HAL
open science

Evaluations physico-chimiques et biologiques de polyéthylène téréphthalate (PET) après traitement de surface par irradiations LASER en vue d'applications biomédicales

Grégoire Mayer

To cite this version:

Grégoire Mayer. Evaluations physico-chimiques et biologiques de polyéthylène téréphthalate (PET) après traitement de surface par irradiations LASER en vue d'applications biomédicales. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2007. Français. NNT : . tel-00381301

HAL Id: tel-00381301

https://theses.hal.science/tel-00381301v1

Submitted on 5 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université du Droit et de la Santé de Lille 2
UFR de Chirurgie-Dentaire

Année : 2007 N° :

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Spécialité : Odontologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Grégoire Mayer
Le 05 décembre 2007

Evaluations physico-chimiques et biologiques de polyéthylène téréphthalate (PET) après traitement de surface par irradiations LASER en vue d'applications biomédicales

JURY

Prof. Frédéric CUISINIER	Rapporteur
Prof. Olivier OUDAR	Rapporteur
Dr Hartmut F. HILDEBRAND, DR Inserm	Directeur de thèse
Prof. Pierre-Hubert DUPAS	Examinateur
Prof. Dominique DEROZIER	Examinateur
Prof. Jacqueline MARCHAND-BRYNAERT	Examinateur

1. INTRODUCTION 5

2. GÉNÉRALITÉS 9
2.1. NOTIONS DE BIOMATERIAUX 10
2.2. PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MODIFICATIONS DE SURFACE 11
2.3. LES DIVERSES MÉTHODES DE FONCTIONNALISATION 12
2.4. CHOIX DU POLYÉTHYLÈNE TÉRÉPHTALATE 13
2.5. FONCTIONNALISATION PAR IRRADIATION LASER 15
2.5.1. Avantages 16
2.5.2. Caractéristiques 16
2.6. EFFETS DU LASER 17
2.6.1. Sur l'état de surface 17
2.6.2. Sur la chimie de surface 19
2.6.3. Sur les comportements cellulaires 21
2.6.3.1. La tension de surface 22
2.6.3.2. La chimie de la surface 23
2.6.3.3. La rugosité 24
2.7. BUT DE L'ÉTUDE 25
2.8. CONCLUSION 27

3. MATÉRIELS 28
3.1. LE POLYÉTHYLÈNE TÉRÉPHTALATE 29
3.2. LES LASERS 30
3.2.1. LES LASERS EXCIMÈRES 32
3.2.1.1. Etude théorique de fonctionnement du LASER KrF (248nm) 34
3.2.2. LES LASERS YAG 36
3.2.2.1. Les LASERS YAG continus 37
3.2.2.2. Les LASERS YAG pulsés 38
3.2.3. INTERACTION LASER - MATIÈRE 39

4. MÉTHODES 40
4.1. EXPÉRIMENTATIONS SUR LE PET 41
4.1.1. Préparation des échantillons 41
4.1.2. Choix de l'énergie d'irradiation 43
4.1.3. Calcul de l'intensité de l'énergie d'irradiation 43
4.2. LE SPECTROMÈTRE 46
4.3. CALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE (DSC) 46
4.4. MESURES DE RUGOSITÉ 47
4.4.1. Le profilomètre 47
4.4.2. Le microscope photonique 48
4.4.3. Le microscope électronique à balayage (MEB) 48
4.5. MESURES D'ÉNERGIE DE SURFACE 48
4.5.1. Mouillabilité, tension superficielle, énergie de surface 49
4.5.1.1. Mouillabilité 49
4.5.1.2. Énergie superficielle d'un liquide 49
4.5.1.3. Énergie de surface d'un solide 50
4.5.2. Evaluation des angles de contact 51
4.6. MESURE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE SURFACE : XPS 53
4.7. TESTS DE CULTURE CELLULAIRE 54

4.7.1. Les cellules L132 54
4.7.2. Test de cytotoxicité par clonage 54
4.7.3. La prolifération cellulaire 55
4.7.3.1. Détermination de la durée de prolifération optimale 55
4.7.3.2. Tests de prolifération 56
4.7.3.3. Comptage cellulaire 57
4.7.4. Vitalité cellulaire en contact direct 57
4.7.4.1. Etalonnage du Bleu Alamar 58
4.7.4.2. Manipulation 58
4.7.5. Etude de la cinétique d'adhésion cellulaire par la méthode du *p*-NPP 59
4.7.5.1. Le principe 59
4.7.5.2. La mise au point de la technique 59
4.7.5.3. La cinétique d'adhésion sur les matériaux nus 60
4.7.6. Le microscope électronique à balayage (MEB) 60
4.7.7. Marquage immunocytochimique des protéines d'adhésion 60
4.7.7.1. L'adhésion cellulaire à la MEC 60
4.7.7.2. Le protocole opératoire 62
4.7.8. Analyses statistiques 62

5. RÉSULTATS 63
5.1. CHOIX DU PET 64
5.1.1. SPECTROMÈTRIE 64
5.1.1.1. Véralite® 65
5.1.1.2. Melinex® et Goodfellow 66
5.1.2. CRISTALLINITÉ DES MATÉRIAUX 67
5.1.2.1. Étude avant irradiation 67
5.1.2.1.1. DSC du Véralite® 67
5.1.2.1.2. DSC du Melinex® et du Goodfellow 69
5.1.2.2. Étude après irradiation 70
5.1.3. MORPHOLOGIE DE SURFACE 71
5.1.3.1. Mesures de profondeur d'ablation des trois PET 71
5.1.3.2. Observations au microscope photonique 73
5.1.4. ANALYSES DE MOUILLABILITÉ 78
5.1.4.1. Energie totale 79
5.1.4.2. Composante dispersive 80
5.1.4.3. Composante polaire 80
5.1.5. TESTS DE CULTURE CELLULAIRE 82
5.1.5.1. Résultats du clonage 82
5.1.5.2. Prolifération cellulaire 83
5.1.5.2.1. Résultats 83
5.1.5.2.2. Indice de corrélation 86
5.1.5.3. Vitalité cellulaire 87
5.1.5.3.1. Résultats 87
5.1.5.3.2. Indice de corrélation 88
5.1.5.4. Observations au MEB 89
5.1.6. CONCLUSION SUR LE CHOIX DU PET 91
5.2. CHOIX DU LASER 94
5.2.1. LASER YAG 1064 nm 95
5.2.1.1. Rugosité 95
5.2.1.2. Mouillabilité 95

5.2.1.3. Prolifération et vitalité cellulaires 96
5.2.1.4. Adhésion cellulaire 97
5.2.1.5. Conclusion sur le LASER YAG 1064 nm 97
5.2.2. LASER YAG 532 nm 98
5.2.2.1. Rugosité 98
5.2.2.2. Mouillabilité 98
5.2.2.3. Prolifération et vitalité cellulaires 99
5.2.2.4. Adhésion cellulaire 100
5.2.2.5. Conclusion sur le LASER YAG 532 nm 100
5.2.3. LASER YAG 266 nm 101
5.2.3.1. Rugosité 101
5.2.3.2. Mouillabilité 101
5.2.3.3. Prolifération et vitalité cellulaires 102
5.2.3.4. Adhésion cellulaire 103
5.2.3.5. Conclusion sur le LASER YAG 266 nm 103
5.2.4. LASER EXCIMÈRE 193 nm 104
5.2.4.1. Rugosité 104
5.2.4.2. Mouillabilité 104
5.2.4.3. Prolifération et vitalité cellulaires 105
5.2.4.4. Adhésion cellulaire 106
5.2.4.5. Conclusion sur le LASER EXCIMÈRE 193 nm 107
5.2.5. LASER EXCIMÈRE 248 nm 108
5.2.5.1. Rugosité 108
5.2.5.2. Mouillabilité 109
5.2.5.3. Chimie de surface 112
5.2.5.4. Prolifération et vitalité cellulaires 115
5.2.5.5. Adhésion cellulaire 116
5.2.5.6. Marquage immunocytochimique 117
5.2.5.6.1. L'organisation du cytosquelette 118
5.2.5.6.2. Le marquage de la vinculine 120
5.2.5.7. Observations au MEB 122
5.2.5.8. Conclusion sur le LASER EXCIMÈRE 248 nm 124
5.2.6. COMPARAISON DES DIFFÉRENTS LASERS 125
5.2.6.1. Rugosité 125
5.2.6.2. Mouillabilité 125
5.2.6.3. Etat de surface 126
5.2.6.4. Tableau récapitulatif 128

6. DISCUSSION 129

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 136

8. BIBLIOGRAPHIE 139

1. INTRODUCTION

Depuis maintenant de nombreuses années, la médecine est capable de proposer aux patients de bénéficier d'organes artificiels afin de pallier à une déficience ou à une perte de l'un d'entre eux. Ces progrès remarquables ont permis d'améliorer considérablement la qualité de vie des personnes concernées. Malheureusement, utilisés à l'état originel, certains matériaux ne remplissent pas parfaitement le cahier des charges qui leur est imposé, bien qu'ils soient pourtant tout à fait intéressants par ailleurs. Ainsi le plus souvent, lorsqu'un dispositif médical implanté est rejeté du tissu-hôte, l'insuffisance de biocompatibilité est incriminée [1]. Cependant, il est désormais possible de faire progresser certaines propriétés de ces dispositifs grâce à diverses méthodes regroupées sous le terme générique de "fonctionnalisation de surface". La plupart du temps, cette méthode consiste à appliquer un traitement physique ou chimique à la surface du matériau afin d'en modifier les propriétés chimiques, électrochimiques ou encore topographiques.

La modification de surface des matériaux utilisés en médecine doit répondre à de nombreuses exigences : la première d'entre elles est de conserver les propriétés physiques et mécaniques du matériau tout en ne modifiant que la surface la plus externe afin d'influencer les bio-interactions. En utilisant des modifications de surface bien conduites, les propriétés mécaniques et les fonctionnalités du dispositif médical resteront inchangées, tandis que les bio-compatibilité, bio-reconnaissance ou bio-fonctionnalités seront améliorées. En conséquence, en restant intimement imprégné par ces idées, les modifications de surface peuvent être utilisées pour l'immobilisation de bio-molécules ou la reconnaissance de ligands, pour fabriquer des dispositifs qui empêcheront toute interaction non spécifique ou toute absorption de bio-molécule, ou au contraire pour produire des matériaux qui favoriseront les interactions avec le milieu environnant.

C'est cette dernière idée qui a plus particulièrement retenu notre attention. Nous nous sommes concentrés plus précisément sur les prothèses réalisées en polyéthylène téréphtalate (PET). Ce matériau peut être utilisé sous forme de tube plastifié en tant que cathéter trans-dermique. Néanmoins, des épisodes infectieux sont régulièrement rapportés à l'endroit où le tube pénètre dans l'organisme. Le PET est également très utilisé en chirurgie cardio-vasculaire, mais présente néanmoins un certain nombre de propriétés qu'il serait opportun de faire progresser. En effet, ce type de prothèse peut être sujet aux infections, avec des conséquences souvent dramatiques pour le patient [2]. En outre, les patients recevant ce type de prothèse auront l'obligation de recourir à un traitement anticoagulant tout au long de leur vie, et il a également été rapporté certains cas de fuite au niveau de ces vaisseaux sanguins artificiels [3].

Ainsi, il semble intéressant de chercher à améliorer ces propriétés, par exemple en empêchant l'adhérence plaquettaire, ou mieux encore, en favorisant la re-colonisation de cet organe artificiel par les cellules endothéliales. Ces caractéristiques pourraient être obtenues en modifiant les propriétés de surface du PET, et seraient ainsi une première étape vers la

transformation de ce type de prothèse en un véritable biomatériau dans le sens le plus noble du terme.

Différentes techniques ont été proposées pour optimiser le comportement biologique de ces matériaux, dans le but de minimiser tout risque post-opératoire pour les patients. Ces améliorations sont le plus souvent obtenues par des modifications de surface permettant d'influencer les interactions à l'interface matériau – biosystème. Diverses méthodes de traitement de surface ont été décrites comme par exemple le greffage de molécules, le bombardement de faisceaux d'électrons [4], d'ions [5], le plasma [6], la déposition de fines couches par vapeur chimique et bien d'autres encore [7]. Les irradiations au moyen de LASERS (excimère, CO_2, YAG …) sont d'autres moyens de modifier les caractéristiques de la surface, pouvant générer une activation de la surface à de basses énergies, ou une ablation moléculaire à de plus fortes puissances [8]. Ces traitements de surface au moyen d'irradiation LASER font ponctuellement l'objet de quelques publications, plus souvent d'ailleurs dans le domaine physico-chimique que dans le domaine biomédical. Néanmoins, comme nous le verrons ultérieurement, aucune d'entre elles ne fournit les conditions expérimentales complètes, que ce soit au sujet de l'utilisation des LASERS ou de la sélection du polymère étudié.

Pour ces raisons, nous proposons de mettre en place des irradiations de la surface du PET au moyen de différents LASERS, en travaillant sur du PET sous forme de film afin de faciliter les expérimentations dans un premier temps. La première partie de ce travail consiste donc à appréhender le fonctionnement des LASERS, ainsi qu'à comprendre leurs interactions avec le matériau. Ensuite, des irradiations de surface seront réalisés sur trois PET d'origine distincte, afin de mettre en évidence l'importance du choix du substrat dans ce type d'étude. Nous mènerons alors différentes investigations dans les domaines physiques, chimiques et biologiques afin de caractériser au mieux les surfaces nouvellement créées. Enfin, différents LASERS seront testés sur le seul PET retenu, afin de sélectionner le meilleur d'entre eux, c'est-à-dire le plus apte à améliorer les propriétés de surface des prothèses en PET. Pour ce dernier, nous conduirons alors des caractérisations physico-chimiques plus poussés (XPS), ainsi que des tests biologiques plus originaux (adhésion cellulaire, marquage immunocyto-chimique) afin d'acquérir un maximum de connaissances sur le meilleur des couples PET – LASER.

Les résultats exposés dans le présent mémoire ont fait, en partie, l'objet des publications suivantes :

HILDEBRAND HF, BLANCHEMAIN N, MAYER G, ZHANG YM, MELNYK O, MORCELLET M, MARTEL B. Functionalization of biomaterials. *Key Engineering Materials 2005;**288-289:**47-50*.

MAYER G, BLANCHEMAIN N, DUPAS-BRUZEK C, TRAISNEL M, DEROZIER D, LAUDE LD, HILDEBRAND HF. Physico-Chemical Modifications and Biological Improvements of Biomedical PET as a Consequence of Excimer LASER Irradiation. *Key Engineering Materials 2005;288-289:347-50*.

BLANCHEMAIN N, MAYER G, TRAISNEL M, SETTI Y, HILDEBRAND HF. Physico-Chemical and Biological Evaluations of Biomedical Polyethylene after YAG-LASER Irradiation. *Key Engineering Materials 2005;288-289:633-6*.

MAYER G, BLANCHEMAIN N, DUPAS-BRUZEK C, TRAISNEL M, GENGEMBRE L, DEROZIER D, HILDEBRAND HF. Consequence of Excimer LASER Irradiation on the Biological Behavior of Biomedical PET. *J Medical Biomechanics 2005;20S:43-4*.

MAYER G, BLANCHEMAIN N, DUPAS-BRUZEK C, MIRI V, TRAISNEL M, GENGEMBRE L, DEROZIER D, HILDEBRAND HF. Physico-chemical and biological evaluation of excimer LASER irradiated polyethylene terephthalate (PET) surfaces. *Biomaterials 2006;27:553-66*.

HILDEBRAND HF, BLANCHEMAIN N, MAYER G, CHAI F, LEFÈBVRE M, BOSCHIN F. Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. *Surface and Coatings Technology 2006;200:6318-24*.

2. GÉNÉRALITÉS

2.1. NOTIONS DE BIOMATERIAUX

La science des biomatériaux examine les propriétés mécaniques, physiques et chimiques des matériaux ainsi que les réponses de l'organisme à l'introduction d'un matériau, la surface du matériau et les applications des biomatériaux. La science des biomatériaux a été officiellement définie comme : « L'étude et la connaissance des interactions entre les matériaux vivants et non-vivants ». Concernant le concept même de biomatériau, la première définition retenue fut proposée par Williams en 1982 : « Un biomatériau est toute substance, autre qu'un médicament, ou une combinaison de substances, d'origine synthétique ou naturelle, qui peut être utilisée pour n'importe quelle durée, en tant que tout ou partie d'un système qui traite, augmente ou remplace un tissu, organe ou fonction du corps ».

C'est seulement en mars 1986 qu'une Conférence de consensus a été organisée par la Société Européenne des Biomatériaux afin de statuer sur la validité de tous ces termes et d'éditer des définitions officielles, établies par 61 médecins et scientifiques concernés [9]. En particulier la définition de Williams sur les biomatériaux fut simplifiée dans une formulation plus générale : « Matériau non vivant destiné à être utilisé dans un appareil médical, et conçu pour fonctionner avec les systèmes biologiques ». Cette définition fut encore améliorée dans une seconde conférence de consensus ayant eu lieu à Chester [10], Grande Bretagne, en 1991 : « Matériaux destinés à être mis en contact avec les tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps ».

Connaissant la multitude de signaux transitant dans l'organisme, il est utopique de ne vouloir engendrer aucune réaction. Il est donc préférable de tenter de les minimiser et de les orienter. La biocompatibilité se définit donc comme étant : « La propriété d'un biomatériau qui est de déclencher chez l'hôte une réaction appropriée pour une application spécifique ». Deux facteurs principaux déterminent la biocompatibilité d'un matériau : les réactions de l'organisme induites par le matériau et la dégradation du matériel dans le milieu biologique.

Le développement des biomatériaux modernes est lié au développement de la médecine moderne et des nouveaux matériaux. Parmi ceux-ci, deux catégories majeures se partagent la plus grande part du marché : les métaux et les polymères. Dans la première catégorie, l'acier inoxydable et les alliages cobalt-chrome ont été les premiers matériaux employés à l'intérieur du corps avec succès. Vers la fin des années 60, les excellentes propriétés du titane ont été découvertes par Brånemark [11]. À cette époque, quelques matériaux ont commencé à être classés en tant que biomatériaux. Aujourd'hui, les biomatériaux métalliques se sont considérablement développés en chirurgie orthopédique, maxillaire et dentaire : les plaques, les clous, les vis pour la réduction des fractures et plus récemment les prothèses ostéo-articulaires et dentaires.

Concernant la seconde catégorie, les polymères, ils sont utilisés encore plus largement que les métaux. Cette catégorie, extrêmement fournie, regroupe aussi bien les polymères résorbables (membranes, colles biologiques …) que les non résorbables. Parmi ceux-ci, les plus utilisés sont le polyéthylène (cupule réceptrice de la prothèse de hanche) et le polyéthylène téréphtalate (prothèses vasculaires, cathéters).

Aujourd'hui, un grand nombre de professions travaillent dans le domaine des biomatériaux et l'approche interdisciplinaire est essentielle. En effet, l'élaboration d'un nouveau matériel implantable, ou l'amélioration de ses propriétés, va faire intervenir des professions aussi différentes que celles du milieu médical (médecin, chirurgien-dentiste, biologiste …) et celles du milieu scientifique (physiciens, chimistes, mathématiciens …). Toute la difficulté de cette tâche, mais qui en fait en même temps toute sa noblesse, consistera à faire travailler tous ces acteurs en parfaite harmonie, à les faire se rencontrer et communiquer dans des termes compréhensibles par chacun, de façon à atteindre le but fixé par tous : faire progresser la médecine au service du patient.

2.2. PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MODIFICATIONS DE SURFACE

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il n'est pas rare de devoir améliorer les propriétés de surface d'un matériel médical implantable. De fines modifications de la surface sont alors recommandées. En effet, des transformations qui pénétreraient trop dans l'épaisseur du matériau pourraient modifier ses propriétés mécaniques et fonctionnelles. D'autre part, des enrobages trop épais sont sujets à une dégradation à cause d'une mauvaise adhérence sur le substrat en raison des propriétés physiques [12]. Idéalement, une altération de la seule couche moléculaire la plus externe (0,3 - 1 nm) devrait être suffisante. Mais en pratique, des couches plus épaisses seront nécessaires dans la mesure où il est difficile de s'assurer que tout le matériau a été uniformément recouvert lorsque les traitements de surface sont aussi fins. De plus, des couches aussi minces seront plus facilement sujettes à une réversibilité des modifications et à une érosion mécanique. Enfin, certaines transformations auront de toute façon une épaisseur intrinsèque minimale, voire même auront besoin de cette épaisseur minimale pour fonctionner correctement. Les modifications réalisées sur les matériaux auront besoin de résister à la dégradation dans les différents milieux biologiques qui les accueilleront. Cette résistance pourra par exemple être améliorée grâce à la réalisation d'une liaison covalente, par l'interpénétration du substrat et de la surface du dispositif médical au niveau de la zone interfaciale, ou enfin en incorporant des groupements fonctionnels appropriés afin de réaliser une adhésion intermoléculaire particulièrement forte.

La force qui va diriger ces modifications de surface est due à la minimisation de l'énergie interfaciale. Quoiqu'il en soit, une mobilité atomique ou moléculaire suffisante doit exister pour que ces changements puissent intervenir dans des périodes de temps raisonnables. Afin de trouver la stabilité dans ces modifications de surface, la réversibilité des phénomènes doit être prévenue ou inhibée, par exemple en bloquant la possibilité pour les différentes structures de surface de bouger, ou en incorporant une couche rigide et imperméable entre le substrat et la surface transformée [12].

L'un des défits les plus difficiles dans les fonctionnalisations de surface est de réaliser un contrôle précis des divers groupements fonctionnels qui ont été créés. La plupart des modifications de surface amènent à la création de plusieurs groupements fonctionnels tels que carbonyle, carboxyle, carbonate, hydroxyle ou encore éther, et non pas la formation d'un seul groupement fonctionnel qui était peut-être préférentiellement attendu. C'est ainsi le cas avec certaines techniques utilisant le plasma ou l'oxydation. En revanche, la littérature a rapporté des cas où la précision et le contrôle des éléments déposés étaient effectifs, notamment avec le RF-plasma (Radio-Frequency plasma) [13]. Mais là où l'on se heurte peut-être à la plus grande difficulté dans la préparation de nouvelles surfaces fonctionnelles est de savoir quelle est la structure exacte nécessaire pour entraîner une réaction biologique donnée. Et tant que l'on ne connaît pas précisément les résultats à atteindre (c'est à dire quelle est la réaction biologique spécifique à obtenir afin de définir le groupement fonctionnel adéquat à greffer), alors il est impossible de savoir quelles nouvelles structures de surface doivent être créées.

Finalement, la possibilité de donner naissance à des traitements de surfaces uniformes, de formes et de géométries complexes, peut être essentielle pour les applications biomédicales. Quelque soit la forme de la pièce (tubulaire (face interne ou face externe), membrane, ou encore découpée de façon complexe), il faut pouvoir associer cette forme avec les exigences de fabrication qui découlent de la fonctionnalisation de surface. Les procédés sont généralement optimisés pour chaque cas spécifique et l'ingéniosité est couramment nécessaire afin d'atteindre ce but.

2.3. LES DIVERSES MÉTHODES DE FONCTIONNALISATION

Les modifications de surface peuvent être regroupées en deux grandes catégories [12] :

☞ Altérer physiquement ou chimiquement les atomes ou molécules présents à la surface (irradiation LASER, plasma à froid…)

☞ Recouvrir cette surface avec un matériel présentant un intérêt particulier, par liaison covalente ou non.

Quelques unes des possibilités de fonctionnalisation de surface sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Différentes méthodes de modification de surface (d'après Ratner [12])

Modification de la surface	Liaison covalente	Liaison non covalente
- Gravure par plasma - *Irradiation UV* - Réactions chimiques (oxydation, réduction…)	- Greffage par radiation - Greffage chimique - Silanisation	- Déposition d'une fine couche par vapeur chimique - Déposition par vapeur de métaux

La fonctionnalisation de surface par irradiation UV, c'est à dire par traitement LASER dans les longueurs d'onde qui nous intéressent, occupe une place de choix parmi les différentes possibilités évoquées dans ce tableau. En effet, la technique est plus reproductible que celle du plasma, et engendre beaucoup moins de pollution environnementale que les différents procédés de réactions chimiques. Enfin, elle ne requiert pas l'utilisation de rayons ionisants comme dans les procédés de greffage par radiation.

2.4. CHOIX DU POLYÉTHYLÈNE TÉRÉPHTALATE

Le PET est un matériau dur, rigide, solide, avec une bonne stabilité dimensionnelle et une faible absorption d'eau. Il possède de bonnes propriétés de protection contre les gaz et une bonne résistance chimique, sauf aux alcalins qui l'hydrolysent. Sa cristallinité varie entre amorphe et relativement élevée ; il est le plus souvent très transparent et incolore, mais les parties épaisses sont généralement opaques et blanchâtres.

Ce polymère est largement connu sous la forme de film orienté biaxialement et stabilisé thermiquement, appelé plus couramment sous les noms commerciaux Mylar®, Melinex® ou Hostophan®. Ces appellations devraient être utilisées uniquement pour cette sorte de film dont les propriétés sont différentes, et même supérieures, aux PET « ordinaires ». Ces films « type Mylar® » sont utilisés pour les condensateurs, les graphiques, les pellicules, les bandes d'enregistrement, etc. Le PET est également utilisé pour une large gamme de fibres de textile et pour des utilisations industrielles (Dacron®, Trevira®, Terylène®) . D'autres applications incluent les bouteilles et les composants électriques.

De très nombreux polymères existent sur le marché, cependant très peu sont susceptibles d'être utilisés en tant que biomatériaux. Le PET fait partie de cette catégorie, ses applications biomédicales les plus fréquentes sont l'utilisation en tant que matériel de suture chirurgicale [14], remplacement de tendons et ligaments [15,16], mèches chirurgicales [17,18], cathéters transcutanés [19], ou encore l'utilisation comme implant palatin dans le traitement du ronflement [20,21].

Mais l'application la plus courante reste évidemment l'utilisation en tant que remplacement de vaisseaux sanguins, et l'industrie s'est adaptée pour proposer des textiles de qualité médicale qui peuvent servir à la fabrication de prothèses vasculaires dont la capacité fonctionnelle est supérieure à l'espérance de vie du receveur. Alors que le nylon, l'Ivalon® (polyvinylalcool), l'Orlon® (polyamide) ont été incapables de résister à la dégradation *in vivo*, le PET s'est imposé de manière irréfutable au cours des 35 dernières années [22,23], et les prothèses vasculaires réalisées avec ce type de polymère sont aujourd'hui les plus couramment utilisées [24]. Citons à titre d'exemple le Dacron®, marque de commerce du PET fabriqué par DuPont ™. Ce dernier constitue effectivement un matériau de choix pour la fabrication de prothèses artérielles de moyen et grand calibre, qu'elles soient tubulaires ou bifurquées. En effet, les fils requis sont disponibles sous des formes nombreuses, dans lesquelles varient la densité linéaire, le diamètre et la section des filaments et le nombre de filaments par fil. Le PET est bien toléré après implantation car il est inerte, biocompatible, souple, élastique et résistant à la stérilisation (rayons gamma). Sa formule chimique se présente comme le montre la Figure 1. Depuis les sutures jusqu'aux prothèses vasculaires, l'utilisation du polyéthylène téréphthalate en tant que matériau médical dure ainsi depuis plus de cinquante ans et constitue l'un des rares matériaux qui ait pu démontrer une efficacité continue avec un minimum de complications dans de nombreuses applications cliniques.

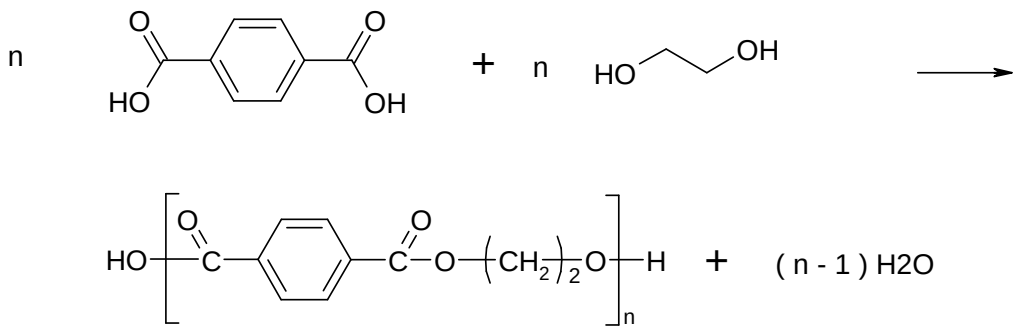


Figure 1 : Formule du PET

Cependant, comme nous le disions en introduction, un certain nombre d'évènements indésirables sont ponctuellement rapportés. Utilisé en tant que prothèse vasculaire, le plus commun est la survenue de réactions de coagulation non contrôlées, obligeant les patients à

vivre sous anti-coagulants, et ceci particulièrement lors du remplacement des plus petits vaisseaux. En outre, certains cas de fuites ont été rapportés, par défaut d'étanchéité au niveau des zones d'ancrage proximale ou distale entre la prothèse vasculaire et le vaisseau natif réparé [25,26] (Figure 2). Utilisé en tant que cathéter trans-cutané, de nombreux cas d'infections sont régulièrement décrits à la jonction entre la peau et le PET. Ces différents types d'évènements justifient à eux seuls la mise en place d'une procédure de fonctionnalisation de surface des matériels médicaux en polyéthylène téréphthalate.

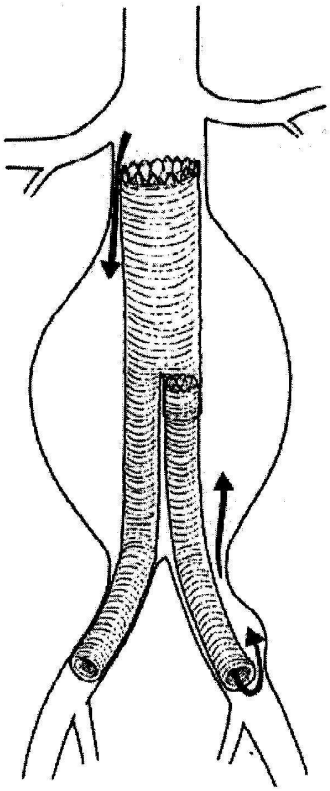


Figure 2 : Exemple de fuite proximale et distale

2.5. FONCTIONNALISATION PAR IRRADIATION LASER

Quelques traitements de surface ont été développés pour tenter de diminuer la thrombogénicité et augmenter la biocompatibilité des polymères [27,28]. Le LASER a démontré des possibilités de modification de la morphologie et des propriétés de surface, par formation de nouveaux groupements fonctionnels et de microstructures à la surface des polymères [29,30,31]. Les modifications de structure induites peuvent augmenter les interactions avec le milieu biologique, agir sur l'adhésion et la croissance cellulaire, et modifier les interactions entre les éléments du flux sanguin et la surface des polymères [32].

2.5.1. Avantages

Nous souhaitons donc évaluer le traitement de surface du PET par irradiation LASER [33]. L'avantage de cette méthode réside dans sa faculté à ne provoquer que peu ou pas d'effets thermiques durant l'irradiation [34], permettant d'obtenir une surface proprement découpée [35], et ne dégradant pas les propriétés mécanique du matériau [34]. D'autre part, il s'agit d'une technique rapide, souple [36] et biocompatible [35]. Enfin, ce procédé rend les résultats plus reproductibles que le plasma par exemple [35], et permet de fonctionnaliser des surfaces précisément puisque seule la région désirée sera modifiée.

2.5.2. Caractéristiques

Les irradiations peuvent s'effectuer selon de nombreux paramètres ajustables : taille, fréquence, intensité et vitesse de déplacement du spot. Elles restent limitées à la surface du PET sans jamais pénétrer dans la profondeur du matériau : une étude réalisée par Lazare et Benet [37] a montré que les radiations dues au LASER excimère, utilisé à 248 nm de longueur d'onde, ne pénètrent pas à plus de 62.5 nm de profondeur. Le résultat de cette irradiation consiste en une amorphization de la surface du PET, laquelle ne dépasse jamais 160 nm de profondeur, quelle que soit l'énergie utilisée (Figure 3). Deux hypothèses, vraisemblablement impliquées toutes les deux, expliquent cette amorphization : elle peut être due à un processus de réchauffement de la surface suivi d'un refroidissement [30,37,38], ou être la conséquence de certaines cassures de chaînes du polymère qui, à partir d'un certain nombre, ne peuvent plus se réaccomoder [37].

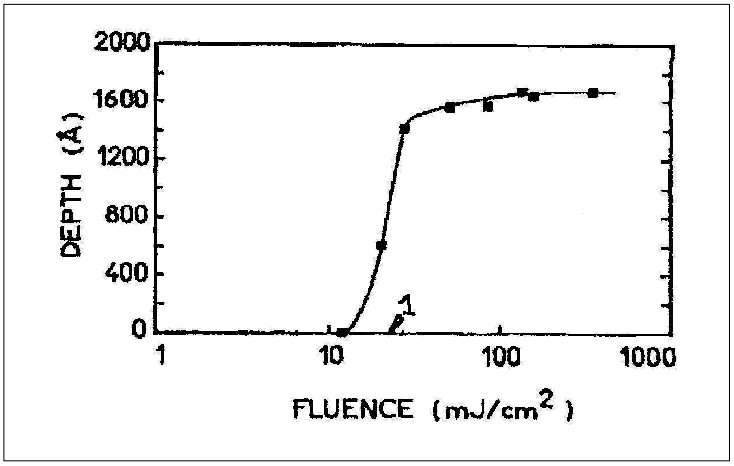


Figure 3 : Profondeur d'amorphization en fonction de l'énergie du coup (d'après Lazare et Benet [37])
(1 = seuil d'ablation)

Les paramètres susceptibles de varier sont très nombreux, et malheureusement souvent incomplètement décrits dans les différentes publications. Ces imprécisions empêchent ainsi de pouvoir comparer les études entre elles, voire même de pouvoir exploiter les résultats. Les principales variables concernant ce type d'expérimentation sont :

- Type de LASER
- Energie du coup d'impulsion
- Durée de l'impulsion
- Nombre de coups d'impulsion
- Fréquence d'irradiation
- Atmosphère utilisée pour l'irradiation
- Cristallinité du PET

} Paramètres liés au LASER

2.6. EFFETS DU LASER

2.6.1. Sur l'état de surface

La nature du rayonnement délivré sur la surface irradiée permet, au travers de l'absorption des très nombreux photons UV par les électrons de valence des monomères, de décomposer les chaînes polymères qui y sont présentes. A forte concentration d'énergie, un processus d'émission de matière, appelé ablation, se développe, et permet le décapage ou la gravure du matériau irradié (Figure 5). Il semblerait alors que chaque coup d'impulsion reçu par le matériau formerait un cratère d'environ 0,5 µm de profondeur [31,35,39]. Cette ablation se manifeste à des concentrations d'énergie supérieures à un seuil, appelé seuil d'ablation [8].

En dessous de celui-ci, des ruptures de chaînes polymères sont obtenues sans toutefois entraîner l'ablation. Ces ruptures de chaînes sont autant de liaisons inter-atomiques brisées qui matérialisent une sensibilité remarquable des surfaces irradiées à l'environnement (Figure 6). Cette sensibilité permet en particulier de fixer chimiquement des atomes ou radicaux ionisés. Elle permet aussi de mettre en jeu des forces d'attraction importantes qui aident à fixer plus ou moins solidement des espèces moléculaires volumineuses, par interaction de type polaire ou électrostatique. En faisant varier le mode d'irradiation d'une surface polymère en fonction des différents paramètres auparavant cités, il est donc possible d'adapter le processus de sensibilisation optique induit par l'irradiation LASER, d'une part à la nature du polymère, et d'autre part à la nature des réactions souhaitées sur cette surface. Par exemple, le choix de l'atmosphère d'irradiation apparaît crucial, puisque comme nous l'avons dit, la surface irradiée devient sensible à l'environnement. Dans le cas d'une irradiation en atmosphère ambiante, des molécules d'oxygène présentes dans l'air seront ainsi capables de se fixer sur la surface du PET. Lors d'une irradiation sous atmosphère saturée en oxygène, la concentration plus importante de cet atome permettra en retour de faire adhérer encore plus de molécules d'oxygène.

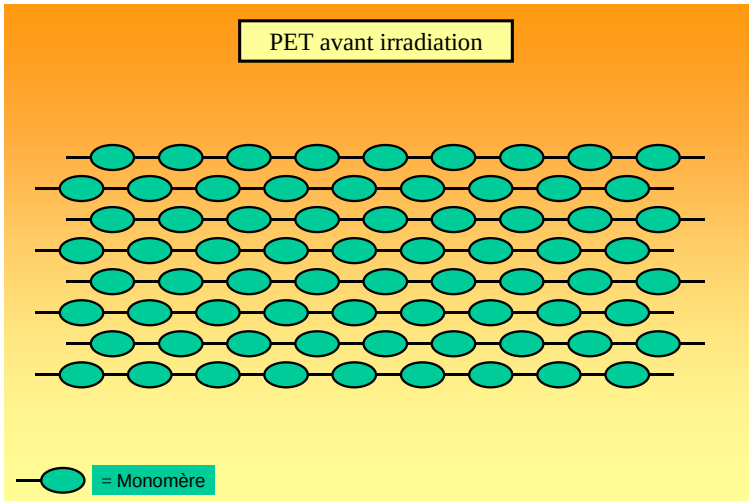


Figure 4 : PET avant irradiation

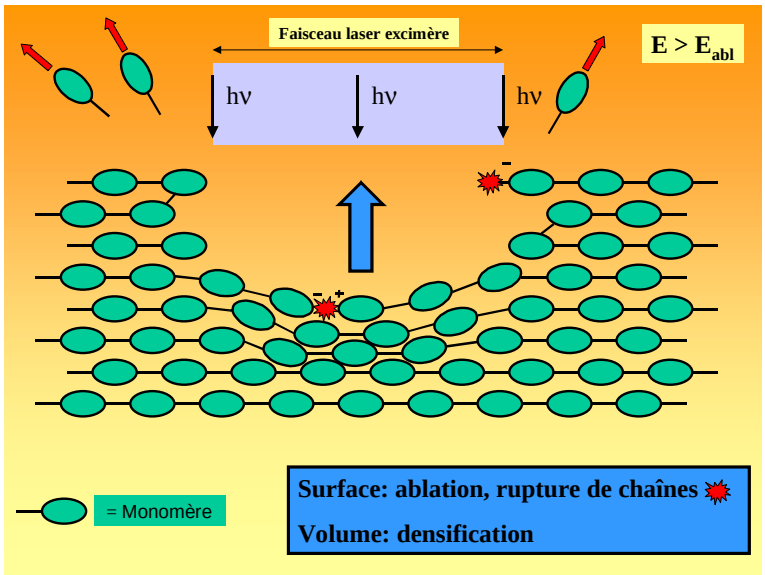


Figure 5 : Irradiation au dessus du seuil d'ablation

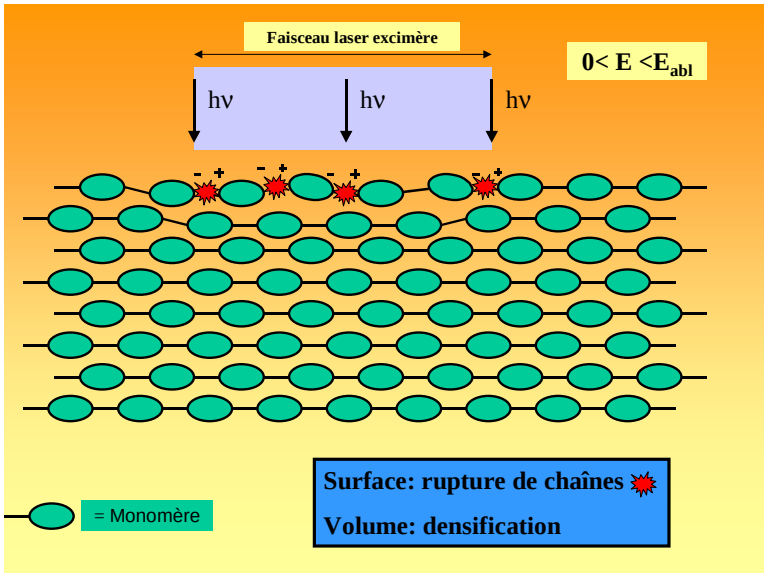


Figure 6 : Irradiation en dessous du seuil d'ablation

2.6.2. Sur la chimie de surface

Au sujet de ce critère, les résultats sont très souvent différents entre les auteurs, voire même parfois paradoxaux ; c'est d'ailleurs ce qu'avaient relevé Petit *et al.* [40] dans leur étude. Une des explications à ce phénomène pourrait être liée au fait que les conditions d'expérimentation ne sont jamais entièrement décrites, rendant ainsi les résultats impossibles à comparer. Généralement le type de LASER utilisé et l'énergie d'irradiation sont détaillés. Les lacunes concernent le plus souvent le nombre de coups, leur fréquence, et la nature du PET.

Ainsi par exemple, Lazare et Benet [37] affirmaient qu'une chute du rapport O/C se produisait quelles que soient les conditions d'irradiation, tandis que Dunn et Ouderkirk [30] le trouvaient invariable, et que Saito *et al.* [29] montraient que ce rapport pouvait fortement augmenter (Figure 7). Ces derniers résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de Ramires *et al.* [41] qui montrent par XPS que les combinaisons d'atomes retrouvés à la surface du PET après traitement par plasma varient avec l'atmosphère sous laquelle a eu lieu la fonctionnalisation (Tableau 2). Cette analyse montre bien la réactivité de la surface avec son environnement après une irradiation LASER.

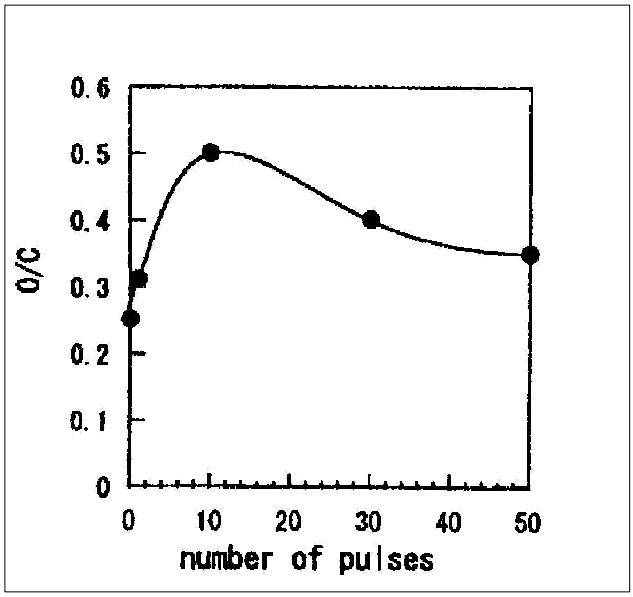


Figure 7 : Rapport O/C en fonction du nombre de coups (E=100mJ/cm²) (d'après Saito *et al.* [29])

Atm.	C (%)	O (%)	N (%)
Contrôle	68.2	31.8	0
O_2 / H_2	56.1	43.9	0
O_2 / H_2O	63.6	36.4	0
NH_3	66.5	28.0	5.5
NH_3 / H_2	65.4	28.6	5.9

Tableau 2 : Composition de la surface en fonction de l'atmosphère d'irradiation (Ramires *et al* [41])

Ainsi, un des paramètres pouvant agir sur la chimie de la surface est l'atmosphère sous laquelle sont irradiés les polymères. Niino et Yabe [42] expliquent que le potentiel de surface du PET après irradiation sous différentes atmosphères est meilleur qu'après une irradiation sous vide. En effet, dans ce dernier cas, les particules éjectées vont retomber sur la surface et se recombiner avec le polymère, rendant l'effet de l'irradiation négligeable. En revanche, sous une quelconque atmosphère, les particules projetées vont alors se recombiner avec les molécules du gaz présent, évitant de retomber directement sur le matériau.

Duncan *et al.* [35] affinent cette analyse et suggèrent deux cas de figure pouvant se produire lors d'une irradiation, si celle-ci est réalisée en dessous ou au dessus du seuil d'ablation. Dans ce dernier cas, l'énergie en excès (qui n'a pas servi à casser des liaisons) est convertie en énergie cinétique, et contraint les fragments à être éjectés à des vitesses supersoniques. Il se forme alors un volume en expansion extrêmement rapide, lequel empêche l'approche des molécules d'oxygène près de la surface : c'est ainsi que sont formés la plupart des radicaux de carbone sur le matériau. Ainsi, une irradiation effectuée au dessus du seuil d'ablation ne semble pas favoriser l'apparition d'une surface chimiquement intéressante.

