnalisés vis-à-vis de deux anesthésiques locaux, la lidocaïne et la ropivacaïne. Tout d'abord, les interactions entre cette dernière et le polyCTR-HP β CD ont été caractérisées en solution par RMN et notamment par la RMN SELNOE qui permet sélectivement d'observer l'environnement chimique d'un groupe de protons. Cette technique a mis en évidence à la fois une inclusion du PA dans la cavité des cyclodextrines mais également des interactions avec les protons extérieurs, notamment ceux de l'agent réticulant, ce qui montre que la ropivacaïne interagit avec l'ensemble du polymère de cyclodextrines. Ce résultat a été confirmé par une étude en électrophorèse capillaire, qui a permis de déterminer la constante d'association apparente entre les deux composés à 76 M^{-1} . Cette valeur traduit des interactions faibles mais toutefois plus fortes qu'avec l'HP β CD seule ($9,41 \text{ M}^{-1}$ - issue de la littérature [165]). Les isothermes d'adsorption ont démontré que la lidocaïne peut s'adsorber non-spécifiquement sur les différents sites d'adsorption du polymère de cyclodextrine (fonction carboxylate et cavité de la cyclodextrine). *A contrario*, une molécule analogue comme la ropivacaïne interagira spécifiquement avec un seul site d'adsorption.

Cette différence de comportement peut être expliquée par l'unique différence structurelle entre ces deux anesthésiques locaux, située au niveau de leur pôle hydrophile. En effet, la lidocaïne possède une amine tertiaire substituée par deux groupements éthyl. La ropivacaïne comporte également une amine tertiaire intégré à un groupement pipéridine et substitué par un groupement éthyl. La mobilité de cet AL peut s'avérer compliquée du fait de l'encombrement stérique, alors que dans le cas de la lidocaïne, elle pourrait facilement accéder aux sites d'adsorption de du polyCD. Ces résultats corréler les durées d'imprégnation nécessaires à un chargement complet en AL des supports. En effet, la saturation du textile fonctionnalisé en lidocaïne s'effectue en minimum 30 secondes quand il faut 5 minutes pour atteindre 80% de la capacité maximale d'adsorption avec la ropivacaïne.

Dans la littérature, des études ont démontré l'efficacité d'une injection unique de 225 mg de ropivacaïne dans les berges de la plaie. Un implant de réfection de paroi fonctionnalisé PET-CD

pesant en moyenne 10 g, il adsorbe 180 mg de ropivacaïne en 20 minutes selon la quantité déterminée par les cinétiques d'adsorption. Cette valeur ne fait néanmoins état que de la ropivacaïne qui interagit directement avec le polyCD. En effet, les échantillons sont rincés après imprégnation dans la solution de principe actif, ce qui élimine une fraction non négligeable de principe actif qui n'est que physisorbée à la surface de l'implant ainsi que dans les gouttelettes formées dans le maillage. Dès lors, il conviendra d'étudier la quantité de ropivacaïne emportée avec le textile et qui, sans interactions spécifique avec le textile, pourra servir de libération (« burst effect ») très efficace dans les premiers temps post-opératoire. Le principe actif adsorbé par le polyCD sera ensuite libérée afin de prolonger l'effet analgésique.

Il est compliqué de comparer notre dispositif à un produit ou une technique actuelle. En effet, les protocoles existants à l'heure actuelle proposent une injection unique cicatricielle, ce qui ne fournit qu'un effet court dans le temps (< 8h) car sans réelle rétention, une grande partie de l'AL est très rapidement métabolisé et éliminé sans pouvoir agir. Il est très compliqué de simuler les conditions rencontrées par le textile fonctionnalisé dans l'environnement corporel, tel que le renouvellement de milieu ou encore les fluides et leurs composants. De plus, la douleur est un symptôme qui ne peut être aisément quantifié par des simples analyses comme une étude microbiologique pour l'évaluation de la persistance antibactérienne. Une étude d'efficacité *in vivo* sera donc nécessaire pour réellement déterminer l'activité de nos supports.

CONCLUSION

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre un partenaire industriel, COUSIN BIOTECH, et deux équipes académiques, l'UMET et l'unité INSERM U1008. L'objectif fixé par le cahier des charges visait à développer un implant de réfection de paroi à propriétés de libération contrôlée. Ce projet était axé autour de deux supports, un biostable, le PET et un résorbable le PLLA et deux types d'activités biologiques étaient ciblées, antibactérienne et analgésique.

Les paramètres de la fonctionnalisation ainsi que les réactifs ont été déterminés : imprégnation dans une solution contenant un mélange d'acide citrique, d'HP β -cyclodextrine et du catalyseur hypophosphite de sodium et thermofixation de 1 h à 140°C.

La concentration pondérale globale a été établie à 180 g/L dans le cas du PET-CD et par défaut du PLLA dans l'attente d'une optimisation de l'étape de neutralisation. Cette concentration correspond à un rapport massique des réactifs de 8/1/10 g pour 100 mL de solution.

Les propriétés mécaniques du PET fonctionnalisé ont été testées et approuvées par COUSIN BIOTECH. Comme il sera complété par une structure biostable (PP) dont le rôle sera d'assurer la tenue mécanique, cette étude n'a pas été effectuée sur le PLLA. Néanmoins, il n'a pas été observé de dégradation structurelle ou dimensionnelle du matériau résorbable par la fonctionnalisation sous les conditions précédemment cités (140°C, 1h).

Des supports PLLA-CD₂₀₀ placés en « batch » dans le PBS à 37°C, ont montré sous 180 jours une perte de masse équivalente au taux de polyCD sur les fibres (- 33%) sans pour autant qu'une dégradation du support textile ne soit observable. Cela prouve que la fonctionnalisation par les cyclodextrines d'un matériau résorbable n'altère pas cette propriété prépondérante.

La biocompatibilité des textiles fonctionnalisés PET et PLLA a été évaluée sur des fibroblastes NIH3T3. Dans le cas du PET, la vitalité cellulaire reste supérieure à la valeur rédhibitoire des 50% et cela même après 6 jours d'incubation. Dans le cas du PLLA, une chute de la vitalité entre 3 et 6 jours d'incubation a montré un défaut de neutralisation qui nécessitera une adaptation de la méthode.

Nous avons démontré que les capacités d'adsorption d'un principe actif sur les supports fonctionnalisés, augmentent avec le degré de fonctionnalisation. Les cinétiques d'adsorption ont permis d'évaluer les quantités adsorbées en fonction des temps de contact avec les solutions de principes actifs pour des durées comprises entre 0 et 60 minutes.

Les cinétiques de libération d'un antibactérien, la ciprofloxacine, ont mises en évidence des durées de libération qui s'accroissent avec le taux de fonctionnalisation dans l'eau et un milieu tamponné, le PBS. Ces résultats ont été confirmés par une étude de la persistance antibactérienne d'échantillons PET et PLLA fonctionnalisés et activés par la CFX. Leur activité s'avère soutenue après 72 h de séjour dans le plasma issu de sang total humain sur *Escherichia coli*.

Dans un aspect fondamental, l'affinité entre le polymère de cyclodextrine et un anesthésique local, la ropivacaïne a été étudiée par RMN et électrophorèse capillaire qui a permis d'établir la constante d'association apparente entre ces deux composés à 76 M^{-1} .

Les isothermes d'adsorption ont complété cette étude en montrant la formation d'une monocouche de ce principe actif à la surface de l'échantillon fonctionnalisé, soit une adsorption spécifique sur soit les fonctions carboxylates soit les cavités des cyclodextrines. Une étude similaire menée sur une molécule analogue la lidocaïne a mise en évidence un comportement totalement différent, à savoir l'adsorption simultanée sur plusieurs sites non spécifiquement du polyCD.

Ces résultats ont permis par ailleurs de définir les quantités q_m d'anesthésiques locaux adsorbés à saturation par les supports.

Deux techniques de stérilisation ont été appliquées aux implants fonctionnalisés, le rayonnement γ et l'adsorption /désorption d'oxyde d'éthylène sans toutefois diminuer les quantités de CFX. De même, les isothermes d'adsorption établis sur des échantillons vieilliss artificiellement (équivalent à 3 ans) n'ont pas montré de pertes significatives des capacités d'adsorption.

Enfin, la biocompatibilité sur fibroblastes NIH3T3 du dispositif final textile PET fonctionnalisé (PET-CD₁₀₀) et activé par imprégnation dans la ropivacaïne a été évaluée. Après une incubation de 6 jours, la vitalité cellulaire du dispositif activé rejoint celle du dispositif seul (60%).

La majeure partie des conditions définies dans le cahier des charges ont été vérifiées lors de cette thèse. Il ne manque qu'à démontrer l'efficacité analgésique des implants fonctionnalisés. Pour cela, des essais *in vivo* sont en préparation afin d'évaluer l'activité analgésique du dispositif. Des cinétiques de libération des anesthésiques locaux pourront être établies *in vivo* en parallèle lors de cette étude.

Il serait intéressant d'évaluer les propriétés « supplémentaires » des anesthésiques locaux qui outre leur capacité à bloquer l'influx nerveux, peuvent générer d'autres effets thérapeutiques comme un effet anti-inflammatoire ou antibactérien .

L'activation par un antibiotique de la prothèse textile fonctionnalisée pourrait permettre l'implantation dans un milieu infecté. En effet, actuellement lors d'une infection du site chirurgical, il est préconisé de ne pas introduire de nouveaux implants afin de ne pas favoriser la prolifération. Cette restriction d'usage peut engendrer une récurrence de la hernie sur une paroi fragilisée. Notre dispositif pourrait dès lors faire office de pansement actif agissant directement sur le site infecté, qui détruirait *in situ* toute bactérie qui pourrait à nouveau proliférer (action curative).

Enfin, la fonctionnalisation par le polymère de cyclodextrines offre de nombreuses possibilités d'adaptation à d'autres types de dispositifs médicaux produits par COUSIN BIOTECH, comme par exemple les ligaments artificiels ou les cas bandelettes destinées à la chirurgie gynécologique. De plus, la polyvalence du polyCD en font une parfaite plateforme pour des utilisations spécifiques comme la délivrance d'anticancéreux ou d'anti-inflammatoires.

Sur le plan personnel, ce projet m'a permis d'aborder des thématiques aussi diverses et variées que la modification de surface, la pharmacotechnie ou bien encore la microbiologie. Il m'a été donné également d'évoluer dans différents types de laboratoire et d'environnement ce qui m'a énormément apporté sur un plan humain et relationnel ainsi qu'en termes de compétences supplémentaires (biologie, microbiologie, pharmacologie).

L'avantage d'une thèse CIFRE est également de découvrir le monde industriel et étant de formation purement, universitaire, j'ai pu découvrir un autre point de vue sur la recherche, à travers ce sujet de recherche très applicatif.

Bibliographie

1. P. Ananian, K.B., P. Balandraud, Y.P. Le Treut, *Cure chirurgicale des hernies inguinales de l'adulte. Enjeux cliniques, fonctionnels et économiques des pratiques chirurgicales.* Journal de Chirurgie Viscérale, 2006. **143**(2): p. 76-83.
2. Kehlet, H., T.S. Jensen, and C.J. Woolf, *Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention.* The Lancet, 2006. **367**(9522): p. 1618-1625.
3. Beaussier, M. and M. Aissou, *Infiltrations cicatricielles en injections uniques. Neurochirurgie, chirurgie ORL, thoracique, abdominale et périnéale.* Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, 2009. **28**(3): p. e163-e173.
4. Péliissier, E., J.X. Mazoit, and M. Beaussier, *Infiltration continue préperitonéale d'anesthésiques locaux pour l'analgésie après laparotomie. Données préliminaires.* Annales de Chirurgie, 2006. **131**(3): p. 198-202.
5. Kfoury, T., et al., *A Comparison of Different Dosages of a Continuous Preperitoneal Infusion and Systemic Administration of Ropivacaine After Laparotomy in Rats.* Anesthesia & Analgesia, 2011. **113**(3): p. 617-625.
6. Blanchemain, M.M., H. F. Hildebrand, S. Haulon, F. Boschin, E. Delcourt-Debruyne, *Biomatériaux porteurs de cyclodextrines aux propriétés d'absorption améliorées et de libération progressive et retardée de molécules thérapeutiques.* 2006.
7. Martel B., M.M.W.M., *Procédé de traitement d'une fibre ou d'un matériau à base de fibres en vue d'améliorer ses propriétés absorbantes et fibre ou matériau à base de fibres présentant des propriétés absorbantes améliorées.* 2000: France.
8. Jenkins, J.T. and P.J. O'Dwyer, *Inguinal hernias.* BMJ, 2008. **336**(7638): p. 269-272.
9. <http://www.chirurgie-hernie-lyon.fr/>.
10. ANAES, *Evaluation clinique et économique de la coeliochirurgie dans le cadre de la hernie de l'aine.* 2000.
11. <http://www.wsiat.on.ca/french/mlo/fhernias.htm>.
12. Muschaweck, U., *Umbilical and epigastric hernia repair.* The Surgical clinics of North America, 2003. **83**(5): p. 1207-1221.
13. M. Mathonnet, D.M., *Hernies antéro-latérales de l'abdomen.* Journal de Chirurgie Viscérale, 2007. **144**(HS n°4): p. 19-22.
14. Keith L. Moore, A.F.D., *Anatomie médicale: Aspects fondamentaux et applications cliniques.* 2001: p. 548.
15. M. Mathonnet, D.M., *Hernies crurales : techniques de réparation.* Journal de Chirurgie, 2007. **144**(HS n°4).

16. Moreno-Egea, A., et al., *Accuracy of clinical diagnosis of inguinal and femoral hernia and its usefulness for indicating laparoscopic surgery*. *Hernia*, 2000. **4**(1): p. 23-27.
17. Hendry, P.O., S. Paterson-Brown, and A. de Beaux, *Work related aspects of inguinal hernia: A literature review*. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, 2008. **6**(6): p. 361-365.
18. Pans, A., et al., *Adult groin hernias: new insight into their biomechanical characteristics*. *European Journal of Clinical Investigation*, 1997. **27**(10): p. 863-868.
19. Szczęśny, W., et al., *Etiology of inguinal hernia: ultrastructure of rectus sheath revisited*. *Hernia*, 2006. **10**(3): p. 266-271.
20. <http://www.fmed.ulaval.ca/med-18654/prive/Cours%2021.htm>.
21. Campanelli, G., et al., *Inguinal hernia: State of the art*. *International Journal of Surgery*, 2008. **6**, **Supplement 1**(0): p. S26-S28.
22. Arthur I. Gilbert, M.F.G., Walter J. Voigt, *Inguinal hernia : Anatomy and Management*. Clinical review, 2000.
23. Lau, W., *History of treatment of groin hernia*. *World Journal of Surgery*, 2002. **26**(6): p. 748-759.
24. Chiotasso, P., *Le Shouldice*. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2009. **8**(2): p. 34-37.
25. J M Hay, M.J.B., A Fingerhut, J Poucher, H Hennet, E Habib, M Veyrières, and Y Flamant, *Shouldice inguinal hernia repair in the male adult: the gold standard? A multicenter controlled trial in 1578 patients*. *Annals of surgery*, 1995. **222**(6): p. 719-727.
26. Amato, B., et al. (2009) *Shouldice technique versus other open techniques for inguinal hernia repair*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, DOI: 10.1002/14651858.CD001543.pub3.
27. Lichtenstein, I.L., et al., *The tension-free hernioplasty*. *The American Journal of Surgery*, 1989. **157**(2): p. 188-193.
28. Read, R., *Milestones in the history of hernia surgery: Prosthetic repair*. *Hernia*, 2004. **8**(1): p. 8-14.
29. Amid, P., *Lichtenstein tension-free hernioplasty: Its inception, evolution, and principles*. *Hernia*, 2004. **8**(1): p. 1-7.
30. Bob, *Abdominal Wall Hernias*. Knol [internet]. **34**.
31. HAS, H.A.d.S., *Evaluation des implants de réfection de paroi, de suspension et d'enveloppement en chirurgie digestive et dans les indications spécifiques à la chirurgie pédiatrique*. 2008.

32. Bringman, S., et al., *Introduction of herniorraphy with mesh plug and patch*. European Journal of Surgery, 2000. **166**(4): p. 310-312.
33. Robbins, A.W. and I.M. Rutkow, *Mesh plug repair and groin hernia surgery*. Surgical Clinics of North America, 1998. **78**(6): p. 1007-1023.
34. Dieudonné, G., *Plug repair of groin hernias: a 10-year experience*. Hernia, 2001. **5**(4): p. 189-191.
35. Leroy, J., et al., *The new 4DDome prosthesis: an original light and partially absorbable composite mesh for hernia repair*. Hernia, 2006. **10**(5): p. 401-408.
36. Kingsnorth, A.K., et al., *Prolene Hernia System compared with Lichtenstein patch: a randomised double blind study of short-term and medium-term outcomes in primary inguinal hernia repair*. Hernia, 2002. **6**(3): p. 113-119.
37. <http://www.cousin-biotech.com/produit.php?idrubrique=1&idspecialite=12&idcategorie1=39&idcategorie2=39&idproduit=125>.
38. Dulucq, J.-L., *Cure de hernie inguinale laparoscopique par voie pré-péritonéale*. Journal de Chirurgie Viscérale, 2000. **137**(5).
39. Johannet, H., *Voie laparoscopique transpéritonéale pour cure de hernie inguinale par prothèse pré-péritonéale*. Journal de Chirurgie Viscérale, 1998. **135**(3).
40. Valverde, A., *Cure de hernie inguinale par abord laparoscopique intrapéritonéal*. Journal de Chirurgie Viscérale, 2008. **145**(3): p. 272-275.
41. Slim, K. and C. Vons, *Traitement chirurgical des hernies de l'aine. Résultats des essais randomisés et des méta-analyses*. Journal de Chirurgie, 2008. **145**(2): p. 122-125.
42. Bouillot, J.L., et al., *Comment choisir une prothèse pour le traitement des éventrations abdominales ?* Annales de Chirurgie, 2004. **129**(3): p. 132-137.
43. Scales, *Tissue reactions to synthetic materials*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1953. **48**(8): p. 641-652.
44. Earle, D.B. and J. Romanelli, *Prosthetic materials for hernia: What's new. How to make sense of the multitude of mesh options for inguinal and ventral hernia repairs*. Contemporary Surgery, 2007. **63**(2): p. 63-69.
45. Coda, A., R. Lamberti, and S. Martorana, *Classification of prosthetics used in hernia repair based on weight and biomaterial*. Hernia: p. 1-12.
46. Vettorel, *Prothèses pariétales : que choisir?* Revue Médicale Suisse, 2001. **649**.
47. Campanelli, G., F. Catena, and L. Ansaloni, *Prosthetic abdominal wall hernia repair in emergency surgery: from polypropylene to biological meshes*. World Journal of Emergency Surgery, 2008. **3**(1): p. 33.