Petit *et al.* [40] vont plus loin et analysent par XPS la chimie de surface du PET après traitement par LASER dans l'air et sous hélium. Cette fois-ci, l'irradiation est réalisée en dessous du seuil d'ablation, c'est à dire à de très faibles énergies. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3, qui montre qu'une amélioration de la quantité d'oxygène sur la surface peut être obtenue uniquement après irradiation dans l'air, à partir d'une centaine de coups. La raison est la suivante : après traitement LASER, la surface devient très sensible à l'environnement, ce qui permet aux molécules d'oxygène présentes dans l'air de se lier plus facilement au polymère.

	Energie	0 coup	50 coups	100 coups	200 coups	500 coups
Sous Hélium	10 mJ/cm²	0.38	0.30	0.27	0.33	0.24
	20 mJ/cm²	0.38	0.30	0.27	0.19	0.15
	30 mJ/cm²	0.38	-	-	0.17	0.13
Dans l'air	6 mJ/cm²	0.38	0.35	0.39	0.41	0.45
	10 mJ/cm²	0.38		0.35	0.39	0.40
	20 mJ/cm²	0.38	0.36	0.37	0.28	0.32
	30 mJ/cm²	0.38	0.34	0.32	0.30	-

Tableau 3 : Rapport O_{1S} / C_{1S} du PET après traitement dans l'air et l'hélium (d'après Petit *et al.* [40])

2.6.3. Sur les comportements cellulaires

La réponse biologique est un paramètre essentiel à étudier puisque le but final de la fonctionnalisation de la surface est de pouvoir permettre l'adhésion et la prolifération des cellules. Il a été montré qu'il était possible de faire adhérer des fibroblastes L929 sur du PET en forme de microfibres [43], même lorsque la surface n'était pas préparée. En revanche, cette même adhésion sur des polymères en plaque est pauvre, voire quasi impossible [41], et elle sera de toute façon améliorée, quelque soit le support, grâce aux traitements de surface.

Afin d'être capable d'analyser les comportements cellulaires de la manière la plus fidèle possible, Dewez *et al.* [44] proposent une classification intéressante permettant d'évaluer de façon reproductible l'adhésion cellulaire. Ce classement repose sur quatre critères :

- *Grade 0* : Aucune cellule ne reste attachée au substrat après rinçage.
- *Grade 1* : Des cellules adhèrent au substrat, mais la plupart d'entre elles conservent une morphologie sphéroïdale.
- *Grade 2* : Les cellules adhèrent et s'étalent mais la majorité d'entre elles restent individualisées.
- *Grade 3* : Les cellules adhèrent et s'étalent sur le substrat, formant une monocouche confluente.

Un consensus se dégage pour montrer que trois facteurs principaux sont capables d'influencer de façon essentielle le comportement cellulaire : la tension de surface du matériau, sa chimie de surface et enfin sa rugosité [28,45,46,47]. Ces caractéristiques sont d'ailleurs regroupées sous le terme générique de "propriétés physico-chimiques".

2.6.3.1. La tension de surface

Ce paramètre est extrêmement important à prendre en considération concernant le comportement cellulaire sur un biomatériau, quel qu'il soit. Dans le cas des polymères, les surfaces originelles ont très souvent tendance à présenter un caractère hydrophobe, provoquant une réponse cellulaire peu favorable. L'une des façons de calculer cette tension de surface est de mesurer la valeur de l'angle que forme une goutte de liquide avec la surface d'un solide, valeur qui est déterminée par les énergies superficielles et interfaciales des phases en présence. Un des avantages présentés par le LASER est de pouvoir augmenter cette tension de surface, donc augmenter la mouillabilité du matériau, c'est à dire diminuer l'angle de contact d'un liquide (particulièrement l'eau) avec cette surface, incitant à une meilleure réponse cellulaire [45].

Les figures 8 et 9 montrent deux exemples possibles d'évolution de la tension de surface du PET en fonction de l'irradiation par le LASER excimère.

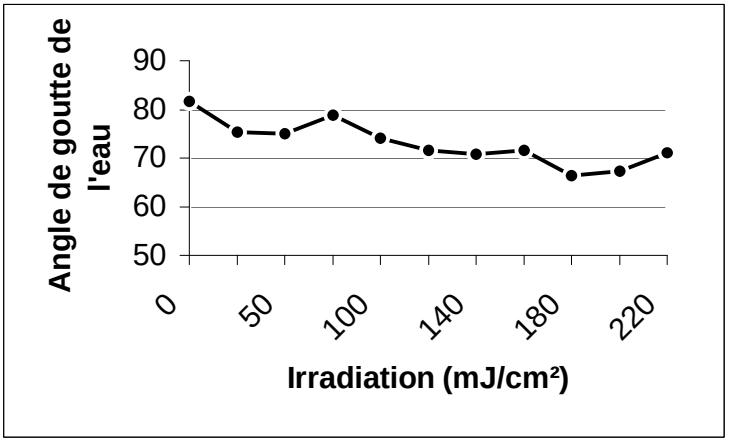


Figure 8 : Evolution de l'angle de goutte de l'eau en fonction de l'irradiation (d'après Haulon [48])

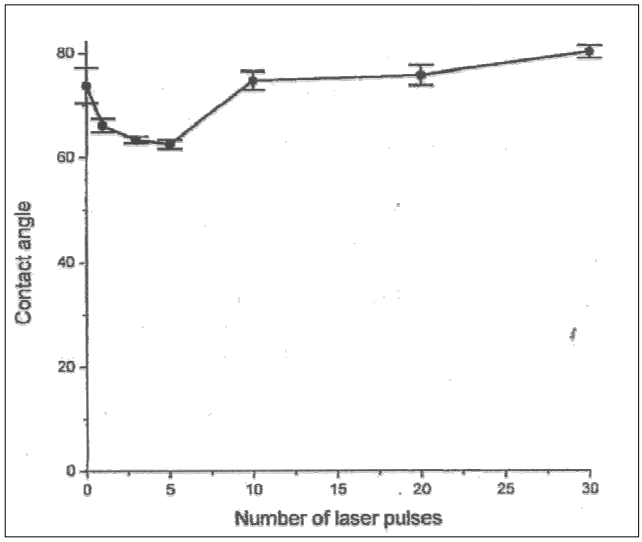


Figure 9 : Evolution de l'angle de goutte de l'eau en fonction de l'irradiation (d'après Dadsetan *et al* [27])

Deux grandes explications permettent d'argumenter cette diminution de l'angle de contact du liquide avec la surface [49] : d'une part, une rugosité augmentée du matériau, permettant un meilleur étalement de la goutte. D'autre part, une chimie de surface modifiée, avec notamment l'apparition d'atomes d'oxygène en plus grand nombre. Ces observations montrent bien d'ailleurs à quel point ces trois propriétés physico-chimiques sont intimement liées (tension de surface, chimie de surface et rugosité).

Cette amélioration de l'hydrophilie du matériau est intéressante à considérer car l'on sait que les cellules présentent un comportement plus favorable lorsque le caractère hydrophobe est diminué. Il ne faut cependant pas chercher à obtenir le plus petit angle de contact possible, car l'activité cellulaire est conditionnée par un savant dosage entre les composantes hydrophile et hydrophobe, et ce n'est jamais au niveau des valeurs extrêmes de ces deux paramètres que l'on obtient les meilleurs résultats. Lee *et al.* [50] réussissent même à donner la valeur approximative de 55 degrés comme étant la meilleure valeur de l'angle de contact de l'eau avec le matériau afin d'obtenir les résultats les plus encourageants. Cette estimation était d'ailleurs valable quelque soit le type de cellule considéré dans cette étude, comprenant notamment des cellules endothéliales.

2.6.3.2. La chimie de la surface

La chimie de la surface est une notion qu'il convient d'examiner si l'on connaît son importance vis-à-vis des cellules. Intimement mêlée avec les deux autres paramètres, Curtis et Wilkinson [51] avaient essayé de comparer l'impact de cette variable sur l'activité cellulaire par rapport à la rugosité. Ils en avaient tiré cette conclusion intéressante : lorsque la valeur moyenne de la rugosité est inférieure à 500 nm, alors le comportement cellulaire est principalement dicté par la chimie de la surface. En revanche, lorsque les irrégularités à la surface du matériau présentent une profondeur moyenne supérieure à 5 µm, alors c'est incontestablement ce dernier paramètre qui agit le plus sur les cellules : 80 % d'influence contre 7 % pour l'effet de la chimie de la surface.

Concernant plus particulièrement la chimie de la surface proprement dite, Duncan *et al.* [35] regrettaient, en 2002, qu'il n'y avait pas encore à ce jour de théorie prédictive concernant le comportement des cellules en réponse à la chimie de la surface. Néanmoins, il est présumé qu'une augmentation du taux d'oxygène amène à de meilleurs résultats biologiques. Cependant cet accroissement ne doit pas être obtenu avec n'importe quel groupement chimique : en effet, il semble que les cellules réagissent mieux avec les fonctions C-O qu'avec les fonctions C=O [41]. Ainsi, la réponse biologique dépendrait non seulement du nombre d'atomes d'oxygène à la surface, mais aussi de la réduction des groupements

carbonyles (C=O) au profit des groupements hydroxyles (C-OH). Une fonctionnalisation de surface par irradiation LASER dans une atmosphère ambiante pourrait donc théoriquement permettre d'atteindre ce but [52].

2.6.3.3. La rugosité

Il est admis de manière consensuelle que les meilleurs résultats concernant les comportements cellulaires sont obtenus avec une rugosité de l'ordre de quelques µm. En effet, la rugosité augmentant, ce sont alors les adhésions, migrations, et synthèses cellulaires qui augmentent à leur tour.

Les progrès dans les techniques de fonctionnalisation de surface et dans l'analyse de ces modifications aidant, il est maintenant possible d'étudier l'influence d'une rugosité de l'ordre de quelques nanomètres [53] (Figures 10 et 11). C'est ce qu'ont réalisé Y. Xie *et al.* dans une étude datant de 2002 [54], confirmée par MD Ball *et al.* en 2007 [55]. Leurs résultats ont tendance à montrer que les bénéfices apportés par ces techniques sont inférieurs à ceux obtenus avec des irrégularités d'ordre micrométrique.

En résumé, une rugosité de l'ordre de 5-10 µm semble être la plus adaptée en vue d'optimiser le comportement cellulaire, tout en sachant que celle-ci devra être adaptée tout à la fois au modèle de cellule concerné ainsi qu'au type de réponse souhaité.

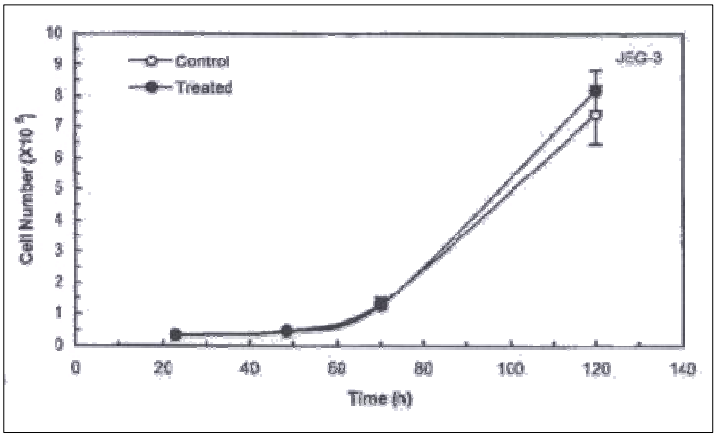


Figure 10 : Effet d'une rugosité nanométrique sur la croissance cellulaire (d'après Xie *et al* [54])

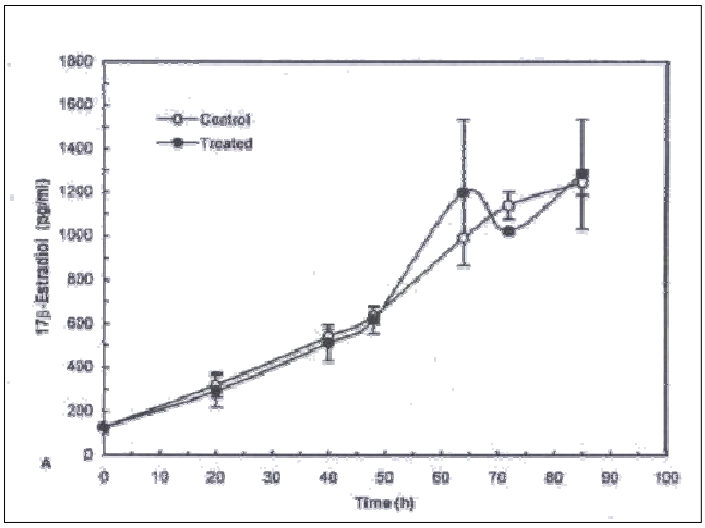


Figure 11 : Effet d'une rugosité nanométrique sur la sécrétion cellulaire (d'après Xie *et al* [54])

2.7. BUT DE L'ÉTUDE

L'irradiation d'un matériau par rayonnement LASER dans le but de faire progresser ses propriétés de surface est une idée originale, mais peu mise en œuvre, dont les premiers rapports remontent maintenant à une vingtaine d'années. Différents LASERS ont d'ailleurs été testés, parmi lesquels sont retrouvés le plus fréquemment le LASER CO_2 [27,28,49] et le LASER excimère [8,27-31,38,39,48]. En revanche, les irradiations menées au moyen de LASERS YAG sont particulièrement rares [56,57]. Le LASER excimère a reçu progressivement la faveur des scientifiques pour les divers avantages que nous avons cités au § 2.5.1. Cependant, les publications traitant d'une irradiation du PET au moyen d'une source LASER ne sont pas si nombreuses dans le domaine biomédical, et elles se distinguent toutes par un point commun : l'absence de critères parfaitement définis permettant une reproductibilité et une confrontation des résultats. Pourtant, seules des conditions expérimentales parfaitement définies, agrémentées d'un choix judicieux des matériaux utilisés, permettent un suivi et une compréhension rigoureuses des modifications engendrées à la surface du matériau. Ces dernières constituent alors la base des connaissances nécessaires à la future compréhension des modifications des interactions biologiques.

Ainsi, les critères susceptibles de varier lors de l'utilisation de cette technique sont nombreux, parmi lesquels on retrouve cinq paramètres principaux : l'énergie du coup, le nombre de coups, la fréquence d'irradiation, l'atmosphère utilisée pour l'irradiation, et enfin la cristallinité du PET. Malheureusement, aucune étude ne définit de façon tout à fait claire ces différentes valeurs, et la plupart d'entre elles n'en précisent que deux ou trois sur les cinq précédemment citées. Le travail publié par Dadsetan *et al.* [27] sur le comportement des plaquettes sanguines sur une surface irradiée par LASER excimère est même le moins bien loti

dans ce domaine, puisque le seul critère qui soit établi est le nombre de coups reçus par le matériau ! Sans connaître l'énergie de ceux-ci, ni leur fréquence, il est alors impossible de pouvoir renouveler l'expérience ni même de pouvoir profiter de ses conclusions. En conséquence, des indications plus précises des conditions d'irradiation s'imposent afin d'uniformiser les modalités d'expérience, et de pouvoir de ce fait les comparer entre elles.

Ainsi, l'esprit qui nous anime au cours de cette recherche est de clarifier les données dans ce domaine, et de caractériser de manière précise les différents paramètres qui interviennent dans une telle expérimentation. D'autre part, il serait intéressant de mettre en évidence l'influence que peut avoir chacune de ces valeurs sur le résultat final. Par exemple, nous sommes persuadés que la cristallinité du matériau peut influer sur le résultat, et pourtant aucune publication ne définit ce critère dans les conditions de départ. Ainsi, nous testerons trois PET d'origine distincte afin d'examiner leur différence de comportement physico-chimique et biologique suite à une irradiation LASER. De plus, une analyse par calorimétrie différentielle (DSC) permettra de déterminer la valeur de la cristallinité de chaque PET avant et après traitement de surface.

Toutefois, la principale difficulté consiste à déterminer les conditions d'irradiation optimales [35]. En effet, chaque critère aura des conséquences sur le résultat final. Une irradiation trop forte du matériau par exemple entraînerait une dévalorisation des résultats : dans un premier temps, l'excès d'énergie amènerait à des cassures de liaisons chimiques intéressantes [8], et à une recombinaison des radicaux de carbones entre eux, produisant une surface aux propriétés hydrophobes [29]. Dans un second temps, les propriétés mécaniques et fonctionnelles de la prothèse risqueraient d'être altérées [12]. De ce fait, la première étape de ce travail consistera à déterminer le seuil d'ablation du matériau, puis à rester proche de celui-ci afin de ne pas dégrader le PET. Dans un second temps, différents LASERS pourront être testés afin de comparer les résultats obtenus.

Différents tests seront alors réalisés, visant à définir de la manière la plus précise possible les caractéristiques de la surface nouvellement générée. Puisque les méthodes d'analyses conventionnelles sont la plupart du temps insuffisamment sensibles pour détecter les modifications de surface, des techniques d'analyses particulières seront mises en œuvre [65]. Nous citerons ainsi par exemple les mesures d'angle de contact, par la méthode de l'angle de goutte, afin de définir la tension de surface du matériau [58]. Suivront ensuite des analyses au LASER confocal, pour déterminer la rugosité du matériau, accompagnées de photographies au microscope électronique à balayage (MEB).

Concernant la chimie de surface, les techniques infrarouges ou Raman ont déjà démontré leurs limites pour caractériser les modifications de surface [48,59]. Ceci s'explique par une profondeur de pénétration de ces rayonnements trop importante par rapport à l'épaisseur,

très fine, concernée par la fonctionnalisation de surface. De ce fait, nous réaliserons d'emblée des analyses de chimie de surface par XPS.

Enfin des tests biologiques sont indispensables pour compléter ces résultats, à savoir des tests de prolifération, de vitalité, d'adhésion et de morphologie cellulaires, et enfin du marquage immunocytochimique [60].

2.8. CONCLUSION

Le premier but de cette recherche est d'augmenter la bio-fonctionnalité des prothèses déjà existantes [61]. De précédentes investigations ont réussi à diminuer la thrombogénicité de ces dispositifs, ou encore à y faire coloniser des cellules endothéliales. Cependant, soit ces résultats n'étaient pas transposables chez l'homme, soit les industriels ne suivaient pas, par crainte de se lancer dans des procédures de fabrication trop complexes. Le traitement par LASER présente donc une nouvelle alternative, simple et reproductible, d'activation de surfaces qui pourrait être le premier pas vers une facilitation des différentes procédures de bio-fonctionnalisation des matériaux. Citons à titre d'exemple le greffage de molécules intermédiaires ou la déposition de protéines de la matrice extra-cellulaire afin de contribuer à la re-colonisation de ces matériaux par les tissus. D'ailleurs en réalité, le premier évènement à se produire lors de la mise en place d'une prothèse dans le corps humain est l'adsorption de protéines de la matrice extra-cellulaire, elle-même influencée par les propriétés de surface du matériau [62,63]. Ensuite, ces protéines influenceront à leur tour l'adhésion et l'étalement cellulaire [29,46]. Ces protéines de la matrice extra-cellulaire pourraient être représentées par le collagène bien-sûr, mais également la fibronectine, la vitronectine, ou encore des protéines plus spécifiques des cellules endothéliales, notamment la laminine 5.

D'autre part, animés par la volonté d'accéder à ces résultats de façon constante, nous aimerions pouvoir redéfinir les conditions expérimentales par un cahier des charges parfaitement déterminé. Actuellement, les diverses variables n'étant jamais exhaustivement spécifiées – et peut-être d'ailleurs mal connues des auteurs – il n'est pas possible de tirer de conclusions satisfaisantes des expérimentations déjà réalisées. Nous espérons ainsi pouvoir conduire nos expériences futures de façon plus rigoureuse afin d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats. En effet, des adaptations commerciales plus étendues de ces techniques de fonctionnalisation de surface seront plus courantes lorsque les stratégies développées démontreront un caractère d'uniformité, de reproductibilité, de rapidité, de coût raisonnable et d'existence de procédés de contrôle.

3. MATÉRIELS

3.1. LE POLYÉTHYLÈNE TÉRÉPHTALATE

Le polyéthylène téréphthalate est un matériau qui existe sous différentes formes, les deux plus répandues étant la forme fibrillaire tissée ou tricotée (Figure 12) et la forme de film plastifié (Figure 13). Dans ce dernier cas, l'exemple le plus connu est celui des bouteilles plastifiées des eaux minérales.

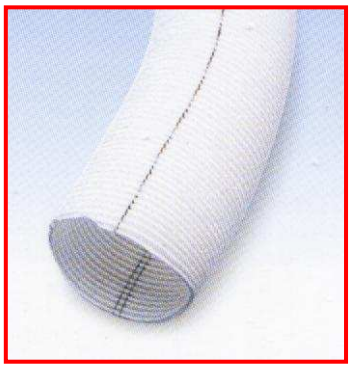


Figure 12 : PET sous forme tricotée (prothèse vasculaire Dacron®)

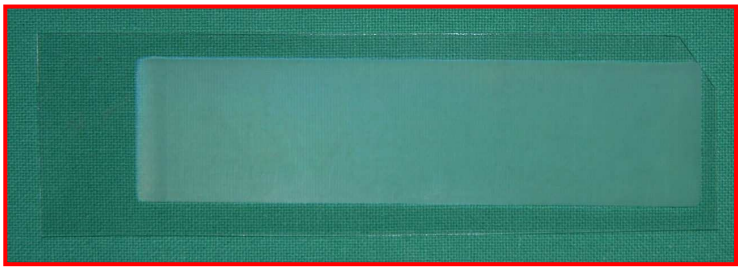


Figure 13 : PET sous forme plastifiée, après irradiation LASER

Le but ultime de notre étude est de pouvoir irradier le PET sous sa forme tissée. Toutefois dans ce travail préliminaire, consistant à déterminer le LASER le plus apte à fonctionnaliser la surface du matériau, nous nous sommes arrêtés à la forme plastifiée afin de faciliter l'ensemble des expérimentations.

De ce fait, avant de choisir le LASER le plus adapté, il fallait sélectionner une marque de PET sous forme plastifiée, capable de simuler au mieux le comportement du matériau originel. Nous avons donc décidé de tester trois marques différentes de films de PET, afin de définir si les résultats sont reproductibles entre les matériaux, ou s'il existe des variations plus ou moins sensibles pour chacun d'entre eux. En effet, chaque fournisseur peut posséder ses propres procédés de fabrication, faisant d'ailleurs souvent l'objet d'une marque déposée. De ce fait, les formules exactes des produits finis (et notamment leur pureté) ne sont jamais intégralement connues et peuvent ainsi influencer les résultats des expériences. En revanche, l'avantage de se procurer un PET de marque déposée est de pouvoir toujours s'approvisionner dans les mêmes conditions.

Les trois marques de PET retenues sont donc :

- Véralite®
- Melinex®
- Goodfellow

Le Véralite® est fourni par une entreprise de la banlieue lilloise, et présente une épaisseur de 750 µm. Sa composition exacte nous est totalement inconnue, le fabricant souhaitant conserver secret son procédé de fabrication.

Le Melinex® a été délivré par DuPont Teijin Films ™, entreprise qui fabrique également le Dacron®, PET sous forme fibrillaire. Le Melinex® est donc l'équivalent du Dacron®, mais délivré sous forme de film. D'une épaisseur de 250 µm, il est délivré avec une fiche technique. Le fabricant nous garanti sa très grande pureté.

Enfin le dernier, comme son nom l'indique, a été acheté chez Goodfellow, entreprise de revente de matériaux pour la recherche et l'industrie. Ce PET est également livré avec une fiche technique, dont l'analyse minutieuse permet de mettre en évidence des additions de matières ignifugeantes. Son épaisseur est également de 250 µm.

3.2. LES LASERS

Dans une source de lumière conventionnelle, la matière est excitée par l'intermédiaire d'un courant électrique, lequel permet aux atomes de passer d'un niveau fondamental à un niveau excité. Ces atomes reviennent à leur niveau fondamental spontanément, sans aucune incitation externe, en émettant un photon dont l'énergie correspond à la différence entre les deux niveaux en question. Les photons sont essentiellement indépendants et chaque photon émis n'a aucun lien particulier de phase avec les autres photons.

Mais si nous considérons un ensemble d'atomes occupant un état excité, chacun d'entre eux peut alors émettre un photon de deux manières :

- Par émission spontanée (cf. ci-dessus)
- Par émission stimulée, caractérisée par une émission déclenchée par la présence d'un photon de même fréquence que le photon pouvant être émis.

Une caractéristique remarquable de ce dernier processus est que le rayonnement émis est en phase avec le rayonnement stimulateur, dans le même état de polarisation, et qu'il se propage dans la même direction. L'intensité lumineuse s'en trouve ainsi renforcée. C'est le principe fondamental de la plupart des LASERS, ce qui permet d'en comprendre facilement l'abréviation :

LASER = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

Un LASER est traditionnellement constitué de deux éléments : un milieu amplificateur et un résonateur optique. Le milieu amplificateur va amplifier une longueur d'onde déterminée ; il peut être de différentes natures : liquide, solide ou gazeux - parfois milieu plasma. Le résonateur optique est composé d'un ensemble de miroirs, formant une cavité résonnante correspondant à la longueur d'onde déterminée par le milieu amplificateur. Ceci permet de créer une densité de photons très élevée qui permet à l'émission stimulée d'être beaucoup plus importante que l'émission spontanée. Le milieu ne devient amplificateur que lorsque l'on y crée une inversion de population par apport d'énergie extérieure. Cette énergie nécessaire à l'amplification peut être apportée par différentes méthodes :

- décharge électrique (LASERS à gaz)
- flash lumineux très intense (LASERS à solide)
- réaction chimique (LASERS chimiques).
- courant électrique (LASERS à semi-conducteurs)
- autre LASER (LASER solide, liquide ou gaz)

Il existe de nombreux LASERS sur le marché, différenciés entre eux essentiellement par leur nature, leur puissance, leur fréquence, leur mode d'irradiation (continu ou pulsé) et la longueur d'onde de leur rayonnement. Le tableau suivant décrit, de façon non exhaustive, quelques types de LASERS disponibles sur le marché (Tableau 4).

Matériau actif	Milieu actif	Longueur d'onde (µm)	Techno-logie	Energie	Durée des impulsions	Cadence
CO_2	Gaz carbonique + hélium + azote	10,6	Scellé	1 à 100 W	- Continu - Pulsé	Quelques centaines d'Hz (pulsé)
			Flux transverse	1500 W à 45.000 W		
			Flux axial	Jusqu'à 18.000 W	Continu Pulsé Superpulsé	Quelques milliers d'Hz (pulsé)
Nd-YAG	Cristal de grenat d'yttrium et d'aluminium dopé au néodyme	1,064 0,532 0,266 …	Barreau cylindrique	Jusqu'à 4.000 W	Continu	-
			Barreau cylindrique	150 J	0,5 à 20 ms	1 à 1000 Hz
Diodes	Semi-conducteur	… 0,80 à 0,98 …	Solide	Jusqu'à 4000 W	- Continu - Pulsé	-
Excimères	Mélange de plusieurs gaz : - Halogène - Argon, xénon, krypton, hélium, néon	0,157 0,193 0,248 0,308 0,351 …	Flux transverse	100 nJ à 1 J	10 à 30 ns	1 à 500 Hz

Tableau 4 : Exemples de LASERS disponibles sur le marché

3.2.1. LES LASERS EXCIMÈRES

Les LASERS excimères sont des LASERS à gaz, pulsés, émettant généralement un rayonnement ultra-violet. Leur nom français provient de l'anglais « excimer LASER », contraction des mots « excited » et « dimer ». Le terme excimère désigne ainsi une molécule constituée de deux atomes électroniquement excités (combinaisons diatomiques entre un atome de gaz rare et un atome de gaz halogène) afin de permettre la réaction chimique. Ces molécules, liant un atome de gaz halogène et un atome de gaz rare, n'existent évidemment pas à l'état naturel. On a donc recours à une décharge électrique très puissante pour réaliser cette réaction qui permet de parvenir à l'état excité à l'origine du rayonnement. Cette décharge haute tension nécessite une densité de puissance très élevée qui ne peut être maintenue que durant quelques dizaines de nanosecondes et, par conséquent, le LASER résultant est pulsé. Ces LASERS délivrent, en général, un faisceau de section rectangulaire présentant une répartition d'énergie quasi uniforme. Ce faisceau est généralement remis en forme par passage au travers d'un masque.

Comme le montre le Tableau 4, cinq longueurs d'onde sont plus fréquemment disponibles pour les LASERS excimères, en fonction du gaz rare utilisé. Dans cette étude, qui vise à terme à pouvoir industrialiser le processus, nous nous sommes concentrés sur les deux LASERS excimères les plus couramment accessibles, à savoir les longueurs d'onde de 193 nm (ArF) et 248 nm (KrF) (Figures 14 et 15). Par exemple, le LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde se base sur la modification de la structure électronique de deux atomes, le krypton et le fluor, pour former un dimère instable qui se dissociera en émettant un photon par le biais d'un électron. C'est donc un processus atomique d'émission cohérente de photons. Cette source LASER émet un rayonnement ultraviolet mono-chromatique et pulsé (durée : 40 ns), de très grande puissance instantanée (20 MW).

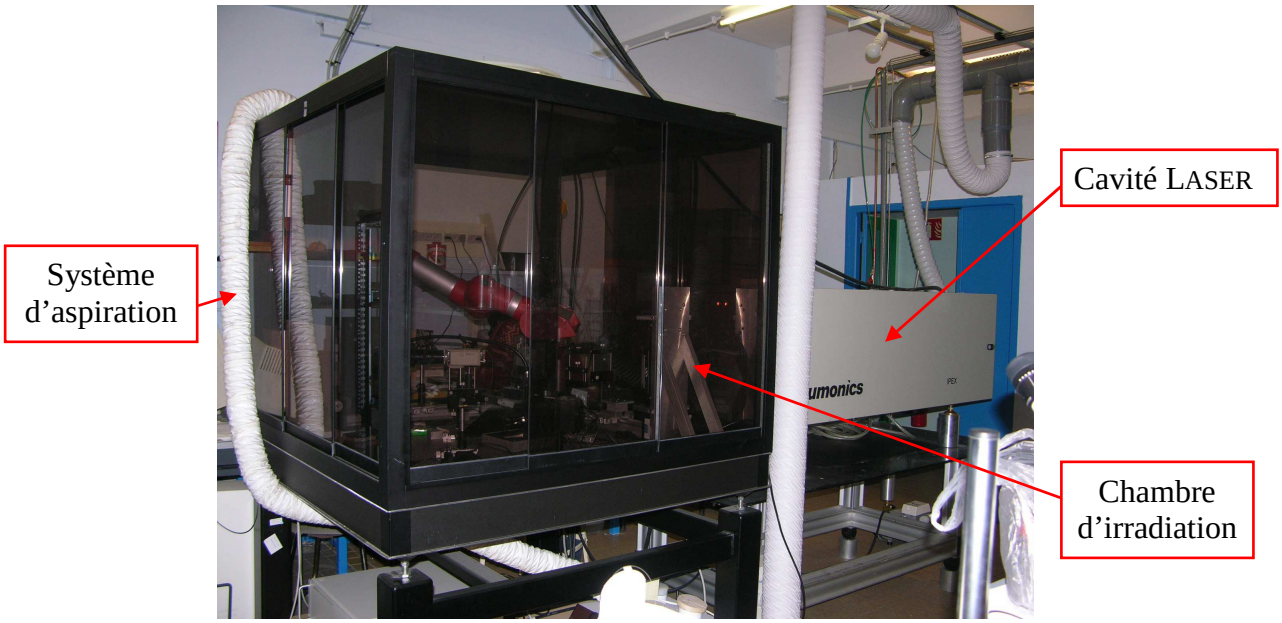


Figure 14 : Exemple de LASER excimère utilisé dans cette étude

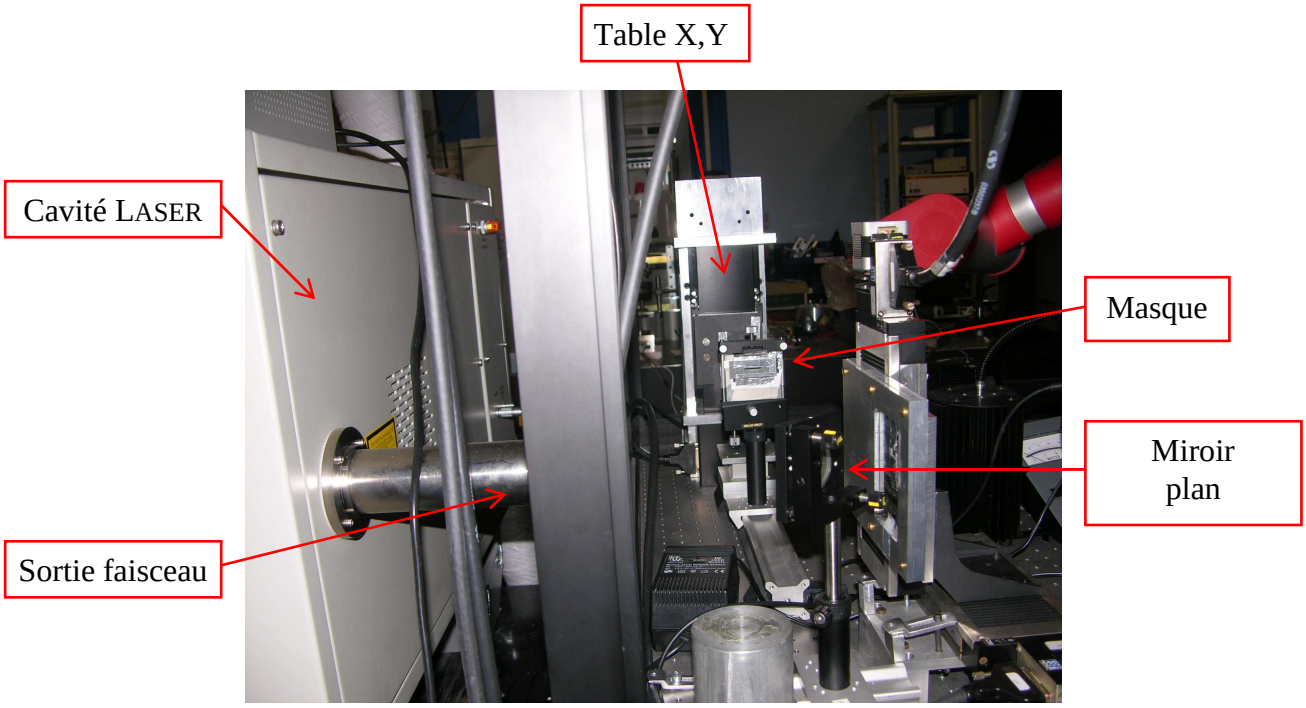


Figure 15 : Vue en détail de la chambre d'irradiation

3.2.1.1. Etude théorique de fonctionnement du LASER KrF (248nm)

Nous allons étudier dans ce paragraphe la théorie de fonctionnement du LASER excimère KrF à 248 nm de longueur d'onde. Bien entendu, cette théorie reste la même dans le cas du LASER excimère ArF à 193 nm de longueur d'onde. Pour ce dernier, seul le gaz rare change, puisque l'argon (Ar) remplace le krypton (Kr). En référence à son mode de fonctionnement, le LASER excimère est appelé « LASER à quatre niveaux » (Figure 16).

Dans la cavité du LASER se trouvent deux atomes à l'état gazeux, le fluor F et le krypton Kr, sous une pression de 10^{-2} Torr. Sous l'action d'une différence de potentiel de 20 à 27 kV générée par deux électrodes, positive et négative, le krypton s'ionise :

$$Kr \rightarrow Kr^{+} + 1e^{-}$$

Le krypton ionisé et le fluor s'associent alors pour former le dimère excité $[Kr^{+}\ F]$ qui occupe un niveau métastable : la place libre sur la couche superficielle du krypton est occupée par le fluor. Cependant, la dissociation initiale du krypton laisse dans le mélange gazeux une abondance d'électrons libres. Ceux-ci peuvent interagir avec le dimère excité pour former du [Kr F]. Cette réaction s'accompagne de l'émission d'un photon UV de 5 eV :

$$[Kr^{+}\ F] + 1e- \rightarrow [Kr\ F] + 5\ eV$$

Bien vite le niveau [Kr F], quasiment vide car de durée de vie très courte, se transforme en Kr + F et il s'établit alors un retour à l'état initial :

$$[Kr\ F] \rightarrow Kr + F$$

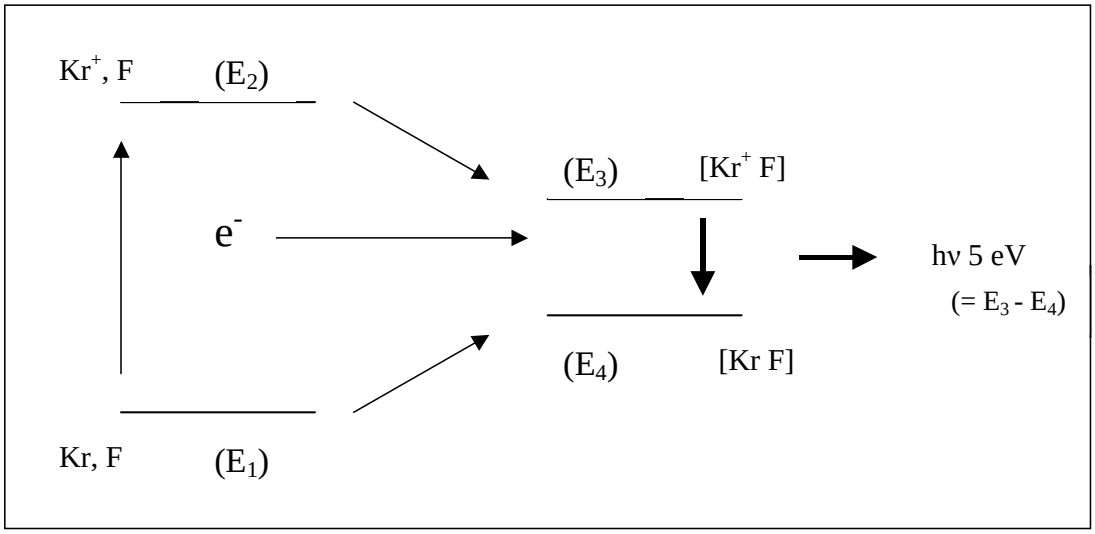


Figure 16 : Mode de fonctionnement du LASER excimère 248 nm

A la sortie du LASER utilisé dans nos études, le faisceau a une dimension de 15 x 25 mm et est homogène sur environ 80% de cette surface. A son rendement maximum, le faisceau possède une énergie de 0,6 J sur l'ensemble du spot, ce qui équivaut donc à 0,16 J/cm^2. En exprimant cette valeur en nombre de photons de 5 eV par centimètre carré, cela donne :

$$\frac{\left(\frac{0.16}{1.6\times10^{-19}}\right)}{5} = 2\times10^{17} \text{ photons de 5 eV/cm}^2$$

Ce nombre est considérable et montre bien l'intérêt d'utiliser un LASER excimère UV pulsé. L'émission des photons se fait pendant 25 nanosecondes. Le LASER utilisé peut travailler à des fréquences allant de 1 à 100 Hz.

Pour faire varier l'énergie sur la cible, deux moyens sont à notre disposition : faire varier la tension d'alimentation du LASER de 20 à 27 kV et/ou utiliser une lentille réductrice pour focaliser le faisceau, la distance lentille-échantillon déterminant la variation d'énergie. Il est à noter que la première solution ne modifie pas la taille du faisceau, à l'inverse de la seconde. Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour la variation de la tension d'alimentation du LASER (première solution).

Dans la première partie de notre étude (choix du PET, § 5.1), les expérimentations ont été réalisées au Laboratoire de Physique de l'Etat Solide (LPES, Mons, Belgique). L'appareil utilisé était un LASER Lambda Physik (Lasertechnik, Göttingen, Allemagne), série Compex 205, fonctionnant à une longueur d'onde de 248 nm grâce à un mélange de gaz Fluor-Krypton (KrF).

Pour la seconde partie de l'étude (choix du LASER, § 5.2), et suite à la fermeture du premier laboratoire, nous avons poursuivi nos expérimentations au Centre d'Etudes et de Recherches LASERS et Applications (CERLA, Villeneuve d'Ascq, France). Les appareils utilisés étaient un LASER excimère de la marque GSI Lumonics ipex-848 fonctionnant à une longueur d'onde de 248 nm (n° série : E040101) et un LASER excimère de la marque Lambda Physics fonctionnant à une longueur d'onde de 193 nm.

3.2.2. LES LASERS YAG

Contrairement aux LASERS excimères qui utilisent des gaz, les LASERS solides utilisent, comme leur nom l'indique, des milieux solides comme milieu d'émission des photons tels que des cristaux ou des verres. Le cristal ou le verre n'est que la matrice et doit être dopé par un ion qui est le milieu amplificateur LASER. Le premier LASER est le LASER à rubis dont l'émission provient de l'ion Cr^{4+}. D'autres ions sont très utilisés (la plupart des terres rares : Néodyme, Ytterbium, Praséodyme, Erbium, Thulium ..., ou encore le titane et le chrome, entre autres).

Le choix entre le verre ou le cristal en tant que matrice se fait sur l'utilisation attendue du LASER :

- Le verre est utilisé pour des LASERS nécessitant de fortes puissances, mais des fréquences faibles. Cependant, le problème posé par le verre est sa faible conductivité thermique, rendant ainsi difficile le refroidissement du LASER lorsqu'il tourne à plein régime.
- Le cristal est choisi lorsque des fréquences élevées sont nécessaires (supérieures à 1 coup par seconde, soit 1 Hz). Dans ce cas, un dégagement important de chaleur doit être opéré en dehors du LASER, mais la conductivité thermique du cristal étant supérieure à celle du verre, le refroidissement se fait dans de bonnes conditions. L'exemple le plus connu de cristal est le grenat d'aluminium et d'yttrium, YAG en abrégé (de l'anglais *Yttrium Aluminium Garnet*).

Le milieu amplificateur peut être un barreau dans le cas d'un LASER Nd-YAG (donc dopé au Néodyme et utilisant comme matrice du YAG, mais il peut aussi se présenter sous la forme d'une fibre dans le cas des LASERS à fibre (donc dopé à l'Ytterbium et utilisant une matrice en silice).

La longueur d'onde d'émission du LASER dépend essentiellement de l'ion dopant, mais la matrice influe aussi. Ainsi, le verre dopé au néodyme n'émet pas à la même longueur d'onde (1053 nm) que le YAG dopé au néodyme (1064 nm). Ils fonctionnent en continu ou de manière impulsionnelle (impulsions de quelques microsecondes à quelques picosecondes). Ils sont capables d'émettre aussi bien dans le visible, le proche infrarouge ou l'ultraviolet.

Tout comme le LASER excimère, le LASER YAG est un LASER à quatre niveaux (Figure 17). Un apport d'énergie extérieur par un système de pompage optique a pour effet de porter les atomes (ou ions) de leur état fondamental *f* à un niveau excité *e*. Un transfert d'énergie par vibrations au réseau cristallin les amène alors rapidement au niveau *b*, niveau supérieur de la transition LASER, où ils peuvent s'accumuler : c'est la relaxation. Le système est « piégé » dans ce niveau en raison de l'existence d'une relaxation lente du niveau *b* vers le niveau *a*, c'est la transition LASER. Enfin le niveau *a*, lui, se vide rapidement vers le niveau fondamental, par relaxation également, permettant le renouvellement continuel du cycle.