48. Schuster, R., et al., *The use of acellular dermal matrix for contaminated abdominal wall defects: wound status predicts success*. The American Journal of Surgery, 2006. **192**(5): p. 594-597.
49. Brown, P., *Abdominal Wall Reconstruction Using Biological Tissue Grafts*. AORN journal, 2009. **90**(4): p. 513-524.
50. Earle, D.B. and L.A. Mark, *Prosthetic Material in Inguinal Hernia Repair: How Do I Choose?* The Surgical clinics of North America, 2008. **88**(1): p. 179-201.
51. LeBlanc, K.A., et al., *In vivo study of meshes implanted over the inguinal ring and external iliac vessels in uncastrated pigs*. Surgical Endoscopy, 1998. **12**(3): p. 247-251.
52. Morris-Stiff Mb, B.F.G.J. and F.F.L.E. Hughes Ds, *The Outcomes of Nonabsorbable Mesh Placed Within the Abdominal Cavity: Literature Review and Clinical Experience*. Journal of the American College of Surgeons, 1998. **186**(3): p. 352-367.
53. Cobb, W., et al., *Mesh terminology 101*. Hernia, 2009. **13**(1): p. 1-6.
54. Covidien, *Parietex ProGrip® Mesh - Plaquette commerciale*.
55. Champault, G., et al., *A "self adhering" prosthesis for hernia repair: experimental study*. Hernia, 2009. **13**(1): p. 49-52.
56. Deeken, C.R., et al., *Physicomechanical Evaluation of Polypropylene, Polyester, and Polytetrafluoroethylene Meshes for Inguinal Hernia Repair*. Journal of the American College of Surgeons, 2011. **212**(1): p. 68-79.
57. Cobb, W.S., K.W. Kercher, and B.T. Heniford, *The Argument for Lightweight Polypropylene Mesh in Hernia Repair*. Surgical Innovation, 2005. **12**(1): p. 63-69.
58. Coda, A., R. Lamberti, and S. Martorana, *Classification of prosthetics used in hernia repair based on weight and biomaterial*. Hernia, 2011: p. 1-12.
59. Kehlet, H. and P.F. White, *Optimizing Anesthesia for Inguinal Herniorrhaphy: General, Regional, or Local Anesthesia?* Anesthesia & Analgesia, 2001. **93**(6): p. 1367-1369.
60. Gerges, F.J., G.E. Kanazi, and S.I. Jabbour-khoury, *Anesthesia for laparoscopy: a review*. Journal of Clinical Anesthesia, 2006. **18**(1): p. 67-78.
61. Bay-Nielsen, M., et al., *Pain and Functional Impairment 1 Year After Inguinal Herniorrhaphy: A Nationwide Questionnaire Study*. Annals of Surgery, 2001. **233**(1): p. 1-7.
62. Aubrun, F. and D. Barouk, *Prise en charge de la douleur : Intégration de la démarche qualité/coût*. Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement, 2008. **9**(1, Supplement 3): p. 15-20.
63. Aasvang, E. and H. Kehlet, *Chronic postoperative pain: the case of inguinal herniorrhaphy*. British Journal of Anaesthesia, 2005. **95**(1): p. 69-76.

64. H. Merskey, N.B., *Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain*. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, 1994. **2nd édition**.
65. <http://jocelynerollin.com/Photos/Nerfs/Structure%20nerf.jpg>.
66. http://www.vetopsy.fr/sens/soma/doul/images/control_gate.gif.
67. Hansen, M., K. Andersen, and M. Crawford, *Pain following the repair of an abdominal hernia*. *Surgery Today*, 2010. **40**(1): p. 8-21.
68. Asokumar, B., *Regional anesthesia and analgesia: prevention of chronic pain*. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 2008. **12**(4): p. 199-202.
69. Estebe, *Incidence et facteurs de risque de la douleur chronique postchirurgicale*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2009. **28**(2): p. e71-e74.
70. Perkins, F.M. and H. Kehlet, *Chronic Pain as an Outcome of Surgery: A Review of Predictive Factors*. *Anesthesiology*, 2000. **93**(4): p. 1123-1133.
71. Emmanuelle Marret, A.V., Yolaine Raffray, Francis Bonnet, *De la douleur postopératoire à la douleur chronique*. *Douleurs*, 2007. **8**(4): p. 211-216.
72. Delavierre, D., et al., *Évaluation des douleurs pelvipérinéales chroniques*. *Progrès en Urologie*, 2010. **20**(12): p. 865-871.
73. Huskisson, *Measurement of pain*. *The Lancet*, 1974. **304**(7889): p. 1127-1131.
74. ANAES, *Evaluation et suivi de la douleur chronique chez le patient en chirurgie ambulatoire*. 1999.
75. Fränneby, U., et al., *Validation of an Inguinal Pain Questionnaire for assessment of chronic pain after groin hernia repair*. *British Journal of Surgery*, 2008. **95**(4): p. 488-493.
76. Mogil, J.S., et al., *Screening for pain phenotypes: Analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays*. *Pain*, 2006. **126**(1-3): p. 24-34.
77. Hargreaves, K., et al., *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. *Pain*, 1988. **32**(1): p. 77-88.
78. Ness, T.J. and G.F. Gebhart, *Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat*. *Brain Research*, 1988. **450**(1-2): p. 153-169.
79. Rousseaux, C., et al., *Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 35-37.
80. Yang JP, Y.M., Jiang XH, Wang LN, *Establishment of model of visceral pain due to colorectal distension and its behavioral assessment in rats*. *World journal of gastroenterology*, 2006. **12**(17): p. 2781-2784.

81. Jones, R.C.W. and G.F. Gebhart, *Models of Visceral Pain: Colorectal Distension (CRD)*, in *Current Protocols in Pharmacology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
82. Hussain, A. and S. El-Hasani, *Chronic pain 5 years after randomized comparison of laparoscopic and Lichtenstein inguinal hernia repair (Br J Surg 2010; 97: 600–608)*. British Journal of Surgery, 2010. **97**(9): p. 1453-1453.
83. Bromley, *Pre-emptive analgesia and protective premedication. What is the difference?* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2006. **60**(7): p. 336-340.
84. DE Moulin, A.C., I Gilron, *Pharmacological management of chronic neuropathic pain – Consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society*. Pain research and management, 2007. **12**.
85. Aasvang, E. and H. Kehlet, *Surgical management of chronic pain after inguinal hernia repair*. British Journal of Surgery, 2005. **92**(7): p. 795-801.
86. Aveline, C., *Infiltrations et bloc analgésiques au cours de la chirurgie inguinale : actualités et optimisation*. Le praticien en anesthésie réanimation, 2007. **11**(2): p. 85-93.
87. http://www.surgisphere.com/SurgRad/images/articles/July_2011/A01/Figure-9.jpg.
88. Møiniche, S., et al., *A qualitative systematic review of incisional local anaesthesia for postoperative pain relief after abdominal operations*. British Journal of Anaesthesia, 1998. **81**(3): p. 377-383.
89. Narita, M., et al., *Tumescent local anesthesia in inguinal herniorrhaphy with a PROLENE Hernia System: original technique and results*. The American Journal of Surgery, 2009. **198**(2): p. e27-e31.
90. Oakley, M.J., et al., *Randomized placebo-controlled trial of local anaesthetic infusion in day-case inguinal hernia repair*. British Journal of Surgery, 1998. **85**(6): p. 797-799.
91. Tan, K.J. and H. Farrow, *Improving postoperative analgesia for transverse rectus abdominis myocutaneous flap breast reconstruction; the use of a local anaesthetic infusion catheter*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2009. **62**(2): p. 206-210.
92. LeBlanc, K.A., et al., *Evaluation of continuous infusion of 0.5% bupivacaine by elastomeric pump for postoperative pain management after open inguinal hernia repair*. Journal of the American College of Surgeons, 2005. **200**(2): p. 198-202.
93. Chavez-Abraham, V., J. Barr, and P. Zwiebel, *The Efficacy of a Lidocaine-infused Pain Pump for Postoperative Analgesia Following Elective Augmentation Mammoplasty or Abdominoplasty*. Aesthetic Plastic Surgery, 2011. **35**(4): p. 463-469.
94. <http://www.wymfrance.com/>.
95. http://www.iflo.com/prod_onq_classic.php.

96. Hovsepian, R.V., et al., *Infection Risk From the Use of Continuous Local-Anesthetic Infusion Pain Pumps in Aesthetic and Reconstructive Abdominal Procedures*. *Annals of Plastic Surgery*, 2009. **62**(3): p. 237-239 10.1097/SAP.0b013e31817fe4a2.
97. Fuzier, *Effets indésirables des anesthésiques locaux en 2008 : études pharmaco-épidémiologiques en France*. 2009, Toulouse III - Paul Sabatier: Toulouse.
98. Eneida de Paula, C.M.S.C., Giovana R. Tofoli, Michelle Franz-Montan, Leonardo F. Fraceto, Daniele R. de Araujo *Drug delivery systems for local anesthetics*. *Recent Patents on drug delivery formulations*, 2010. **4**(1).
99. Görner, T., et al., *Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix*. *Journal of Controlled Release*, 1999. **57**(3): p. 259-268.
100. Zimmer, P., M. McCann, and M. O'Brien, *Bupivacaine use in the Insuflow® device during laparoscopic cholecystectomy: results of a prospective randomized double-blind controlled trial*. *Surgical Endoscopy*, 2010. **24**(7): p. 1524-1527.
101. PELISSIER E., S.S., *Implantable structure for prolonged and controlled release of an active principle*. 2005.
102. Shikanov, A., A.J. Domb, and C.F. Weiniger, *Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **117**(1): p. 97-103.
103. Shikanov, A., et al., *Paclitaxel tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **358**(1-2): p. 114-120.
104. Kenawy, E.-R., et al., *Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems*. *Materials Chemistry and Physics*, 2009. **113**(1): p. 296-302.
105. Le Corre, P., et al., *Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: in vitro evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002. **238**(1-2): p. 191-203.
106. Maestrelli, F., et al., *New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **395**(1-2): p. 222-231.
107. Sivakumaran, D., D. Maitland, and T. Hoare, *Injectable Microgel-Hydrogel Composites for Prolonged Small-Molecule Drug Delivery*. *Biomacromolecules*, 2011.
108. Yu, H.-Y., P. Sun, and W.-Y. Hou, *Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. **176**(1): p. 133-136.
109. Borgbjerg, *Local anesthetic preparation*. 1995.
110. Dollo, L.C., Fréville, Chevanne, Leverage, *Biopharmacie de complexes anesthésiques locaux-cyclodextrines après administration loco-régionale*. *Annales de pharmacie française*, 2000. **58**: p. 425-432.

111. White, P.F. and H. Kehlet, *Improving Postoperative Pain Management: What Are the Unresolved Issues?* *Anesthesiology*, 2010. **112**(1): p. 220-225
10.1097/ALN.0b013e3181c6316e.
112. H. Beloeil, J.-X.M., *Pharmacologie des anesthésiques locaux*. EMC Anesthésie-Réanimation, 2011. [36-320-A-10]
113. http://www.pharmacology2000.com/Central/Local_Anes/LAobj1.htm.
114. D Becker, K.R., *Essentials of Local Anesthetic pharmacology*. *Anesth Prog*, 2006. **53**(3): p. 98-109.
115. Hollmann, M.W. and M.E. Durieux, *Local Anesthetics and the Inflammatory Response: A New Therapeutic Indication?* *Anesthesiology*, 2000. **93**(3): p. 858-875.
116. Beloeil, H. and J.X. Mazoit, *Effet des anesthésiques locaux sur la réponse inflammatoire postopératoire*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2009. **28**(3): p. 231-237.
117. Sakellaris, G., et al., *Effects of ropivacaine infiltration on cortisol and prolactin responses to postoperative pain after inguinal hernioraphy in children*. *Journal of Pediatric Surgery*, 2004. **39**(9): p. 1400-1403.
118. Comer, A.M. and H.M. Lamb, *Lidocaine Patch 5%*. *Drugs*, 2000. **59**(2): p. 245-249.
119. Saber, A.A., et al., *Early experience with lidocaine patch for postoperative pain control after laparoscopic ventral hernia repair*. *International Journal of Surgery*, 2009. **7**(1): p. 36-38.
120. Franchi, M., et al., *Comparison between lidocaine-prilocaine cream (EMLA) and mepivacaine infiltration for pain relief during perineal repair after childbirth: a randomized trial*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2009. **201**(2): p. 186.e1-186.e5.
121. Wyman, M.G., et al., *Prevention of primary ventricular fibrillation in acute myocardial infarction with prophylactic lidocaine*. *The American Journal of Cardiology*, 2004. **94**(5): p. 545-551.
122. Pharand, C., et al., *Lidocaine prophylaxis for fatal ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction[ast]*. *Clin Pharmacol Ther*, 1995. **57**(4): p. 471-478.
123. Cox, B., M.E. Durieux, and M.A.E. Marcus, *Toxicity of local anaesthetics*. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 2003. **17**(1): p. 111-136.
124. Kaba, L., Detroz, Sessler, Durieux, Lamy, Joris, *Intravenous lidocaine infusion facilitates acute rehabilitation after laparoscopic colectomy*. *Anesthesiology*, 2007. **5**(106): p. 11-18.
125. Casati, A. and M. Putzu, *Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different?* *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 2005. **19**(2): p. 247-268.

126. Knudsen, K., et al., *Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers*. British Journal of Anaesthesia, 1997. **78**(5): p. 507-514.
127. Scott, D.A., *Ropivacaine for postoperative epidural analgesia*. 2001. **5**(2): p. 64-69.
128. Senard, J., *Utilisation de la ropivacaine par voie péridurale pour l'analgésie postopératoire*. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation, 2002. **21**: p. 713-724.
129. Forastiere, E., et al., *Effectiveness of continuous wound infusion of 0.5% ropivacaine by On-Q pain relief system for postoperative pain management after open nephrectomy*. British Journal of Anaesthesia, 2008. **101**(6): p. 841-847.
130. Dagtekin, O., et al., *Postoperative analgesia and flap perfusion after pedicled TRAM flap reconstruction – continuous wound instillation with ropivacaine 0.2%. A pilot study*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2009. **62**(5): p. 618-625.
131. Beaussier, M., et al., *Continuous Preperitoneal Infusion of Ropivacaine Provides Effective Analgesia and Accelerates Recovery after Colorectal Surgery: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study*. Anesthesiology, 2007. **107**(3): p. 461-468
10.1097/01.anes.0000278903.91986.19.
132. Kingsnorth, A. and K. LeBlanc, *Hernias: inguinal and incisional*. The Lancet, 2003. **362**(9395): p. 1561-1571.
133. Engelsman, A.F., et al., *The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction*. Biomaterials, 2007. **28**(14): p. 2314-2327.
134. ALEXANDER, J.W., J.Z. KAPLAN, and W.A. ALTEMEIER, *Role of Suture Materials in the Development of Wound Infection*. Annals of Surgery, 1967. **165**(2): p. 192-199.
135. Leber, G.E., et al., *Long-term Complications Associated With Prosthetic Repair of Incisional Hernias*. Arch Surg, 1998. **133**(4): p. 378-382.
136. Çakmak, A., et al., *Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **381**(2): p. 214-219.
137. Pessaux, P., et al., *Predictive risk score for infection after inguinal hernia repair*. The American Journal of Surgery, 2006. **192**(2): p. 165-171.
138. Sanchez-Manuel Francisco, J., J. Lozano-García, and L. Seco-Gil Juan (2007) *Antibiotic prophylaxis for hernia repair*. Cochrane Database of Systematic Reviews, DOI: 10.1002/14651858.CD003769.pub3.
139. Terzi, C., et al., *Single-dose oral ciprofloxacin compared with single-dose intravenous cefazolin for prophylaxis in inguinal hernia repair: a controlled randomized clinical study*. Journal of Hospital Infection, 2005. **60**(4): p. 340-347.
140. Shankar, V.G., et al., *Prophylactic antibiotics in open mesh repair of inguinal hernia – A randomized controlled trial*. International Journal of Surgery, 2010. **8**(6): p. 444-447.

141. Elsner, J.J. and M. Zilberman, *Antibiotic-eluting bioresorbable composite fibers for wound healing applications: Microstructure, drug delivery and mechanical properties*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(8): p. 2872-2883.
142. <http://www.eng.tau.ac.il/~meitalz/biomaterials/index2.html>.
143. DeBord, J., et al., *Short-term study on the safety of antimicrobial-agent-impregnated ePTFE patches for hernia repair*. Hernia, 1999. **3**(4): p. 189-193.
144. Satishkumar, R., et al., *Evaluation of the Antimicrobial Activity of Lysostaphin-Coated Hernia Repair Meshes*. Antimicrob. Agents Chemother., 2011. **55**(9): p. 4379-4385.
145. Guillaume, O., et al., *New antibiotic-eluting mesh used for soft tissue reinforcement*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(9): p. 3390-3397.
146. Thatiparti, T.R., A.J. Shoffstall, and H.A. von Recum, *Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics*. Biomaterials, 2010. **31**(8): p. 2335-2347.
147. Villiers, *Sur la transformation de la fécule par le ferment butyrique*. Comptes-rendus de l'académie des sciences, 1891. **112**: p. 536-538.
148. Loftsson, T. and D. Duchêne, *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **329**(1-2): p. 1-11.
149. E.M.Martin, D.V., *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process Biochemistry, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.
150. Tabary, *Fonctionnalisation de supports cellulosiques résorbables pour la libération prolongée d'agents anti-infectieux pour applications thérapeutiques en Parodontologie*. 2009.
151. Astray, G., et al., *A review on the use of cyclodextrins in foods*. Food Hydrocolloids, 2009. **23**(7): p. 1631-1640.
152. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chemical Reviews, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
153. http://www.roquette-chimiebioindustrie.fr/kleptoser-1/industry_id=6/.
154. Lina, B.A.R. and A. Bär, *Subchronic (13-week) oral toxicity study of α -cyclodextrin in dogs*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004. **39**, **Supplement 1**(0): p. 27-33.
155. Munro, I.C., et al., *Safety assessment of γ -cyclodextrin*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004. **39**, **Supplement 1**(0): p. 3-13.
156. SCF, *Opinion on β -cyclodextrin manufactured by the action of the enzyme Cycloglycosyltransferase obtained from Bacillus circulans on partially hydrolysed starch*, in *Forty First series of reports of the Scientific Committee for Food*. 1997: Luxembourg.