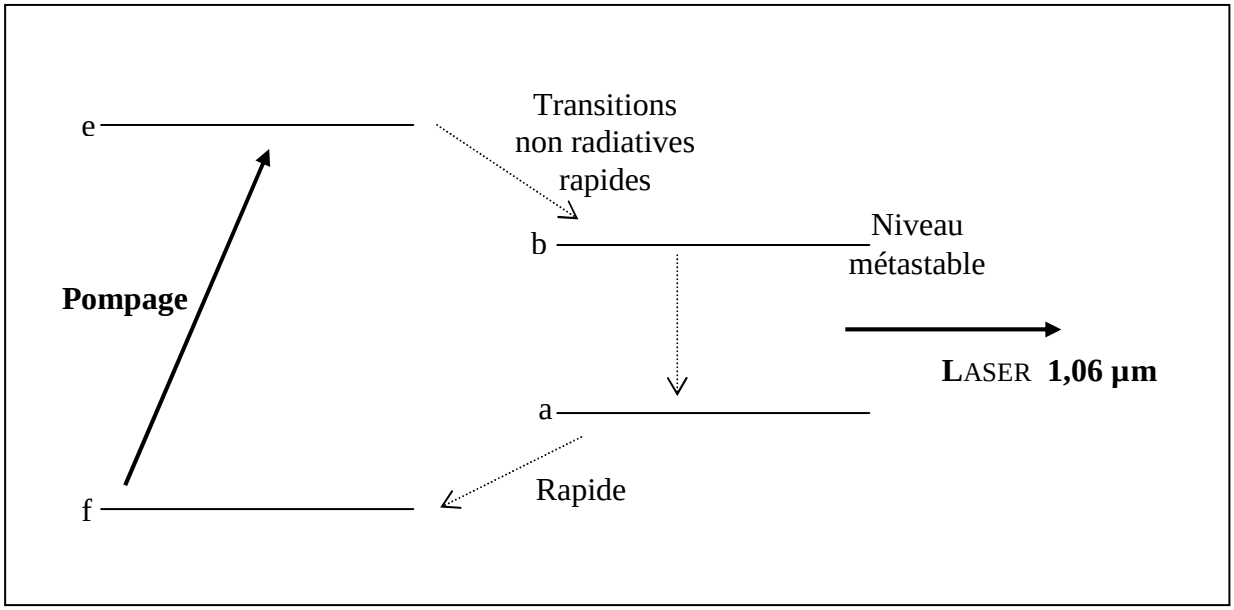


Figure 17 : Mode de fonctionnement du LASER YAG 1064 nm

3.2.2.1. Les LASERS YAG continus

Plusieurs technologies de LASER YAG existent privilégiant la qualité ou la puissance maximale du faisceau pouvant être extraite de la cavité. Les LASERS YAG présentent l'avantage, par rapport aux LASERS CO_2, de pouvoir utiliser des fibres optiques pour le transport du faisceau. Le cristal de grenat d'yttrium et d'aluminium ($Y_3Al_5O_{12}$) contient en faible quantité du néodyme, qui est l'atome actif. Le milieu actif est excité par une ou deux lampes flash émettant en "continu", positionnées autour du cristal ; l'ensemble constitue la chambre de pompage. Il est possible d'assembler plusieurs chambres de pompage et ainsi de réaliser des LASERS d'une puissance totale maximum de 3000 W. L'amplification du faisceau d'énergie s'effectue par allers et retours successifs dans le milieu amplificateur constitué d'un résonateur simple, ou d'un résonateur simple et d'une chambre de pompage montée en amplificateur. Le faisceau émis est guidé vers le poste de travail par des miroirs ou par une fibre optique. L'émission du néodyme a lieu dans le proche infra rouge à 1,06 µm.

3.2.2.2. Les LASERS YAG pulsés

Le résonateur et les chambres de pompage sont de conception similaire à celles des LASERS YAG continus. L'excitation s'effectue de manière différente. Les lampes flash sont alimentées à des fréquences et des durées d'impulsion variables, parfaitement définies et reproductibles dans le temps. A chaque impulsion électrique correspond l'émission d'une impulsion LASER. Un pilotage de l'excitation des lampes flash permet de contrôler le profil temporel de l'énergie émise par l'impulsion LASER. Un module de pompage permet la production d'une énergie LASER de l'ordre de 50 J pour une puissance moyenne de 500 W.

Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé un LASER YAG pulsé dit « Q-switched » grâce à des cellules de Pockels et émettant à une longueur d'onde de 1064 nm (Figure 18). Il s'agit d'un LASER YAG ND 6000 Continuum. Un système de cristaux non linéaires permet de doubler ou de quadrupler la fréquence, permettant d'atteindre les longueurs d'onde de 532nm et 266 nm.

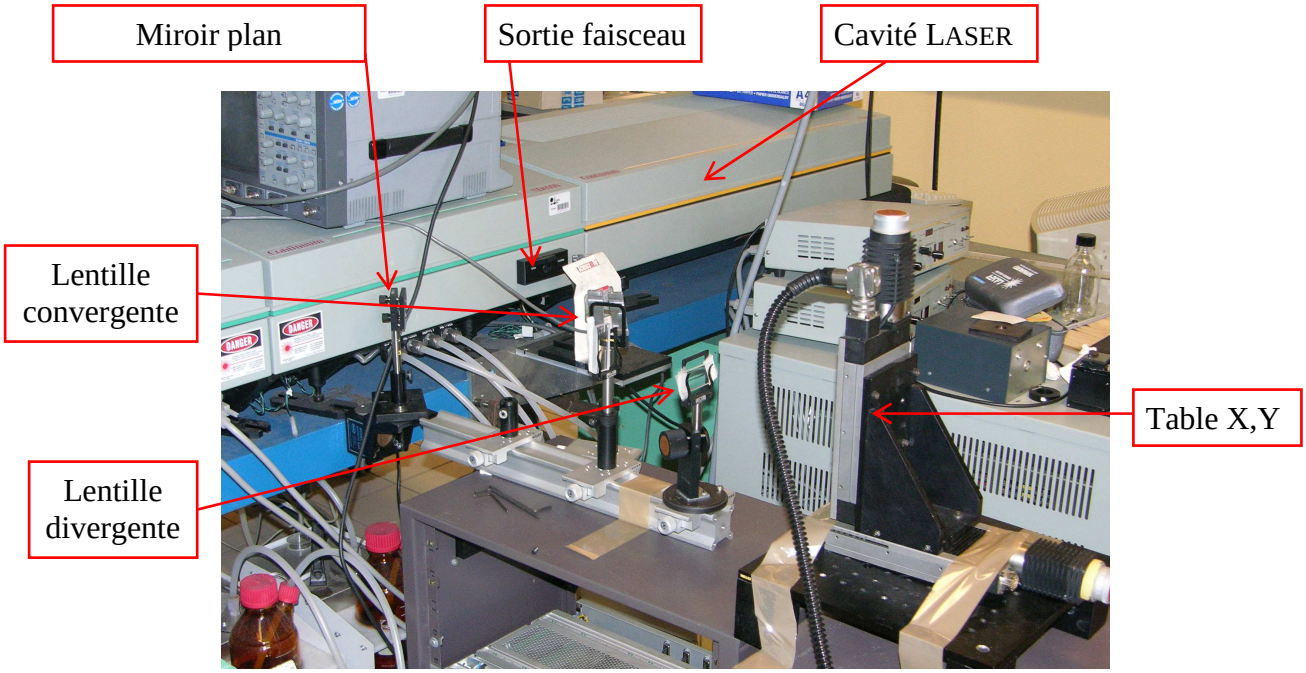


Figure 18 : Exemple de LASER YAG utilisé dans cette étude

3.2.3. INTERACTION LASER - MATIÈRE

Un photon du rayonnement est absorbé par un électron de valence du matériau, celui-ci passe alors de la bande de valence vers la bande de conduction, et il y a création d'une paire électron-trou : la liaison est donc momentanément cassée. Avant qu'il ne puisse y avoir recombinaison de l'électron et du trou, ceux-ci interagissent avec le réseau et cèdent une partie de leur énergie sous forme de vibrations atomiques : il y a création de phonons. Les phonons se propagent et vont distribuer leur énergie cinétique pendant environ 10^{-12} seconde. Après recombinaison, qui a lieu au bout de 10^{-9} seconde environ, le réseau se retrouve dans un nouvel état d'équilibre thermodynamique, possédant une température légèrement supérieure à la température avant irradiation. En revanche, lorsqu'il se produit un couplage entre un photon et un électron déjà excité et qui n'a pas eu le temps de se recombiner, ce dernier va absorber l'intégralité de l'énergie du photon. Il sera alors expulsé dans le vide et il se produira ainsi une ablation ''froide''. Etant donné l'ordre de grandeur de l'énergie des photons émis par un LASER travaillant dans le visible ou l'ultraviolet (de l'ordre de l'électron-volt), seuls les électrons libres et les électrons faiblement liés (c'est à dire les électrons de valence) peuvent absorber cette énergie par couplage électron - photon.

L'intérêt du LASER réside dans le fait de sa grande densité d'énergie. En effet, si plusieurs électrons de valence appartenant à des liaisons voisines, c'est à dire proches de quelques distances inter-atomiques, se trouvent simultanément excités (en fait dans le temps de recombinaison de 10^{-9} seconde), il peut se produire l'éjection d'un groupe d'atomes de la surface : c'est l'ablation. Cependant si ce n'est pas le cas, l'électron et le trou se recombinent, permettant à l'électron de retourner dans son état de valence : la surface est excitée, devient sensible à l'environnement, mais il n'y a pas d'ablation de la surface du matériau. C'est donc la densité de liaisons instables par unité de volume et par unité de temps qui va générer la perte de matière.

En résumé, pour qu'il y ait ablation, il faut que :

- ☑ L'énergie des électrons incidents soit supérieure à la largeur de la bande interdite de la liaison.
- ☑ Le faisceau soit focalisé dans l'espace pour permettre la rupture de liaisons voisines.
- ☑ L'émission de photons soit concentrée dans le temps pour permettre à des liaisons de se rompre simultanément (ou tout au moins dans un temps inférieur au temps de recombinaison).

4. MÉTHODES

4.1. EXPÉRIMENTATIONS SUR LE PET

4.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de PET étaient découpés de manière rectangulaire et mesuraient 2,5 cm de largeur sur 8 cm de longueur. Chaque échantillon a été nettoyé durant 15 minutes dans un bain d'éthanol aux ultrasons, puis laissé séché à l'air libre.

Un masque était alors découpé dans de l'aluminium, servant à centrer le faisceau irradiant sur le matériau. Ses mesures étaient de 2,1 cm de largeur et 2 mm de hauteur. Son premier intérêt est d'éliminer les parties les plus externes du faisceau, lesquelles sont les moins homogènes, et de ne conserver que la partie la plus énergétique du faisceau. Seule la partie la plus centrale de ce dernier atteint donc la surface, permettant d'en réduire les irrégularités. En effet, le profil de sortie d'un coup de LASER sur une surface quelconque n'est pas homogène sur toute sa largeur, mais présente une intensité d'énergie plus importante au centre et plus faible sur les côtés. En fait, la distribution d'énergie ressemble à une courbe d'allure gaussienne (Figure 19).

Le deuxième intérêt du masque est de nous permettre d'assurer que la dimension du faisceau qui atteindra l'échantillon de PET sera toujours la même. Le réglage de la vitesse de balayage sera donc toujours identique (fixée à 2mm/seconde), permettant la reproductibilité des expérimentations entre les différents LASERS.

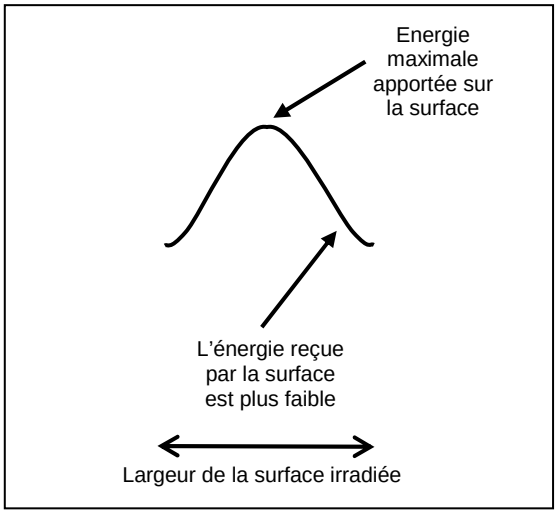


Figure 19 : Profil d'énergie typique du faisceau LASER

Les échantillons de PET sont fixés à l'aide d'aimants sur une table capable de se déplacer suivant deux directions (table X, Y) (Figures 20 et 21). La vitesse de déplacement est déterminée par l'opérateur, et permet de produire une irradiation en mode balayage, par

opposition au mode statique. Cette option a été choisie car elle permet d'une part d'irradier des surfaces plus importantes, et d'autre part de produire un résultat plus homogène.

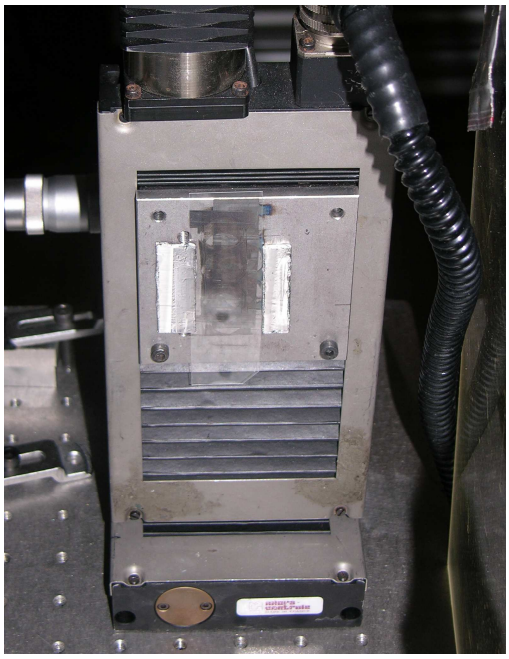


Figure 20 : Echantillon de PET avant irradiation

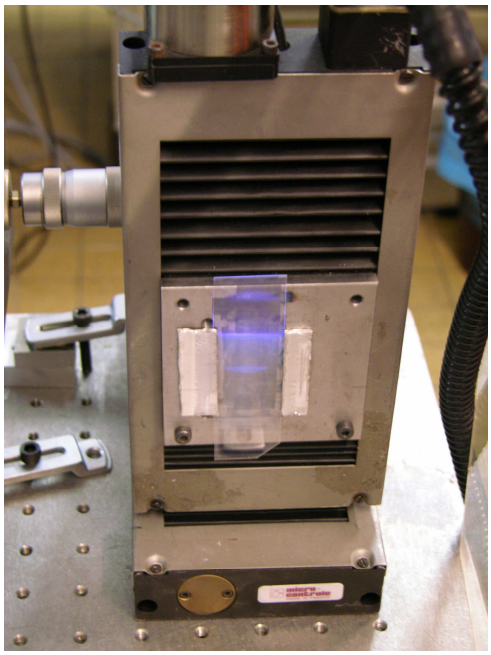


Figure 21 : Echantillon de PET pendant irradiation

Nous avons décidé de réaliser les irradiations à la fois au-dessus et au-dessous du seuil d'ablation (*cf.* paragraphe suivant). Le polymère irradié peut soit se décomposer directement (ablation photochimique), ou subir un procédé de relaxation non radiative qui chauffe le polymère jusqu'à atteindre une température pyrogène (ablation photothermique) en convertissant l'énergie électronique en énergie thermique. Concernant les phénomènes d'ablation engendrés par les LASERS UV, le mécanisme dominant la décomposition du polymère reste controversé à cause de la difficulté à mesurer les variations de température, et donc à déterminer précisément le mécanisme mis en jeu durant des périodes aussi courtes que les nanosecondes ou même picosecondes [56]. Durant le phénomène d'ablation, de petits segments volatiles de haute densité, des molécules et des ions, sont produits dans un espace et un temps très limités. Ainsi une très forte pression est produite à la surface du PET, se rapprochant d'un effet « explosif ». D'ailleurs durant le traitement LASER, réalisé au dessus du seuil d'ablation, un bruit de claquement net pouvait être entendu, accompagné parfois d'un léger dégagement de fumée.

4.1.2. Choix de l'énergie d'irradiation

La littérature rapporte de manière unanime un seuil d'ablation du PET situé entre 20 et 50 mJ/cm² lors d'une irradiation au moyen de LASERS ultraviolets. La valeur exacte de ce seuil d'ablation varie d'ailleurs de quelques millijoules en fonction de la longueur d'onde du LASER ; en effet, le coefficient d'absorption du PET est logiquement modifié en fonction de la longueur d'onde du rayonnement reçu.

Nous avons donc décidé de réaliser les expérimentations en nous situant entre 12 mJ/cm² pour la valeur la plus basse (LASER excimère 248 nm) et 1000 mJ/cm² pour la valeur la plus haute (LASER YAG 1064 et 532 nm), et ceci en faisant varier l'énergie par paliers, adaptés en fonction de la valeur d'énergie minimale et maximale pouvant être fournie par chaque LASER.

4.1.3. Calcul de l'intensité de l'énergie d'irradiation

Le faisceau sort de la cavité du LASER et se dirige dans la chambre d'irradiation. Il passe alors successivement dans différents dispositifs afin d'être modelé : la totalité pour le LASER YAG (Figure 18) ; le premier et le dernier pour le LASER excimère (Figure 15) :

- ✓ Un miroir plan, dont le simple but est de rediriger le faisceau vers la table X,Y.
- ✓ Une lentille cylindrique, convergente, qui sert à focaliser le faisceau.
- ✓ Une lentille cylindrique, divergente, qui sert à modeler le faisceau.
- ✓ Un masque, qui sert à éliminer les parties les plus externes du faisceau, et à garantir une reproductibilité de la taille du faisceau.

Nous avons dû ajouter les lentilles convergente et divergente au LASER YAG en raison de la taille inappropriée du faisceau en sortie de la cavité LASER. Ces lentilles ont été choisies pour leur absence de modifications sur la nature du faisceau.

Afin de rendre plus facilement compréhensibles les explications sur le calcul de l'intensité de l'énergie d'irradiation, nous allons prendre pour exemple le LASER excimère 248 nm. Cette démonstration reste valable avec les autres types de LASERS.

Un premier tir LASER est effectué sur un papier thermique afin de visualiser et de mesurer l'impact du faisceau sur la surface. Lors de l'irradiation, le papier thermique subit une élévation de température entraînant un changement de couleur à l'endroit de l'impact du rayonnement. Cette opération est à réaliser à chaque session, car le LASER peut se dérégler

d'une séance à l'autre. Le jour de notre opération, l'impact affiché sur le papier thermique a été mesuré à 0,42 cm² (Longueur:L x largeur:l) = (2,1 x 0,2 cm).

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la différence de potentiel générée par les deux électrodes peut varier de 20 à 27 kV, faisant ainsi varier l'intensité du faisceau LASER. Cependant, les valeurs les plus faibles sont à éviter car à ce niveau, le faisceau est plus instable. Ceci réduit un peu les possibilités d'atteindre les valeurs d'irradiation très faible de l'ordre de quelques mJ/cm².

La vitesse (v) de translation de la table motrice est fixée à 2 mm/s, ce qui permet d'irradier un échantillon en 35 secondes environ. La fréquence f du LASER est fixée à 10 Hz. Le nombre de coups N reçus par la surface est donc égal à :

$$N = (f.l) / v$$
$$N = (10x2) / 2$$
$$N = 10$$

Le fait de déterminer ainsi un nombre de dix coups pour chaque unité de surface permettra ici encore de diminuer les risques d'inhomogénéité d'irradiation. En effet, lorsque chaque unité de surface ne reçoit qu'un seul coup, des disparités peuvent se produire dans l'irradiation. Cette affirmation s'explique par le fait que chaque coup envoyé a une intensité d'énergie légèrement différente de ses voisins, en raison de la stabilité imparfaite dénotée dans la cavité du LASER. En revanche, sur une moyenne de 10 coups, les disparités sont fortement diminuées.

La dernière étape consiste alors à calculer, pour chaque énergie d'irradiation reçue par le PET (en mJ/cm²), la puissance P qui doit être établie à la sortie de la lentille (c'est à dire en sortie du miroir plan pour les LASERS excimères ; en sortie de lentille divergente pour les LASERS YAG). Soient P la puissance mesurée en sortie de lentille (en Watts), L la longueur du faisceau (2,1cm), l sa largeur (0,2cm), S sa surface, Ei l'énergie par impulsion et Ed l'énergie déposée sur l'échantillon (en mJ/cm²). Le calcul est alors simple. Illustrons le avec une irradiation souhaitée à 120 mJ/cm² (Ed = 0,12 J/cm²) :

Sachant que :	$P = f.Ei$ (1) et $Ed = (Ei/S) . N$ (2)
Alors :	$Ed = (Ei/L.l) . (f.l/v)$
Donc :	$Ed = (Ei.f) / (L.v)$
D'où :	$Ei = (Ed.L.v) / f$ (3)
Avec (1) et (3) on obtient :	$P = Ed.L.v$
	P = 0,12 x 2,1 x 0,2 = 0,0504 W

Il suffit alors d'obtenir une puissance en sortie de lentille de 50,4 mW. Pour cela, nous faisons varier la tension d'alimentation du LASER entre 20 et 27 kV de manière à obtenir la quantité d'énergie souhaitée. Un mesureur de puissance (*Powermeter* en anglais) placé en sortie de lentille permet d'objectiver ce résultat. Le réglage est jugé satisfaisant lorsque l'écart-type moyen obtenu pour dix mesures est de plus ou moins 10 mW, les précisions du LASER et de l'appareil de mesure utilisés ne nous permettant pas de descendre en dessous. Ceci nous donne donc une incertitude *i* de :

$$i = P / f.\ S$$
$$i = 10 / 4{,}2 = 2{,}4 \text{ mJ/cm}^2$$

Pour chaque niveau d'irradiation donné, l'incertitude s'établit donc à plus ou moins 2,4 mJ/cm² par rapport au niveau d'énergie souhaité. Le Tableau 5 résume les différents paramètres utilisés dans cette étude.

LASER	Excimère 248 nm	Excimère 193 nm	YAG 266 nm	YAG 532 nm	YAG 1064 nm
Marque	GSI Lumonics ipex-848	Lambda Physics	YAG ND 6000 Continuum	YAG ND 6000 Continuum	YAG ND 6000 Continuum
Tension	22 à 27 kV	22 à 27 kV	22 à 27 kV	22 à 27 kV	22 à 27 kV
Energie d'irradiation	**12 à 210 mJ/cm²**	**20 à 500 mJ/cm²**	**20 à 270 mJ/cm²**	**30 à 1000 mJ/cm²**	**150 à 1000 mJ/cm²**
Incertitude	± 2,4 mJ/cm²	± 2,4 mJ/cm²	± 2,4 mJ/cm²	± 2,4 mJ/cm²	± 2,4 mJ/cm²
Nombre de cps	10 coups	10 coups	10 coups	10 coups	10 coups
Fréquence	10 Hz	10 Hz	10 Hz	10 Hz	10 Hz
Atmosphère d'irradiation	Air	Air	Air	Air	Air
Mode d'irradiation	Balayage	Balayage	Balayage	Balayage	Balayage
Vitesse de balayage	2 mm/s	2 mm/s	2 mm/s	2 mm/s	2 mm/s

Tableau 5 : Paramètres utilisés pour l'irradiation du PET.
Le seul paramètre variable est l'intensité de l'énergie utilisée (en gras).

4.2. LE SPECTROMÈTRE

Le spectromètre utilisé dans notre étude permet de réaliser des mesures d'absorbance du matériau irradié ou vierge. Il s'agit d'un spectromètre Lambda 19 de Perkin Elmer. Le balayage en longueur d'onde a été effectué entre 300 et 3000 nm, par intervalles de 1 nm. L'analyse est donc effectuée dans le visible pour ses plus petites longueurs d'onde (environ 350 à 1000 nm), puis dans le proche infrarouge pour ses plus grandes valeurs (1000 à 3000 nm). Un premier passage est fait avec un "blanc" afin de tracer l'horizontale, puis les échantillons sont analysés les uns après les autres.

Les mesures de longueur d'onde données par le logiciel Lambda 19 sont donc exprimées en nanomètre pour les analyses effectuées ici. Sachant que la longueur d'onde (λ) est reliée au nombre d'onde (en cm^{-1}), on peut en déduire ce dernier grâce à la formule suivante :

$$\text{Nb ondes } (cm^{-1}) = 10.000 / \lambda\ (\mu m)$$

En résumé, la gamme des nombres d'ondes sur laquelle nous avons travaillé est comprise entre 33.333 cm^{-1} et 3.333 cm^{-1} pour le visible et le proche infrarouge respectivement.

4.3. CALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE (DSC)

La calorimétrie différentielle permet de détecter les effets thermiques (phénomènes endothermiques ou exothermiques) se produisant lors d'une transformation ou d'une évolution structurale. La mesure revient à déterminer la quantité H (variation d'enthalpie positive ou négative) mise en jeu lorsque le matériau est soumis à une variation de température parfaitement linéaire avec le temps.

Lors d'une analyse calorimétrique, le thermogramme enregistré correspond à la variation de dH/dT, c'est-à-dire à la variation de chaleur spécifique (C_p) avec la température. Le système est constitué de deux boucles de contrôle de chauffe. La boucle "intégrale" permet d'assurer une montée linéaire de la température de référence (T_r) et de l'échantillon (T_e) en fonction du temps. La boucle différentielle permet d'ajuster la puissance de chauffe de l'échantillon de telle sorte qu'à chaque instant, la température T_e soit égale à la température T_r en compensant les effets endothermiques et exothermiques mis en jeu lors des transitions de phases. La compensation de puissance calorifique dQ/dt est mesurée en fonction de la température T (Figure 22).

L'appareil utilisé est un microcalorimètre DSC-7 de Perkin Elmer. Le système est initialement étalonné en température et en puissance calorifique à l'aide d'échantillons

d'Indium de grande pureté. Les échantillons à analyser sont mis dans des capsules en aluminium puis dans le four. Une capsule en aluminium est utilisée comme référence, la différence de température entre les deux échantillons (PET et aluminium) étant enregistrée. Les mesures de DSC des échantillons de PET sont effectués à une vitesse de chauffe de 20°C/min sur la plage de température de 20 à 280°C.

La température de transition vitreuse (T_g) est enregistrée au point d'inflexion à l'endroit où la courbe marque un premier saut dans la puissance calorifique. Le taux de cristallinité (X_c) est estimé à partir de l'énergie correspondant à l'endotherme de fusion divisée par l'enthalpie de fusion d'un PET 100% cristallin (ΔH_f^0 = 120 J/g, paramètre donné par le fabricant DuPont Teijin Films ™). Le taux de cristallinité du Melinex® nous est donné par le fabricant comme situé dans une fourchette variant de 50 à 55 % lorsqu'il est calculé à partir de la densité du film terminé.

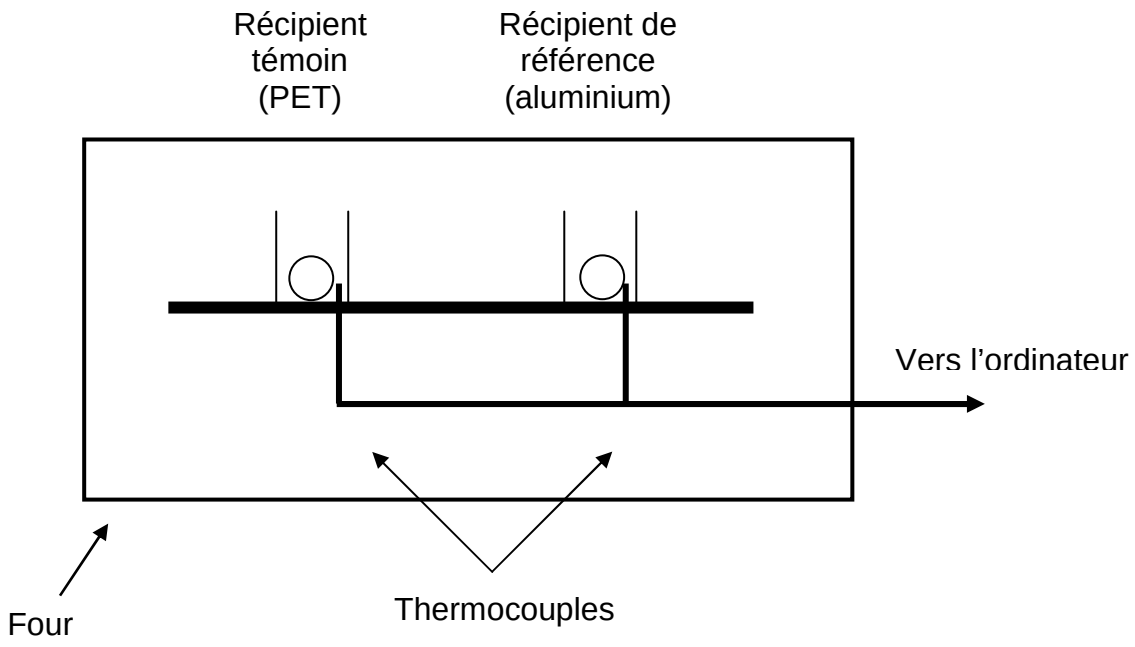


Figure 22 : Principe de fonctionnement de la DSC

4.4. MESURES DE RUGOSITÉ

4.4.1. Le profilomètre

Les mesures de rugosité ont été effectuées avec un profilomètre Taylor Hobson Précision de type FormTalysurf Intra avec un palpeur pointe diamant d'un rayon de 2 µm et une pression de palpeur de 0,8 mN (soit 8mg). La résolution du capteur est de 3,2 nm. L'enregistrement du profil a été effectué sur une distance de 5 mm linéaire avec une pré-

course de 0,3 mm et une vitesse de 1 mm/s. Pour obtenir les valeurs de Ra, le traitement des données a été effectué par le logiciel « *µltra* » spécialement conçu pour la Métrologie.

Dans ce système, les mesures sont donc faites électromécaniquement en déplaçant l'échantillon au dessous d'un stylet à pointe diamantée. Le stylet est relié à un cristal piézo-électrique qui convertit le déplacement vertical du stylet en un signal électrique. Celui-ci est ensuite digitalisé et gardé en mémoire. Une imprimante, reliée à l'appareil, permet de matérialiser sur support papier le profil de surface du matériau analysé.

4.4.2. Le microscope photonique

Le microscope photonique permet de réaliser une première observation des échantillons irradiés. L'appareil utilisé est un microscope métallurgique POLYVAR MET, relié à une caméra CCD qui permet de capturer les images sur l'écran d'un ordinateur adjacent. Ce microscope permet d'observer en lumière polarisée, dont l'intérêt s'explique par le fait que deux faces distinctes d'un échantillon peuvent réémettre la lumière à des polarisations différentes. Les filtres du microscope métallurgique peuvent alors éliminer l'une des polarisations pour mettre une des faces en évidence, permettant bien souvent d'obtenir à la fois un meilleur contraste et un relief augmenté des surfaces étudiées.

4.4.3. Le microscope électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage ne nous donne pas de mesures de rugosité à proprement parler. En revanche, il donne une bonne idée de la topographie et du relief de la surface après traitement LASER.

Dans cette étude, le MEB utilisé a été un microscope électronique à balayage avec canon à émission de champ (FEG), équipé d'une microanalyse EDS, de marque Hitachi S4700. Avant observation, les échantillons sont métallisés (chrome), puis l'analyse est réalisée sous vide, sous un voltage de 1,0 kV.

4.5. MESURES D'ÉNERGIE DE SURFACE

Des gouttes d'eau, sur une surface hydrophobe, peuvent présenter des angles de contacts très différents, car ces surfaces non mouillables ne sont presque jamais à cent pour cent hydrophobes. L'hydrophobie peut être définie comme une répulsion vis-à-vis de l'eau. Cette définition est limitée car un substrat hydrophobe interagit avec l'eau par le biais des forces de dispersion et il peut également contenir des groupements polaires susceptibles

d'attirer les molécules d'eau. Hoffman [64] précise d'ailleurs que les termes hydrophile et hydrophobe ne sont pas adaptés pour décrire le caractère d'un biomatériau dans un environnement biologique, et en particulier pour les interactions protéines/cellules à l'interface d'un biomatériau. Les notions de mouillabilité et d'absorption d'eau sont plus adaptées pour de telles interactions.

4.5.1. Mouillabilité, tension superficielle, énergie de surface

Afin de comprendre parfaitement les différents termes employés dans ce paragraphe, il n'est pas inutile de rappeler les principales définitions : mouillabilité, tension superficielle d'un liquide, énergie de surface d'un solide.

4.5.1.1. Mouillabilité

Elle représente l'aptitude qu'a un liquide à occuper la plus grande surface possible lorsqu'on le dispose sur une surface solide. La mouillabilité d'un corps par un liquide dépend de la tension superficielle de ce liquide et des forces de cohésion entre ce liquide et ce corps.

Pour un système liquide-solide donné, le mouillage dépend de la pression, de la température, de l'hygrométrie, ...

4.5.1.2. Énergie superficielle d'un liquide

Prenons l'exemple de l'eau. Une molécule d'eau au cœur du liquide est attirée par toutes ses voisines, elle ne subit donc globalement pas de force résultante : la résultante des forces est nulle. En revanche une molécule d'eau de la surface est attirée de tout côté sauf vers le haut, puisqu'elle n'a pas de voisine dans cette direction : la force résultante est donc vers le cœur du liquide (Figure 23). C'est la raison pour laquelle les molécules de surface se comportent comme celles d'une membrane confinant le liquide. Comme les molécules sont attirées vers le liquide, elles forment la plus petite surface pour un volume donné : la sphère. Pour définir l'intensité de ces forces de cohésion, nous parlons de tension superficielle.

La tension superficielle caractérise donc l'aptitude qu'a la surface d'un liquide à prendre la plus petite valeur possible dans un milieu donné. Elle caractérise également la cohésion d'un liquide puisqu'il faut vaincre les forces de cohésion interne de celui-ci pour accroître cette surface.

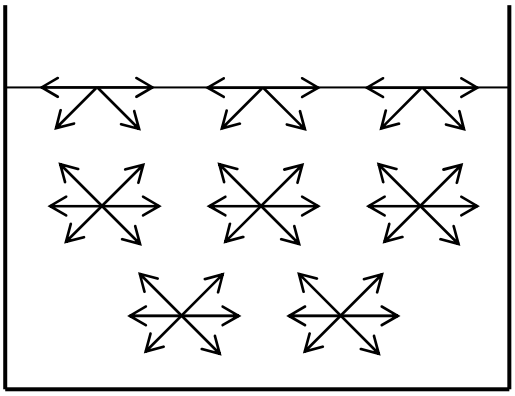


Figure 23 : Résultante des forces exercées sur une molécule d'eau au cœur ou en surface du liquide

4.5.1.3. Énergie de surface d'un solide

L'énergie de surface est une grandeur thermodynamique qui contribue à l'interprétation des phénomènes d'adsorption interfaciaux. Une méthode indirecte pour l'évaluer consiste à étudier les interactions échangées entre le solide et un liquide choisi. La méthode de mouillabilité par une phase liquide permet la détermination expérimentale des composantes superficielles des polymères, afin de prévoir leurs aptitudes à interagir avec d'autres matériaux via des liaisons non covalentes. Si une goutte de liquide est déposée sur la surface parfaitement lisse d'un solide, elle prend la forme d'une calotte sphérique. En effet, cette forme est celle qui donne à la goutte l'aire la plus faible pour un volume donné : augmenter la surface consisterait à fournir de l'énergie. Celle-ci est représentée par la tension de surface, caractéristique de chaque matériau et de chaque liquide (72 mN/m pour l'eau pure par exemple).

La forme de cette goutte, en particulier l'angle de raccordement du liquide sur le solide, est déterminée par les énergies superficielles et inter faciales des phases en présence. Le modèle de Young (Figure 24) illustre ces interactions.

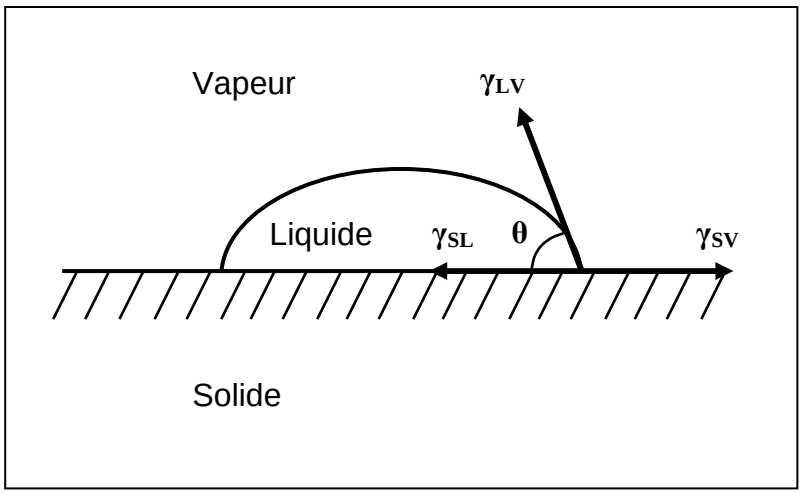


Figure 24 : Représentation schématique de la méthode de l'angle de goutte utilisée pour déterminer l'énergie de surface du matériau [65]

D'après ce modèle, le contact solide-liquide est donné par la relation :

$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta$ (mJ/m²) (1)

Avec : γ_{SV} = énergie libre de surface du solide en présence de vapeur liquide (mJ/m²)

γ_{SL} = énergie libre inter faciale solide-liquide (mJ/m²)

γ_{LV} = tension superficielle du liquide (N/m)

θ = angle de raccordement du liquide sur le solide

L'angle θ caractérise la mouillabilité vis-à-vis du support :
Si θ est élevé, le support est peu mouillant
Si θ est faible, le support est mouillant.

L'aptitude d'un liquide à mouiller un solide (angle θ petit) sera d'autant plus élevée que l'énergie libre de surface du solide γ_{SV} sera élevée. Les mesures des angles de contact θ d'une série de liquides polaires et apolaires dont les composantes polaires et dispersives sont connues vont nous permettre de déterminer les propriétés de surface des solides analysés. Si l'on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (faible énergie de surface) ou hydrophile (grande énergie de surface) de la surface. Si l'on utilise plusieurs liquides de références différentes, on peut accéder à l'énergie libre de la surface (γ_L), tout en discriminant les composantes polaires (γ_L^p) ou dispersives (γ_L^d) de cette énergie. Ces solvants doivent présenter des tensions superficielles assez différentes pour permettre d'accéder à une gamme assez large pour la résolution graphique. Le Tableau 6 présente les caractéristiques des solvants utilisés dans notre étude.

Solvants	Composante dispersive (mJ/m²)	Composante polaire (mJ/m²)	Energie totale (mJ/m²)
Eau	21,6	51	72,6
Formamide	39,5	18,7	58,2
α-bromonaphtalène	44,6	0	44,6
Ethylène glycol	29	19	48
Diiodométhane	50,8	0	50,8

Tableau 6 : Composantes dispersives et polaires de l'énergie de surface de différents liquides tests de référence

4.5.2. Evaluation des angles de contact

La méthode de mouillabilité entre une phase liquide et une phase solide est une

méthode optique nécessitant un appareillage où des gouttes de faibles volumes (5 µL pour éviter les distorsions dues à la gravité) sont déposées à l'aide d'une micro seringue sur l'échantillon à tester. Pour chaque échantillon, cinq solvants sont utilisés : eau, formamide, alpha-bromonaphthalène, éthylène glycol et diiodométhane (Tableau 6).

La manipulation est réalisée dans une enceinte thermostatée à 37° C. Une caméra fixée sur l'appareil permet de suivre l'évolution de la goutte au cours du temps sur l'écran du PC (Figure 25). Elle permet également d'enregistrer une photographie de cette même goutte 10 secondes après avoir été déposée.

Sur cette photographie, le logiciel Digidrop® (GBX Scientific Instruments, France) permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact par des méthodes d'interpolation. Pour chaque goutte déposée, cinq modes de calcul sont effectués afin d'en déduire l'angle de contact moyen : contour, automatique, semi-automatique, manuel 1 et 2. Les trois premiers modes sont automatiquement ou semi-automatiquement déterminés par l'ordinateur. Les deux autres modes font intervenir l'opérateur qui choisit, selon le cas, deux ou trois points de référence, permettant d'en déduire l'angle de contact. Dans tous les cas, l'ordinateur garde en mémoire la mesure moyenne entre les deux angles (droit et gauche) formés par la goutte sur le support.

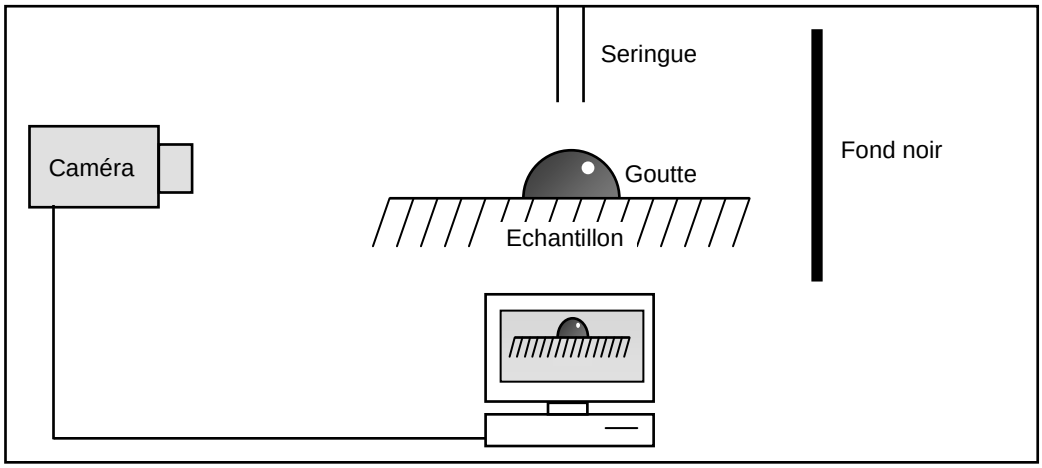


Figure 25 : Schéma de principe de la mesure de l'angle de goutte

Trois gouttes de chaque solvant sont déposées sur l'échantillon pour affiner la moyenne. Pour chaque solvant, ce sont donc quinze mesures qui sont retenues afin de déterminer l'angle de contact moyen que réalise la goutte sur son substrat.

La méthode d'Owens-Wendt est utilisée pour calculer l'énergie de surface totale des échantillons ainsi que leurs composantes polaire et dispersive [66]. Ce modèle d'Owens-Wendt a été choisi car il est bien adapté à la mesure de l'énergie de surface des biomatériaux. Ce

modèle se base sur la décomposition des énergies des différentes phases et sur l'expression de la tension interfaciale suivante :

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - 2(\gamma_S^d.\gamma_{SL}^d)^{1/2} - 2(\gamma_S^p.\gamma_{LV}^p)^{1/2} \qquad (2)$$

La résolution graphique donne une droite du type Y = AX + B. En combinant (2) et (1) on obtient :

$X = ((\gamma_{LV} - \gamma_{LV}^d) / \gamma_{LV}^d)^{1/2} = (\gamma_{LV}^p / \gamma_{LV}^d)^{1/2}$

$Y = \gamma_{LV}(1 + \cos\theta) / 2(\gamma_{LV}^d)^{1/2}$

Avec l'équation (2), les valeurs de A et B sont déterminées :

$A = (\gamma_S^p)^{1/2}$

$B = (\gamma_S^d)^{1/2}$

Ainsi, en ayant la valeur des composantes dispersives (B) et polaire (A), l'énergie totale est facilement calculée (énergie totale = composante dispersive + composante polaire = A + B). Le programme informatique nous donne directement la valeur des trois composantes de l'énergie du matériau étudié.

4.6. MESURE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE SURFACE : XPS

Des échantillons du PET Melinex® vierges et irradiés (à 24 mJ/cm² et 120 mJ/cm²) ont été analysés par XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy). Ces analyses ont été conduites avec le spectromètre ESCALAB 220XL. Les photons incidents étaient inclinés à 45°, puis seuls étaient collectés les photoélectrons émis perpendiculairement à l'échantillon. La profondeur d'analyse était de 10nm. Une ligne Alkα monochromatique (1486,6 eV) a été utilisée pour l'excitation, à une puissance de 120 W, produisant un spot de 500 µm sur l'échantillon [41]. Le spectromètre fut utilisé selon un mode d'énergie passante constante (20 eV), produisant un spectre de haute résolution, lequel fut enregistré par l'intermédiaire d'une lentille électromagnétique. Un bombardement d'électrons à 6 eV d'énergie a également été appliqué sur les échantillons afin de compenser l'effet de charge durant l'analyse. Un masque en acier avec une ouverture de diaphragme de 2 mm appliqué sur les échantillons a permis de stabiliser cette compensation de charge. Les énergies de liaison ont été analysées en prenant référence sur le niveau d'énergie du carbone C_{1S} à 284,7 eV pour les espèces de carbone à noyau aromatique. Ces expérimentations ont été conduites dans un vide supérieur à 10^{-7} Pa. Les données expérimentales ont été interprétées par le logiciel Eclipse fourni par la maison VG Scientific.