157. Allan, H., *Chapter 22 - Cyclodextrins: Properties and Applications*, in *Starch (Third Edition)*, B. James and W. Roy, Editors. 2009, Academic Press: San Diego. p. 833-851.
158. Brewster, M.E., K.S. Estes, and N. Bodor, *An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys*. International Journal of Pharmaceutics, 1990. **59**(3): p. 231-243.
159. Davis, M.E. and M.E. Brewster, *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(12): p. 1023-1035.
160. Chao, J., et al., *Preparation and study on the novel solid inclusion complex of ciprofloxacin with HP- β -cyclodextrin*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2004. **60**(3): p. 729-734.
161. Hoang Thi, T.H., et al., *Bone implants modified with cyclodextrin: Study of drug release in bulk fluid and into agarose gel*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **400**(1-2): p. 74-85.
162. Dollo, G., et al., *Inclusion complexation of amide-typed local anaesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. I. Physicochemical characterization*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **131**(2): p. 219-228.
163. Dollo, G., et al., *Inclusion complexation of amide-typed local anaesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. ii. evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **136**(1-2): p. 165-174.
164. Fraceto, L.F., et al., *Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: b-ciclodextrina*. Química Nova, 2007. **30**: p. 1203-1207.
165. de Araujo, D.R., et al., *Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(1): p. 60-71.
166. <http://www.vidal.fr/Medicament/brexin-2484.htm>.
167. Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie, *Cyclodextrin Drug Carrier Systems*. Chemical Reviews, 1998. **98**(5): p. 2045-2076.
168. Loftsson, T., et al., *Effect of cyclodextrins and polymers on triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(12): p. 1254-1258.
169. Kim, J.J., et al., *Properties of Cholesterol-Reduced Butter Made with β -Cyclodextrin and Added Evening Primrose Oil and Phytosterols*. Journal of Dairy Science, 2006. **89**(12): p. 4503-4510.
170. Kwak, H.S., et al., *Removal of Cholesterol from Cheddar Cheese by β -Cyclodextrin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(25): p. 7293-7298.
171. Amini, A., et al., *Determination of the enantiomeric purity of S-ropivacaine by capillary electrophoresis with methyl- β -cyclodextrin as chiral selector using conventional and*

- complete filling techniques*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **9**(1): p. 17-24.
172. Ducoroy, L., et al., *Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2007. **57**(1): p. 271-277.
173. Szejtli, J., Zsádon, Bela, Fenyvesi, Eva, Horvath, Nee Otta Klara, Tudos, Ferenc, *Sorbents of cellulose basis capable of forming inclusion complexes and a process for the preparation thereof*. 1982.
174. Crini, G., *Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(1): p. 38-70.
175. KENICHI, K., *Treatment of wool having deodorizing function*. 1990.
176. Lee, M.H., K.J. Yoon, and S.-W. Ko, *Grafting onto cotton fiber with acrylamidomethylated β -cyclodextrin and its application*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **78**(11): p. 1986-1991.
177. Buschmann, H.J., D. Knittel, and E. Schollmeyer, *New Textile Applications of Cyclodextrins*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2001. **40**(3): p. 169-172.
178. Nada, A., P. Hauser, and S. Hudson, *The Grafting of Per-(2,3,6-O-allyl)- β Cyclodextrin onto Derivatized Cotton Cellulose via Thermal and Atmospheric Plasma Techniques*. Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2011. **31**(4): p. 605-621.
179. Bai, J., et al., *Synthesis of poly(N-vinylpyrrolidone)/ β -cyclodextrin composite nanofibers using electrospinning techniques*. Journal of Materials Processing Technology, 2008. **208**(1-3): p. 251-254.
180. Ramaseshan, R., et al., *Functionalized polymer nanofibre membranes for protection from chemical warfare stimulants*. Nanotechnology, 2006. **17**(12): p. 2947.
181. Uyar, T., et al., *Molecular filters based on cyclodextrin functionalized electrospun fibers*. Journal of Membrane Science, 2009. **332**(1-2): p. 129-137.
182. Uyar, T. and F. Besenbacher, *Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers*. European Polymer Journal, 2009. **45**(4): p. 1032-1037.
183. Blanchemain, N., et al., *Vascular prostheses with controlled release of antibiotics: Part I: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses*. Biomolecular Engineering, 2007. **24**(1): p. 149-153.
184. El Ghouli, Y., et al., *Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(5): p. 1392-1400.
185. Laurent, T., et al., *Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(8): p. 3141-3149.

186. Leprêtre, S., et al., *Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers*. *Biomaterials*, 2009. **30**(30): p. 6086-6093.
187. Tabary, N., et al., *Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidin*. *Biomolecular Engineering*, 2007. **24**(5): p. 472-476.
188. Martel, B., et al., *Finishing of polyester fabrics with cyclodextrins and polycarboxylic acids as crosslinking agents*. *Journal of Inclusion Phenomena*, 2002. **44**(1-4): p. 443-446.
189. Martel, B., et al., *Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002. **83**(7): p. 1449-1456.
190. Dhordain, M., *Dispositif de filtration d'un flux d'air à activité anti-bactérienne et/ou anti-virale et/ou anti-fongique et procédé de préparation d'un tel dispositif*. 2011.
191. Dhordain, H., *Fonctionnalisation d'une structure non tissée par la cyclodextrine pour l'élaboration d'un filtre textile biocide*. 2011.
192. <http://www.cousin-biotech.com>.
193. Ruffin, D., *Polymérisation et greffage sur fibres textiles des cyclodextrines par réticulation au moyen d'acides polycarboxyliques. Etude des procédés et applications - Thèse de Doctorat*. 2002.
194. Blanchemain, N., et al., *Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: Cytotoxicity and microbiological evaluation*. *Acta Biomaterialia*, 2008. **4**(6): p. 1725-1733.
195. Baquey, C., et al., *Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1999. **151**(1-4): p. 255-262.
196. Ilanchelian, M., C. Retna Raj, and R. Ramaraj, *Spectral Studies on the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Toluidine Blue O and Meldola's Blue in Aqueous Solution*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2000. **36**(1): p. 9-20.
197. Klosterhalfen, B., K. Junge, and U. Klinge, *The lightweight and large porous mesh concept for hernia repair*. *Expert Review of Medical Devices*, 2005. **2**(1): p. 103-117.
198. Stott, K., et al., *Excitation Sculpting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Selective NOE Experiments*. *Journal of the American Chemical Society*, 1995. **117**(14): p. 4199-4200.
199. Lombardo-Agüí, M., C. Cruces-Blanco, and A.M. García-Campaña, *Capillary zone electrophoresis with diode-array detection for analysis of local anaesthetics and opium alkaloids in urine samples*. *Journal of Chromatography B*, 2009. **877**(8-9): p. 833-836.
200. Li, N., et al., *Determination of the binding constant for the inclusion complex between procaine hydrochloride and β -cyclodextrin by capillary electrophoresis*. *Talanta*, 2003. **59**(3): p. 493-499.

201. Wren, S.A.C. and R.C. Rowe, *Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model*. Journal of Chromatography A, 1992. **603**(1-2): p. 235-241.
202. Girardot, M., P. Gareil, and A. Varenne, *Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE*. ELECTROPHORESIS, 2010. **31**(3): p. 546-555.
203. Qin, W.-w., et al., *Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(15-16): p. 1185-1189.
204. Nakayama, G.R., et al., *Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro*. Journal of Immunological Methods, 1997. **204**(2): p. 205-208.
205. http://www.wikilinks.fr/wp-content/uploads/2011/05/Escherichia_coli_1.jpg.
206. <http://www.univ-rouen.fr/M2C/bacteries/infections.html>.
207. Peterlin, A., *Macromolecular physics, vol. 2, Bernhard Wunderlich, Academic Press, New York, 1976, 461 pp*. Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 1976. **14**(9): p. 571-571.
208. Sosnowski, *Poly(l-lactide) microspheres with controlled crystallinity*. Polymer, 2001. **42**(2): p. 637-643.
209. Gabrielse, W., et al., *¹³C Solid-State NMR Study of Differently Processed Poly(ethylene terephthalate) Yarns*. Macromolecules, 1994. **27**(20): p. 5811-5820.
210. Martel, B., et al., *Grafting of cyclodextrins onto polypropylene nonwoven fabrics for the manufacture of reactive filters. II. Characterization*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **78**(12): p. 2166-2173.
211. Jean-Baptiste, E., et al., *Safety, Healing, and Efficacy of Vascular Prostheses Coated with Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Polymer: Experimental In Vitro and Animal Studies*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2012. **43**(2): p. 188-197.
212. Bakkour, Y., *Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées*. 2005, Université Lille 2.
213. Rundlett, K.L. and D.W. Armstrong, *Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis*. ELECTROPHORESIS, 1997. **18**(12-13): p. 2194-2202.
214. Fedder, C., et al., *In vitro exposure of human fibroblasts to local anaesthetics impairs cell growth*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(2): p. 280-288.
215. Blanchemain, N., et al., *Vascular prostheses with controlled release of antibiotics: Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins*. Biomolecular Engineering, 2007. **24**(1): p. 143-148.