4.7. TESTS DE CULTURE CELLULAIRE

Tous les tests de prolifération ont été réalisés selon les normes internationales et européennes (ISO 10993-5 / EN 30993-5).

4.7.1. Les cellules L132

Les cellules de la lignée L132 (ATCC CCL 5, cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain) ont été isolées par E.V. Davis et V.S. Bolin [67] en 1960 et sont reconnues pour leur grande reproductibilité (Tableau 7). Ces cellules sont cultivées dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM) avec des sels de Earl sans L-Glutamine (Gibco) additionné extemporanément de 0,292 g/L de L-Glutamine, 0,1 g/L de streptomycine, 100 Ul/mL de pénicilline et 5% de sérum de veau fœtal (Eurobio).

Leur choix résulte de trois caractéristiques. D'une part, ces cellules épithéliales ont la particularité de toujours vivre et proliférer (caractéristique des lignées cellulaires). D'autre part, cette lignée est extrêmement sensible à la cytotoxicité et réagit avec une reproductibilité très constante. Enfin, ces cellules forment facilement des colonies avec des coefficients de clonages élevés (37% à 40%) [68,69].

Désignation	L132
Numéro ATCC	CCL-5
Organisme	Humain
Dépositaire	E.V. Davis
Morphologie	Epithéliale
Marqueur HELA	Oui
Virus	Poliovirus type 1,2,3 ; Adénovirus type 3 ; Vesicular Stomatis

Tableau 7 : Caractéristiques des cellules L132

4.7.2. Test de cytotoxicité par clonage

Le test de viabilité consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent la concentration létale 50% (LC50) en étudiant la méthode de formation de colonies avec des cellules L132 [70,71]. Le test mesure quantitativement un seul critère de toxicité qui est la mort ou la survie cellulaire. Il est par conséquent spécifique, fiable et reproductible. Il permet d'établir une idée de la cytotoxicité de toute substance chimique par comparaison des LC50.

Les cellules sont exposées en continu à deux concentrations de poudres du matériau à tester (200 et 400 µg/mL) sans changement de milieu de culture pendant la durée de l'expérience : 9 jours à 37°C et 5% de CO_2. Le nombre de cellules inoculées est déterminé pour obtenir environ 100 unités par boîte de culture. Chaque cellule déposée sur le fond de la boîte de Pétri est à l'origine de la formation d'une colonie de cellules filles appelée clone.

Huit expériences séparées sont conduites pour chaque concentration. Après coloration au cristal violet permettant de mettre en évidence les clones, ceux-ci sont comptés et comparés au témoin. Une poudre de Nickel pur est utilisée comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie dans les cultures exposées aux poudres de PET par rapport aux cultures témoin.

La poudre de PET a été obtenue par un procédé de broyage mécanique du polymère dans de l'azote liquide. Cette technique présente le double avantage de ne pas échauffer le matériau d'une part (et donc de ne pas modifier ses propriétés physico-chimiques), et de laisser un produit très cassant d'autre part, donc plus facile à broyer. Cette caractéristique est due à la température très basse de l'azote liquide qui rend le PET très rigide malgré sa souplesse initiale.

Les poudres de PET de différentes concentrations étaient préalablement stérilisées sous deux lampes à ultra-violet de 15W de puissance chacune, à 20 cm de distance, pendant une durée de 2 heures.

4.7.3. La prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire consiste en la détermination de la croissance cellulaire *in vitro*. Le test est effectué sur des lignées cellulaires animales ou humaines provenant on non du futur site d'implantation (concept de cellules cibles). Dans le cadre de notre expérimentation, nous avons choisi les cellules L132 pour déterminer le type de PET optimal d'une part, et le LASER le plus efficace d'autre part.

4.7.3.1. Détermination de la durée de prolifération optimale

Les Figures 26 et 27 montrent l'évolution de la prolifération et de la vitalité des cellules L132 pendant une durée de 7 jours sans changement de milieu. La densité de cellules inoculées le premier jour est de 7500 cellules/cm². La courbe de cinétique de prolifération montre que le nombre de cellules atteint son maximum après 6 jours de prolifération, avant de diminuer par la suite, les cellules n'ayant plus assez de nutriments pour vivre et se reproduire.

Le temps d'incubation des cellules L132 dans l'incubateur ne doit donc pas excéder 6 jours sans changement de milieu.

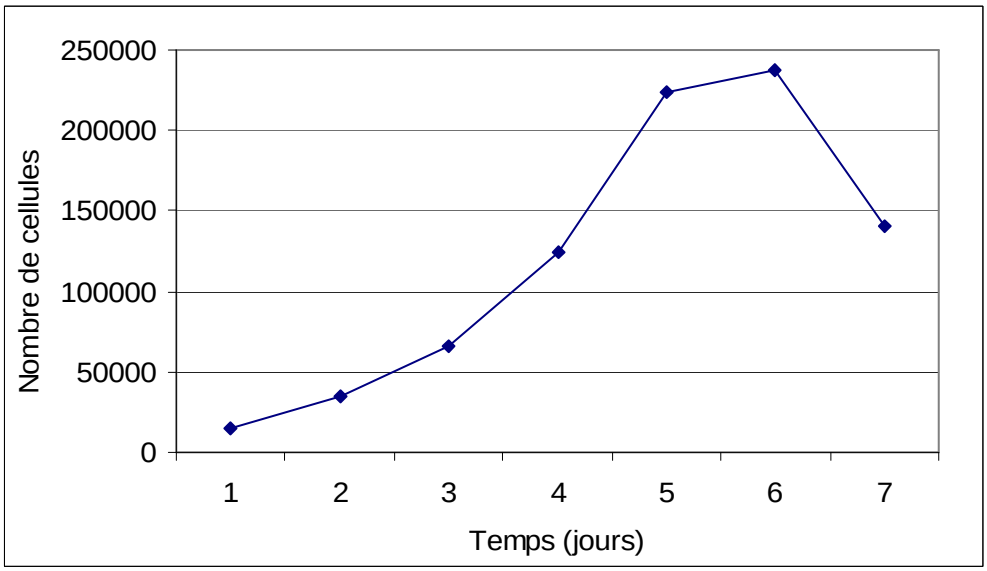


Figure 26 : Cinétique de prolifération des cellules L132 (inoculation 7500 cellules/cm²)

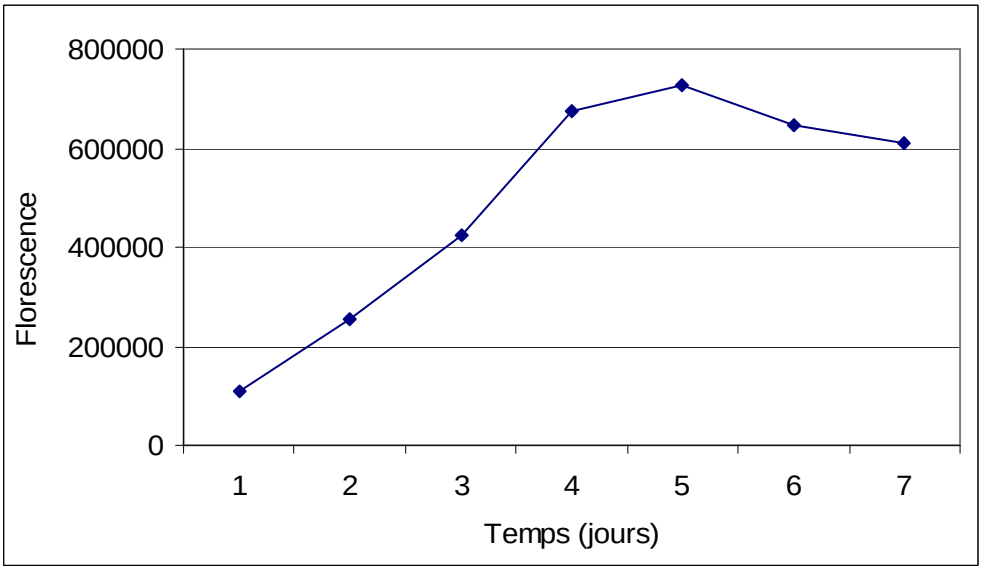


Figure 27 : Cinétique de vitalité des cellules L132 (inoculation 7500 cellules/cm²)

4.7.3.2. Tests de prolifération

Les proliférations sont conduites dans des plaques à 24 puits, sur des éprouvettes d'un diamètre de 14,9 mm. Les échantillons étaient préalablement stérilisés 2 heures sous rayonnement ultra-violet (1 heure par face), puisque la méthode de l'autoclave ne pouvait être

retenue en raison de la sensibilité du PET à si forte température (135°C, au-dessus de la température de transition vitreuse et très proche de la température de cristallisation).

Toutes les manipulations ont été effectuées dans des conditions stériles, sous hotte à flux laminaire. Un anneau de viton a été déposé dans chaque puits pour maintenir la pastille de PET au fond de celui-ci, évitant qu'elle ne flotte à la surface après la mise en place du milieu de culture. Une suspension de 10.000 cellules était déposée dans chaque puits. La période de culture était de 3 jours et de 6 jours sans changement de milieu. Cette double période de prolifération cellulaire a été choisie afin de suivre l'évolution de la reproduction cellulaire dans le temps. Les puits sans pastille, mais avec anneau de viton, constituaient les témoins.

4.7.3.3. Comptage cellulaire

Trois et six jours après inoculation, un comptage cellulaire est réalisé à l'aide d'un compteur de particules Coulter Z1 (Coulter Electronics). Les puits sont vidés de leur milieu à l'aide d'une seringue et 0,3 mL de trypsine sont ajoutés pendant 10 minutes afin de décoller les cellules. L'effet de la trypsine est alors ralenti en injectant 0,7 mL d'EDTA dans chaque puits. La suspension cellulaire (1 mL) contenue dans chaque puits est ensuite aspirée à l'aide d'une pipette Pasteur et déposée dans un pot non stérile, avec 7 mL de solution filtrée de NaCl à 0,9% massique, soit un volume total de 8 mL.

Le compteur prélève alors une goutte de 0,5 µL et détecte toutes les particules ayant un diamètre supérieur à 9 µm. Le nombre total de cellules est déterminé en multipliant le résultat du comptage par le facteur de dilution (=16). Le comptage est réalisé trois fois par puits.

Le taux de prolifération relatif est exprimé en pourcentage ± écart type par rapport au témoin. Pour faciliter la lecture des résultats, les valeurs de prolifération des puits témoin sont donc fixées à 100%. Six expériences séparées sont effectuées chaque fois sur trois échantillons pour chaque niveau d'irradiation, soit une moyenne effectuée sur dix-huit comptages.

4.7.4. Vitalité cellulaire en contact direct

Les tests de vitalité cellulaire (Bleu Alamar) sont réalisés en même temps que les tests de prolifération, 3 jours et 6 jours après inoculation [72]. Le test du Bleu Alamar étant un test non destructif (une toxicité minimale sur la vie cellulaire a été démontrée), il est effectué juste avant le comptage de la prolifération cellulaire. Le même puits sert donc à la fois à réaliser le test du Bleu Alamar et celui de la prolifération, ce qui permet de mettre en parallèle les résultats.

4.7.4.1. Etalonnage du Bleu Alamar

La Figure 28 montre l'évolution de la fluorescence du Bleu Alamar en contact avec les cellules pendant des temps croissants. Cette étude a été réalisée pour une prolifération cellulaire de 3 jours et de 6 jours avec une densité de 7500 cellules / mL. Un palier est obtenu au bout de trois heures de réaction du Bleu Alamar sur les cellules ayant proliféré durant 6 jours. Pour la détermination de la vitalité des cellules L132, un temps d'action du Bleu Alamar de trois heures sera donc choisi quelle que soit la durée de prolifération.

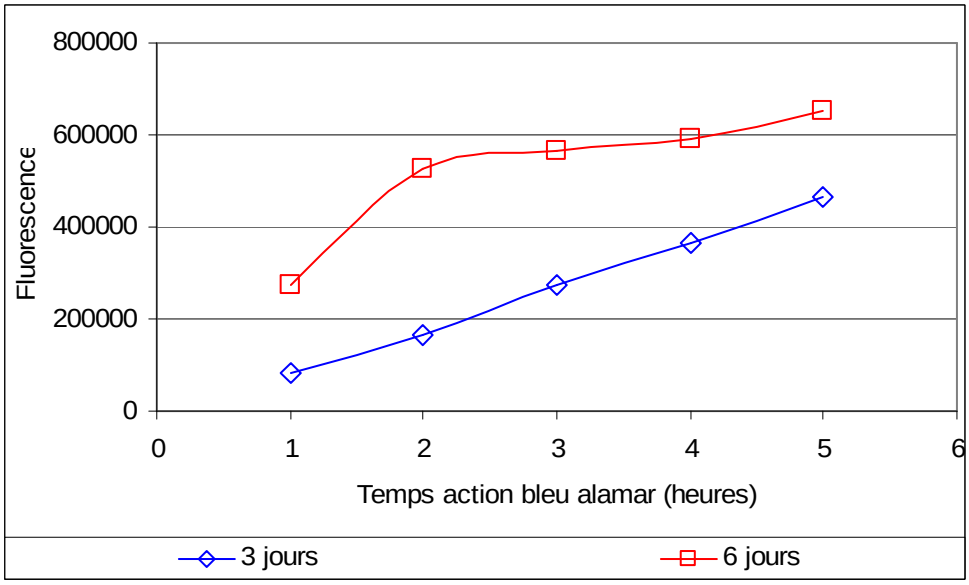


Figure 28 : Evolution de la fluorescence du Bleu Alamar en fonction de son temps d'action sur les cellules

4.7.4.2. Manipulation

Pour la manipulation proprement dite, une solution contenant 0,15 mL de colorant fluorescent (*Uptiblue viable cell counting reagent*, Interchim Réf. : UP669413) est ajoutée à chaque puits, puis la boîte est remise en étuve pendant 3 heures. Ensuite, une goutte de 0,2 µL est prélevée et déposée dans une boîte à 96 puits. La couleur de la solution varie alors du bleu au violet en fonction de la vitalité cellulaire, et un passage en fluorescence permet d'objectiver le résultat (FluoroCount™ de Packard).

Une fois les 3 heures d'incubation passées et la goutte de 0,2 µL prélevée, les puits sont vidés de leur solution et rincés à l'EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*). Le protocole se poursuit alors par celui décrit au § 4.7.3.3 (comptage cellulaire). De même que pour la prolifération, six expériences séparées sont donc effectuées chaque fois sur trois échantillons, soit une moyenne effectuée sur dix-huit comptages.

4.7.5. Etude de la cinétique d'adhésion cellulaire par la méthode du *p*-NPP

4.7.5.1. Le principe

C'est en 1997 que Trochon *et al.* [73] ont mis au point la méthode d'étude quantitative de la cinétique d'adhésion cellulaire par la méthode du *para*-nitrophényl phosphate (*p*-NPP, Sigma). Celle-ci consiste à quantifier le nombre de cellules ayant adhéré à un support par la mesure de l'activité des phosphatases présentes dans les cellules, phosphatases qui vont dégrader le produit en *para*-nitrophénol. Ce composé est incolore en milieu acide sous sa forme protonée. En présence de soude, la déprotonation par équilibre, entraîne l'apparition d'une forme chargée et colorée en jaune. Un dosage colorimétrique par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 405 nm est réalisé. La densité optique (DO) lue est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes adhérant au support. Pour utiliser cette technique avec les L132, une mise au point est nécessaire.

4.7.5.2. La mise au point de la technique

La Figure 29 montre l'évolution de l'absorbance du *p*-NPP en contact avec les cellules pendant des temps croissants. Cette étude a été réalisée pour une adhésion cellulaire de 2 heures et une densité croissante de cellules. Le but est de déterminer le nombre optimal de cellules à inoculer ainsi que le temps de réaction idéal du *p*-NPP. Pour une détermination optimale de l'absorbance par le lecteur optique, celle-ci doit être comprise entre 1 et 1,5. Pour la détermination de la cinétique d'adhésion des cellules L132, un temps d'action du *p*-NPP de trois heures et un nombre de cellules de 40.000 seront donc choisis pour les trois temps d'adhésion étudiés (30, 60 et 120 minutes).

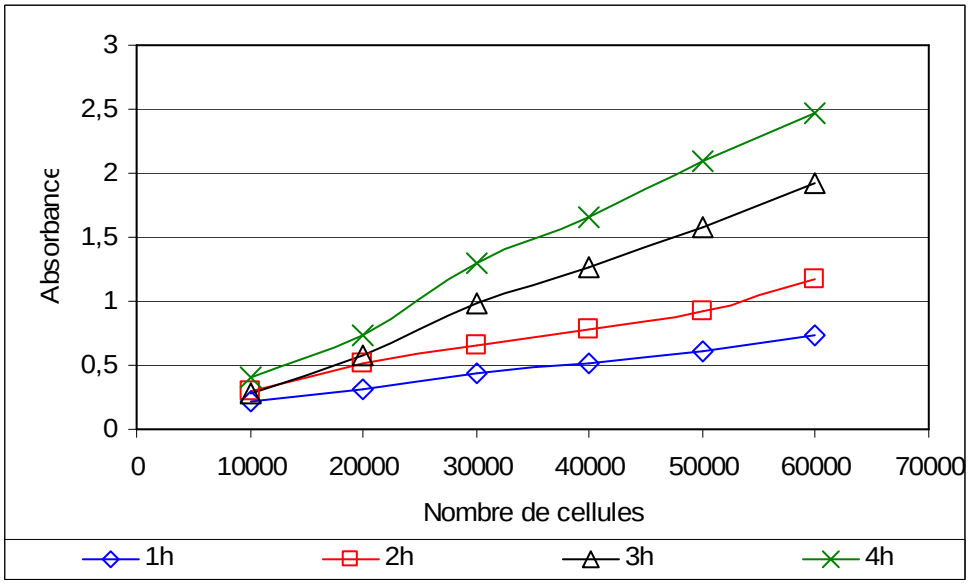


Figure 29 : Evolution de l'absorbance du *p*-NPP
en fonction de son temps d'action et du nombre de cellules

4.7.5.3. La cinétique d'adhésion sur les matériaux nus

Les échantillons sont ensemencés avec une concentration de 40.000 cellules par puits à raison de deux échantillons par matériau testé et pour chacun des trois temps (30 min, 1 h et 2 h). Après ces différents temps d'adhésion, les puits sont rincés avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma) pour éliminer les cellules qui n'ont pas adhéré. 300 µL de solution de *p*-NPP à la concentration de 3 mg/mL dilués dans du tampon acétate (50 mM acétate de sodium, 0.1 triton-X 100, pH=5.5) sont ajoutés dans chaque puits. Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C, à l'abri de la lumière pendant 3 h. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 150 µL de soude (NaOH 1N) par puits. L'absorbance est mesurée par spectro-photométrie à 405 nm. Le pourcentage d'adhésion cellulaire est déterminé par rapport aux puits témoin (fond du puits de la boîte de culture : polystyrène). L'expérience est réalisée 6 fois.

4.7.6. Le microscope électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (JEOL J-SM-5300 Scanning Microscope) permet de visualiser la morphologie des cellules à fort grossissement. La résolution du MEB est de 22 nm. L'observation est réalisée après trois jours de culture cellulaire.

Les échantillons destinés à être analysés sont fixés avec un premier fixateur : glutaraldéhyde (2,5% v/v) dans un tampon Phosphate de Sodium 0,1 M, suivi d'une post-fixation par une solution de O_SO_4 à 2% et de $HgCl_2$ saturé (6 volumes pour 1 volume respectivement), puis déshydratés successivement dans de l'éthanol à concentration croissante. Après déshydratation, les échantillons sont conservés au sec et à l'abri de la poussière jusqu'à l'observation. Juste avant celle-ci, ils sont métallisés par vaporisation sous vide d'une fine couche d'or, et observés sous un voltage de 20 kV et un courant de 100 µA.

4.7.7. Marquage immunocytochimique des protéines d'adhésion

4.7.7.1. L'adhésion cellulaire à la MEC

L'adhésion des cellules à la matrice extra-cellulaire (MEC) joue un rôle fondamental dans les fonctions de régulation des différenciation, croissance et survie cellulaire. Le cytosquelette d'une cellule est relié à la MEC par des jonctions d'ancrage ou jonctions adhérentes. Ces jonctions sont composées de deux catégories de protéines (Figure 30) :

- Les protéines d'attachement intra-cellulaire, qui forment une plaque distincte sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique et qui se connectent soit aux filaments d'actine, soit aux filaments intermédiaires.

- Les protéines de liaisons transmembranaires, dont les domaines cytoplasmiques lient une ou plusieurs protéines d'attachement intra-cellulaire, alors que leurs domaines extra-cellulaires interagissent avec la MEC.

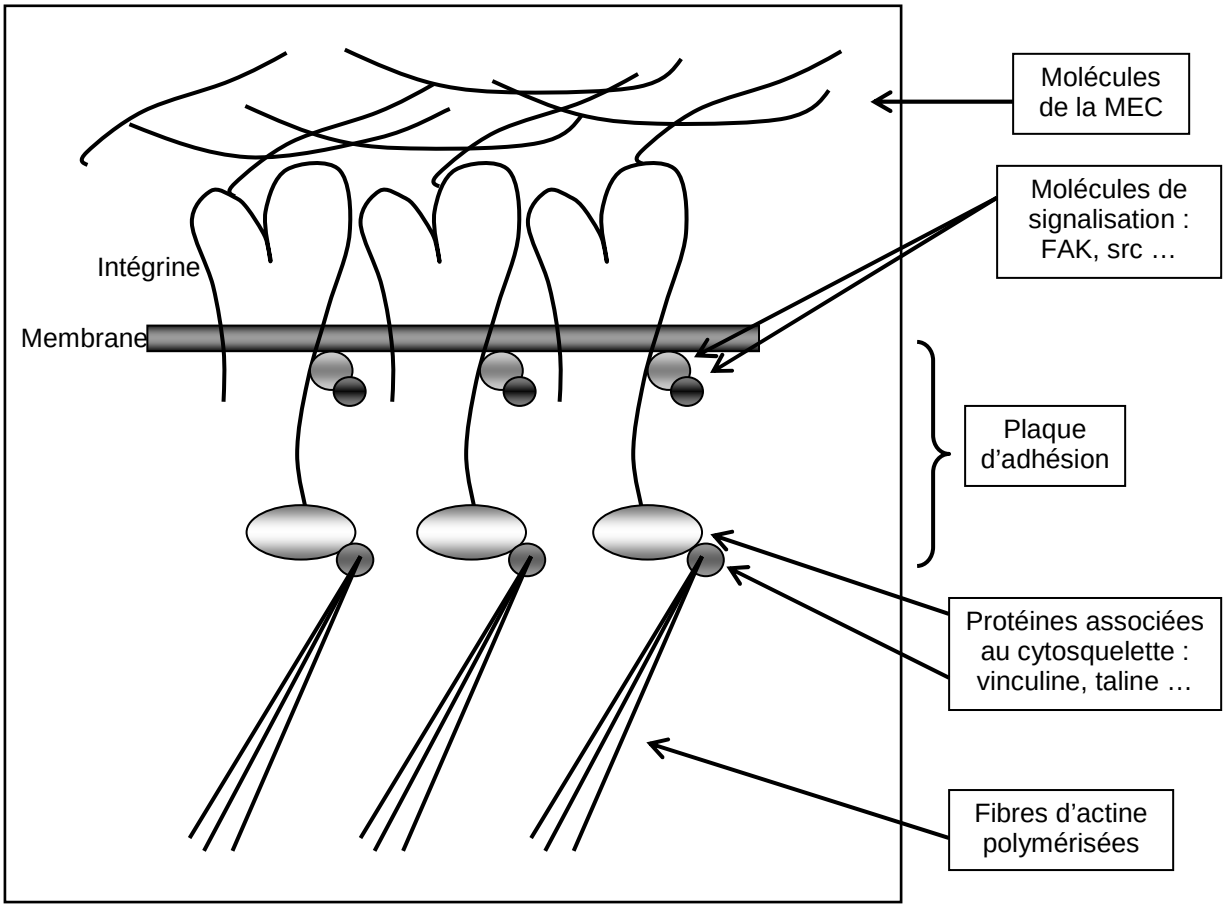


Figure 30 : Représentation schématique d'un contact focal (d'après Koolman et Rohm [74])

Des cellules cultivées sur un support artificiel recouvert de molécules de la MEC adhèrent fortement en des régions particulières de la membrane plasmique appelées points de contact focaux, au niveau desquelles les faisceaux de filaments d'actine aboutissent [75].

Les protéines de liaison transmembranaire, qui sont responsables de ces adhérences et qui servent de lien entre la matrice et les faisceaux de filaments d'actine au sein de ces plaques sont appelées intégrines. Leur domaine extra-cellulaire interagit avec la plupart des protéines de la MEC, dont le collagène, la fibronectine et la laminine alors que leur domaine intra-cellulaire se lie indirectement aux faisceaux de filaments d'actine par l'intermédiaire d'un complexe de protéines d'attachement, incluant la taline, l'α-actinine et la vinculine, formant ainsi les contacts focaux [76].

L'étude immunocytochimique que nous avons mise en place concerne les filaments d'actine du cytosquelette et la vinculine [77].

4.7.7.2. Le protocole opératoire

Après une culture de trois jours, le milieu de culture est retiré, les cellules sont rincées avec du PBS, puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 2% (Sigma), à température ambiante pendant 20 minutes. Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées 15 minutes dans du PBS / Triton à 0,2% (Sigma), afin de perméabiliser les membranes. Les puits sont de nouveau rincés au PBS, puis les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par une solution de PBS/BSA à 1% (Sérum Albumine Bovine, fraction V, Sigma). Enfin, une fois rincés, les échantillons sont transférés dans une boîte 24 puits sèche.

Les filaments d'actine du cytosquelette sont mis en évidence par marquage direct grâce à une solution de Phalloïdine-FITC (Sigma) à 1,25 µg/mL en contact avec les cellules pendant 1 heure.

Un double marquage est nécessaire pour mettre en évidence la vinculine. Le premier anticorps, l'anti-vinculine, est donc déposé le premier (anticorps monoclonal anti-vinculine produit chez la souris, Sigma) dilué au 1/50ème. Il est laissé en contact 1 heure à température ambiante, en atmosphère humide. Après rinçage, le second anticorps couplé au marqueur fluorescent est déposé sur les échantillons. Il s'agit de l'IgG anti-souris-FITC (Sigma) dilué au 1/100ème pour révéler la vinculine. Cet anticorps est également laissé en contact pendant 1 heure à température ambiante, en atmosphère humide à l'abri de la lumière.

Après rinçage, les échantillons sont placés entre lame et lamelle avec une solution de milieu de montage (PBS/Glycérol/*Propidium Iodide Solution* : PIS) et conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Le PBS/Glycérol permet de maintenir les échantillons en milieu humide ; le PIS permet de marquer les noyaux cellulaires en couleur rouge.

Les échantillons sont enfin observés au Microscope Confocal LASER (Leica TCS NT).

Le marquage de l'actine a également été réalisé sur des échantillons de nickel qui sert de témoin positif, le nickel étant reconnu comme un élément cytotoxique pour les cellules de manière générale.

4.7.8. Analyses statistiques

Pour les tests biologiques de prolifération, vitalité, et adhésion cellulaire, des tests statistiques ont été réalisés. Une analyse de variance à une variable (ANOVA) a été entreprise, suivie par un test de Tukey HSD utilisant le logiciel de statistiques 'SPSS'. Pour que les résultats soient considérés comme significatifs, il fallait obtenir $p<0,05$.

5. RÉSULTATS

La présentation des résultats obtenus au cours de notre étude a été subdivisée en deux grands chapitres. Le premier chapitre (§ 5.1, ci-dessous) montre les résultats physico-chimiques et biologiques obtenus sur trois PET différents : Melinex®, Goodfellow et Véralite®. Le but de cette première partie est de connaître l'impact du choix d'une marque de PET sur ses capacités à simuler les caractéristiques d'un biomatériau. La seconde partie (§5.2, p.94) nous permettra, une fois le PET choisi, de sélectionner le LASER le mieux adapté à la fonctionnalisation de surface d'un tel matériau.

5.1. CHOIX DU PET

5.1.1. SPECTROMÈTRIE

Une analyse par spectrométrie a été effectuée avant de commencer les traitements LASERS, dans le but de connaître dans quelle gamme de longueurs d'onde optimale le polyéthylène téréphthalate était capable d'absorber les rayonnements LASERS (Figure 31). Par la suite, les échantillons irradiés à différentes intensités d'énergie ont été à nouveau analysés par spectrométrie (Figures 32 à 34).

Les courbes correspondant aux échantillons de PET vierges montrent une forte capacité d'absorption du Véralite® dans la gamme de longueurs d'onde s'étendant entre 2700 et 3000 nm, ce qui n'est pas le cas des deux autres PET. En revanche, les trois PET présentent une bonne capacité d'absorption pour des rayonnements dont la longueur d'onde est inférieure à 600 nm, et plus particulièrement encore pour des longueurs d'onde inférieures à 300 nm. L'utilisation du LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde est donc particulièrement adaptée à cette étude préliminaire consistant à déterminer le plus apte des trois PET sous forme de film à simuler le comportement d'un biomatériau.

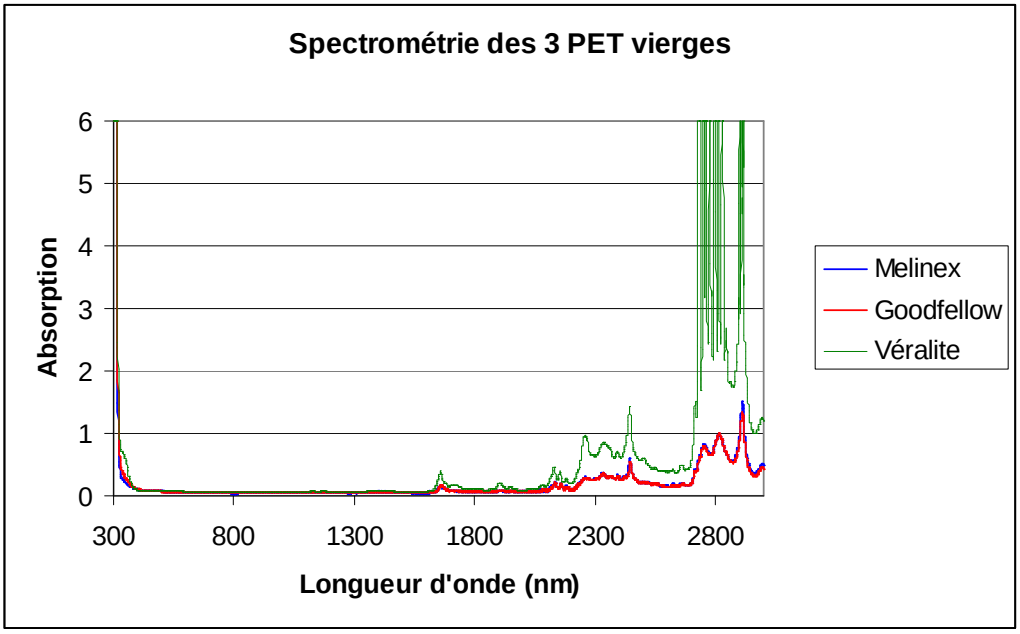


Figure 31 : Spectrométrie du Melinex®, du Goodfellow et du Véralite® non irradiés

5.1.1.1. Véralite®

Le résultat de l'étude spectrométrique sur le Véralite® montre que la courbe est inchangée, qu'il soit vierge ou irradié, et ceci quel que soit le niveau d'irradiation (Figure 32).

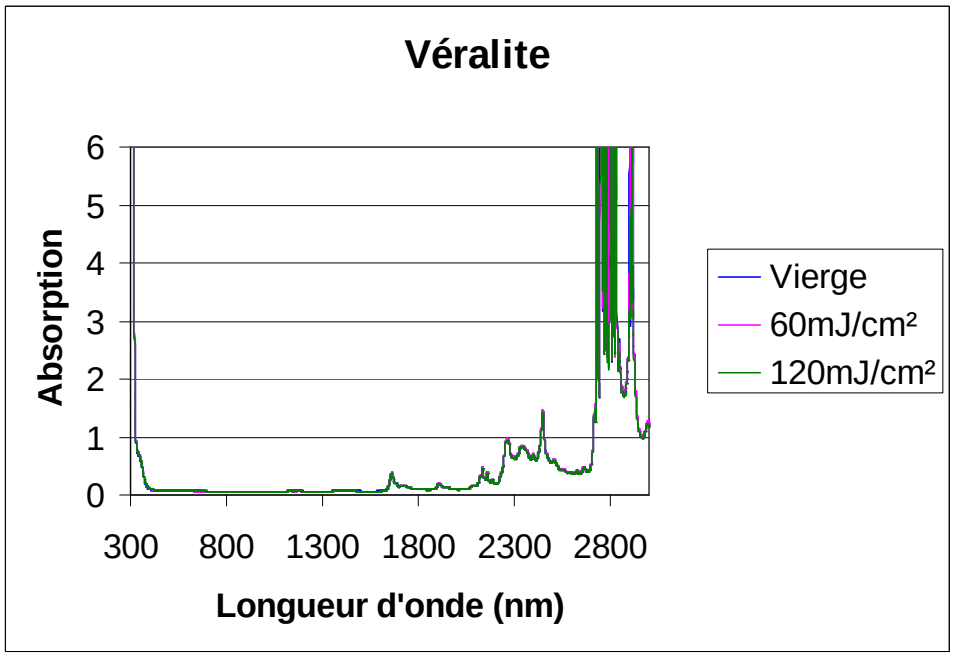


Figure 32 : Spectre d'absorption du Véralite®

5.1.1.2. Melinex® et Goodfellow

Concernant le Melinex® et le Goodfellow en revanche, la totalité des pics apparaît sur le graphique (Figures 33 et 34). On retrouve sensiblement les mêmes pics que le Véralite®, avec toutefois une amplitude moins élevée pour chacun d'entre eux.

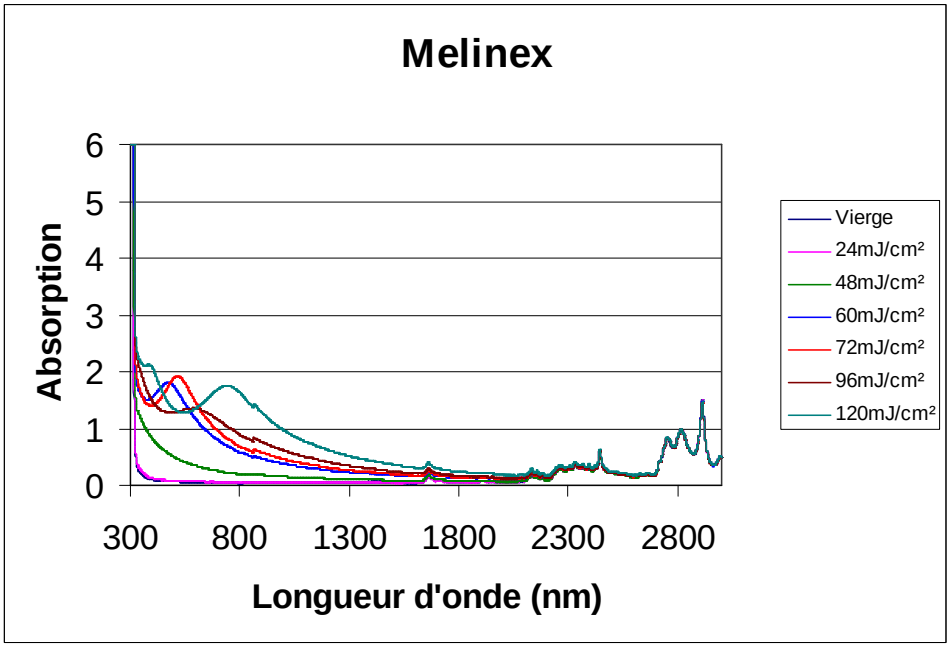


Figure 33 : Spectre d'absorption du Melinex®

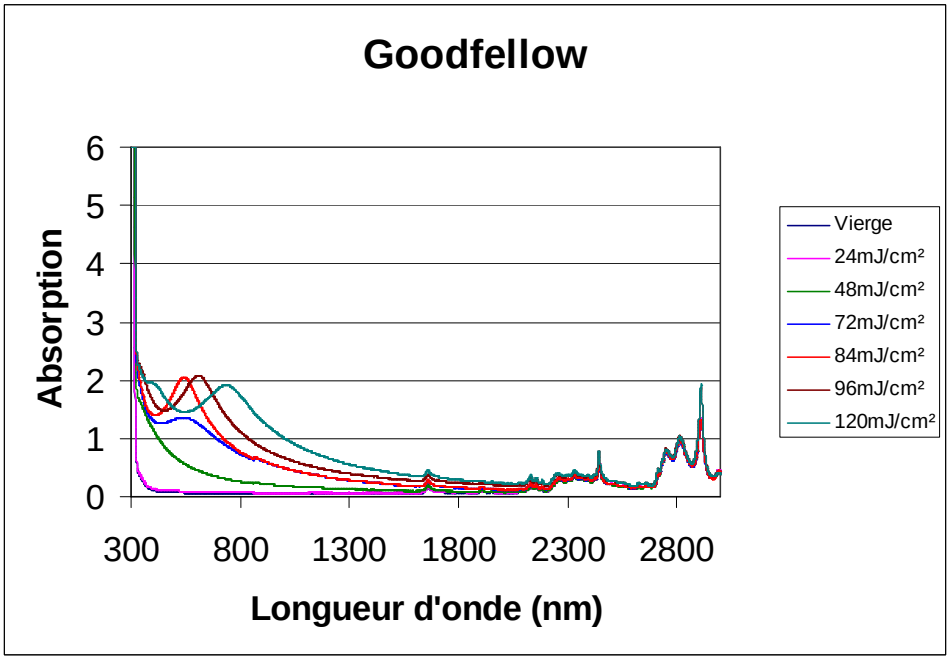


Figure 34 : Spectre d'absorption du Goodfellow

Par contre, la partie du spectre située entre 2200 et 300 nm présente une évolution très distincte en fonction des échantillons considérés. En effet, cette partie du spectre reste identique de 00 à 24 mJ/cm², puis montre une élévation de plus en plus forte de sa pente. Cette évolution se poursuit jusqu'à faire apparaître de nouveaux pics dont la situation est variable en fonction de l'intensité de l'irradiation, mais toujours située entre 500 et 800 nm.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces variations, la première d'entre elle étant bien évidemment l'apparition de nouveaux composés chimiques en réponse à l'irradiation du matériau. La seconde suggestion concernait la théorie des lames minces : en effet, lorsque deux fines lames d'épaisseur approximativement identique composent le matériau, alors une diffraction des rayons peut se produire, engendrant ce signal particulier bien visible en fin de courbe. Cependant, le caractère très superficiel du traitement LASER (quelques dixièmes de micromètres) est bien peu important par rapport à l'épaisseur du polymère (250 µm) pour expliquer cette variation de la courbe. En effet, la théorie des lames minces suppose deux lames d'épaisseur approximativement identique.

Finalement, il semblerait donc que les changements observés dans le spectre soient dus à un indice de réfraction différent entre les zones irradiées et les zones non atteintes par le LASER dans l'épaisseur du matériau. De ce fait, plus le lasage est important et plus la différence entre les deux indices de réfraction est grande, faisant ainsi varier la pente de la partie terminale de la courbe.

5.1.2. CRISTALLINITÉ DES MATÉRIAUX

Afin de définir précisément les caractéristiques des PET en plaques utilisés dans cette étude, une analyse DSC est réalisée avant et après irradiation.

5.1.2.1. Étude avant irradiation

5.1.2.1.1. DSC du Véralite®

Sur la courbe, on observe tout d'abord un pic réduit correspondant à la transition vitreuse (T_g), caractéristique de la phase amorphe du matériau (Figure 35 et Tableau 8). Il apparaît à 78°C. Le second pic correspond à la cristallisation du matériau (T_c), et se distingue à 137°C. Il s'agit d'un pic exothermique qui correspond à la cristallisation de la partie amorphe du PET, qui devient donc à ce stade de la manipulation quasi cristallin. L'étape suivante correspond à une évolution entre le pic de cristallisation et le pic de fusion. Le polymère est à l'état métastable, il subit donc un vieillissement qui se traduit par une légère fluctuation de la courbe. Finalement, le pic correspondant à la fusion du Véralite® (réaction endothermique) apparaît vers 245°C (T_f). Le polymère à ce stade est complètement fondu, à

l'état amorphe.

Avec les différents chiffres obtenus, il est alors possible de connaître le pourcentage de cristallinité du matériau (X_C). Celui-ci est égal à la valeur de l'énergie de l'endotherme de fusion ("delta H") divisé par la valeur de l'enthalpie de fusion d'un PET 100 % cristallin ("delta H" théorique d'un PET cristallin = ΔH_0). Dans le cas du Véralite®, cela nous donne donc :

$$\Delta H_0 = 120 \text{ J/g}$$

$$X_C = 1180 / 120$$

$$X_C = 9{,}8 \%$$

Ce pourcentage de cristallinité est donc assez éloigné de celui des prothèses vasculaires.

	Véralite®	**Goodfellow**	**Melinex®**
Transition vitreuse (T_g)	78°C	-	-
Cristallisation (T_c)	137°C	-	-
Fusion (T_f)	245°C	258°C	262°C

Tableau 8 : Températures d'apparition des différents pics observés suite à l'analyse DSC avant et après irradiation

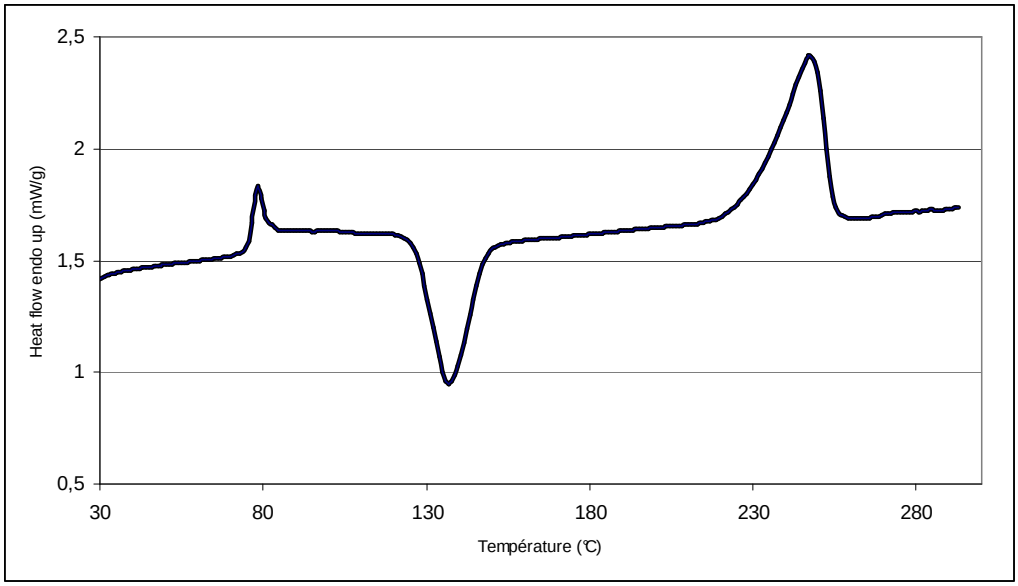


Figure 35 : Courbe de DSC du Véralite®

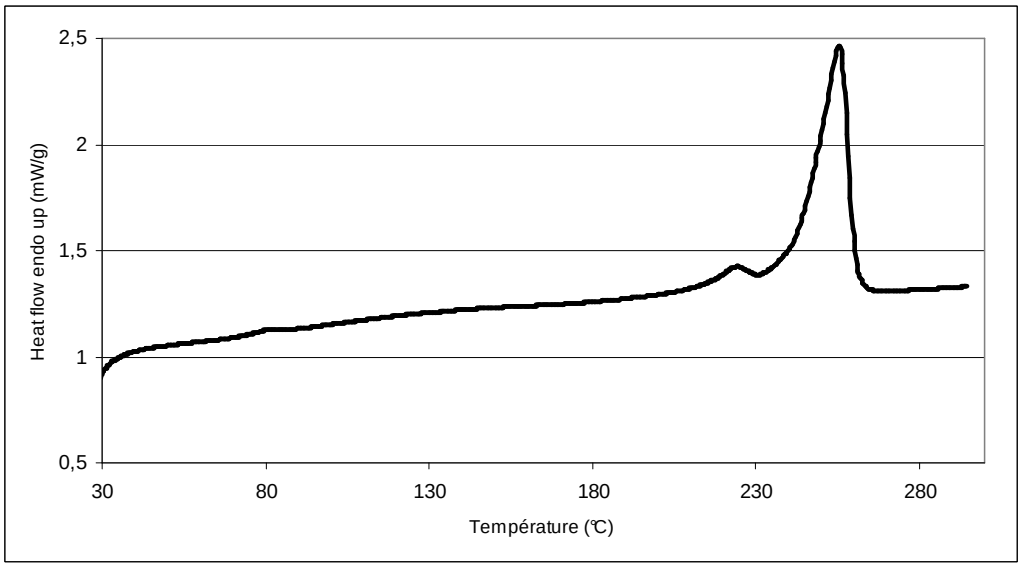


Figure 36 : Courbe de DSC du Melinex® et du Goodfellow

5.1.2.1.2. DSC du Melinex® et du Goodfellow

Les courbes de ces deux PET sont similaires ; de ce fait un seul graphique a été représenté ici. Elles sont bien peu semblables à la courbe du Véralite® (Figure 36). En effet, on remarque tout d'abord que le pic correspondant à la transition vitreuse est inexistant, tandis que le pic de cristallisation est complètement absent. Cette observation nous indique donc que la phase amorphe est inexistante dans ce matériau. A la différence du Véralite®, les deux PET

étudiés ici sont donc quasi cristallins, se rapprochant fortement de ce fait des prothèses tissées utilisées en chirurgie vasculaire. Seul le pic de fusion du polymère apparaît, à une température de 262°C. Le calcul du pourcentage de cristallinité donne donc :

$$X_C = 5180 / 120$$
$$X_C = 43\ \%$$

5.1.2.2. Étude après irradiation

Les courbes obtenues après irradiation n'ont pas été représentées ici : en effet, elles sont absolument identiques à leur conformation d'origine, quel que soit le niveau d'irradiation. Cette vérification nous permet donc, dans les limites de sensibilité de ce test, de présumer du caractère superficiel du traitement effectué, puisque le matériau conserve la même caractérisation. Les propriétés mécaniques des prothèses en PET ne devraient donc pas être altérées par le traitement LASER.