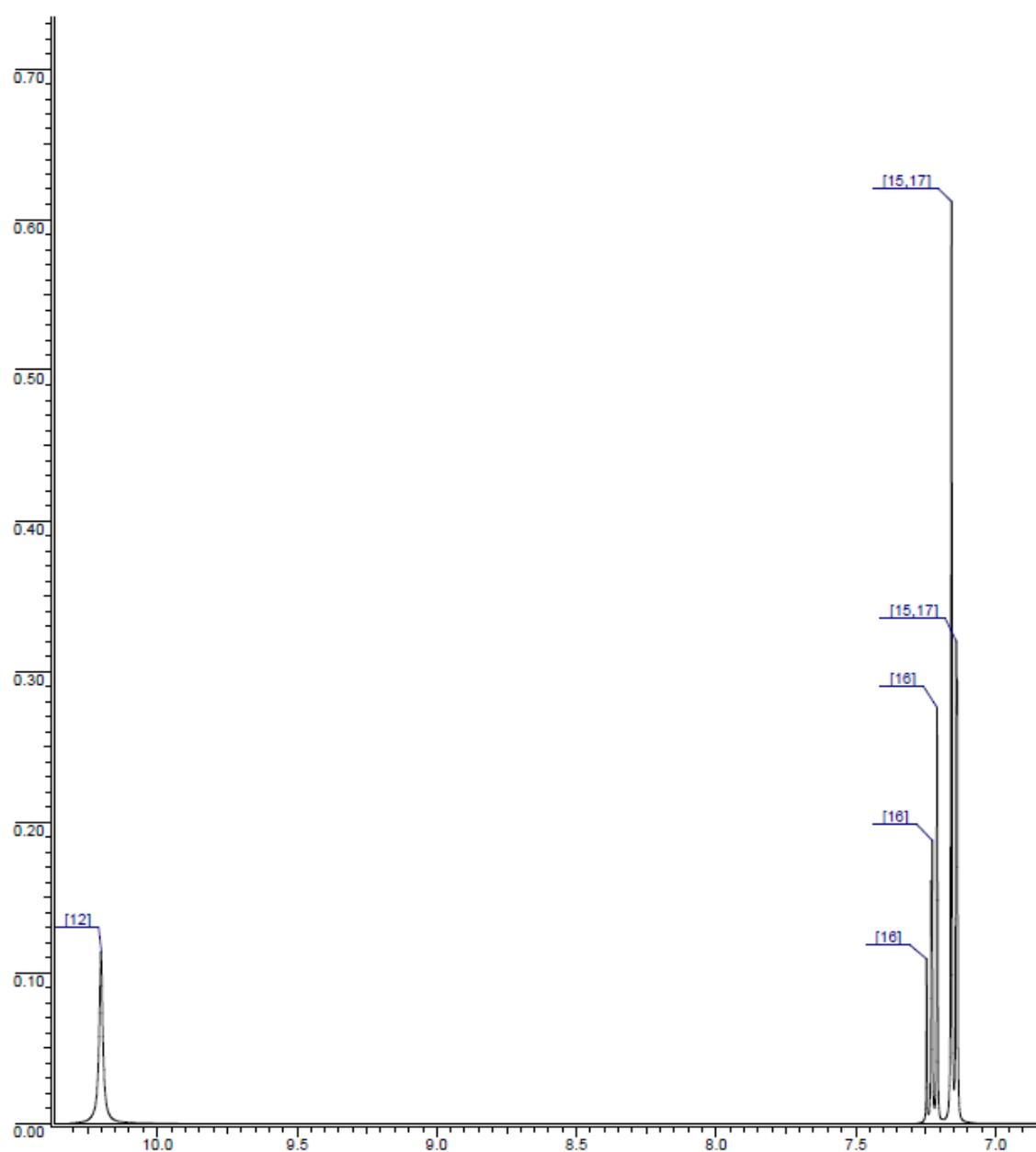
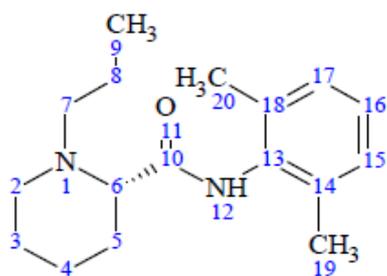
216. Blanchemain, N., et al., *Vascular PET Prostheses Surface Modification with Cyclodextrin Coating: Development of a New Drug Delivery System*. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2005. **29**(6): p. 628-632.

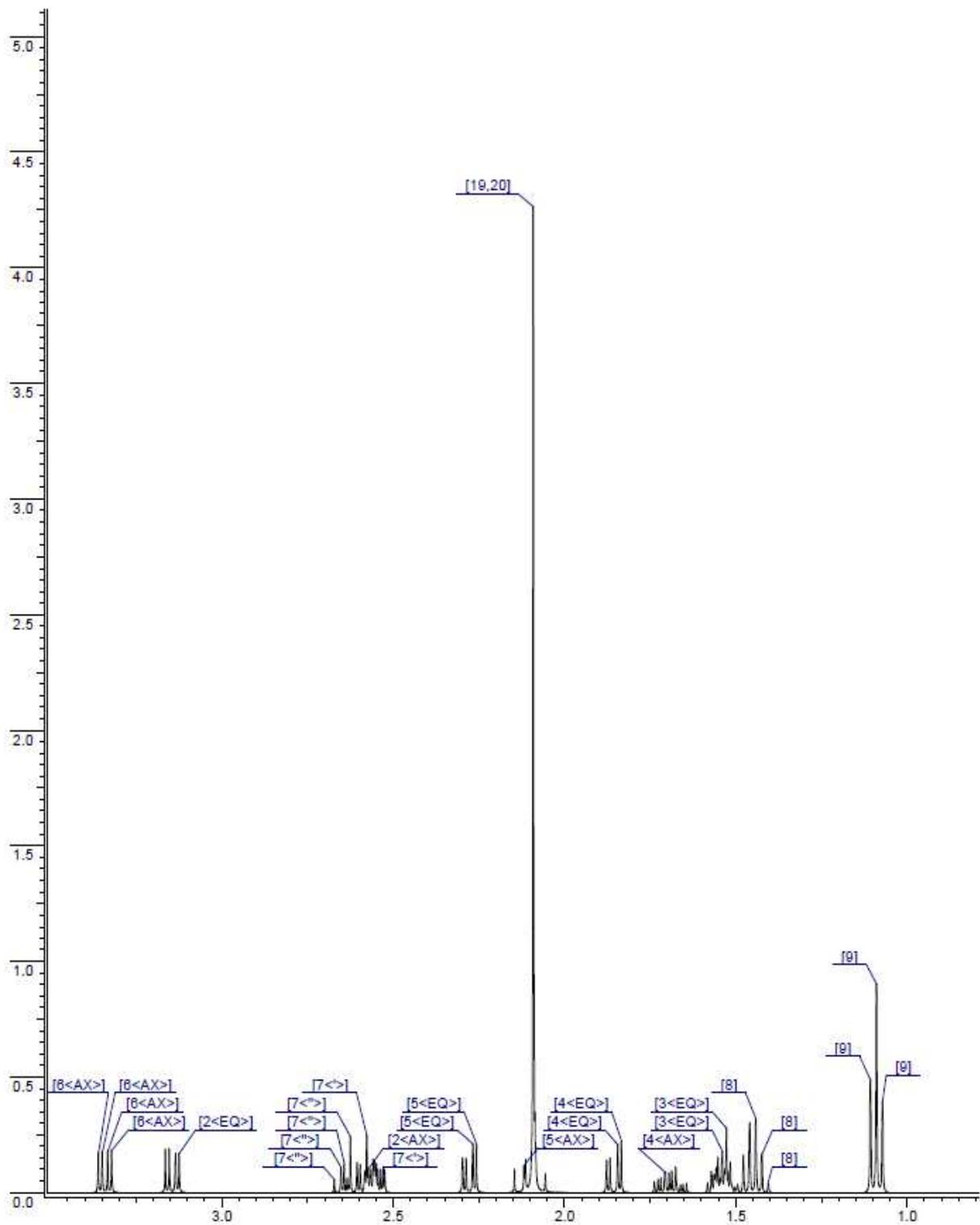
ANNEXES

Annexe 1 : Spectre RMN théorique de la ropivacaine	II
Annexe 2 : Liste des communications	V
Annexe 3 : Abstract CIRAT-4	VII

Annexe 1

Spectre RMN ^1H théorique de la ropivacaïne





Annexe 2

Proceedings :

1. G. Vermet, S. Degoutin, N. Blanchemain, F. Chai, M. Taha, C. Neut, H.F. Hildebrand, B. Martel. *Polyester inguinal mesh with prolonged release of ciprofloxacin properties*. International Conference of applied Research in Textile, CIRAT-4, Monastir (Tunisia), December 2nd – 5th, 2010

Communications orales :