5.1.3. MORPHOLOGIE DE SURFACE

5.1.3.1. Mesures de profondeur d'ablation des trois PET

Les relevés de l'état de surface du PET ont été réalisés avec le profilomètre Taylor Hobson Précision de type FormTalysurf Intra. Les résultats affichés sur l'écran peuvent être reproduits sur une feuille de papier grâce à une imprimante reliée au système. La Figure 37 donne un exemple de tracé obtenu avec ce type d'appareil.

Sur l'échelle des abscisses, graduée en micromètres, apparaît la longueur du trajet effectué. Sur l'échelle des ordonnées, graduée en nanomètres, apparaît la mesure de la profondeur relevée par le stylet.

Le trajet est réalisé de telle sorte qu'il se situe à cheval sur la zone irradiée et sur la zone non irradiée, obligeant donc le stylet à franchir le seuil, très net, entre les deux parties. Chaque courbe présente trois entités différentes : le premier palier, inférieur, correspond à la zone irradiée du PET. Puis une élévation franche de la courbe indique le passage du stylet sur la zone de transition. Enfin le second palier correspond à la partie non irradiée du matériau, sur laquelle le stylet termine son trajet. La différence de hauteur entre les deux paliers détermine donc la profondeur d'ablation du polymère. Pour chaque mesure effectuée, nous nous sommes systématiquement positionnés au centre de la zone d'irradiation, de manière à ne pas être trompés par les inhomogénéités du faisceau parfois visibles sur la surface du matériau.

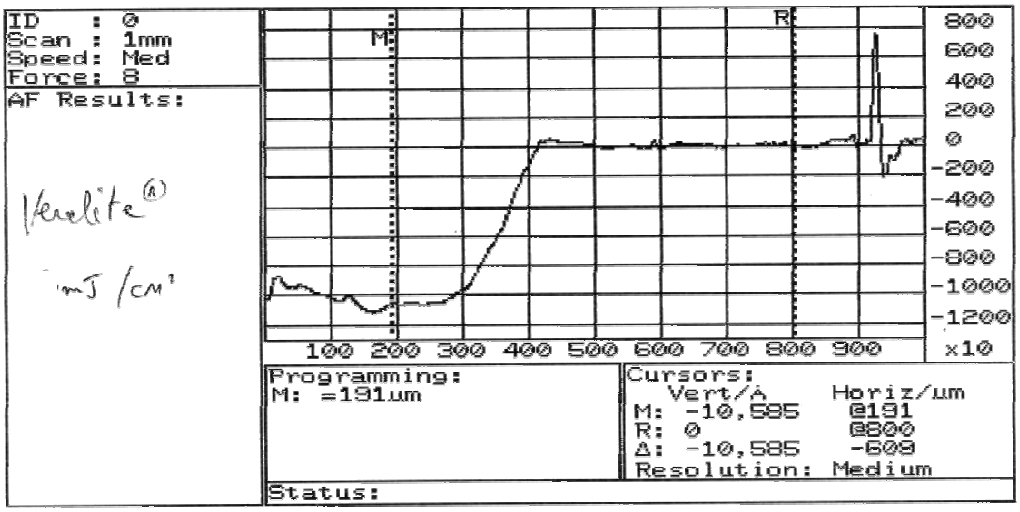


Figure 37 : Exemple de tracé obtenu avec le profilomètre (Véralite, 120 mJ/cm²)

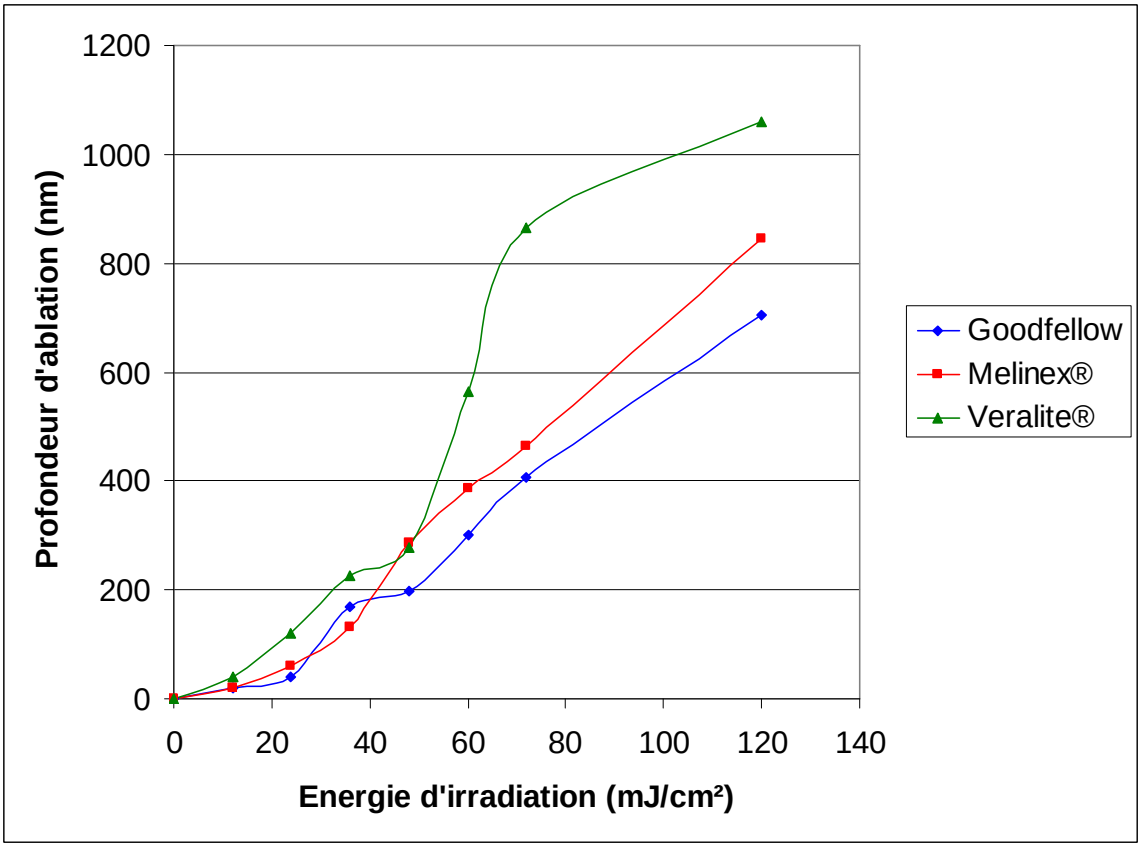


Figure 38 : Profondeur d'ablation des 3 PET en fonction de l'énergie d'irradiation

La courbe représentée sur la Figure 38 montre les diverses profondeurs d'ablation mesurées pour différentes intensités d'irradiation. Pour les trois PET étudiés, le profil de la courbe obtenue est particulièrement significatif et présente de manière suffisamment nette une forme de "S" aplati. Ainsi, la profondeur d'ablation mesurée est quasiment nulle à faible énergie, puis monte brutalement pour se terminer par une ligne droite dont la pente est variable en fonction du PET concerné.

Le seuil d'ablation que l'on peut donc déduire de ce graphique se trouve en considérant le point de la courbe à partir duquel l'ascension de celle-ci est particulièrement marquée. Cette observation donne donc comme résultat un seuil d'ablation de 24 mJ/cm² pour le Goodfellow, 36 mJ/cm² pour le Melinex®, et 48 mJ/cm² pour le Véralite®. Ces données sont donc conformes à celles relevées dans la littérature [37,40,78,79,80,81].

En réalisant une lecture attentive des trois courbes représentées sur la Figure 38, on peut remarquer qu'une légère profondeur est mesurée en dessous du seuil d'ablation trouvé ci-dessus. Cette remarque se justifie par l'explication suivante : le matériau a été irradié avec 10 coups par unité de surface et non un seul, ce qui est susceptible d'engendrer le profil rencontré sur ce graphique.

5.1.3.2. Observations au microscope photonique

Les observations réalisées au microscope photonique ont été faites en lumière polarisée avec un grossissement x100 pour chaque photographie représentée sur les Figures 39 à 47. Lors d'une observation à l'œil nu déjà, une différence de taille est remarquée entre le Véralite® et les deux autres PET. En effet, si ces derniers montrent après lasage une surface blanche, laissant apparaître très nettement l'impact du faisceau (Figure 13, p.29), en revanche le Véralite® reste transparent quelle que soit l'énergie d'irradiation utilisée. Il en est de même au microscope photonique : aucun relief de surface n'est mis en évidence (Figures 39 et 40). L'effet du LASER semble simplement produire un « nettoyage » de la surface, puisque cette dernière, qui paraît particulièrement inhomogène sur l'échantillon vierge, est nettement plus lisse après l'irradiation LASER. Enfin des impuretés sont aléatoirement détectées dans le Véralite® irradié à 120mJ/cm². Ces impuretés sont très probablement déjà présentes et ancrées dans le PET vierge, puis sont fusionnées dans la masse du polymère lors du traitement LASER. Les impuretés ont été analysées par EDS (*Energy-dispersive X-Ray Spectroscopy*) et se sont révélées être de la calcite ou de l'aragonite ($CaCO_3$), minéral parfois ajouté comme charge à ce type de polymère industriel dans le but de le rendre plus hydrophobe.

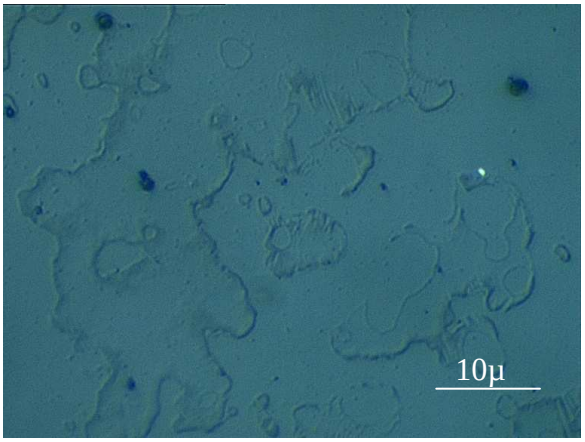


Figure 39 : Photographie en microscopie photonique du Véralite vierge, x100

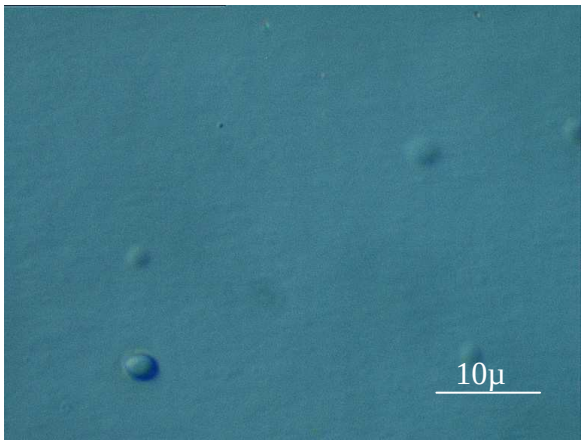


Figure 40 : Photographie en microscopie photonique du Véralite 120mJ/cm², x100

En revanche, pour le Goodfellow et le Melinex®, une modification de la surface du matériau est nettement visible dès les premiers niveaux d'irradiation, ceci étant en parfait accord avec les différentes données de la littérature [29,39,82]. La première observation manifeste à mettre en évidence concerne les matériaux vierges : une différence notable se situe entre ces deux PET, puisque le Goodfellow fait apparaître de nombreuses rayures sur sa surface (Figure 42). En revanche le Melinex® présente une surface lisse, avec uniquement quelques défauts microscopiques vraisemblablement générés par le procédé de fabrication (étirage biaxial)

(Figure 41).

L'état de surface de ces deux polymères évolue cependant de manière identique par la suite. Lors d'une irradiation à 24 mJ/cm², donc en dessous du seuil d'ablation, une légère ondulation est visible sur la surface du matériau, qui ne fait pas encore disparaître les défauts microscopiques (Figure 43). Ce type de structure est maintenant connu sous le terme anglais de LIPSS (*Light Induced Periodic Surface Structure*), et n'apparaît qu'à de faibles énergies [82]. Il s'agit d'une structure périodique comme son nom l'indique, dont la période est proche de la longueur d'onde du LASER utilisé, soit 248 nm dans le cas présent.

Lors d'une irradiation à partir de 48 mJ/cm², donc au dessus du seuil d'ablation, l'aspect de la surface change de façon remarquable (Figure 44). Il ne s'agit plus seulement d'une ondulation de surface, mais le matériau est véritablement ablaté. Il en résulte une surface au relief très tourmenté – et en même temps très homogène – avec un taux de répétition de 2 à 3 µm. Cette fois-ci, le terme anglais consacré à cette structure est « *roll like structures* », qui regroupent des reliefs diversement appelés rouleaux, rides [83], cellules [84] ou dendrites [85] selon les auteurs. La distance entre ces *roll like structures* augmente à la fois en fonction de la longueur d'onde du LASER utilisé, de l'intensité de l'énergie, du nombre de coups et enfin de l'angle incident du faisceau LASER sur sa cible. La technique utilisée en microscopie photonique ne permet pas de connaître la rugosité de l'échantillon (hauteur pic / creux), mais il est possible de distinguer les parties saillantes (plus claires) et les zones en profondeur (plus foncées).

Lorsque l'énergie d'irradiation continue d'augmenter, la même structure est formée sur la surface, avec un relief qui s'accentue. La configuration de l'ablation semble plus organisée, avec des sommets et des vallées de plus en plus étendus (Figure 45). Il reste cependant difficile de donner une orientation générale à cette structure, même si elle paraît approximativement horizontale sur cette photographie.

Enfin, même en soumettant le PET de Goodfellow à une énergie de 72 mJ/cm², il est visible que les rayures superficielles n'ont toujours pas disparu, malgré le processus d'ablation en cours (Figure 46). Cette observation nous confirme dans notre idée que l'ablation reste superficielle, et n'amoindrit donc pas les propriétés mécaniques du matériau. Cette idée est d'ailleurs confirmée par l'analyse d'un échantillon irradié, découpé et regardé transversalement par microscopie photonique (Figure 47). L'échelle indiquée sur cette photographie nous confirme que la profondeur du PET transformé n'excède pas quelques micromètres d'épaisseur, à relativiser par rapport aux 250 µm d'épaisseur du polymère originel.

Inévitablement, sans parler encore de la chimie de la surface, il apparaît évident que de telles modifications physiques auront des conséquences sur les comportements cellulaires

[35,51]. Les types de changement de structure observés au microscope photonique paraissent favorables vis-à vis des cellules, car nous avions noté qu'un relief d'ordre micrométrique semblait plus favorable qu'un relief d'ordre nanométrique (§ 2.6.3.3). D'autre part, Duncan *et al.* [35] avaient observé que les cellules répondaient plus favorablement en regard d'une surface aux transitions douces, plutôt que vis-à-vis d'une surface très fortement tourmentée. Les observations au microscope photonique semblent nous indiquer que nous nous situions plutôt dans le premier cas. Cette hypothèse sera néanmoins à affiner avec d'autres techniques d'analyses : microscope électronique à balayage, analyses de rugosité.

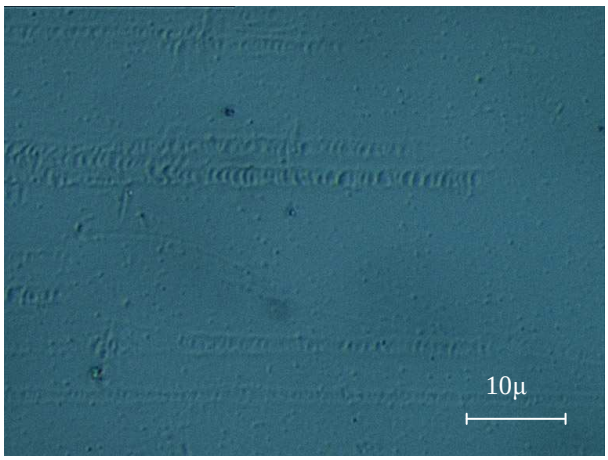


Figure 41 : Melinex vierge, x100

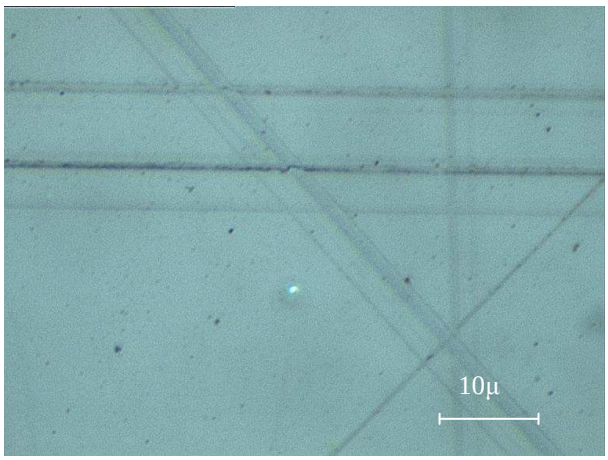


Figure 42 : Goodfellow vierge, x100

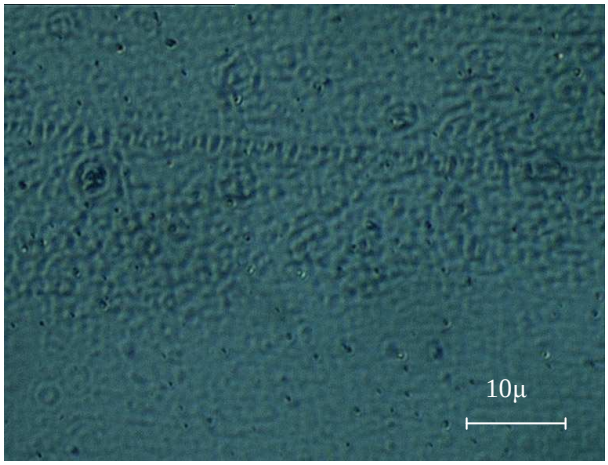


Figure 43 : Melinex 24mJ/cm², x100

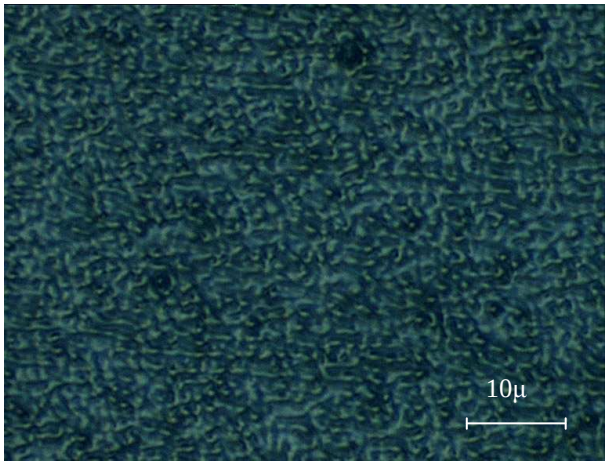


Figure 44 : Melinex 48mJ/cm², x100

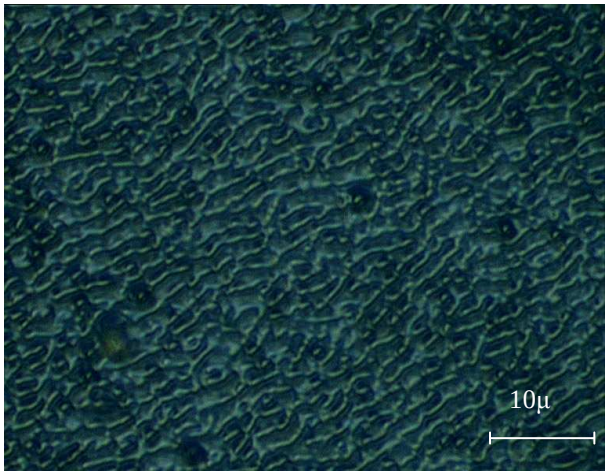


Figure 45 : Melinex 72mJ/cm², x100

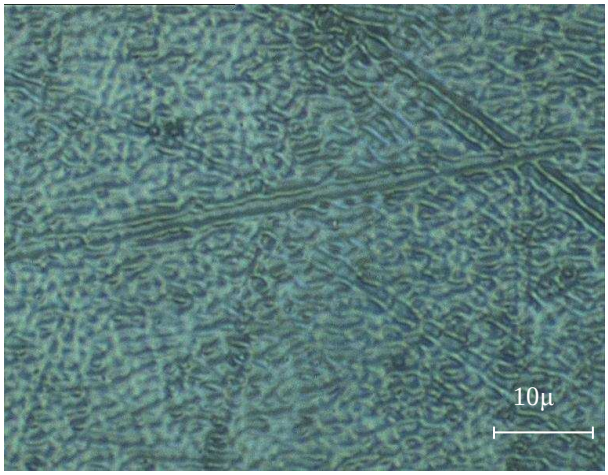


Figure 46 : Goodfellow 72mJ/cm², x100

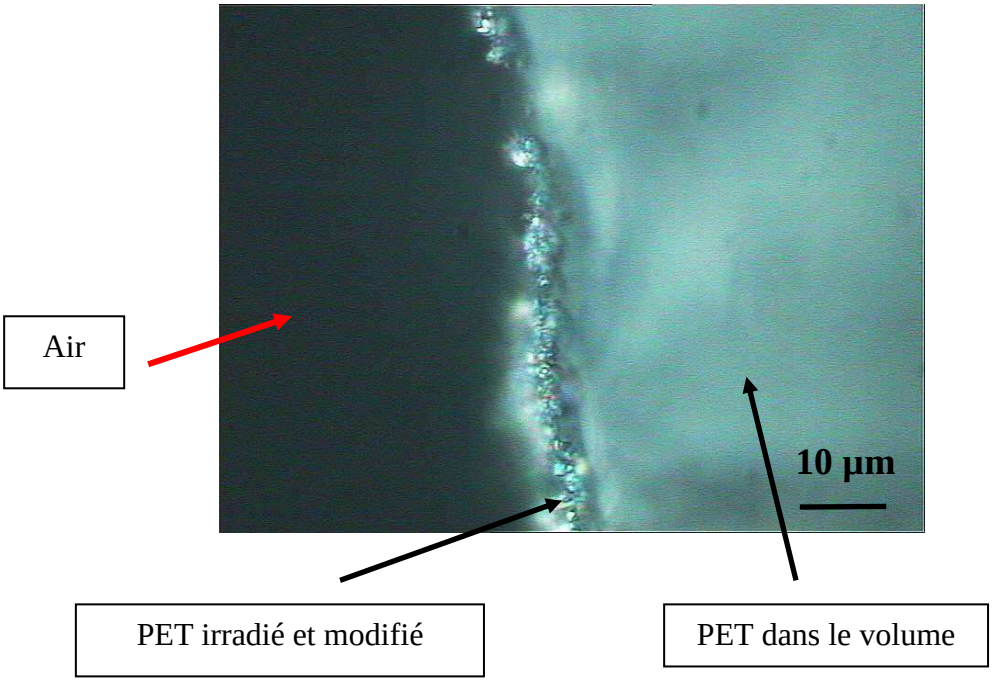


Figure 47 : Coupe transversale de Melinex® irradié à 72mJ/cm²

5.1.4. ANALYSES DE MOUILLABILITÉ

L'analyse de l'énergie de surface d'un biomatériau déterminera les possibilités d'adhésion cellulaire à la surface de celui-ci. Ce paramètre aura donc une répercussion sur les propriétés biologiques du biomatériau étudié.

En terme d'énergie de surface, il existe l'énergie libre de surface non polaire ou dispersive qui résulte des interactions de London et l'énergie de surface polaire résultant d'interactions du type dipôle-dipôle, dipôle induit et liaison hydrogène. Tous les matériaux comportent une composante dispersive mais pas obligatoirement une composante polaire. C'est cette dernière qui, si elle est présente, influencera le plus les capacités d'adhérence au matériau. Par exemple le PTFE, pour lequel la composante dispersive est prédominante, a de faibles propriétés adhésives. A l'opposé, les alliages ou les polymères présentant une composante polaire peuvent servir de support pour faire adhérer des cellules. C'est la composante dispersive qui permet un bon étalement mais la composante polaire est nécessaire pour permettre un bon accrochage sur le support.

Les mesures de tension de surface des différents PET sont réalisés à l'aide du logiciel Windrop®. Pour chaque échantillon, le logiciel détermine la moyenne et l'écart type des quinze mesures d'angle de goutte effectuées pour chaque solvant. Par souci de lisibilité des graphiques, l'écart type n'a pas été représenté sur ceux-ci, sachant que sur toutes les manipulations, il a toujours été égal à plus ou moins 1,5 degré. Pour illustrer cette manipulation, nous présentons les photographies de l'étalement d'une goutte d'eau sur le PET Goodfellow, respectivement à 12 et 120 mJ/cm² (Figures 48 et 49) : une évolution très nette de cet angle de goutte est observable.

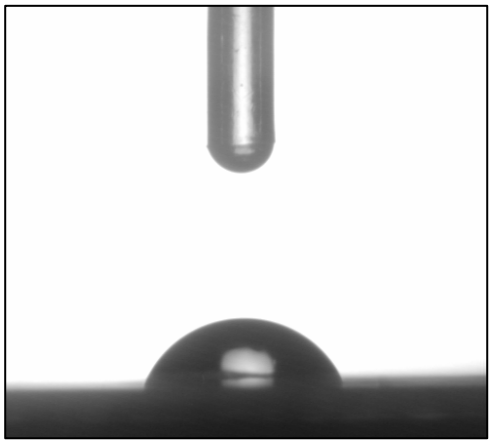


Figure 48 : Angle de goutte de l'eau (Goodfellow, 12 mJ/cm²)

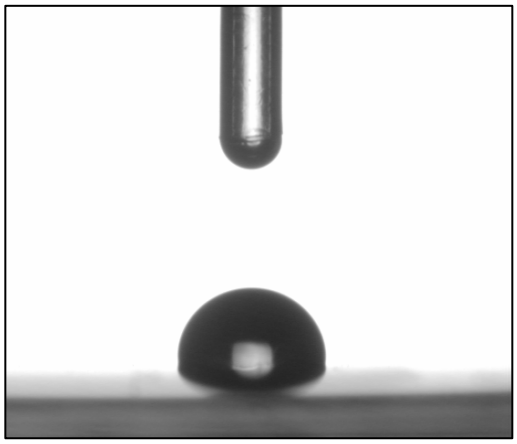


Figure 49 : Angle de goutte de l'eau (Goodfellow, 120 mJ/cm²)

Avec l'équation d'Owens-Wendt, l'énergie totale et ses composantes dispersive et polaire sont calculées à l'aide d'une droite de régression linéaire. Le logiciel fournit, en fin de manipulation, une feuille avec les résultats complets pour l'échantillon considéré. Lorsque l'énergie de surface totale du matériau augmente, celui-ci est dit plus hydrophile : sa mouillabilité est augmentée. L'intérêt de l'équation d'Owens-Wendt réside dans sa faculté à pouvoir dissocier les composantes dispersive et polaire du matériau, dont la somme est égale à l'énergie de surface totale. Ainsi l'utilité de connaître ces deux composantes permettra d'estimer les capacités d'étalement et d'accrochage des cellules sur les supports considérés.

5.1.4.1. Energie totale

La Figure 50 représente les résultats de l'évolution de la tension de surface de chaque PET en fonction de l'intensité de l'énergie d'irradiation. Pour chaque PET considéré, l'énergie de surface du matériau est augmentée, quel que soit le niveau d'irradiation, par rapport au même matériau vierge, confirmant ainsi les données de la littérature [27,48,49]. D'un point de vue individuel, il s'agit du Melinex® qui obtient, en tout point, les plus fortes valeurs d'énergie de surface. La différence entre la valeur la plus faible (44,6 mJ/m²) et la valeur la plus forte (50,4 mJ/m²) représente même un gain de 13%.

Pour chaque polymère étudié, l'augmentation de l'énergie de surface est importante au tout début de l'irradiation, puis évolue plus lentement. L'irradiation par LASER excimère produit des radicaux (formation de fonctions hydroperoxydes et hydroxyles) qui sont convertis en groupement hydrophiles au contact de l'air [48].

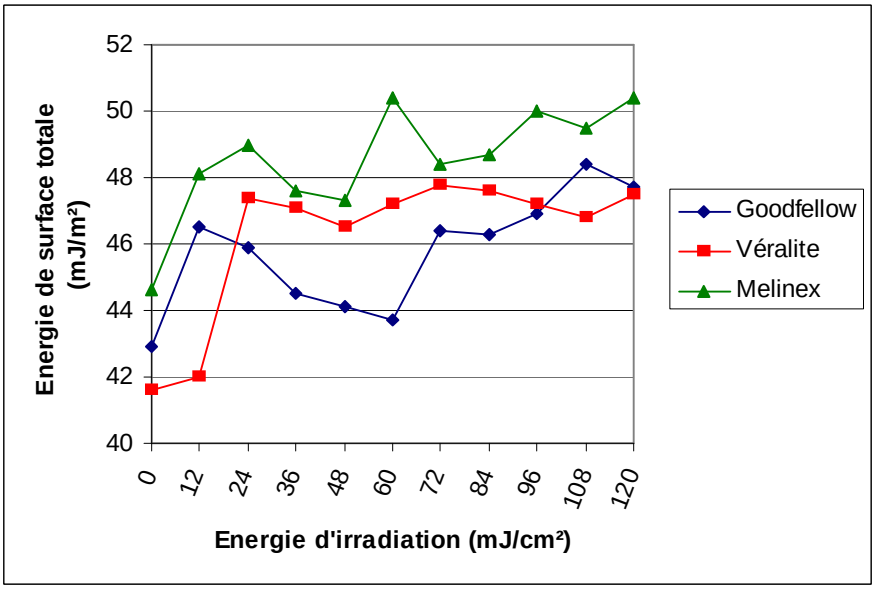


Figure 50 : Evolution de la tension de surface du PET en fonction de l'intensité de l'irradiation

5.1.4.2. Composante dispersive

La Figure 51 nous montre l'évolution de la composante dispersive de chaque polymère en fonction de la même gamme d'irradiation. Ici encore, la tendance est la même, et montre une propension à l'augmentation de cette variable. De ce fait, les liaisons de type hydrophobe se produisant entre ce type de matériau et les divers groupements ou molécules à greffer seront facilitées, ce qui permettra d'envisager des liaisons plus fortes.

Il est intéressant de noter à ce stade que cette composante dispersive soit augmentée bien que l'hydrophilie du matériau soit elle aussi plus élevée. En effet, ces deux critères ne sont pas antagonistes puisque l'énergie de surface totale est égale à la composante dispersive augmentée de la composante polaire.

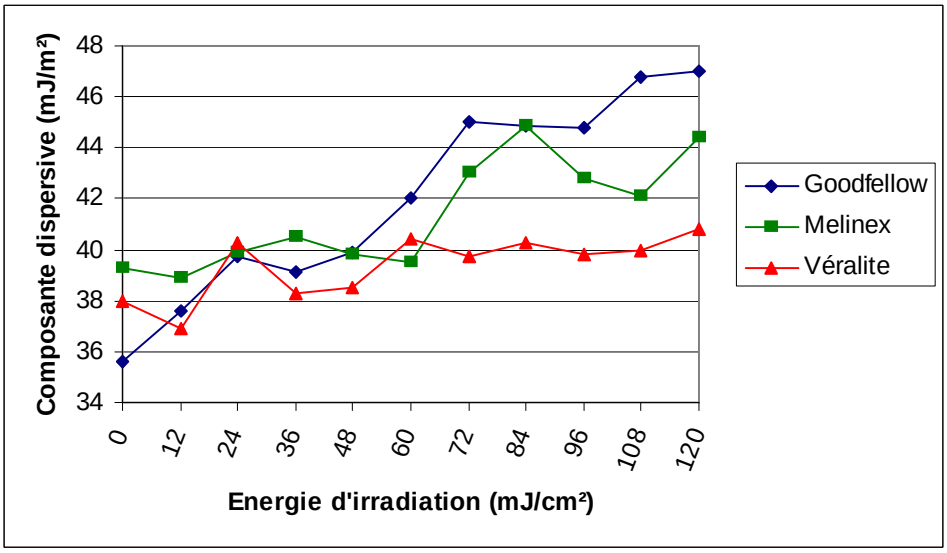


Figure 51 : Evolution de la composante dispersive de l'énergie de surface du PET en fonction de l'irradiation

5.1.4.3. Composante polaire

Finalement, c'est sans doute la composante polaire de l'énergie de surface qui a les variations les plus chaotiques, concernant notamment le Melinex® (Figure 52). De plus, les résultats sont différents sur les trois PET, ne permettant pas de dégager une conclusion commune pour ces trois matériaux. Une des explications qui peut être avancée concerne la différence de composition des trois matériaux.

En effet, les courbes montrent une tendance à l'augmentation de la composante polaire du PET pour le Véralite®, mais pas ou peu d'influence pour le Melinex®. Concernant le PET

de Goodfellow, la composante polaire est fortement diminuée avec l'intensité de l'irradiation, constat que l'on pouvait présumer à la vue des angles de goutte de l'eau présentés sur les Figures 48 et 49. Des trois PET étudiés ici, c'est celui qui présente la plus faible composante polaire après irradiation, alors qu'il a pourtant la plus élevée au départ. Un plus faible accrochage des cellules à la surface de ce matériau pourra donc être soupçonné lors des différents tests biologiques.

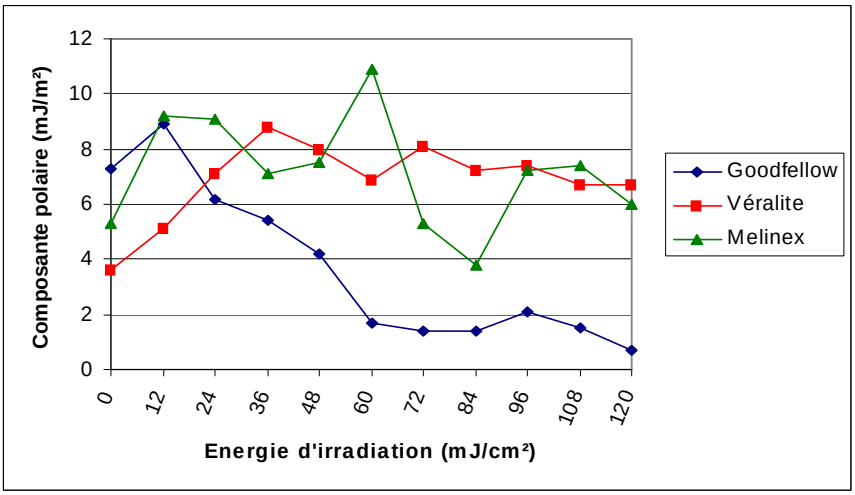


Figure 52 : Evolution de la composante polaire de l'énergie de surface du PET en fonction de l'irradiation

Enfin le dernier graphique a pour but de présenter en ordonnée le taux de la composante polaire rapporté à celui de la composante totale (Figure 53). En effet, comme nous l'avons vu, lorsque la composante polaire augmente, la composante totale augmente elle aussi. Il était donc intéressant de savoir comment évoluait, en pourcentage de la valeur totale, cette valeur de la constante polaire. Les courbes obtenues sont en fait identiques à celles représentant uniquement la composante polaire (Figure 52), ce qui nous indique que la valeur relative de cette composante suit la même évolution que la valeur brute.

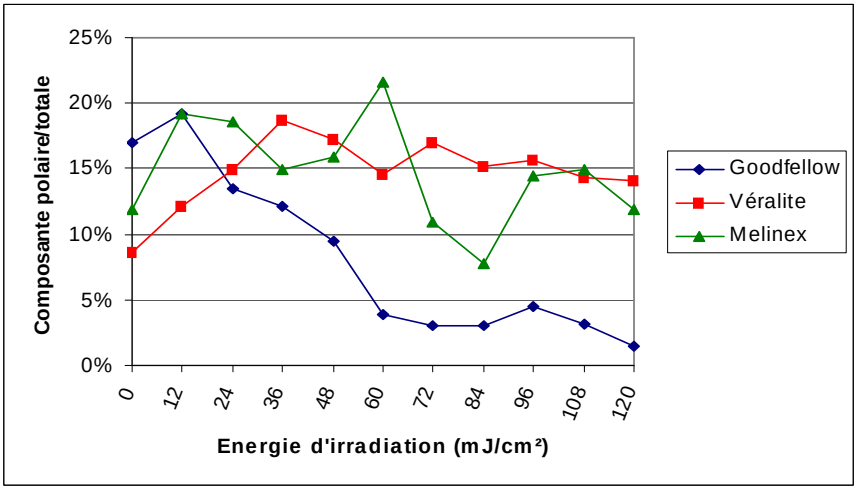


Figure 53 : Pourcentage de la composante polaire par rapport à l'énergie de surface totale du PET

5.1.5. TESTS DE CULTURE CELLULAIRE

5.1.5.1. Résultats du clonage

Le PET est un matériau dont la biocompatibilité est reconnue, puisqu'il est amplement utilisé en tant que biomatériau, concernant notamment les prothèses vasculaires. Cependant, dans cette utilisation particulière, il est employé sous sa forme tissée ou tricotée, c'est à dire sous forme de fils, et non sous forme de plaque. Il paraissait donc intéressant de vérifier l'absence de cytotoxicité de ce matériau sous cette forme particulière. Pour cela, nous avons utilisé une poudre provenant du cryo-broyage du Melinex® (cf. § 4.7.2).

Les résultats sont sans équivoque et montrent un taux de survie des cellules en présence de PET supérieur à 90 %, et ceci quelle que soit la concentration utilisée (Tableau 9 et Figure 54). En revanche pour le Nickel, la survie est inférieure à 50 % dès 50 µg/mL, démontrant la toxicité de ce métal.

Concentration	Survie Relative / témoin									
µg/ml	Cl1	Cl2	Cl3	Cl4	Cl5	Cl6	Cl7	Cl8	**Poudre PET**	**SD**
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	**100 %**	0%
200	103%	101%	102%	95%	99%	94%	87%	85%	**96 %**	4 %
400	107%	95%	95%	79%	92%	91%	85%	88%	**92 %**	9 %

Tableau 9 : Résultats des huit clonages exprimés en pourcentage par rapport au témoin

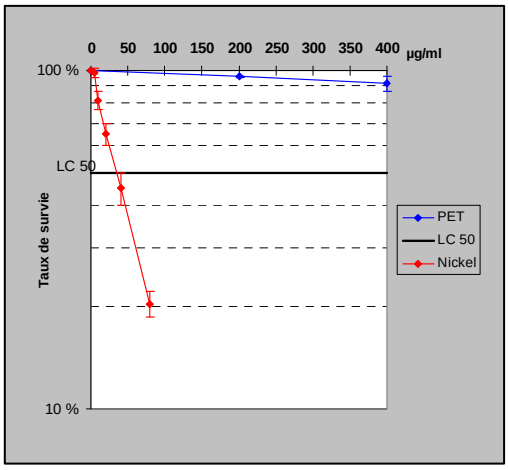


Figure 54 : Résultat du clonage sous forme graphique, comparé au Nickel comme témoin négatif (L132, n=8)

5.1.5.2. Prolifération cellulaire

5.1.5.2.1. Résultats

Les résultats des proliférations effectuées sur les trois PET sont proposés sur les Figures 55 à 57. Ils reflètent la moyenne des six expérimentations pour les trois polymères.

Concernant le PET de Goodfellow, les effets de l'irradiation sur les cellules sont légers, puisque les résultats restent toujours proches de 100 %. Cependant, côté positif, on peut également conclure que l'irradiation ne provoque pas d'effets délétères sur ces mêmes cellules. Les barres d'erreur liées aux six manipulations sont un peu importantes, et peuvent s'expliquer par des ajouts de matières ignifuges que nous avons retrouvées sur la fiche technique du matériau. De toute évidence, nous ne connaissons pas la nature de ces matières, ni surtout leurs répercutions possibles après une irradiation par LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde.

Concernant le Véralite®, le constat est à peu près le même, à ceci près que la prolifération est parfois moins bonne suite à une irradiation. D'autre part, les barres d'écart type sont relativement importantes, indiquant une surface à l'aspect moins homogène du point de vue physico-chimique et surtout une faible reproductibilité des résultats. L'interprétation probable de ce phénomène réside dans la composition du Véralite® qui nous est inconnue : il est possible que le passage au LASER libère ponctuellement certains composés non biocompatibles. En outre, la topographie de la surface après irradiation montre le moins de variations en microscopie photonique, et peut également expliquer l'aspect de ces résultats.

Enfin le Melinex® est de loin celui qui donne les meilleurs résultats de prolifération : pour tous les niveaux d'irradiation la prolifération moyenne est améliorée par rapport au témoin, et nettement plus encore par rapport au PET vierge. Cette tendance est nettement visible sur la Figure 57, laquelle révèle des barres d'erreur bien moins importantes que sur les deux autres PET. L'homogénéité et la reproductibilité des résultats ne fait donc aucun doute avec ce type de matériau. De plus, ce graphique nous révèle une augmentation de la prolifération cellulaire directement liée à l'intensité de l'irradiation : en effet, plus l'énergie d'irradiation augmente, et plus les valeurs de prolifération sont élevées. Il est intéressant de remarquer la très bonne valeur de prolifération cellulaire à 12 mJ/cm². A cette valeur d'énergie, nous nous situons en dessous du seuil d'ablation du PET (36 mJ/cm²). Il n'y a donc pas de conséquences sur la topographie de la surface, et pourtant la prolifération est notablement augmentée. Deux raisons nous permettent d'expliquer les bons résultats à cette énergie d'irradiation : tout d'abord la chimie de surface. Après passage du faisceau LASER, la surface est devenue sensible à l'environnement, et a donc capté les molécules d'oxygène présentes dans l'air, favorables au comportement cellulaire (cf. §2.6.2 et §2.6.3.2). Comme l'avaient démontré Curtis et Wilkinson en 1997 [51], nous sommes dans un cas de figure où la

chimie de surface joue un rôle prépondérant sur sa topographie. La deuxième raison est l'augmentation notable de l'énergie de surface du matériau dès cette première valeur d'énergie d'irradiation (Figure 50, p.79), permettant un meilleur étalement et une meilleure adhésion des cellules.

Pour l'ensemble des autres valeurs d'irradiation, des inter-combinaisons complexes des données de chimie de surface, de topographie, de rugosité et de mouillabilité expliquent l'augmentation constante des valeurs de prolifération cellulaire. Il est cependant intéressant de constater que la propension du Melinex® à montrer un taux de prolifération amélioré avec l'intensité de l'irradiation peut être approximativement comparée à l'évolution de la tension de surface du PET irradié (Figure 58). Plus l'énergie de surface du polymère est élevée, et donc plus il est hydrophile, et plus la prolifération est améliorée. Il convient toutefois de ne pas oublier que tous les autres paramètres cités en début de ce paragraphe interviennent également chacun à leur propre niveau.

Le Melinex® est un matériau garanti sans additif par DuPont Teijin Films ™. Il nous montre donc parfaitement l'intérêt de choisir minutieusement tout matériau avant une expérimentation : des trois polymères testés dans cette partie, il se détache nettement des deux autres par la qualité de ses résultats.

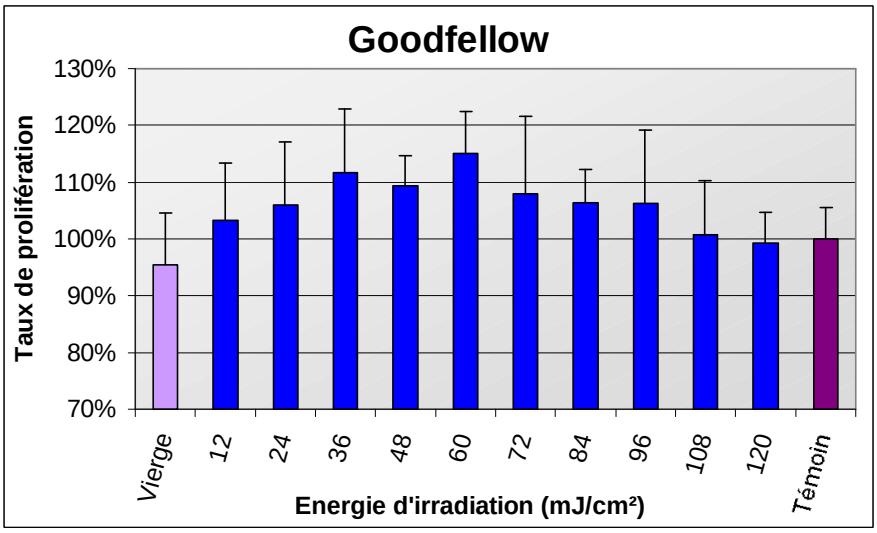


Figure 55 : Prolifération à 6 jours de cellules L132 sur Goodfellow en fonction de l'irradiation (n=6)

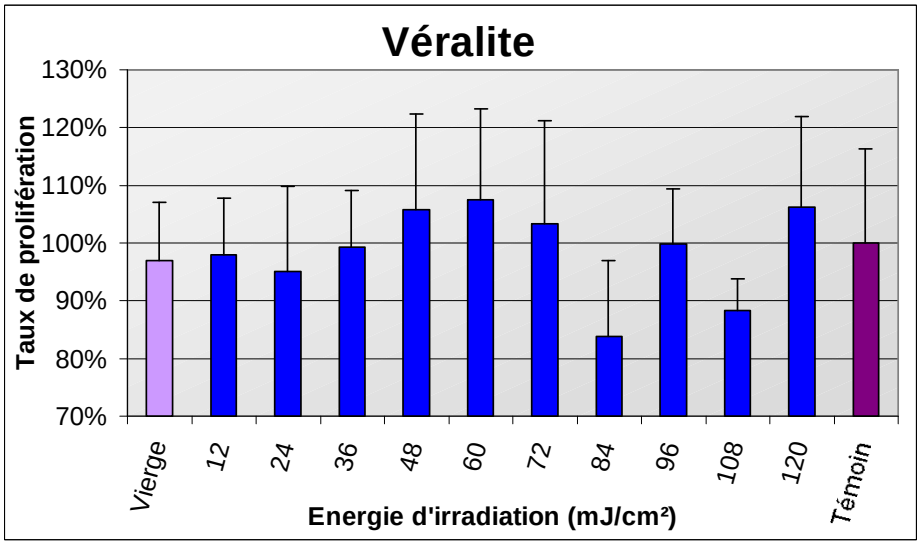


Figure 56 : Prolifération à 6 jours de cellules L132 sur Véralite® en fonction de l'irradiation (n=6)

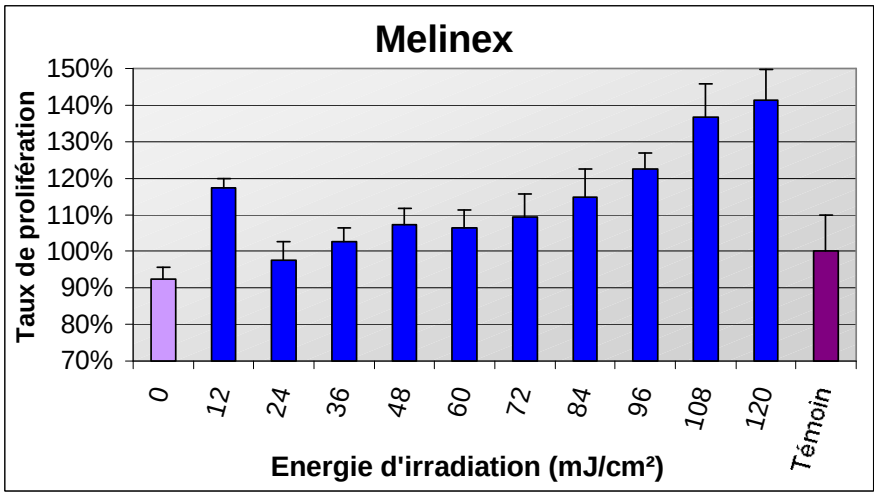


Figure 57 : Prolifération à 6 jours de cellules L132 sur Melinex® en fonction de l'irradiation (n=6)

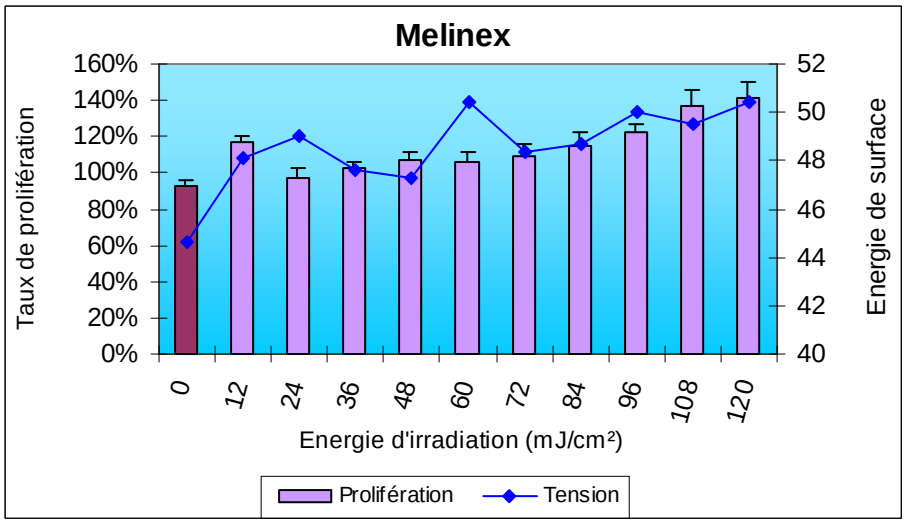


Figure 58 : Evolution comparée du taux de prolifération à 6 jours de cellules L132 et de la tension de surface du Melinex®

5.1.5.2.2. Indice de corrélation

Un indice de corrélation a été calculé entre la valeur de l'énergie d'irradiation et le résultat de la prolifération pour les trois PET. Il varie entre -1 et +1, et se définit ainsi : proche de +1, il signifie qu'une forte corrélation existe entre les deux séries de données. Voisin de zéro, il montre qu'aucune relation n'existe, et proche de -1 il indique que la corrélation entre les deux séries est inversement proportionnelle. Il est accompagné de son coefficient de détermination (R^2), égal au carré du coefficient de corrélation, qui peut être interprété comme la proportion de la variance de *y* imputable à la variance de *x*. C'est à dire que plus les deux séries de données sont liées, plus l'indice est proche de 1. Le Tableau 10 résume les résultats. Ceux-ci montrent indiscutablement que le Melinex® répond le mieux aux variations des intensités d'irradiation, avec un indice de corrélation de 0,874 et un coefficient de détermination de 0,763. Au contraire le R^2 du Véralite®, particulièrement proche de zéro, nous montre l'absence totale de lien existant entre l'énergie du LASER et les résultats de prolifération cellulaires.

	Goodfellow	Véralite®	Melinex®
Indice de corrélation (R)	0,465	- 0,044	0,874
Indice de détermination (R^2)	0,216	0,002	0,763

Tableau 10 : Indices de corrélation et détermination entre la prolifération et l'énergie d'irradiation

La Figure 59 illustre un exemple de tracé de courbe de tendance concernant les résultats de la prolifération sur le Melinex®. Hormis les deux points à 12 et 96 mJ/cm², tous les autres sont fortement rapprochés de la droite. Sans ces deux points décalés, l'indice de détermination R^2 serait même supérieur à 0,9 !

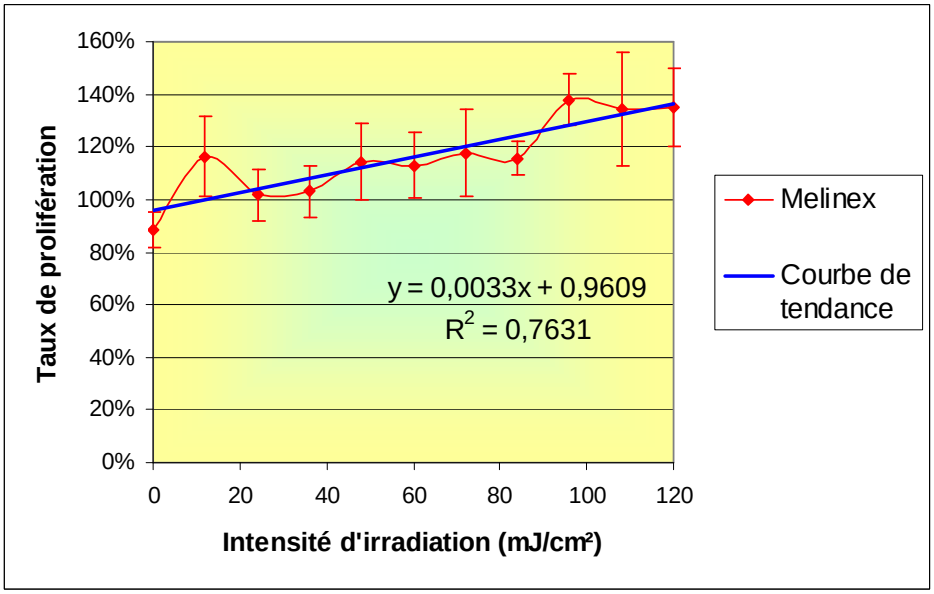


Figure 59 : Courbe de tendance relative à la prolifération sur Melinex®

5.1.5.3. Vitalité cellulaire

Le réactif Bleu Alamar (Interchim) incorpore un indicateur de croissance colorimétrique et fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire. Le système comprend un indicateur de l'oxydation / réduction qui devient fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique du milieu de culture. Cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité cellulaire. L'indicateur du taux d'oxydo-réduction relatif au métabolisme cellulaire indique des changements clairs et stables.

5.1.5.3.1. Résultats

Concernant les résultats de la vitalité cellulaire à proprement parler, ils ont été regroupés sur un seul graphique pour les trois PET sur la Figure 60. En effet, l'impact de l'irradiation sur la vitalité cellulaire semble assez proche pour les trois polymères : une légère amélioration se produit avec le traitement de surface par rapport au matériau vierge, et plus encore par rapport au témoin. Comme pour les résultats de prolifération cellulaire, le témoin a été ramené à 100% afin de faciliter la lecture du graphique.

Ainsi, ces résultats prouvent l'impact favorable du traitement LASER sur la vitalité cellulaire. En effet, malgré le fait que l'expérimentation ait été menée dans la plus difficile des configurations pour les cellules (six jours de culture sans renouvellement du milieu, donc sans réapprovisionnement de nutriments), la Figure 60 montre une vitalité cellulaire légèrement améliorée. Pourtant les cellules, d'autant plus nombreuses, disposent de moins de « carburant » pour leur métabolisme. Un temps de culture moins important ou un renouvellement du milieu à mi-parcours permettrait certainement d'obtenir des résultats encore meilleurs.

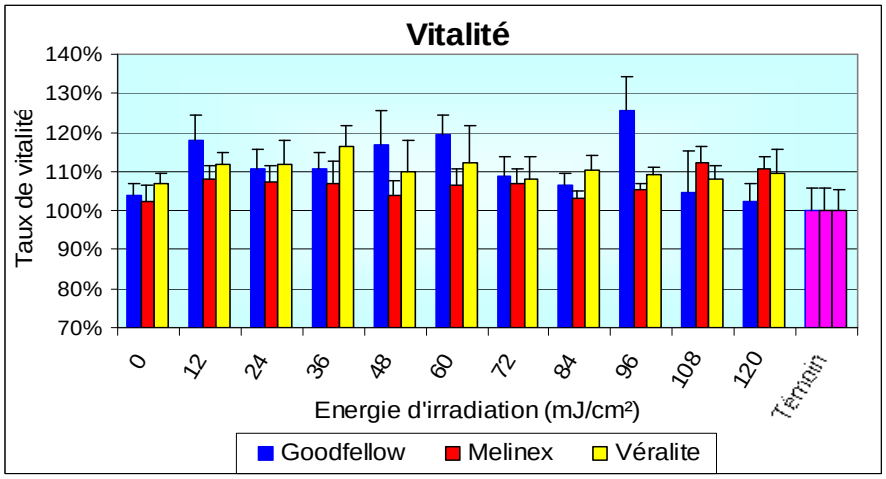


Figure 60 : Vitalité comparée des cellules L132 cultivées 6 jours sur les 3 PET par rapport au témoin (n=6)

5.1.5.3.2. Indice de corrélation

De même que pour la prolifération cellulaire, un indice de corrélation et un coefficient de détermination ont également été calculés pour la vitalité cellulaire (Tableau 11). Ils confirment que la réponse des trois PET aux variations de l'intensité d'irradiation n'est pas hautement significative dans ce domaine. Ici encore, il s'agit cependant du Melinex® qui répond le mieux aux changements de l'intensité d'irradiation en terme de corrélation avec un indice de 0,573 (soit $R^2 = 0,328$).

	Goodfellow	Véralite®	Melinex®
Indice de corrélation (R)	0,05	- 0,268	0,573
Indice de détermination (R^2)	0,002	0,072	0,328

Tableau 11 : Indices de corrélation et détermination entre la vitalité et l'énergie d'irradiation

5.1.5.4. Observations au MEB

Après avoir évalué les prolifération et vitalité cellulaires, nous avons observé l'impact d'une irradiation LASER sur la morphologie cellulaire. Rappelons que les cellules observées sont des L132, après 3 jours de culture sans renouvellement du milieu.

Une observation sur une surface vierge du Melinex® montre des cellules correctement étalées, avec toutefois quelques signes de décollement probablement liés au laps de temps passé sans renouvellement du milieu (Figure 61). Sur une surface irradiée à 12 mJ/cm², les résultats sont différents : on observe des connections intercellulaires (Figure 63). En outre, un grossissement plus important nous permet de voir une surface cellulaire plus complexe et plus développée, signe de vitalité accrue (Figure 62 et Figure 64). Ces cellules ont développé de plus nombreuses micro-villosités, ainsi que de larges lamellipodes. Dans ce cas, nous pouvons remarquer que la morphologie cellulaire passe d'un grade 1 à un grade 2, voire même grade 3, dans la classification de Dewez [44] développée au paragraphe 2.6.3, p.21.

A forte intensité, il est très intéressant de voir l'aspect transformé de la surface, sur laquelle le passage du LASER est bien visible (Figure 65). Les cellules n'ont cependant pas souffert d'une intensité si élevée, puisqu'elles gardent le même aspect que sur le matériau vierge. Elles sont néanmoins moins structurées qu'à de plus faibles énergies, et ne montrent pas de tendance à s'orienter préférentiellement dans aucune direction. Ces résultats corroborent ceux de Yu *et al.* [57] qui avaient noté qu'en comparaison avec des cellules HPF (*Human Pulmonary Fibroblast*) ensemencées sur des reliefs en ligne, les cellules déposées sur des reliefs en forme de plots ne montraient aucune direction spécifique, mais étaient plutôt orientées aléatoirement à l'instar des cellules ensemencées sur le polymère vierge. Enfin, la Figure 66 montre le PET Goodfellow traité à 120 mJ/cm² : des rayures sont toujours visibles sur le matériau, qui pourraient éventuellement influer le comportement cellulaire : les cellules semblent s'aligner le long des trajets ainsi créés [86]. L'état de surface de ce matériau, imparfait au départ, n'est donc pas amélioré par le traitement LASER lorsque les rainures sont trop profondes.

Figure 61 à Figure 66 : Micrographies de cellules L132 à différents grossissements, après trois jours de culture cellulaire.

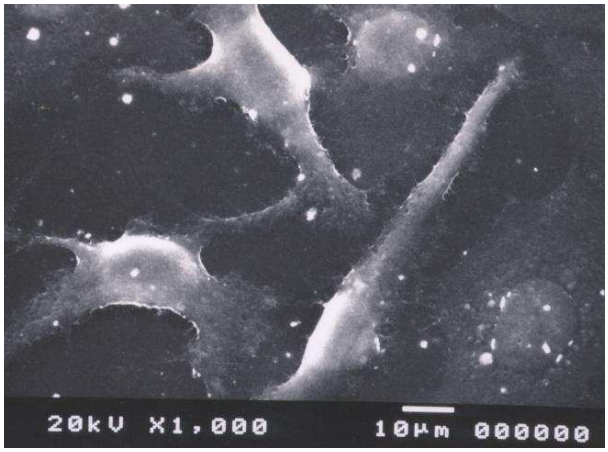


Figure 61 : Melinex® vierge

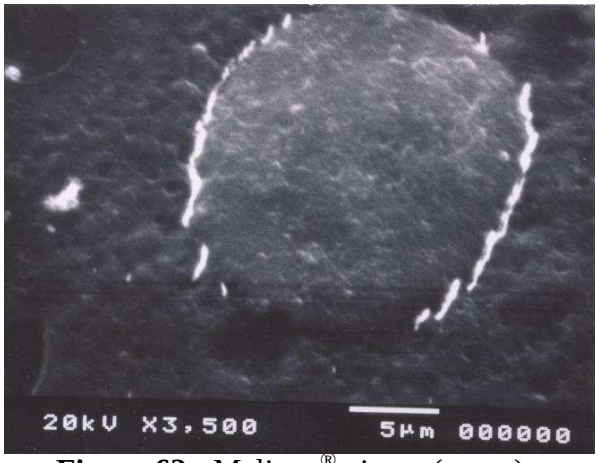


Figure 62 : Melinex® vierge (zoom)

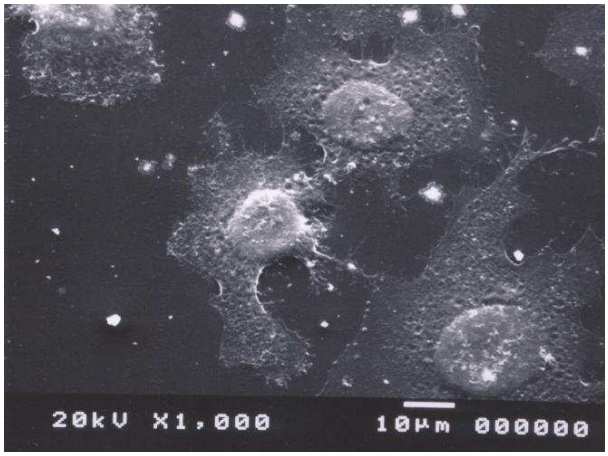


Figure 63 : Melinex® 12mJ/cm²

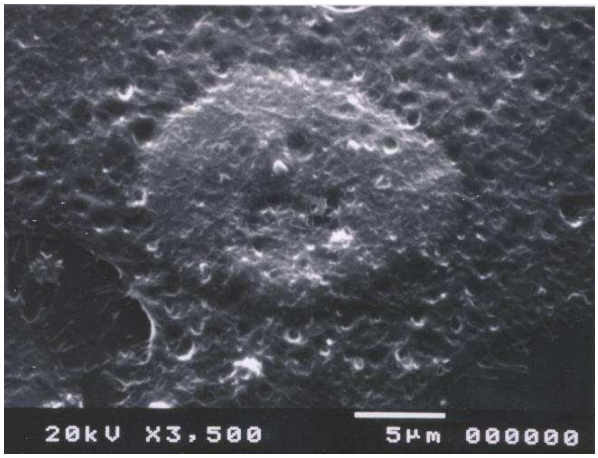


Figure 64 : Melinex® 12mJ/cm² (zoom)

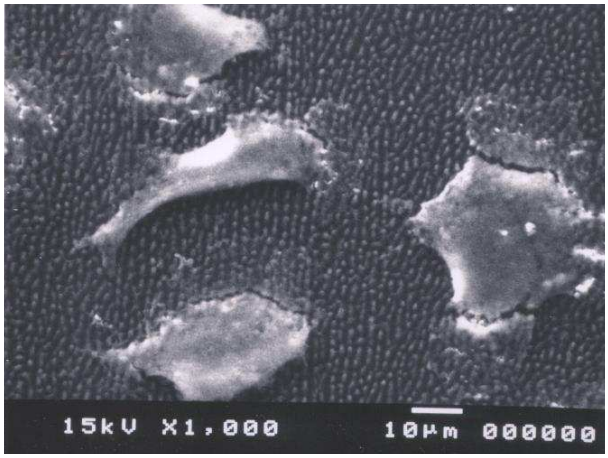


Figure 65 : Melinex® 96mJ/cm²

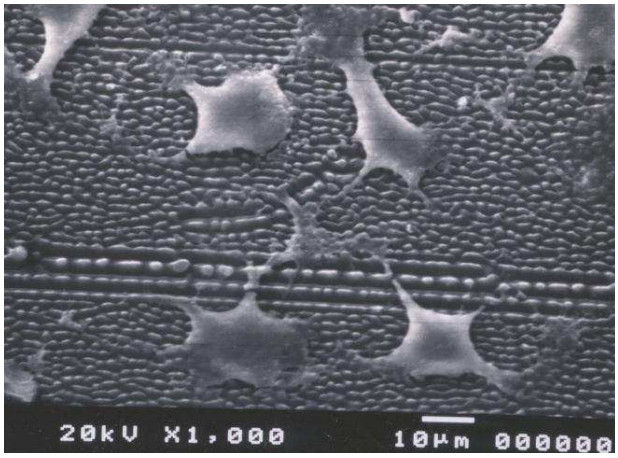


Figure 66 : Goodfellow 120mJ/cm²

5.1.6. CONCLUSION SUR LE CHOIX DU PET

L'idée de cette première partie est de comparer les résultats d'une série d'irradiations, effectuées le même jour et dans les mêmes conditions, sur trois marques de PET différentes, hypothèse qui n'avait jamais été mise en œuvre auparavant. Les conclusions sont intéressantes et montrent bien l'intérêt de choisir méticuleusement les matériaux destinés aux expérimentations scientifiques. En effet, ce premier chapitre nous a permis de révéler l'influence que la composition chimique initiale et les propriétés physiques d'un même polymère, le PET, pouvaient avoir sur les modifications physico-chimiques dues au traitement LASER. La connaissance de ces paramètres est essentielle pour effectuer raisonnablement le choix d'un film de PET en vue d'applications bio-médicales, choix qui était au contraire fait de façon arbitraire jusqu'à présent [27,28,8,40,41,54,59,82,87,88,89]. En effet, aucune de ces études n'avait jamais évalué les conséquences de l'impact LASER sur différents substrats, dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, dans cette première partie, nous présentons des résultats biologiques complets, en relation avec des résultats physico-chimiques, plutôt que de simples estimations d'ordre qualitatif ou semi-qualitatif [28].

Les mesures des profondeurs d'ablation sur les trois PET nous ont permis de conclure à des seuils d'ablation différents pour les trois polymères, conduisant ainsi à des comportements différents de ces substrats en réponse à une même énergie d'irradiation appliquée. Les photographies prises en microscopie optique démontraient un état de surface similaire entre le Goodfellow et le Melinex®, mais l'état de surface du Véralite® restait inchangé quelle que soit l'intensité de l'impact LASER. Ce résultat est expliqué par la faible cristallinité du Véralite®, mesurée par DSC, faisant suspecter que le processus d'irradiation puisse générer un film liquide de faible viscosité à la surface du PET, lequel se re-solidifierait à l'issue du traitement [90]. Ce faible taux de cristallinité est en outre assez éloigné de celui des prothèses vasculaires, quasi cristallines.

Ainsi le Véralite® semble procurer les moins bonnes propriétés physico-chimiques des trois polymères étudiés : sa composition chimique est inconnue, présentant des additifs ignorés tels que de la calcite ou de l'aragonite que nous avons pu détecter. De plus la composante dispersive de son énergie de surface varie peu, ne favorisant donc pas l'étalement des cellules. Enfin comme nous le disions, son état de surface reste inchangé malgré l'application du traitement LASER. Sans véritable surprise, les résultats biologiques se montrent similaires aux propriétés physico-chimiques, c'est à dire modestes et faiblement reproductibles. La composition exacte du Véralite® nous étant inconnue, il est possible que le passage au LASER libère certains composés non biocompatibles. Cette hypothèse serait à vérifier avec des méthodes de caractérisation chimique de surface (infrarouge, XPS). Enfin ce PET d'origine industrielle, voué à des applications industrielles, ne présente donc sûrement pas la même rigueur de fabrication que ses deux autres concurrents.

Le PET de Goodfellow présente un problème majeur : Goodfellow est une entreprise de vente de métaux et de matériaux pour la recherche et l'industrie, à un degré de pureté plus ou moins poussé. Cependant, cette entreprise se procure ces matériaux chez différents fournisseurs, suivant l'évolution du marché. Nous ne sommes donc pas sûrs de pouvoir à nouveau nous réapprovisionner dans les mêmes conditions dans les années à venir. Pourtant, il est particulièrement important de sélectionner des matériaux parfaitement connus et surtout faisant l'objet d'une marque déposée, garante d'une fiabilité dans les méthodes de fabrication. Cette garantie permet d'éviter d'aboutir à des résultats inexplicables hérités de conditions expérimentales mal définies [91].

D'autre part, une analyse minutieuse de la fiche de caractérisation du PET fourni par Goodfellow nous a permis de trouver des ajouts de matières ignifuges dans sa composition. Ce constat n'est pas de bon augure, car Lippert *et al.* [92] avaient montré qu'une petite quantité d'additifs ajoutés au PET pouvait modifier grandement le phénomène de l'ablation LASER. En effet, les additifs possèdent généralement des coefficients d'absorption plus élevés, ainsi qu'une plus basse stabilité thermique et photonique. Le PET de Goodfellow n'est donc pas non plus pur, le faisant s'éloigner lui aussi de la composition des prothèses vasculaires, bien que les tests cellulaires ne semblent pas en souffrir. Ces résultats biologiques ne concluent cependant pas à l'utilité de réaliser une irradiation de surface en vue d'améliorer les propriétés de biocompatibilité du matériau : en effet, la courbe de prolifération cellulaire ne montre qu'une faible tendance à l'augmentation du nombre total de cellules après six jours de mise en culture. Enfin, la présence de nombreuses rayures à la surface de ce PET est inopportune pour les tests que nous réalisons : le comportement cellulaire risque d'être influencé par la disposition de ces défauts incontrôlables [35,51,86].

En ce qui nous concerne, nous poursuivrons dorénavant cette étude avec le Melinex®, de DuPont Teijin Films ™, qui présente plusieurs avantages sur ses concurrents : son épaisseur et sa composition sont identiques aux prothèses vasculaires, et il provient du même fournisseur que les prothèses vasculaires en Dacron®. Ce PET est sans rayures, plan, et garanti sans additif : il est de pureté biomédicale. Enfin il présente les résultats les plus probants vis-à-vis des comportements cellulaires, et surtout avec le meilleur indice de corrélation. Différentes raisons peuvent expliquer ces bons résultats : l'augmentation de la tension de surface du PET, l'apparition d'une rugosité à la surface du matériau, ou encore la propreté sans reproches du matériau irradié. Ce dernier paramètre a été confirmé par les observations en microscopie photonique, mais surtout sur les micrographies au MEB : les surfaces des différents PET sont très propres après le traitement LASER, quelque soit l'énergie appliquée, et aucun débris n'a jamais été retrouvé sur la surface. Enfin la chimie de surface joue très probablement un rôle sur ces bons résultats, tests que nous mettrons en œuvre dans la deuxième partie de cet exposé. Nous pressentons néanmoins d'ores et déjà cette amélioration, au regard de la différence des résultats biologiques obtenus sur le PET de

Goodfellow et sur le Melinex®. En effet ces deux polymères présentent une augmentation de mouillabilité, une rugosité accrue, une surface très propre et pourtant les résultats de prolifération cellulaire sont dissemblables, différence certainement expliquée par les variations de la chimie de surface entre ces deux matériaux. Cette observation montre avec force que ce sont des combinaisons complexes des différents paramètres physiques et chimiques qui contribuent à une interaction optimisée entre la surface du matériau et le biosystème, et qu'un seul de ces paramètres considéré isolément ne serait pas suffisant à lui seul pour expliquer l'amélioration des résultats biologiques obtenus sur la surface du Melinex®.

Une fois le polymère choisi grâce à de tels critères objectifs, il nous est maintenant possible de faire varier les paramètres d'irradiation sans avoir à réaliser les expériences en triple exemplaire à chaque fois. Les premiers résultats obtenus dans cette partie sont prometteurs. Le seuil d'ablation du Melinex® est conforme aux données de la littérature [29,37,39], et les conséquences de l'irradiation sont déjà bien visibles à l'œil nu et au microscope. De plus, le lasage ne modifie pas les propriétés mécaniques du matériau, et peut donc être utilisé sans crainte de ce point de vue. Nous allons donc maintenant étudier l'impact que peuvent avoir quatre autres types de LASERS sur les propriétés biologiques du Melinex®.

5.2. CHOIX DU LASER

Après avoir sélectionné le Melinex® comme étant le meilleur PET, capable d'imiter au mieux le comportement d'un biomatériau, nous allons maintenant tester différents types de LASERS dans le but de choisir le plus efficace dans la perspective qui nous anime, à savoir l'augmentation de la biocompatibilité du polyéthylène téréphthalate. Deux grandes catégories de LASERS ont été sélectionnées : les LASERS excimères et les LASERS YAG. Ces appareils ont été utilisés à cinq longueurs d'onde différentes, à savoir :

- YAG 1064 nm
- YAG 532 nm
- YAG 266 nm
- Excimère 193 nm
- Excimère 248 nm

L'avantage des LASERS excimères réside dans leur faculté à laisser une surface très propre après traitement [35], ils ne dégradent pas les propriétés mécanique du matériau et constituent une technique rapide, souple, biocompatible et reproductible (§ 2.5.1). Les LASERS YAG possèdent les mêmes propriétés, et présentent en plus l'avantage d'être beaucoup plus accessibles pour le monde industriel où ils sont moins chers à l'achat et à l'entretien. Enfin, ce sont des LASERS à solide qui ne nécessitent pas l'utilisation de gaz dangereux à l'inverse des LASERS excimères (LASERS à Krypton / Fluor ou Argon / Fluor selon la longueur d'onde).

Les résultats présentés dans cette seconde partie concerneront à la fois des tests physico-chimiques et des tests biologiques. Les expérimentations les plus courantes ont été systématiquement réalisées quel que soit le type de LASER (à savoir mesures de rugosité et de mouillabilité pour la partie physico-chimique ; prolifération, vitalité et adhésion cellulaire pour la partie biologique). Les expériences plus exigeantes telles que le marquage immunocytochimique ou le calcul de la chimie de surface par XPS ont été réservées au LASER présentant les meilleurs résultats biologiques.

Animé par le souci de pouvoir comparer facilement les LASERS entre eux, nous avons décidé de fixer tous les paramètres d'irradiation, pour ne faire varier que l'intensité de l'énergie d'irradiation, exprimée en mJ/cm². Les différents traitements LASERS ont donc tous été réalisés en atmosphère ambiante, par balayage de la surface du PET à une vitesse de 2 mm/s, avec un nombre de coups par unité de surface égal à 10 et une fréquence de 10 Hz (Tableau 5, p.45). De la même façon, concernant les réglages d'intensité de l'énergie utilisée, nous avons essayé chaque fois que possible de répéter les mêmes valeurs entre les différents LASERS. Cependant, en fonction du type de LASER utilisé, il n'était pas toujours possible de monter à la même valeur maximale d'énergie (Tableau 5).

5.2.1. LASER YAG 1064 nm

5.2.1.1. Rugosité

Les mesures de rugosité ont été effectuées avec le profilomètre Taylor Hobson Précision. Comme le montre la Figure 67, la rugosité du PET irradié par LASER YAG n'est pas affectée par le traitement de surface. En effet, celle-ci reste constante aux environs de 0,007 µm (soit 7 nm).

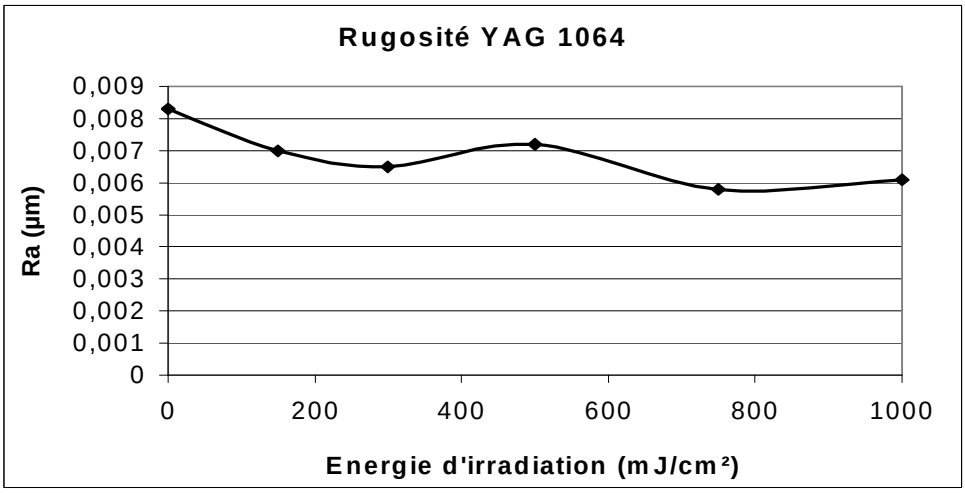


Figure 67 : Rugosité due au traitement LASER (YAG 1064 nm)

5.2.1.2. Mouillabilité

De même que pour la rugosité, les mesures de mouillabilité effectuées avec cinq solvants différents montrent l'absence d'évolution significative de l'énergie de surface du PET suite à un traitement par LASER YAG 1064 nm (Figure 68).

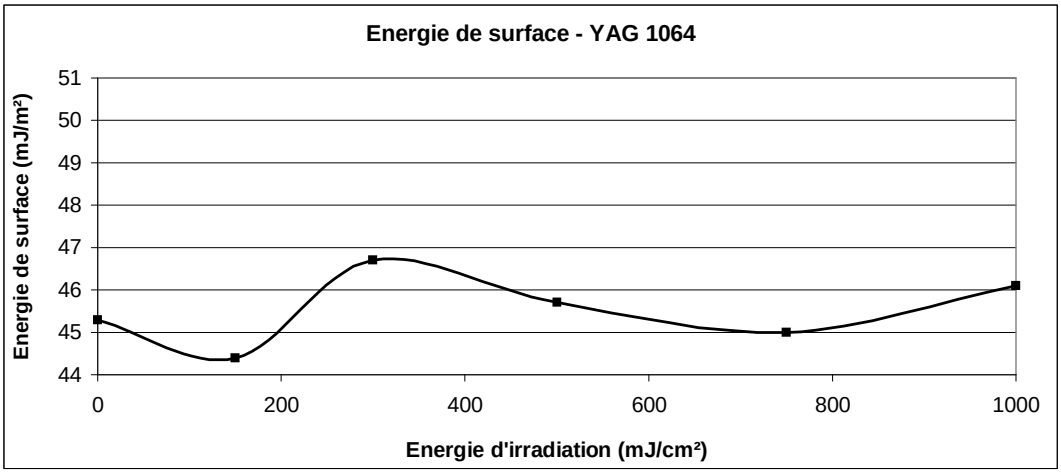


Figure 68 : Energie totale du Melinex® après irradiation au LASER YAG 1064 nm

5.2.1.3. Prolifération et vitalité cellulaires

Les graphiques présentés ci-après montrent les résultats biologiques en terme de vitalité et de prolifération cellulaire obtenus après 3 jours et 6 jours de culture cellulaire, sans renouvellement du milieu de culture. Ces résultats ne montrent pas d'effet favorable sur le comportement cellulaire d'un traitement par LASER YAG 1064 nm. Au contraire, le bilan biologique semble montrer un effet préjudiciable du traitement LASER sur les cellules, puisque la prolifération cellulaire aussi bien que la vitalité diminuent par rapport au PET non irradié (Figures 69 et 70).

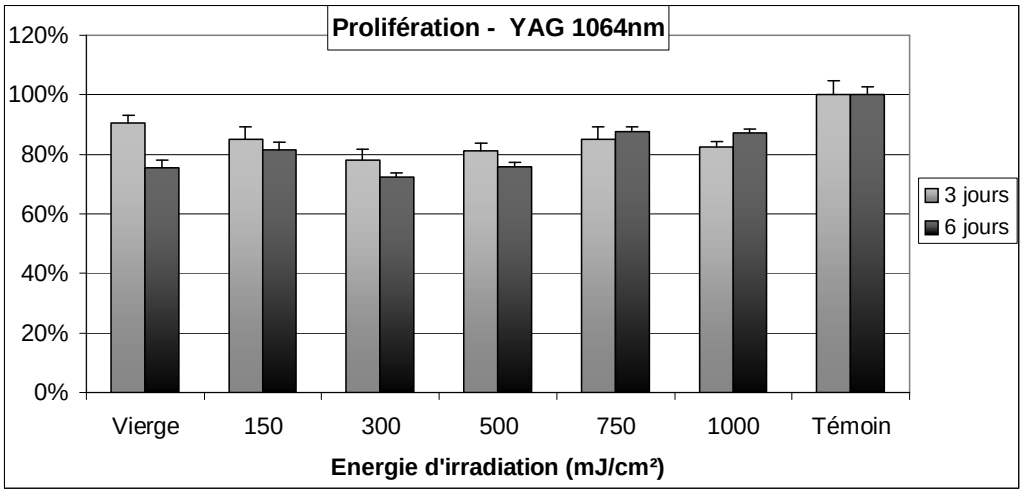


Figure 69 : Prolifération cellulaire après irradiation par LASER YAG 1064 nm (L132, n=4)

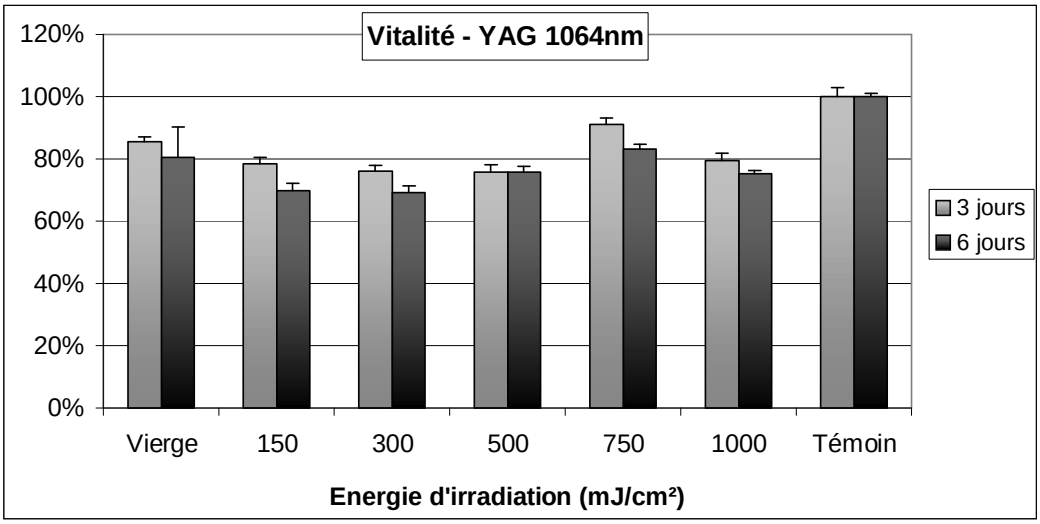


Figure 70 : Vitalité cellulaire après irradiation par LASER YAG 1064 nm (L132, n=4)

5.2.1.4. Adhésion cellulaire

Contrairement aux prolifération et vitalité cellulaires qui peuvent durer jusqu'à six jours, les mesures d'adhésion cellulaire se font sur 30, 60 et 120 minutes. Une éventuelle surface défavorable du matériau a donc moins le temps de se faire ressentir au niveau cellulaire. C'est ce que l'on peut voir sur la Figure 71 qui ne nous montre aucune différence entre le matériau vierge et les matériaux irradiés à différentes intensités. L'effet d'une irradiation par LASER YAG 1064 nm n'est donc ni bénéfique, ni néfaste, en terme d'adhésion cellulaire immédiate.

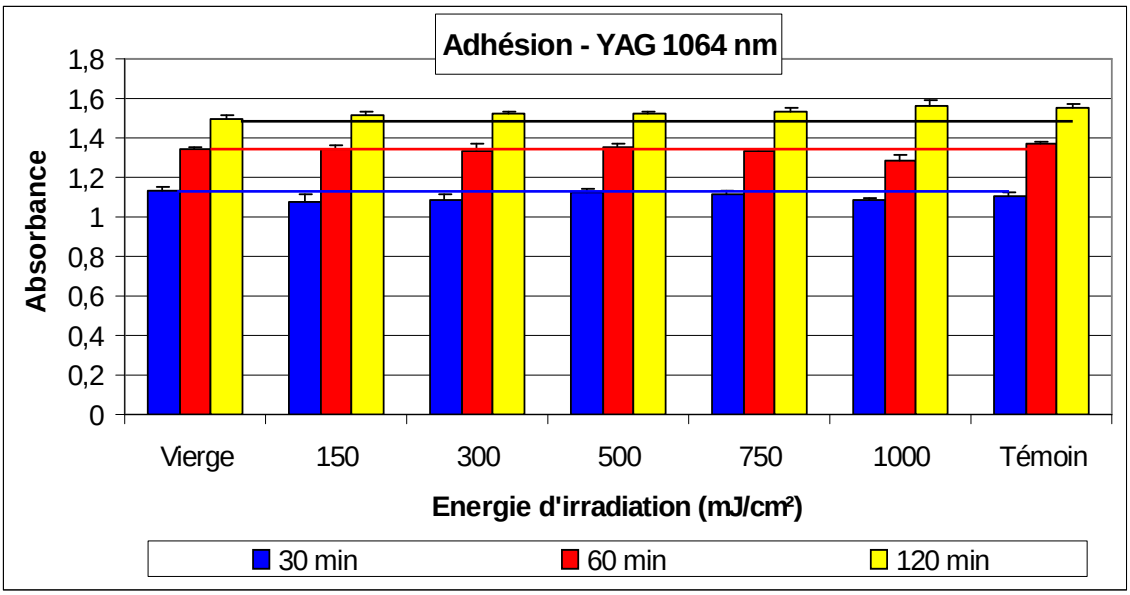


Figure 71 : Adhésion cellulaire après irradiation par LASER YAG 1064 nm (L132, n=4)

5.2.1.5. Conclusion sur le LASER YAG 1064 nm

Au vu des résultats biologiques présentés ci-avant, l'irradiation du PET par LASER YAG 1064 nm ne présente pas d'effet bénéfique sur les comportements cellulaires. Son utilisation ne sera donc pas prorogée dans le projet qui nous intéresse.