2. G. Vermet, S. Degoutin, N. Blanchemain, F. Chai, M. Taha, C. Neut, H.F. Hildebrand, B. Martel. *Polyester inguinal mesh with prolonged release of ciprofloxacin properties*. International Conference of applied Research in Textile, CIRAT-4, Monastir (Tunisia), December 2nd – 5th, 2010
3. G. Vermet, N. Blanchemain, S. Degoutin, G. Solecki, V. Dalle, B. Martel, H.F. Hildebrand. *Peritoneal implants with controlled release of therapeutic molecules*. BIOMEDevice Europe, Paris (France), February 23rd – 24th, 2011

Posters

4. G. Vermet, B. Martel, N. Blanchemain, S. Degoutin. *Implants viscéraux à libération prolongée de molécules thérapeutiques*. 12^{ème} Journée du Club Français des Cyclodextrines, Lyon (France), 3-4 Décembre, 2009
5. G. Vermet, N. Blanchemain, S. Degoutin, F. Chai, C. Neut, H. Friedrich Hildebrand, B. Martel, *Polyester inguinal mesh with prolonged drug delivery properties*. European Society for Biomaterials, ESB, Dublin (Ireland), September 4th-9th, 2011

Annexe 3

International Conference of Applied Research in Textile
© CIRAT-4, 2010
Monastir, Tunisia

Polyester inguinal mesh with prolonged release of ciprofloxacin properties

^{1,2}G. VERMET, ^{1,2}S. DEGOUTIN, ^{1,3}N. BLANCHEMAIN, ^{1,3}F. CHAI, ^{1,3}M. TAHA, ^{1,4}C. NEUT, ^{1,3}H. F. HILDEBRAND, ^{1,2}B. MARTEL

¹ Univ. Lille Nord De France, 59000 Lille, France

² Unité Matériaux et Transformations UMR 8207, groupe Ingénierie des Systèmes Polymères, Université Lille 1 –Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

³ INSERM U1008, Médicaments et Biomatériaux à Libération Contrôlée, Université Lille 2 – Droit et Santé, 59006 Lille, France

⁴ INSERM U995, Laboratoire de Bactériologie, Université Lille 2 – Droit et Santé, 59006 Lille, France

Abstract: A visceral implant made of knitted polyethyleneterephthalate (PET) was coated with a hydropropyl- β -cyclodextrin polymer, in order to prolong the release of therapeutic molecules, in particular ciprofloxacin. Functionalisation parameters such as temperature, time and monomers concentration in the impregnation bath were optimized. Toluidine Blue Oxide spectrophotometric titration was used to evaluate the degree of functionalization of the support. Sorption/desorption tests carried out in batch system revealed the prolonged release of an increased dose of ciprofloxacin from supports modified with variable modification rates. Vitality rates assessments confirmed the acceptable biocompatibility of the modification and microbiological assays on *E. coli* permitted to evaluate the antibacterial efficacy of both virgin and coated textiles.

Key Words: polyethylene terephthalate, cyclodextrin, antibiotic release, ciprofloxacin, textile finishing, inguinal mesh

INTRODUCTION

Hernia curing is the second most practiced surgical act in France. The closure of the hernial orifice can be done using a prosthetic mesh fabric type, called eventration plate. Like any surgical intervention, the implant placement has a visceral infection risk. A parentally or intravenous antibiotherapy is used. Nevertheless, the risk of infectious development at the intervention site remains. The solution proposed in this project is to achieve the finishing of the textile fibers of the implant by a cyclodextrin (CD) polymer, to improve their adsorption capacity towards various active molecules through the formation of inclusion complexes, and other less specific interactions. Historically, this concept was developed in our laboratory through a study that consisted of the development of a vascular prosthesis made of Dacron® yarns (Blanchemain et al, 2008). In the present case, the active molecule was Ciprofloxacin (CFX), a large-scale antibiotic. The goal was to demonstrate the possibility of functionalizing a PET inguinal mesh in order to prolong the release of CFX *in situ*.

Polyester plates (polyethylene terephthalate, PET, Biomesh A2®) were manufactured by Cousin Biotech (Wervicq-Sud, France).

The textile finishing with cyclodextrin process was developed by Martel *et al.* (Martel *et al.*, 2004; Martel, 2007), using hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) and citric acid (CTR) as crosslinking agent. The reaction between HP β CD and CTR beforehand impregnated onto the textiles by padding yielded a wash resistant crosslinked cyclodextrin polymer (polyCTR-HP β CD) under curing. In a typical experiment, the impregnating solution consisted of 8 grammes of CTR, 1 gramme of catalyst and 10 grammes of HP β CD in 100 mL of water (summarized by 8/1/10). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) was provided by Roquette (Kleptose® HP, apyrogen grade, Lestrem, France). Citric acid (CTR) was purchased from Aldrich (Lyon, France). Ciprofloxacin (Ciflox®, CFX) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Human blood plasma was purchased from Etablissement Français du Sang (EFS, Lille, France)

The finishing rate of the textile samples with CDs was evaluated by the measurement of the weight increase of the samples upon modification with CD by the relation:

$$\% = (m_f - m_i) / m_i$$

MATERIALS AND METHODS

with m_i , the textile mass before coating and m_f , the mass of the treated support.

In parallel, the finishing rate was also evaluated by the Toluidine Blue Oxide (TBO, Sigma Aldrich, France) titration method (Sano *et al.*, 1993; Baquey *et al.*, 1999) using a UV spectrophotometer (UV1800, Shimadzu, France). TBO, a cationic dye, was adsorbed onto polyCTR-HP β CD fixed onto the support through ionic interactions on one hand, and by inclusion into the CDs cavities on the other hand. The results are reported in μmol of TBO sorbed by gram of textile.

Scanning Electron Microscopy (SEM) observations were done on a Hitachi S4700 microscope.

The total amount of sorbed CFX by virgin and CD finished plates was determined according to the following method. Samples were preliminarily dipped into a 2 g.L^{-1} CFX aqueous solutions during 20 minutes and 24 hours. The samples were dipped in a 0.05 M (20 mL) sodium hydroxide (NaOH) solution in order to hydrolyse the polyCTR-HP β CD polymer, and so release the CFX still trapped in the coating polymer network. The concentration of CFX in NaOH was determined by UV spectrometry at 271 nm and the total amount of CFX sorbed onto plates was calculated (Malasiney, 1996).

Release kinetics were obtained by dipping 11 mm diameter samples during 20 minutes in a solution of CFX (2 g.L^{-1}) and then placing them in a Phosphate Buffer Solution (PBS, pH 7,4) batch. At regular intervals (30 minutes, 1, 2, 3, 4, 6, 24 hours), CFX concentration in the batch was assessed by spectrophotometry at 275 nm . The dynamic of medium turnover applied was 100% . It corresponded to the total replacement of the release medium by “fresh” feed of the bath at each measurement.

For both biological and microbiological evaluation, 11 mm and 15 mm diameter discs cut off from virgin and finished plates with CD were sterilized by ethylene oxide.

Microbiological tests were performed according to the Kirby-Bauer method (Scott *et al.*, 2003). Samples were impregnated for 20 minutes by a CFX solution (2 g.L^{-1}), dried and placed in contact with human plasma. They were withdrawn from human plasma batches at regular intervals (30 minutes, 1, 2, 4, 3, 5, 6, 24, 48 and 72 hours) and placed in contact with a Agar gel (Muller Hinton) inoculated with a 24h culture of an *Escherichia coli* (Gram -) strain. After one day of incubation at 37°C , the radius of the clear zone (decontamination zone) all around the sample was measured. The “inhibition radius” was then calculated as the difference between the radius of the circular clear zone minus that of the plates pellets (5.5 mm)

Cytocompatibility of functionalised supports was determined by evaluating fibroblasts NIH3T3 vitality. Alamar Blue was used to quantify cellular activity.

Sample disks were placed in the bottom of a 24-well plates. NIH3T3 cells (10^4) were seeded in each well, and the wells with no sample disk but only cell suspension served as controls. The growth periods were 3 and 6 days, without renewal of the medium.

The culture medium was removed from each well 3 and 6 days after the cell seeding. A $500 \mu\text{L}$ aliquot of diluted fluorescent dye (Alamar blue, Interchim) was deposited in each well. After 3 hours of incubation, the solutions were transferred into 96-well plates and the absorbance was measured by fluorimetry (Twinkle LB970TM Berthold) at 560 nm . The fibroblasts vitality rate was calculated as the absorbance of living respiratory cells on PET samples divided by that of control cells (Mayer *et al.*, 2006).

RESULTS

The optimization of the polyCTR/HP β CD coating parameters on PET was performed at different temperatures, comprised between 130 and 160°C during variable fixation times comprised between 0 and 60 min . For each temperature/time couple, the coating rate was determined (Fig. 1) as the weight increase of the samples.

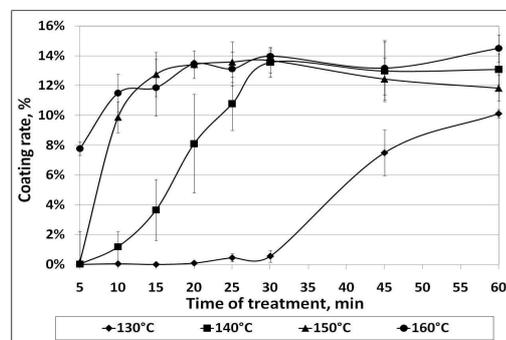


Fig. 1: Coating rate of CDs (%) onto PET textile sample vs time and temperature of treatment, 8/1/10 formulation.