5.2.2. LASER YAG 532 nm

5.2.2.1. Rugosité

Les résultats de rugosité obtenus avec le LASER YAG 532 nm sont similaires à ceux obtenus avec le LASER YAG 1064 nm, c'est-à-dire que l'on ne dénote pas d'effets dus à l'irradiation, avec une rugosité de surface moyenne qui oscille autour de 6 nm (Figure 72).

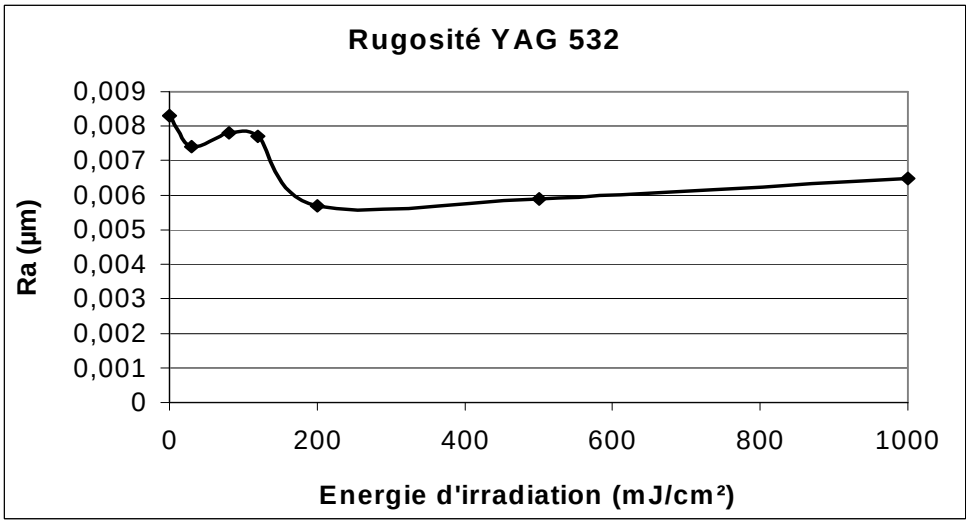


Figure 72 : Rugosité due au traitement LASER (YAG 532 nm)

5.2.2.2. Mouillabilité

Pour la mouillabilité comme pour la rugosité, les résultats entre les deux LASERS YAG à 532 nm et 1064 nm sont assez semblables, puisque ici non plus il n'est pas mis en évidence de différence notable avant ou après traitement LASER (Figure 73).

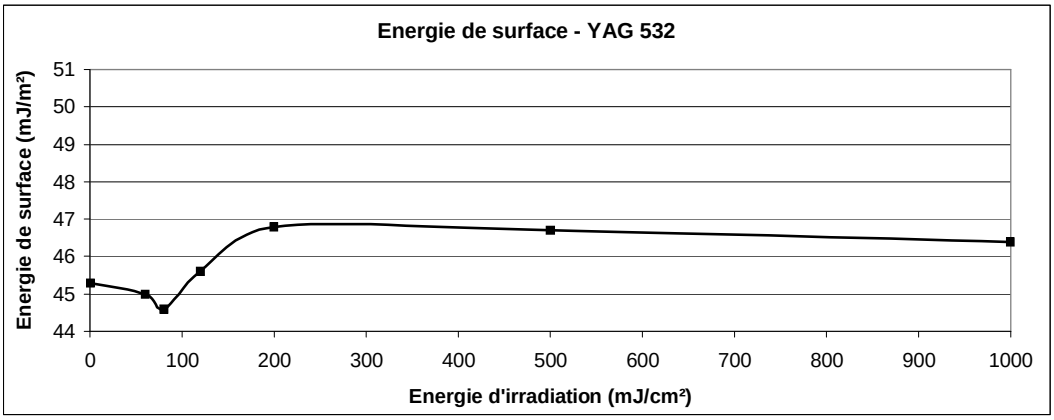


Figure 73 : Energie totale du Melinex® après irradiation au LASER YAG 532 nm

5.2.2.3. Prolifération et vitalité cellulaires

Pour les tests biologiques comme pour les tests physico-chimiques, les résultats entre le LASER YAG 532 nm et le LASER YAG 1064 nm sont très proches, puisqu'ils montrent ici encore une prolifération et une vitalité cellulaires diminuées par rapport au PET vierge de toute irradiation (Figures 74 et 75). Seule différence, les barres d'erreur assez importantes, puisque sensiblement égales à 20% du total, montrent la difficulté à obtenir des résultats homogènes entre les différentes séances avec ce LASER YAG 532 nm.

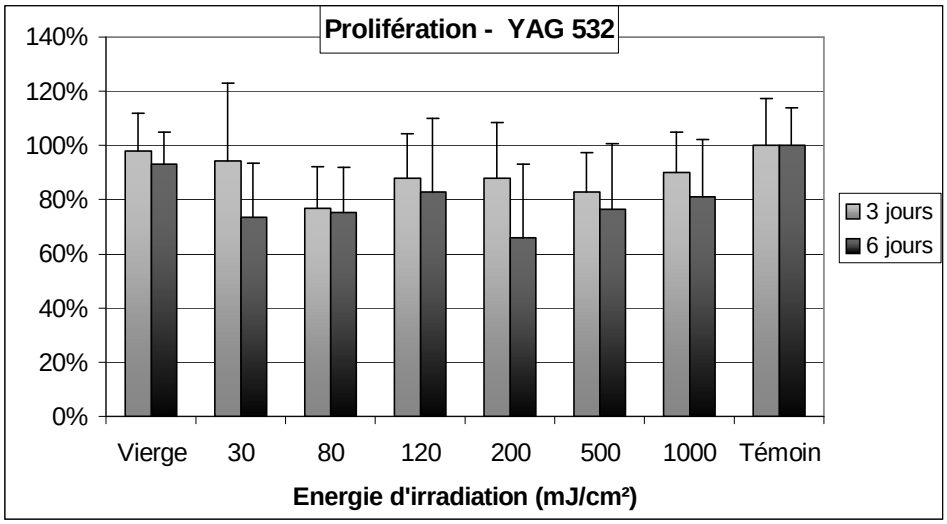


Figure 74 : Prolifération cellulaire après irradiation par LASER YAG 532 nm (L132, n=4)

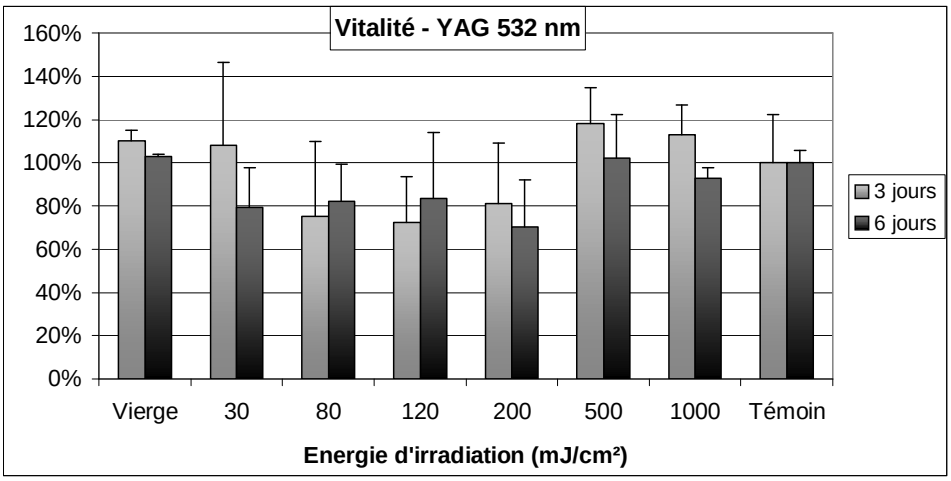


Figure 75 : Vitalité cellulaire après irradiation par LASER YAG 532 nm (L132, n=4)

5.2.2.4. Adhésion cellulaire

Pour faciliter la lecture du graphique et la comparaison des différentes valeurs, les résultats d'adhésion cellulaire sont présentés avec des traits reproduisant la valeur d'adhésion de l'échantillon vierge pour chaque durée déterminée (Figure 76). Ces résultats ne montrent pas d'effet significatif de l'irradiation par LASER YAG 532 nm sur l'adhésion cellulaire immédiate, ceci quelle que soit la durée de l'expérimentation.

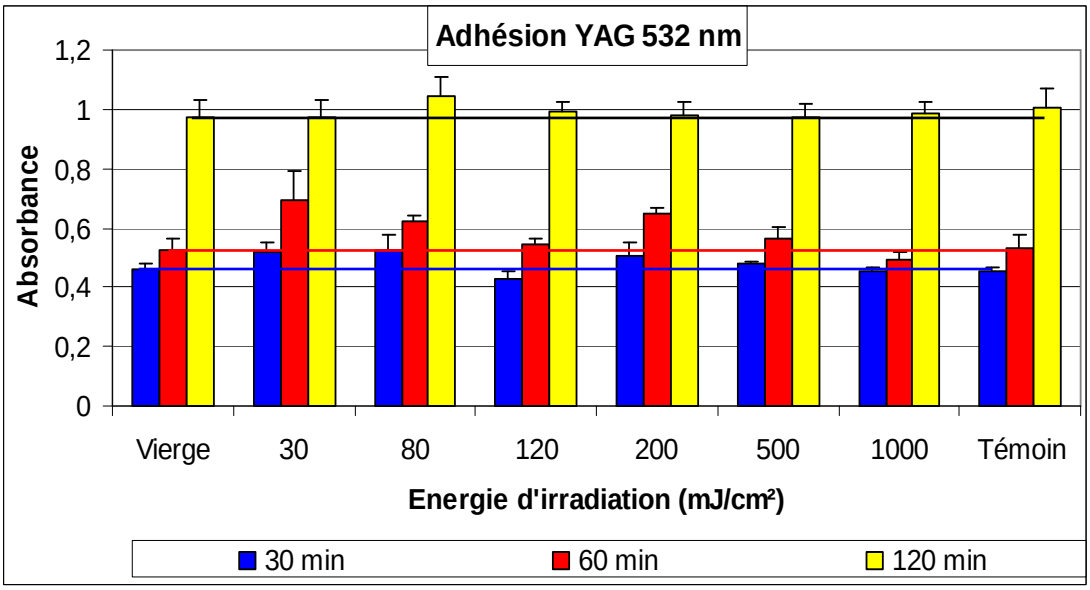


Figure 76 : Adhésion cellulaire après irradiation par LASER YAG 532 nm (L132, n=4)

5.2.2.5. Conclusion sur le LASER YAG 532 nm

Puisque les résultats biologiques obtenus avec le LASER YAG 532 nm ne montrent pas non plus d'amélioration du comportement cellulaire, son utilisation, comme celle du LASER YAG 1064 nm, ne sera pas prolongée dans le cadre du projet qui nous intéresse.

5.2.3. LASER YAG 266 nm

5.2.3.1. Rugosité

Contrairement aux deux précédents LASERS YAG, la rugosité est cette fois-ci augmentée corrélativement au traitement par LASER YAG 266 nm (Figure 77). Le Ra moyen est augmenté d'un facteur 10 pour une énergie d'irradiation de 200 mJ/cm², pour redescendre ensuite aux énergies plus élevées. Comme nous pouvons le remarquer sur ce graphique, l'énergie d'irradiation maximale que nous avons pu atteindre avec ce type de LASER est limitée à 270 mJ/cm².

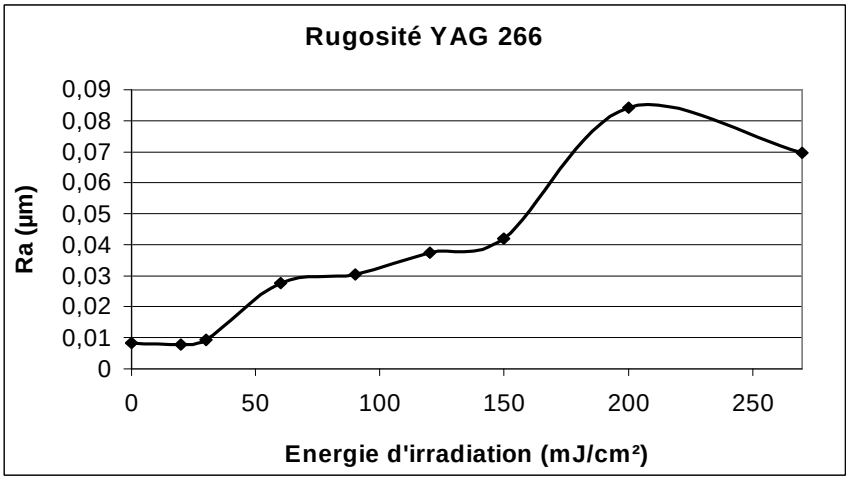


Figure 77 : Rugosité due au traitement LASER (YAG 266 nm)

5.2.3.2. Mouillabilité

La mouillabilité du Melinex® après traitement par LASER YAG 266 nm est augmentée dans un premier temps, avant de redescendre à un niveau inférieur à celui de départ pour les plus fortes énergies (Figure 78).

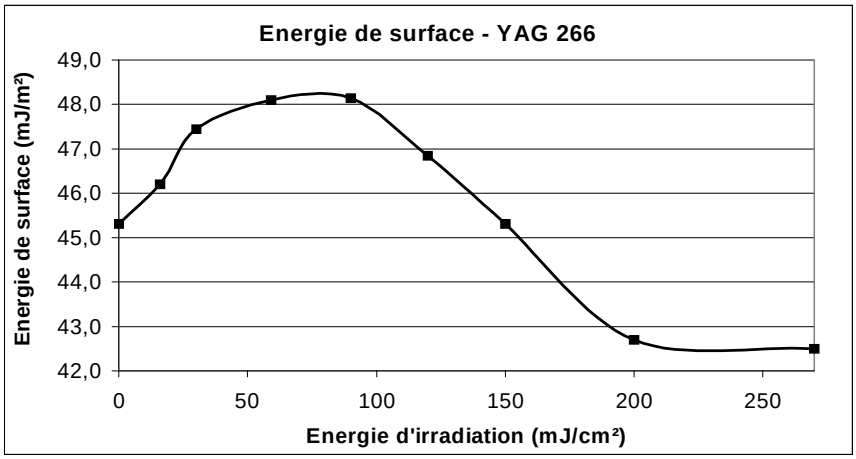


Figure 78 : Energie totale du Melinex® après irradiation au LASER YAG 266 nm

5.2.3.3. Prolifération et vitalité cellulaires

Les prolifération et vitalité cellulaires ne sont pas augmentées par un traitement par LASER YAG à 266 nm de longueur d'onde (Figures 79 et 80). Cette impression visuelle à la lecture du graphique, est confirmée par les tests statistiques. Concernant la prolifération cellulaire, il est intéressant de noter que la « courbe » de prolifération en fonction de l'énergie d'irradiation semble être inversement proportionnelle aux valeurs de l'énergie de surface totale du matériau (Figure 78). En effet, le maximum de convexité de la courbe de mouillabilité est situé aux environs de 60 mJ/cm², alors que c'est précisément la plus faible valeur de prolifération cellulaire.

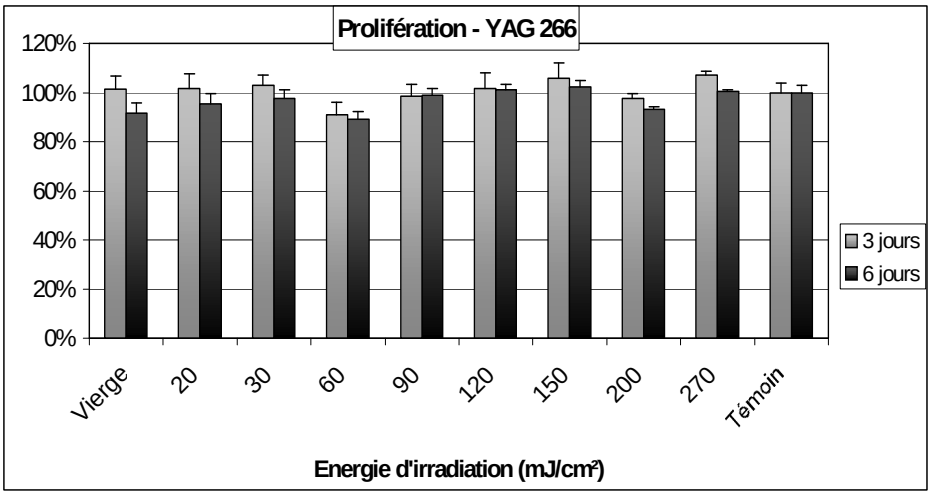


Figure 79 : Prolifération cellulaire après irradiation par LASER YAG 266 nm (L132, n=6)

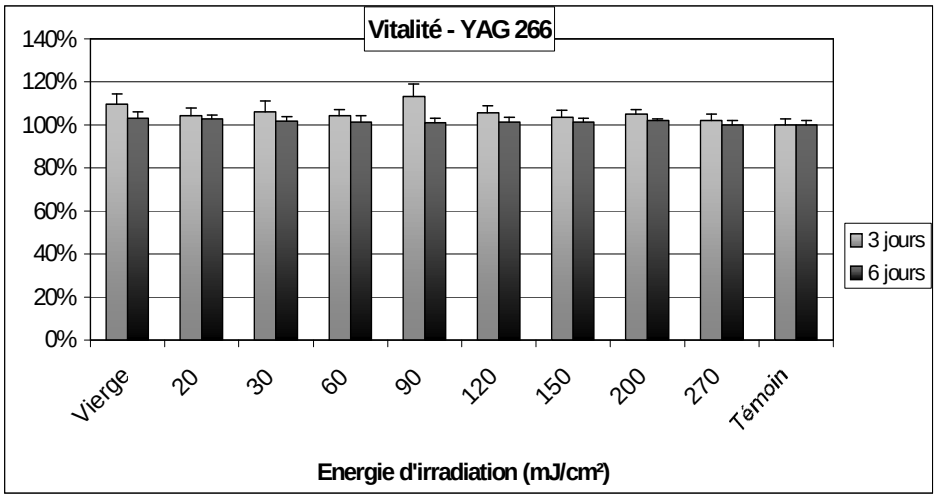


Figure 80 : Vitalité cellulaire après irradiation par LASER YAG 266 nm (L132, n=6)

5.2.3.4. Adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire n'est pas augmentée non plus par un traitement par LASER YAG 266 nm comme le montre la Figure 81. Au contraire, pour les valeurs situées à 30 min, il semblerait même que l'adhésion cellulaire ait tendance à être diminuée par l'irradiation.

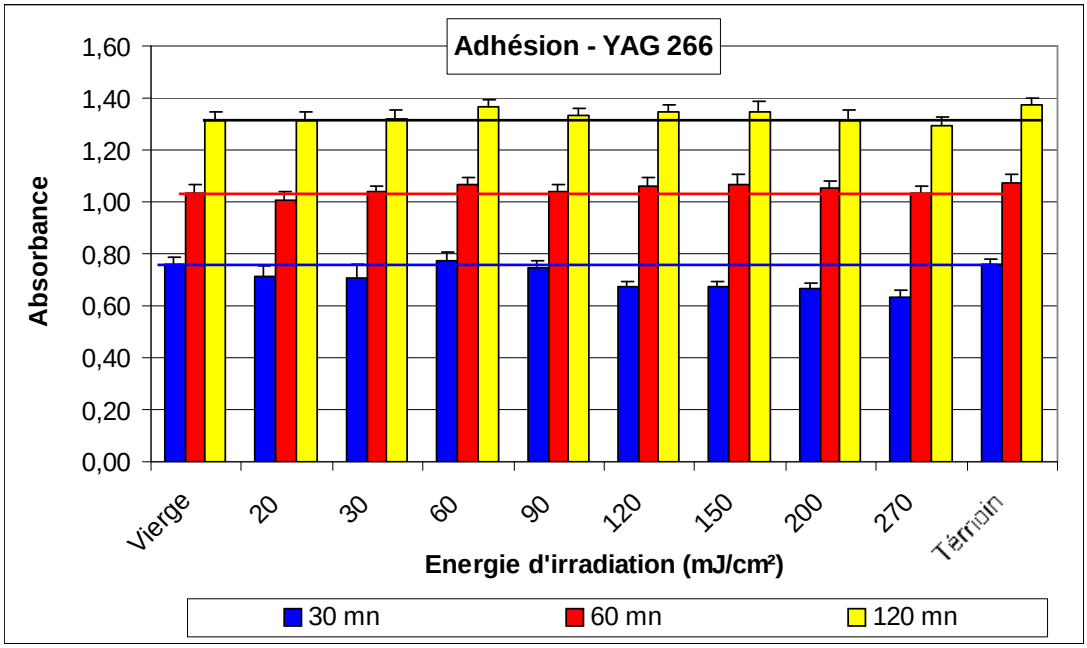


Figure 81 : Adhésion cellulaire après irradiation par LASER YAG 266 nm (L132, n=6)

5.2.3.5. Conclusion sur le LASER YAG 266 nm

Malgré un effet perceptible du traitement LASER sur les rugosité et mouillabilité du polyéthylène téréphthalate, les résultats biologiques ne sont pas convaincants. Ce LASER sera donc abandonné lui aussi pour la suite des travaux, tout comme les deux précédents LASERS YAG.

5.2.4. LASER EXCIMÈRE 193 nm

5.2.4.1. Rugosité

La rugosité de la surface du PET traité par LASER excimère à 193 nm de longueur d'onde montre d'abord une légère augmentation du Ra d'un facteur 4, avant de diminuer pour les plus fortes énergies (Figure 82). Une fois passée la valeur de 120 mJ/cm², la surface est vraisemblablement fondue par la puissante énergie distribuée par le faisceau LASER, puis, en se re-solidifiant, ne laisse qu'une faible ondulation de surface : le Ra se situe alors aux environs de 15 nm.

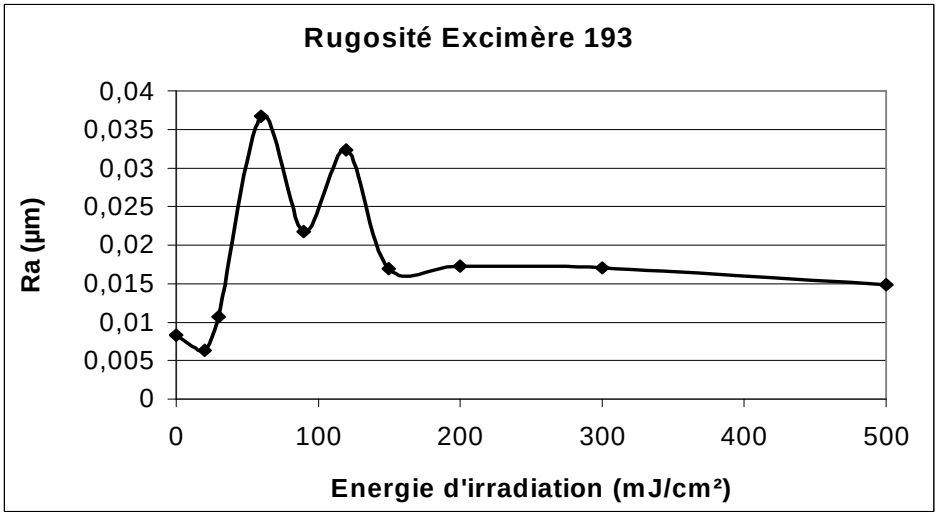


Figure 82 : Rugosité due au traitement LASER (Excimère 193 nm)

5.2.4.2. Mouillabilité

L'augmentation de mouillabilité obtenue sur le Melinex® suite à un traitement par LASER excimère à 193 nm de longueur d'onde est la plus importante de tous les LASERS (Figure 83). Il est cependant intéressant de noter, lors d'une analyse plus fine de ces résultats, que pour la plus grande valeur de mouillabilité (60 mJ/m² pour une irradiation LASER de 300 mJ/cm²), nous obtenons au contraire une valeur d'angle de goutte de l'eau très haute à 99,5°. A titre comparatif, pour le PET vierge, la valeur d'angle de goutte de l'eau se situe à 78,5°. Il en résulte une composante polaire de l'énergie de surface extrêmement faible, puisque égale à 0,2 mJ/m², donnant ainsi une composante dispersive égale à 58,8 mJ/m².

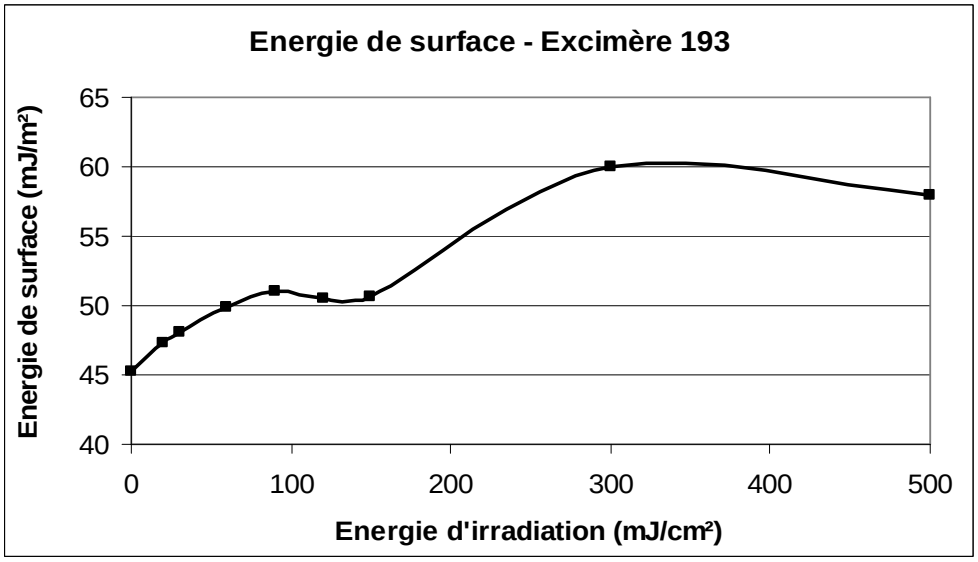


Figure 83 : Energie totale du Melinex® après irradiation au LASER Excimère 193 nm

5.2.4.3. Prolifération et vitalité cellulaires

Les résultats de prolifération cellulaire montrent cette fois-ci une tendance différente à 3 jours et à 6 jours. En effet après 3 jours de prolifération, la tendance est à la baisse puisque le taux de prolifération, pour les fortes énergies, descend à 80% par rapport au matériau vierge, avec de surcroît des écarts-types particulièrement importants (Figure 84). Ces résultats confirment l'impression laissée par l'angle de goutte de l'eau, très élevé à ces valeurs d'irradiation. Les cellules subissent donc la loi de l'hydrophobie de ce matériau fortement irradié. En revanche après 6 jours de culture cellulaire, l'effet est atténué puisque l'on retrouve des valeurs de prolifération proches du matériau vierge. Enfin le dernier enseignement fourni par cette figure concerne le bénéfice apporté par les différentes énergies fournies par le LASER. En effet, il n'est pas utile d'appliquer des énergies maximales, puisque au contraire la prolifération cellulaire est diminuée aux plus fortes énergies. Cependant, la Figure 85 nous montre que les cellules ne semblent pas souffrir de cette situation en terme de vitalité : les tests réalisés au Bleu Alamar ne montrent pas de changement significatif par rapport au témoin.

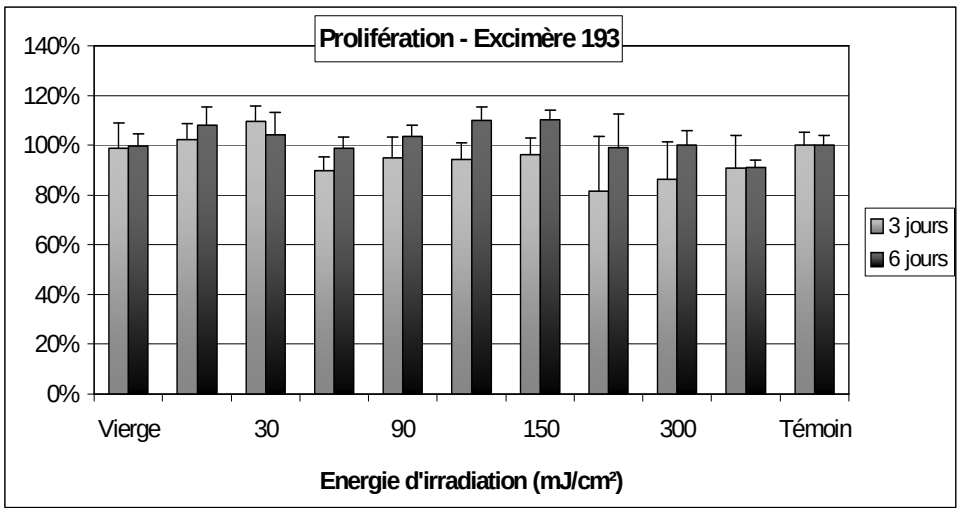


Figure 84 : Prolifération cellulaire après irradiation par LASER Excimère 193 nm (L132, n=6)

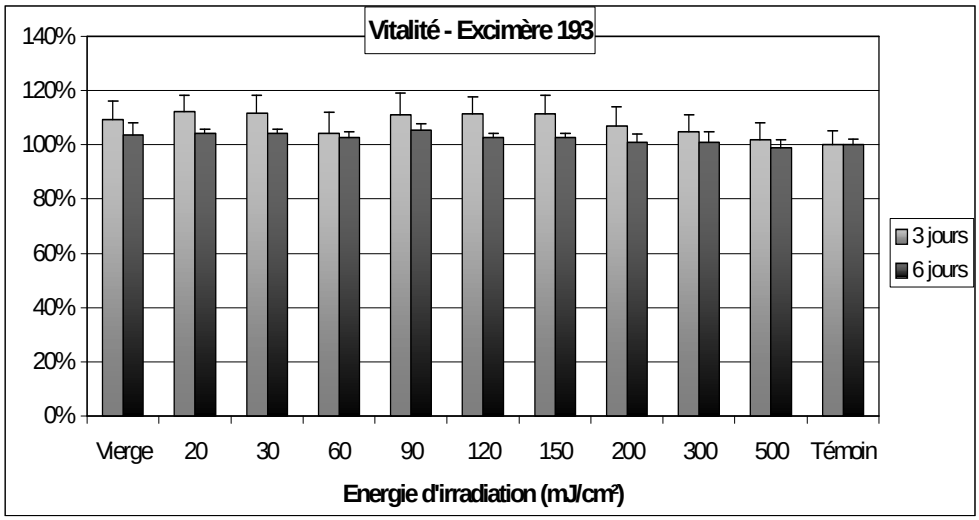


Figure 85 : Vitalité cellulaire après irradiation par LASER Excimère 193 nm (L132, n=6)

5.2.4.4. Adhésion cellulaire

Sur la Figure 86, il est intéressant de noter à quel point la courbe d'adhésion cellulaire ressemble à celle de l'énergie de surface. En effet, cette dernière nous montrait une double ascension que l'on retrouve, toutes proportions gardées, sur le graphique d'adhésion, quelle que soit la durée étudiée. Ce résultat est le plus visible après 60 minutes d'incubation, mais la tendance est la même pour les autres durées. Ici encore, du point de vue de l'adhésion cellulaire, nous constatons qu'il n'est pas utile de pousser l'irradiation LASER aux plus fortes énergies, puisque des valeurs moyennes de l'ordre de 60 mJ/cm² donnent d'aussi bons résultats que des valeurs beaucoup plus élevées.

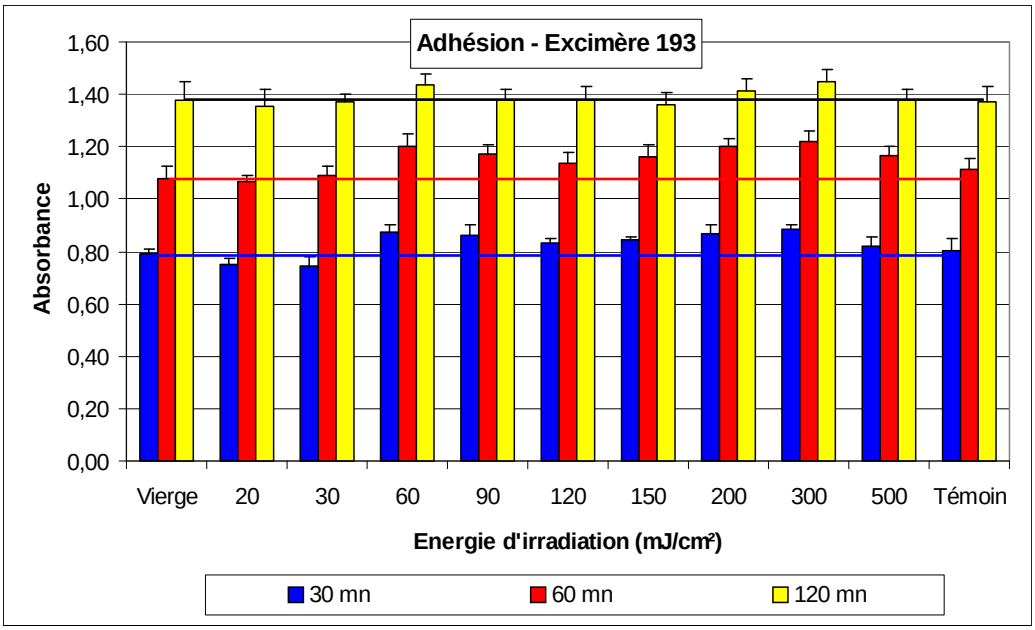


Figure 86 : Adhésion cellulaire après irradiation par LASER Excimère 193 nm (L132, n=6)

5.2.4.5. Conclusion sur le LASER EXCIMÈRE 193 nm

Les changements apportés par une irradiation avec le LASER excimère 193 nm sont les plus nets des différents LASERS étudiés dans ce chapitre, aussi bien sur le plan physico-chimique que sur le plan biologique. En effet, cette modification de la surface induite par le rayonnement UV induit des différences en terme de rugosité, mouillabilité, prolifération et adhésion cellulaire. Néanmoins les résultats biologiques ne sont pas à la hauteur des espérances et ne justifient pas l'intérêt d'effectuer un traitement de surface du PET par LASER excimère 193 nm. En outre, les tests statistiques n'ont démontré aucune différence significative pour $p<0,05$. Une fois encore, ce LASER sera donc abandonné pour la suite de cette étude.

5.2.5. LASER EXCIMÈRE 248 nm

Les résultats présentés ici reprennent une fraction des résultats de la première partie. Néanmoins, ils ont été complétés par des expériences incluant plus de puissances d'irradiation (jusqu'à 210 mJ/cm²) et par d'autres approches évaluatives physico-chimiques et biologiques (rugosité, XPS, marquage immunocytochimique).

5.2.5.1. Rugosité

La rugosité de surface obtenue après une irradiation avec le LASER excimère 248 nm est augmentée de façon progressive en fonction de l'énergie d'irradiation (Figure 87). Cette élévation semble néanmoins atteindre un palier, puisque la courbe a tendance à redescendre aux très fortes énergies. Concernant le Ra, celui-ci est donc augmenté d'un facteur 6 dans la fourchette des valeurs étudiées. La différence de rugosité obtenue entre une irradiation par LASER YAG 266 nm et par LASER excimère 248 nm est donc évidente, ceci malgré leur longueur d'onde pourtant très proche. Il semblerait donc que le PET possède un coefficient d'absorption particulièrement sensible à l'une de ces deux valeurs.

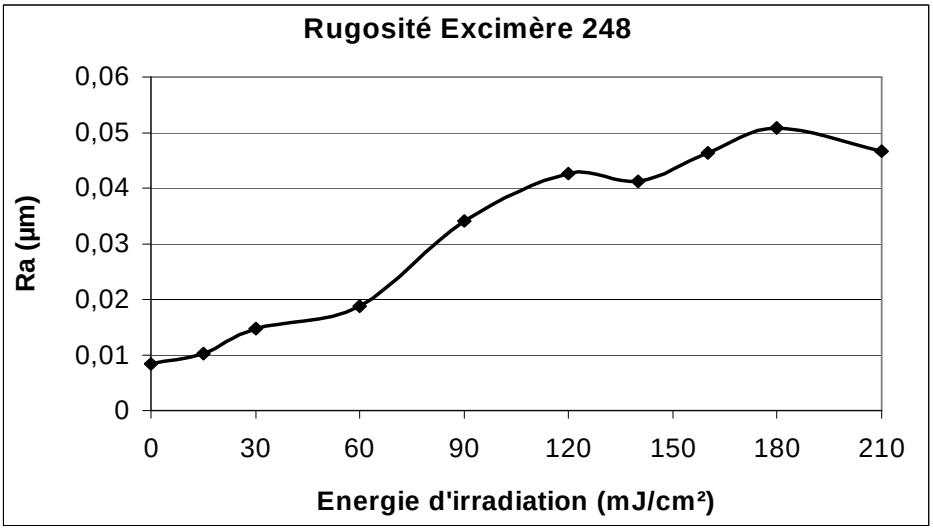


Figure 87 : Rugosité due au traitement LASER (Excimère 248 nm)

5.2.5.2. Mouillabilité

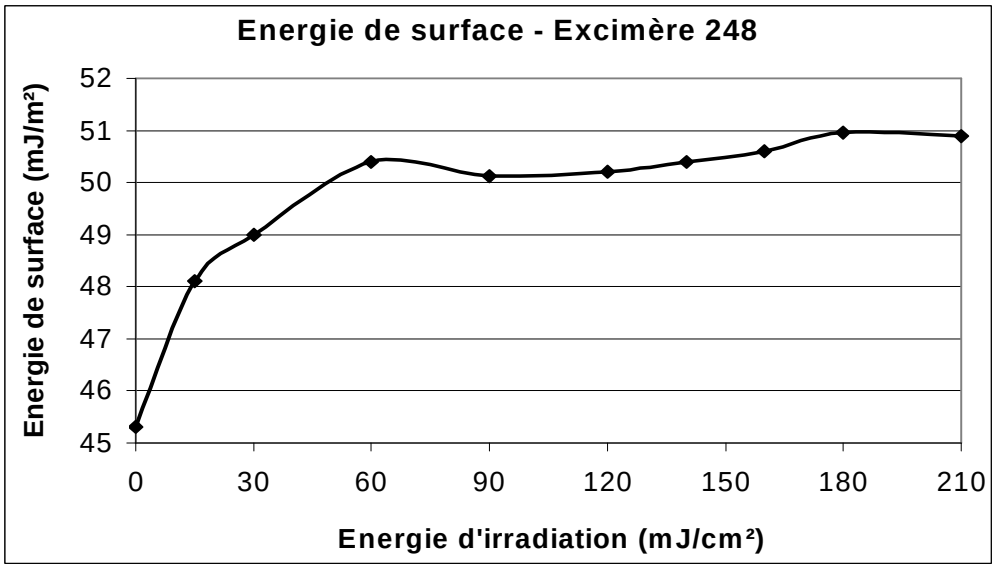


Figure 88 : Energie totale du Melinex® après irradiation au LASER Excimère 248 nm

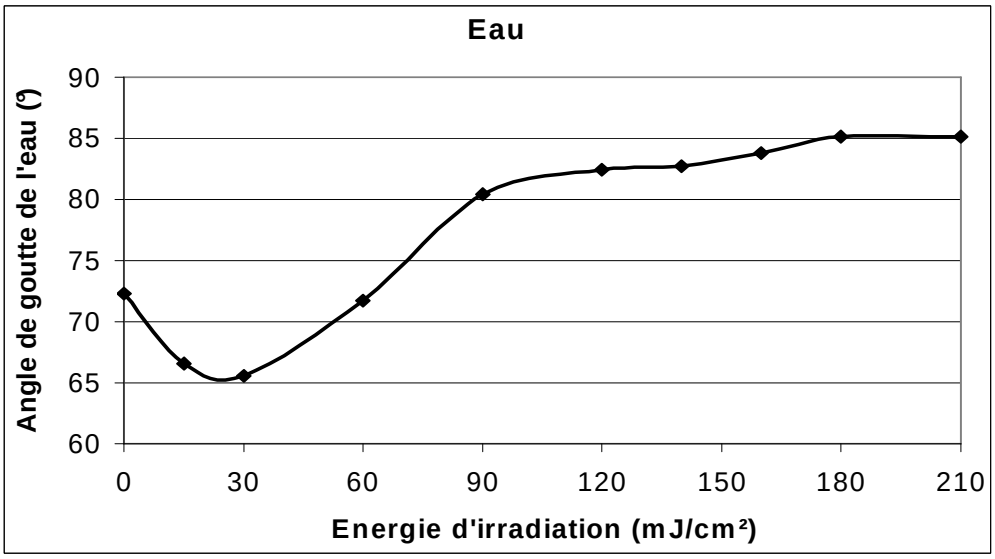


Figure 89 : Angle de goutte de l'eau après irradiation au LASER Excimère 248 nm

Les valeurs concernant les résultats d'analyse de mouillabilité nous indiquent clairement une tendance à l'augmentation de la mouillabilité liée à l'irradiation LASER (Figure 88). La courbe nous montre une aptitude du LASER excimère 248 nm à augmenter rapidement la tension de surface du matériau pour les premières valeurs d'énergies d'irradiation, puis à poursuivre plus lentement cette progression, donnant ainsi à la courbe une allure exponentielle. Aux plus fortes énergies, l'augmentation de l'énergie de surface se

stabilise en atteignant un plateau. Comme pour le graphique de rugosité, la courbe de mouillabilité n'est pas parfaitement « lisse », mais montre parfois quelques légers soubresauts. Ce constat, tout aussi valable pour les autres courbes de mouillabilité, peut tirer son explications de différentes origines, comme par exemple les variations possibles des degrés d'hygrométrie dans l'air ambiant (ce paramètre n'étant pas contrôlé dans notre étude), ou encore la topographie de la surface. En effet, Li *et al.* [93] avaient déjà calculé des énergies de surface hétérogènes lorsqu'ils les avaient mesurées à différents endroits d'un même polymère. Ils avaient expliqué ce phénomène par une rugosité qu'ils avaient trouvée différente selon qu'elle était mesurée au sommet ou à la base des reliefs (sous forme de lignes dans leur étude) créés par le LASER.

Pour en revenir aux résultats, il est extrêmement intéressant de comparer cette augmentation de mouillabilité à la valeur de l'angle de goutte de l'eau (Figure 89). En effet, celui-ci a tendance à diminuer à faible énergie, indiquant donc une augmentation de l'hydrophilie. Cependant, l'angle de goutte de l'eau augmente ensuite nettement pour les plus fortes énergies, atteignant des valeurs de l'ordre de 85°, c'est-à-dire supérieures au PET vierge (72°). Ce constat qui peut paraître contradictoire trouve cependant son explication grâce à ce que l'on appelle désormais « l'effet lotus » : l'effet lotus est un phénomène physique d'interactions entre des gouttelettes d'eau et une surface hydrophobe utilisé par certaines plantes pour nettoyer la surface de leurs feuilles, tout en les maintenant « sèches » [94]. Cette particularité est présente dans la famille du lotus qui, malgré son développement dans des rivières et des lacs boueux, arrive à conserver des feuilles propres. La structure microscopique de la surface et les propriétés chimiques de la plante font que ses feuilles ne sont jamais mouillées. Au contraire, les gouttes d'eau roulent à la surface de la feuille, emportant avec elles débris, insectes et poussières.

Le principe de cette hydrophobicité très élevée par rapport aux normes habituelles est maintenant bien connue des scientifiques : une goutte d'eau déposée sur une surface lisse hydrophobe forme un angle de contact légèrement supérieur à 90°. Or, cet angle peut augmenter fortement en présence de micro-aspérités, pouvant atteindre près de 180° : la goutte reste alors dans une forme sphérique (Figure 91). On atteint un état de « super-hydrophobie » caractéristique de l'effet lotus [95,96]. Ce phénomène tire son explication de deux causes : une physique et une chimique. Dans le premier cas, des photographies au microscope électronique ont montré que la surface est couverte de micro-textures, à des échelles souvent comprises entre 1 et 10 µm. Du point de vue chimique, on a découvert que ces surfaces sont des cires : la cire étant hydrophobe, l'eau ne remplit pas les intervalles entre les textures et repose donc principalement sur de l'air – comme elle le fait dans un nuage. Pour la goutte, il devient énergétiquement trop coûteux de mouiller une surface si hydrophobe. La meilleure configuration pour la goutte devient alors de se poser au sommet des reliefs, tel un fakir sur

une planche de clous. On comprend ainsi pourquoi l'ajout des micro-textures peut amplifier « artificiellement » l'hydrophobie. Il est à noter que la taille des aspérités a cependant une certaine importance : si la rugosité n'est pas adaptée, la gouttelette peut « s'empaler » sur les pointes, réalisant un « état de Wenzel » super-mouillant et contraire à l'effet souhaité (Figure 90).