In order not to degrade the PET mechanical properties, a compromise between temperature and curing time had to be adopted: therefore the following experiments were carried out at 140°C during 1hour.

The monomer concentration up to 360 g/L in the impregnation bath allowed controlling the coating rate of the samples as observed in Fig. 2, as proportionality was observed between the coating rate and the concentration of the impregnating bath, in the range 0 - 360 g/L . Nevertheless, the plates rigidity rose with the coating rate. As this device

has to be easily handled by the surgeon during the surgical act, an optimal coating rate will have to be defined with regard to this parameter.

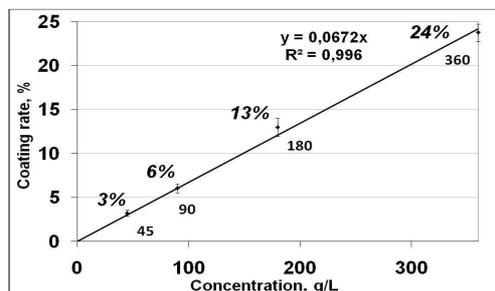


Fig. 2: Coating rate (%) of PET textile samples treated with HPβCDs (after treatment at 140°C for 1 hour) vs monomers (CD and CTR) concentration in the impregnation bath (g/L)

TBO titration was used to compare the functionalisation rates between virgin and treated samples for both support types. As TBO is a cationic aromatic dye, it presents a good affinity towards both the HPβCD cavity, and the residual COOH groups carried by the crosslinker present in the polyCTR-HPβCD network. Therefore its adsorption onto the treated supports is dependent on their functionalisation rate. This method of titration is a good complement to the weight increase measurement as it gives an information on the availability of the functional groups (-CD and COOH) that can be reached by the active molecule. Considering Fig. 3, it appeared that the CD polymer coating allowed the finished samples to sorb 60 to 100 times more TBO than the virgin support (Fig.4). Though, no proportionality was observed with the coating rate of the samples as when the later increased from 3 to 24%, TBO sorption only varied from 54 to 89 μmol/g. This was due to a saturation effect of the surface, as a repulsive effect may occur between the TBO sorbed monolayer and the TBO molecules present in the bulk solution.

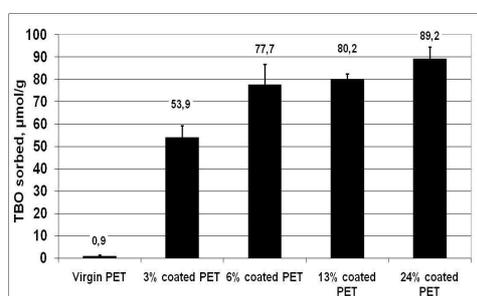


Fig. 3: TBO sorbed (mmol.g⁻¹) onto PET textile vs its coating rate (%)

The presence of the cyclodextrin polymer onto the samples was clearly observed by SEM (Fig. 4). One can see the evolution of a yarn under finishing, whose diameter sharply increased. The presence of

polyCTR/HPβCD entrapped in between the monofilaments building the yarn is fairly visible.

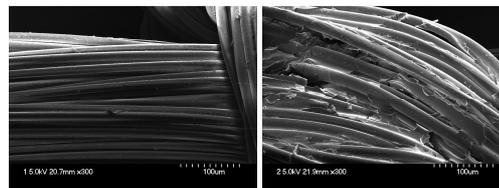


Fig. 4: SEM observations (x300) of virgin (left) and 25% functionalised (right) samples.

The affinity between CFX and both virgin and functionalised supports was determined by the measurements of the amount of antibiotic loaded onto the samples (Fig 5). For practical purposes, at the operating room, 20 minutes is the maximum time that would be acceptable for impregnating the device in the antibiotic solution. Therefore an impregnation time of the samples in the CFX solution was fixed to 20 minutes. In parallel, in order to evaluate the maximal sorption capacity of the samples, a time of contact of 24 hours was also applied. These experiments were carried out with samples presenting coating rates comprised between 0 and 24%. Firstly one can observe the CD finishing provoked a sharp increase of the CFX adsorption onto the PET supports. Secondly, the comparison between both curves in fig. 5 displayed that the best compromise between the coating rate and the total CFX sorption according to the 20 minutes of contact restriction was reached for a coating rate comprised between 10 and 15%.

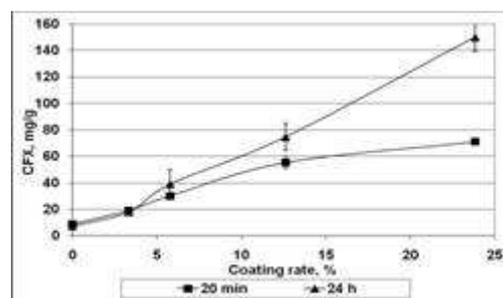


Fig. 5: Amount of CFX sorbed (mg.g⁻¹) on PET vs coating rate (%) for 20 min and 24 h of impregnation of the samples in the CFX solution.

The kinetics of CFX release was studied in in PBS batch. As displayed in figure 6, the duration of the CFX release was widely increased with CD finished samples, and was linked to their coating rate.

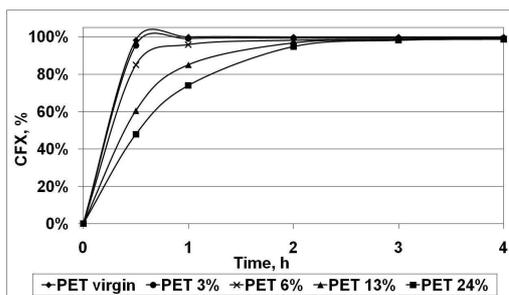


Fig. 6: Kinetics of CFX release (%) in PBS with 100% of medium turn-over for virgin and treated implants

The antibacterial efficacy of the supports was determined by microbiological assays on *E. Coli*. As observed in figure 7, the evolution of the radius of the growth bacterial inhibition zone showed that CD modified samples presented a sustained activity compared to the control. This confirmed the double role played by the functionalization: a) an increase of the antibiotic dose loaded onto the sample ; b) the slow release of the substrate which interacts through weak interactions with the polyCTR-HP β CD network.

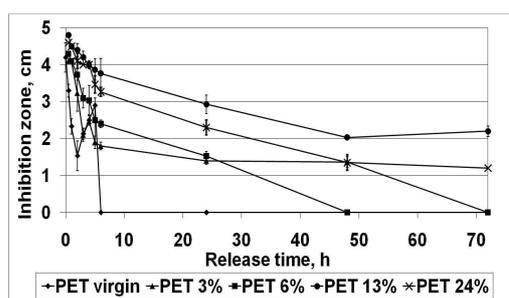


Fig. 7: Antimicrobial activity of different types of PET coated and virgin samples vs *E. coli*

Finally, the cytocompatibility of the supports was studied by the determination of the NIH3T3 fibroblasts vitality. It appeared that the cell vitality slowly decreased when the polymer rate increased onto the support fibers. However, the vitality results never decreased below 50%, which is receivable by the ISO 10993-5 standards.

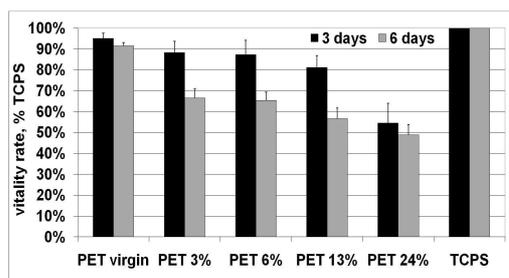


Fig. 7: Vitality rate (% TCPS) of NIH3T3 fibroblasts on PET coated and virgin samples

CONCLUSION

This project demonstrated the feasibility of functionalizing a PET visceral implant, with cyclodextrins and carboxylic groups. Coating rate can be set by modifying temperature and time of fixation and monomer concentration in the impregnation bath. Coating rates up to 24% were obtained in controlled conditions. Though results showed that high coating rates were not necessary to apply, for a question of rigidity and handling by the clinician on one hand, and on the point of view of the sorption kinetic on the other hand. Implant finishing with CD improved its sorption capacity and induced the sustained release of ciprofloxacin at the same time. This was confirmed by the microbiological tests, which displayed a good persistency of the antibacterial activity of the samples exposed to blood plasma. In conclusion, those results are very promising for our goal, which is to improve patient healing conditions through his protection against post operatory nosocomial infections after a hernia curing. This concept will be enlarged not only to other antibiotics, but also to other classes of drugs.

Blanchemain et al (2008). Polyester Vascular Prostheses Modified With Cyclodextrins And Activated With Antibiotics: Cytotoxicity And Microbiological Evaluation. *Acta Biomaterialia*, 4:1725-33

Sano et al (1993). Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials*, 14: 817-22

Martel et al. (2004) EP 1,157,156 B1

Martel et al (2007) EP1824531

Baquay et al. (1999). Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. *Nucl. Inst. And Met. In Physics Res.*, B151, 255-262

Malasiney et al. (1996). Rifampicin loading of vascular grafts. *J. Antimicrob Chemoter.*, 37, 1121-1129

Scott et al.(2003). Antibiotic bone cement for the treatment of pseudomonas aeruginosa in joint arthroplasty: comparison of tobramycin and gentamicin-loaded cements. *J. Biomed. Mat. Res.*, 64B: 94-8

Mayer G et al. (2006). Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (PET) surfaces. *Biomaterials*, 27: 553-66