Pour revenir aux analyses d'angle de goutte du PET, les résultats que nous trouvons aux fortes énergies sont assimilables à cet effet lotus : l'angle de goutte de l'eau est assez élevé, faisant soupçonner une certaine hydrophobicité de la surface, mais la tension de surface du PET irradié (analysée à l'aide de plusieurs solvants) est tout de même augmentée.

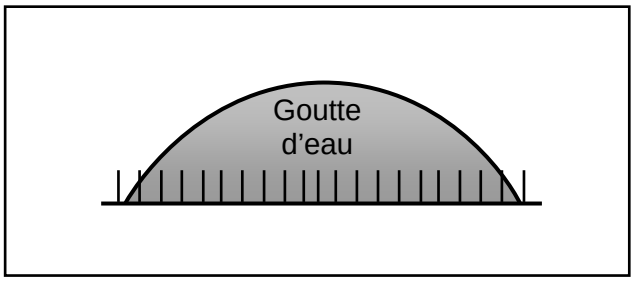


Figure 90 : Goutte d'eau sur une surface rugueuse

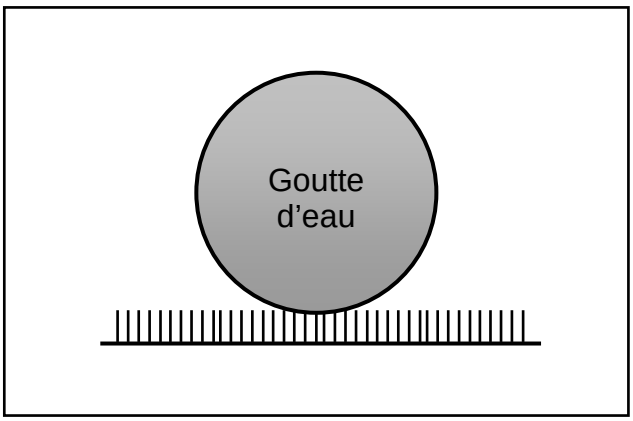


Figure 91 : Goutte d'eau sur une surface rugueuse, super-hydrophobe

Enfin pour en terminer avec les analyses de tension de surface, nous avons étudié l'évolution de la mouillabilité du polymère irradié sur plus de deux mois (Figure 92). Ce graphique nous permet de voir une surface qui devient plus hydrophobe la première semaine, avant que les gouttes d'eau ne s'étalent progressivement de plus en plus. L'hydrophilie du matériau est même améliorée la neuvième semaine pour les irradiations à 90 et 120 mJ/cm² par rapport au PET vierge (72° d'angle de goutte de l'eau).

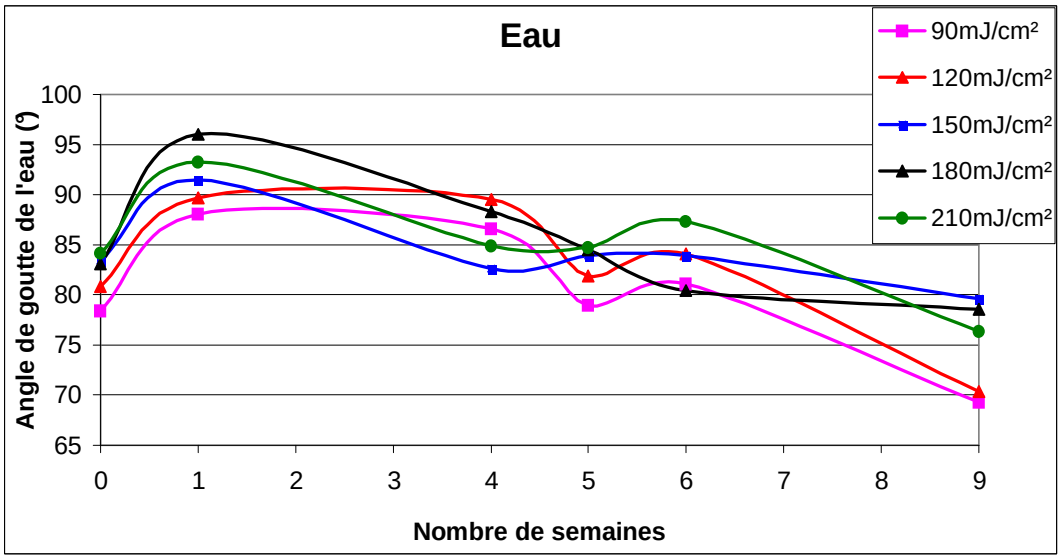


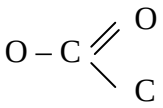
Figure 92 : Evolution de l'angle de goutte de l'eau sur 9 semaines

5.2.5.3. Chimie de surface

Les Figures 93 à 98 montrent les résultats des analyses XPS réalisées sur le Melinex®, vierge et irradié. Ces courbes montrent les résultats obtenus pour l'analyse du C_{1S} et de l'O_{1S}. Ces graphiques nous permettent de mettre en évidence trois phénomènes majeurs :

- Une différence est nettement observée entre le matériau vierge et les éprouvettes irradiées. Par contre, aucune différence significative n'apparaît entre les deux PET irradiés à différentes énergies (24 mJ/cm² et 120 mJ/cm²).

- Les Figures 95 et 97 montrent l'apparition d'un nouveau pic (pic C) à 287.0 eV correspondant à l'apparition du groupement carbonyle (C=O). Ce groupement n'est pas présent sur le matériau vierge (Figure 93), puisqu'à l'état originel ce carbone doublement lié à l'oxygène l'est aussi à un autre carbone et à un autre oxygène (cf. formule du PET, Figure 1, p.14). Ce résultat nous permet de mettre en évidence que la coupure des liaisons suite au traitement LASER se fait préférentiellement à cet endroit, entraînant donc la cassure au niveau du groupement :



et libérant ainsi des groupements carbonyles à la surface du PET irradié. Cette hypothèse est confirmée par les Figures 94 et 96, qui montrent la diminution du

pic éther (C-O-C, pic B) comparativement au pic carbonyle (C=O, pic A).

- Enfin l'analyse du rapport oxygène / carbone montre une légère diminution de ce ratio qui passe de 0,40 sur le PET vierge à 0,34 sur le PET irradié, quelque soit l'intensité de l'énergie d'irradiation. La surface du PET est donc plus riche en carbone après irradiation par LASER excimère 248 nm.

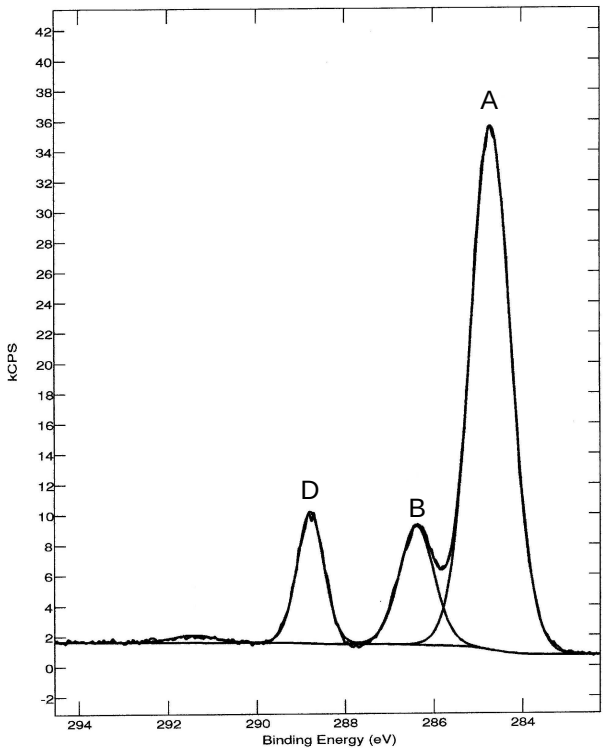


Figure 93 : Pic C_{1S} du PET vierge

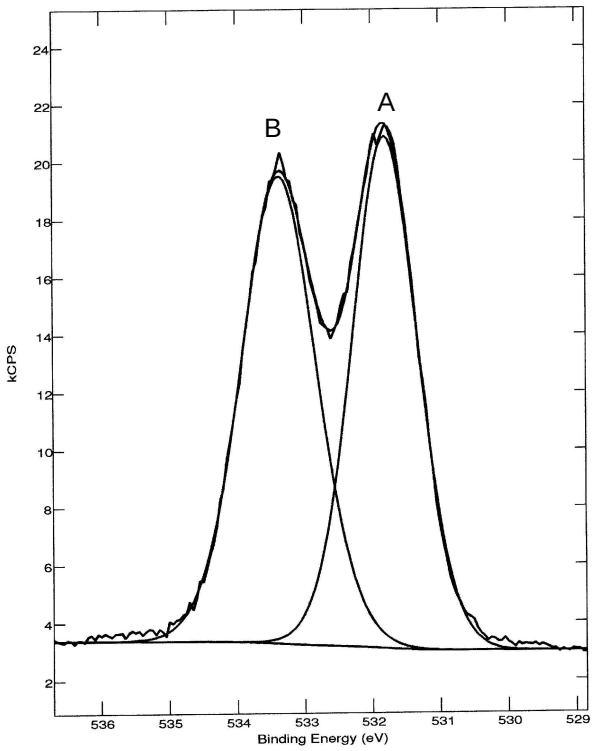


Figure 94 : Pic O_{1S} du PET vierge

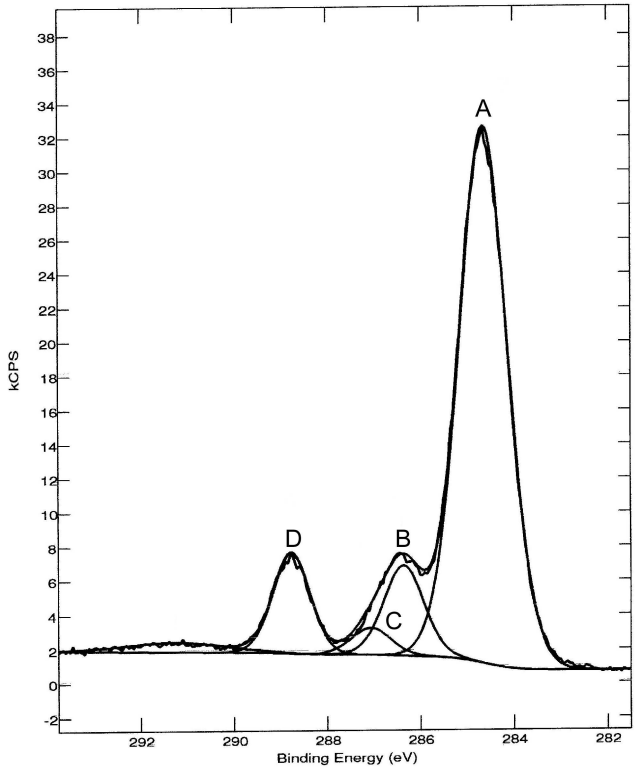


Figure 95 : Pic C_{1S} du PET irradié à 24 mJ/cm²

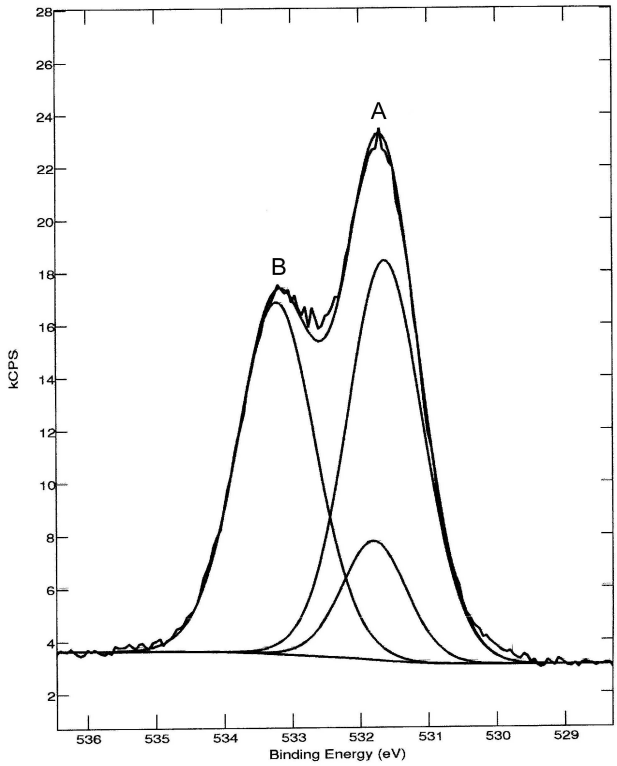


Figure 96 : Pic O_{1S} du PET irradié à 24 mJ/cm²

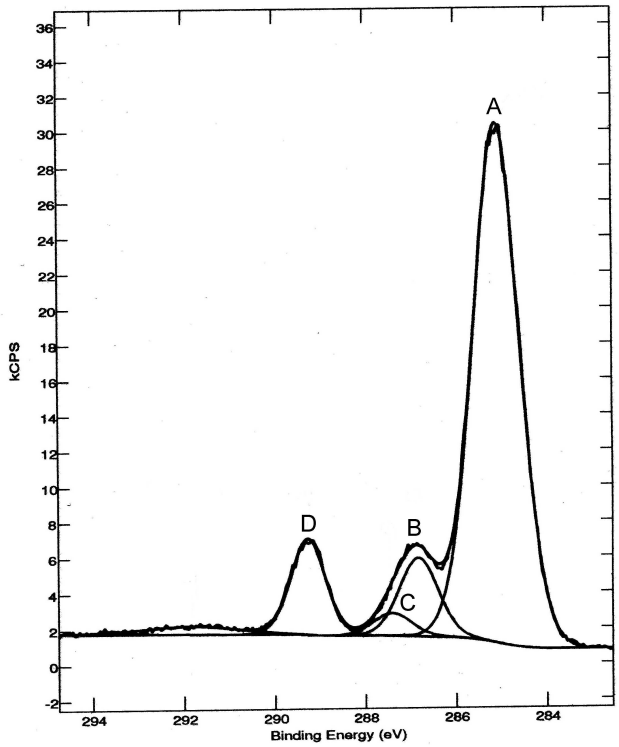


Figure 97 : Pic C_{1S} du PET irradié à 120 mJ/cm²

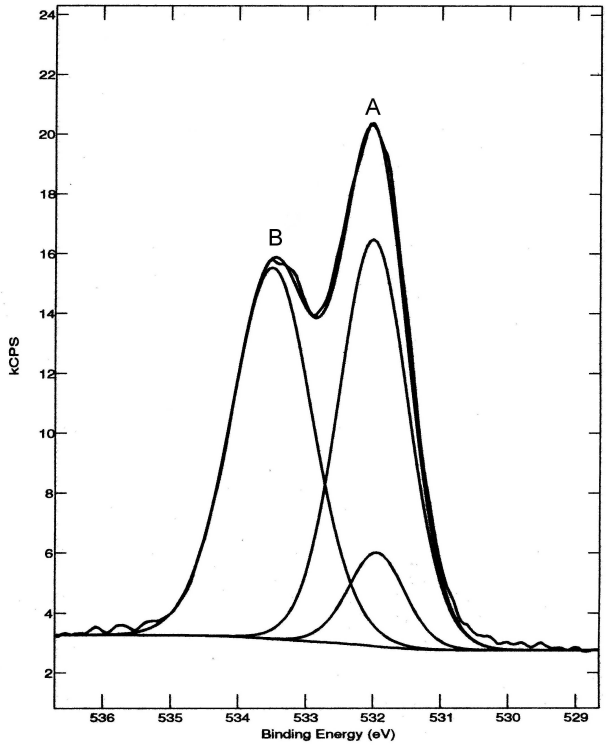


Figure 98 : Pic O_{1S} du PET irradié à 120 mJ/cm²

5.2.5.4. Prolifération et vitalité cellulaires

Les résultats de prolifération et de vitalité cellulaire sont montrés sur les figures 99 et 100. Par rapport aux résultats présentés en première partie (choix du PET), ceux-ci sont plus complets car effectués après trois et six jours de prolifération. En outre, nous avons testé des énergies plus élevées, puisque les résultats de prolifération présentés sur la Figure 57 (p.85) montrait une courbe ascendante dont on ne savait pas si elle pouvait continuer à augmenter ou au contraire atteignait un plateau. Le graphique ci-après nous permet de tirer plusieurs conclusions en terme de prolifération cellulaire :

1- L'allure générale de la courbe est la même que celle présentée sur la Figure 57, puisque l'on retrouve notamment la valeur de prolifération cellulaire la plus élevée aux environs de 120 mJ/cm². Néanmoins, cette valeur est quelque peu inférieure à celle trouvée précédemment (126% contre 141%). Ce résultat peut s'expliquer par le changement de laboratoire et surtout de LASER entre les deux expérimentations (LASER Lambda Physik série Compex 205 (LPES, Mons, Belgique) ; LASER GSI Lumonics ipex-848 (CERLA, Villeneuve d'Ascq, France)). Un affinement des réglages du LASER pourrait peut-être s'avérer nécessaire pour retrouver les résultats obtenus à Mons.
2- Les tests statistiques montrent que les différences en terme de prolifération cellulaire sont statistiquement significatives après six jours de culture cellulaire par rapport au PET vierge pour les valeurs de 90 mJ/cm² et 120 mJ/cm² ($p<0,05$). En outre, la valeur de prolifération obtenue à six jours avec le PET irradié à 120 mJ/cm² est statistiquement plus élevée par rapport à toutes les autres valeurs, excepté contre le 15 mJ/cm² et le 90 mJ/cm² ($p<0,05$).
3- Il n'est pas utile d'irradier à des valeurs supérieures à 120 mJ/cm² avec ce type de LASER, puisque les résultats montrent que la prolifération cellulaire diminue à nouveau à partir de 150 mJ/cm² (différence statistiquement significative). En outre, les barres d'erreur ont tendance à augmenter, ce qui signe une moins bonne répétitivité des résultats.
4- L'effet de l'irradiation est bénéfique en terme de prolifération sur plusieurs jours puisque jusqu'à 150 mJ/cm², la courbe montre une progression en nombre de cellules après six jours de culture cellulaire plutôt qu'après trois jours de culture. Néanmoins à partir de 180 mJ/cm², l'effet est inverse : le nombre de cellules à la surface de l'échantillon est proportionnellement moins important après six jours de culture plutôt qu'après trois jours.
5- Enfin en terme de vitalité cellulaire, l'effet du LASER sur les cellules n'est absolument pas négatif, puisque le résultat reste proche de la valeur du témoin à trois jours ou à six jours, quelle que soit la valeur de l'énergie considérée. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

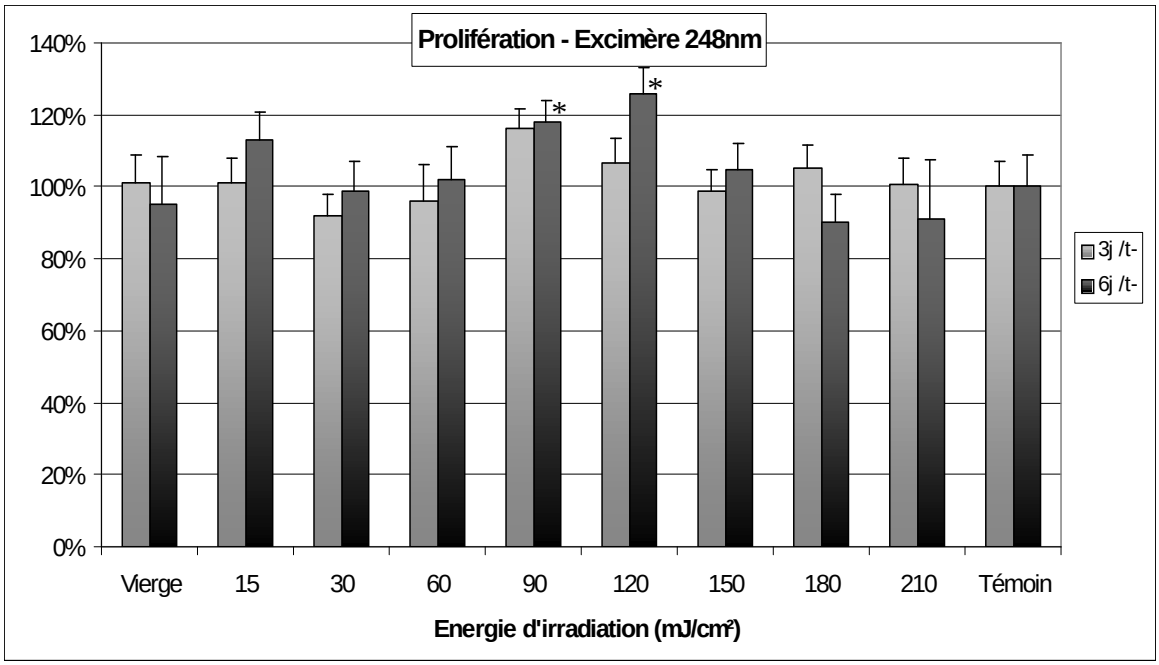


Figure 99 : Prolifération cellulaire après irradiation par LASER Excimère 248 nm (L132, n=6)
* Différence statistiquement significative par rapport au PET vierge

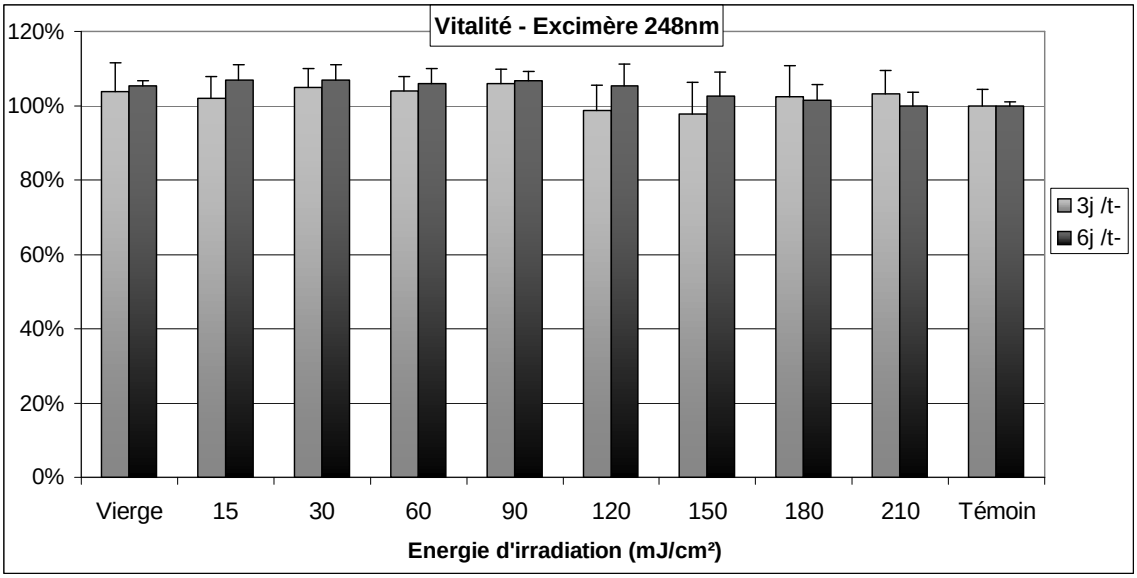


Figure 100 : Vitalité cellulaire après irradiation par LASER Excimère 248 nm (L132, n=6)

5.2.5.5. Adhésion cellulaire

Les résultats obtenus sur la Figure 101 sont tout à fait parlants : l'irradiation par LASER excimère 248 nm permet d'augmenter notablement l'adhésion cellulaire à très court terme, c'est-à-dire à 30 min, pour les plus fortes valeurs d'énergie. Cette amélioration reste valable après 60 min d'adhésion cellulaire, puis les résultats ont tendance à se lisser au bout

de deux heures. L'effet de l'irradiation LASER est donc particulièrement efficace dès le début de l'accrochage cellulaire sur le polymère, ce qui pourrait théoriquement permettre une colonisation accélérée de la prothèse par les cellules humaines. L'explication majeure de ce phénomène d'adhésion accélérée peut être attribuée à l'augmentation de la rugosité, ainsi qu'à la présence d'une chimie de surface plus favorable pour les cellules [97,98].

Les tests statistiques n'ont néanmoins pas pu démontrer de différence significative pour $p<0,05$.

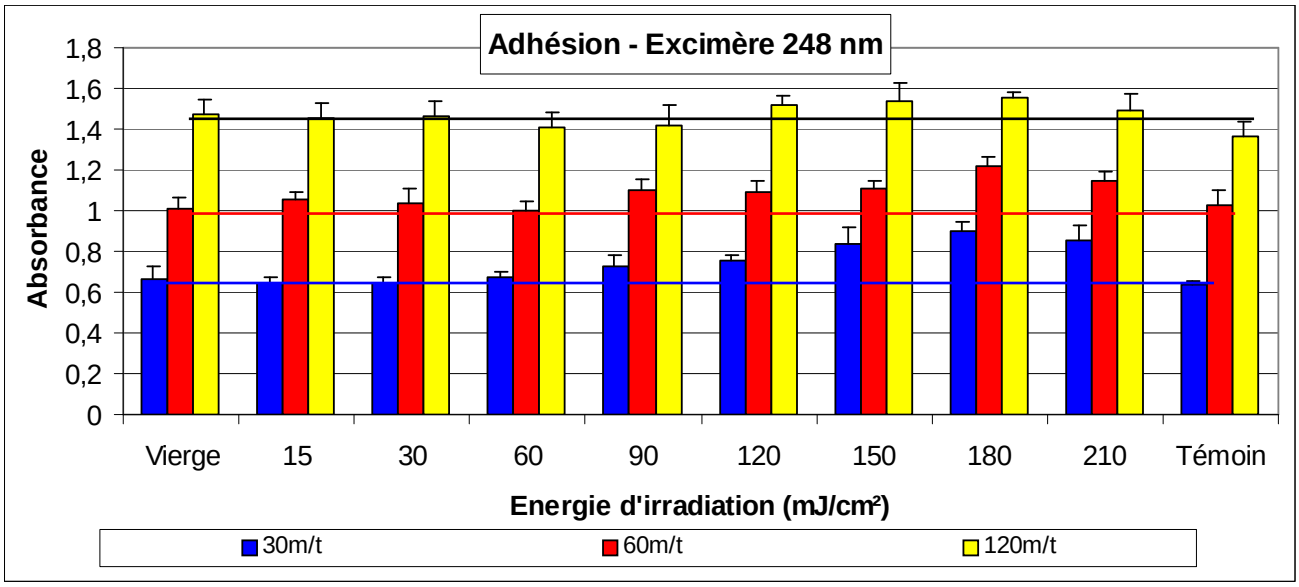


Figure 101 : Adhésion cellulaire après irradiation par LASER Excimère 248 nm (L132, n=6)

5.2.5.6. Marquage immunocytochimique

Le marquage de la vinculine et des filaments d'actine de cellules L132 cultivées sur cinq substrats (Nickel, Thermanox®, Melinex® vierge, Melinex® irradié à 120 mJ/cm² et à 210 mJ/cm²) a été réalisé à la phalloïdine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (coloration verte). En outre, un marquage complémentaire de l'ADN à l'iodure de propidium a été réalisé (coloration rouge du noyau).

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme, et organisant celui-ci, permettant aux cellules eucaryotes de s'adapter à une grande variété de changements morphologiques et d'effectuer des mouvements coordonnés. Le cytosquelette est constitué de trois types de filaments protéiques : les microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre), les microtubules (25 nm de diamètre) et les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre).

L'actine est la protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote. Elle se présente dans la cellule soit sous forme de monomère globulaire (actine G) soit sous forme de

polymère (actine F). Le réseau d'actine est localisé d'une part juste sous la membrane plasmique, où il constitue un maillage bi-dimensionnel associé à la membrane, et d'autre part, au sein de la cellule, où il constitue un réseau tri-dimensionnel conférant un aspect gélatineux au cytosol. L'actine polymérise au niveau du front de migration de la cellule, en fibres qui soutiennent des profusions cellulaires appelées lamellipodes ou filipodes et qui s'ancrent au niveau de zones d'adhérences focales conduisant à l'assemblage spatialement contrôlé de filaments d'actine organisés en faisceaux puis en fibres de stress. L'actine est donc reliée aux molécules d'adhérences membranaires et cela permet la migration. Comme les microtubules, les fibres d'actine forment un ensemble très dynamique, se polymérisant et se dépolymérisant sans cesse.

Le réseau de microtubules est responsable de la polarité cellulaire. De plus, lors du déplacement de la cellule, les microtubules vont s'accrocher aux zones d'adhérence focales pour permettre la locomotion. Enfin, il existe deux types de microfilaments intermédiaires, les kératines et la vimentine qui sont essentiellement impliqués dans les jonctions stables (desmosomes, hemidesmosomes).

Le cytosquelette constitué de cet ensemble de protéines filamenteuses assure le modelage de la forme de la cellule et sa mobilité. La mobilité de la cellule est obtenue par modification de sa forme, et par formation de pseudopodes.

5.2.5.6.1. L'organisation du cytosquelette

L'observation au microscope confocal LASER de l'adhésion cellulaire est un examen qualitatif effectué avec les cellules L132 après trois jours de culture cellulaire. Pour les cellules L132, le marquage de l'actine avec la phalloïdine/FITC met en évidence sur les échantillons et les témoins des fibres de stress. Leur répartition spatiale et leur nombre permettent de distinguer plusieurs réponses cellulaires [99] (Figures 102 à 106).

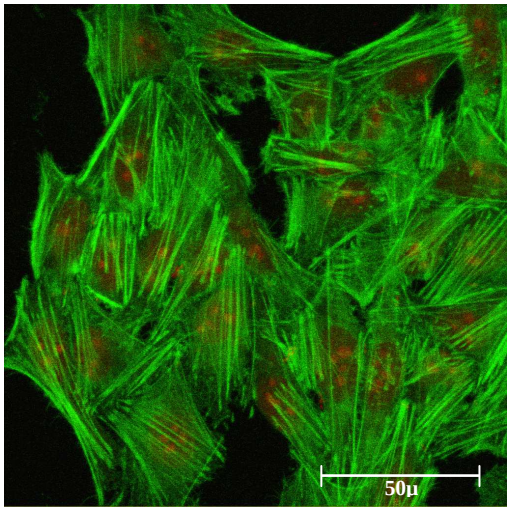


Figure 102 : Marquage à 3jours de l'actine de L132 sur Thermanox® (témoin négatif)

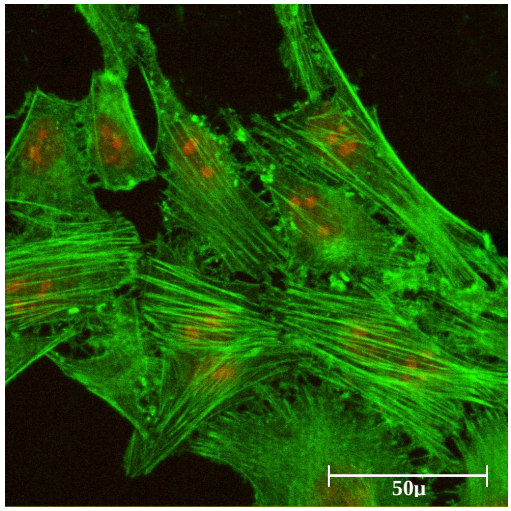


Figure 103 : Marquage à 3jours de l'actine de L132 sur Melinex® vierge

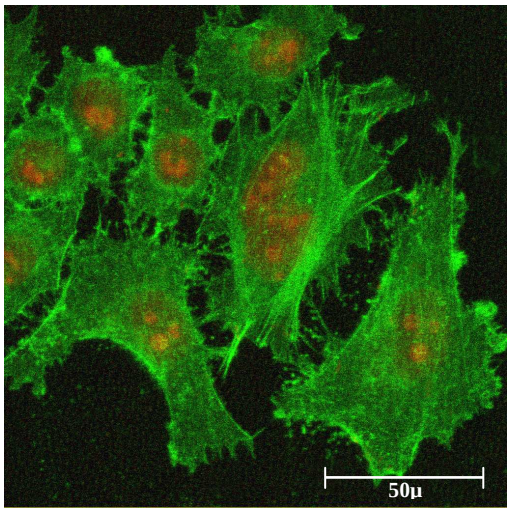


Figure 104 : Marquage à 3jours de l'actine de L132 sur Melinex® irradié à 120 mJ/cm²

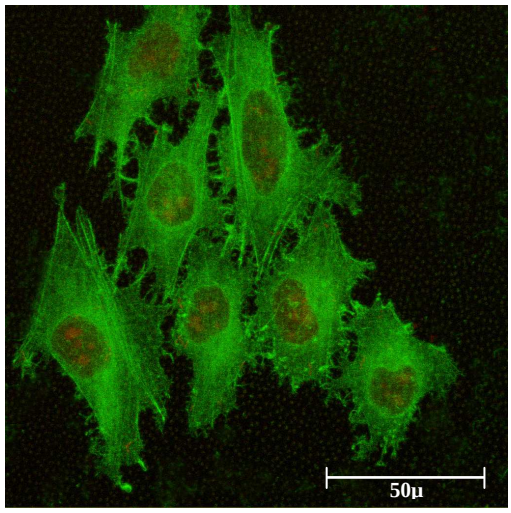


Figure 105 : Marquage à 3jours de l'actine de L132 sur Melinex® irradié à 210 mJ/cm²

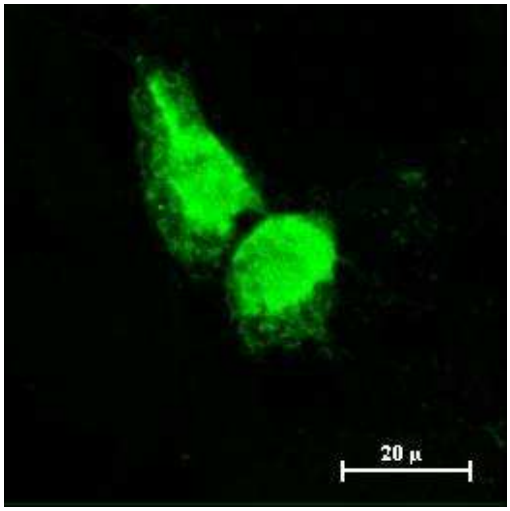


Figure 106 : Marquage à 3jours de l'actine de L132 sur Nickel (témoin positif)

Sur le témoin négatif, la répartition des cellules à la surface de l'échantillon se fait sous forme polygonale typique des cellules épithéliales. Les formes obtenues sur les échantillons testés sont globalement toutes polygonales à l'exception des observations faites sur le nickel pur. Sur cet échantillon au contraire, les cellules sont très fortement arrondies, leur cytosquelette est fortement altéré avec une dépolymérisation importante des fibres d'actine. Il n'est pas possible de mettre en évidence d'organisation fibrillaire, ce qui montre que la cellule est très peu adhérente au substrat.

Le deuxième critère d'évaluation concerne le nombre et l'organisation des fibres de stress au sein de la cellule. Sur le témoin négatif, la quantité de fibres de stress est importante signant un nombre conséquent de zones d'adhérences focales, signifiant un contact et une adhésion intime sur le matériau. Les fibres d'actine parcourent toute la longueur de la cellule, et sont parfois très épaisses, signes d'une bonne rigidité des cellules. Cette quantité et cette répartition des fibres d'actine sont retrouvées sur les échantillons de Melinex® vierge. Cependant, des quantités moins nombreuses de fibres de stress sont observées sur les échantillons de polymère irradié. Le cytosquelette semble ainsi quelque peu désorganisé avec assez peu d'actine polymérisée. Enfin, sur le nickel pur, plus aucune fibre de stress n'est visualisable et l'organisation du cytosquelette est complètement altérée. L'irradiation du PET par LASER excimère n'altère donc pas la morphologie cellulaire ; néanmoins elle désorganise discrètement la structure du cytosquelette, ceci surtout à très forte énergie (210 mJ/cm²).

5.2.5.6.2. Le marquage de la vinculine

Un double marquage est nécessaire pour observer la vinculine. Celle-ci est repérée sous forme de patchs de couleur verte, tandis que les noyaux ont été colorés en rouge à l'aide du *Propidium Iodide Solution*. La localisation de la vinculine dans la cellule varie en fonction des matériaux (Figures 107 à 110). Sur le Thermanox®, le Melinex® vierge et le Melinex® irradié à 120 mJ/cm², la protéine se situe en périphérie cellulaire. En revanche sur le Melinex® irradié à 210 mJ/cm², si les patchs de vinculine restent préférentiellement disséminés en périphérie de la cellule, leur nombre est néanmoins fortement diminué.

Les cellules L132 cultivées sur le Melinex® irradié à 120 mJ/cm² ne souffrent donc pas du passage du LASER. Certes, les patchs de vinculine semblent de taille légèrement inférieure, mais leur nombre est plus grand et ils sont parfaitement répartis sur la périphérie cellulaire, traduisant une bonne adhérence au support qui leur est proposé. Diener *et al.* [100] avaient d'ailleurs expliqué cette diminution de la taille des adhésions focales par la rugosité accrue de la surface du biomatériau. C'est pourquoi on peut conclure avec eux que les caractéristiques de surface du biomatériau influencent le nombre, la taille et la dynamique des adhésions focales.

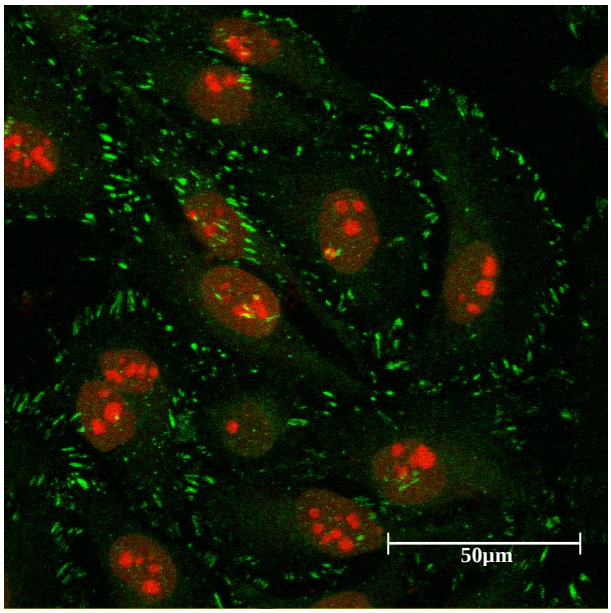


Figure 107 : Marquage à 3jours de la vinculine de L132 sur Thermanox® (témoin négatif)

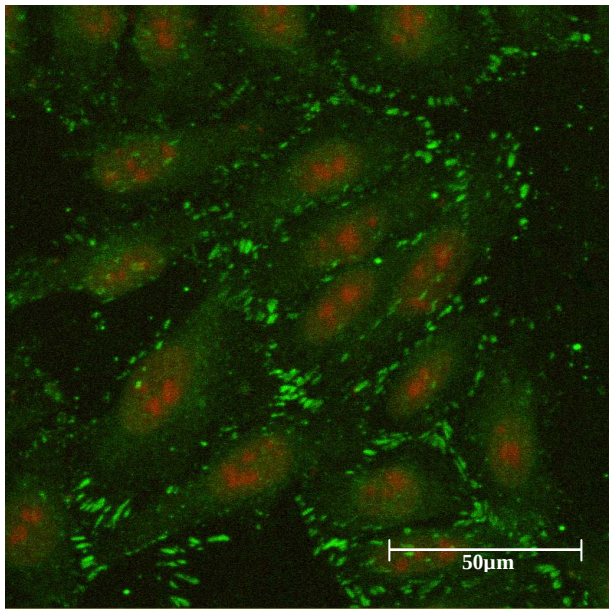


Figure 108 : Marquage à 3jours de la vinculine de L132 sur Melinex® vierge

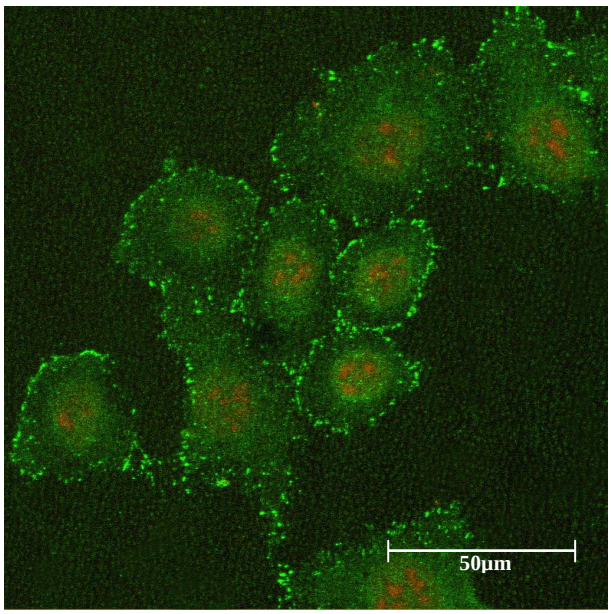


Figure 109 : Marquage à 3jours de la vinculine de L132 sur Melinex® 120mJ/cm²

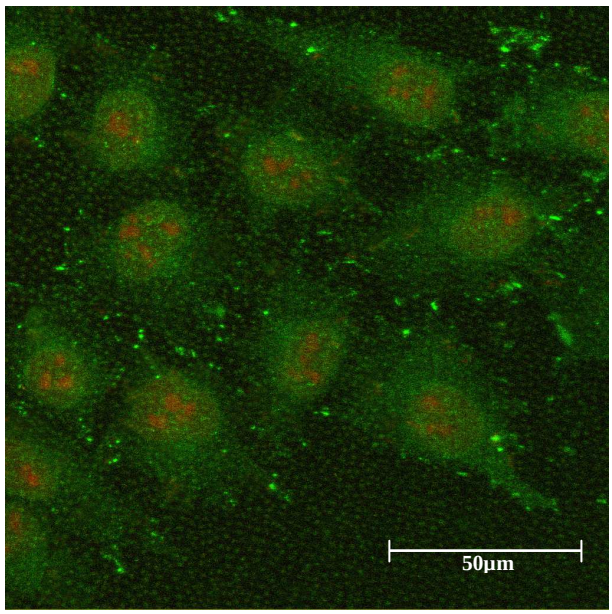


Figure 110 : Marquage à 3jours de la vinculine de L132 sur Melinex® 210mJ/cm²

5.2.5.7. Observations au MEB

Des observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées dans la première partie de ce mémoire avec des expériences de cultures de cellules épithéliales (L132) sur des échantillons de Melinex® vierge et irradiés à 12 et à 96 mJ/cm² (§5.1.5.4, p.89). Nous avons ici complété ces expériences avec des échantillons irradiés par des valeurs d'énergie plus élevées de 120 et 210 mJ/cm², après trois jours de culture cellulaire (Figures 111 à 116).

Les micrographies sur le Melinex® vierge montrent, comme lors des premières expériences, des cellules aux formes polygonales arrondies ou plus souvent allongées, avec une structure de membrane cellulaire de surface bien développée : connexions intercellulaires, micro-villosités, et larges lamellipodes.

Pour les échantillons de PET irradié, il est possible de tirer les mêmes conclusions que sur les micrographies présentées en première partie : malgré le changement de source LASER, les résultats restent superposables. En premier lieu, le changement de structure de la surface du matériau est parfaitement visible. De plus les cellules, qui présentent globalement la même morphologie que sur le PET vierge, montrent toutefois une structure de surface moins développée sur tous les points précédemment cités : connexions, micro-villosités, et lamellipodes. Enfin les micrographies présentées ci-après démontrent que les résultats sont semblables à 120 ou à 210 mJ/cm². Les effets d'une irradiation à forte énergie ne semblent donc ni néfastes, ni profitables aux cellules du point de vue de leur morphologie.

Figure 111 à Figure 116 : Micrographies de cellules L132 après 3 jours de culture cellulaire.

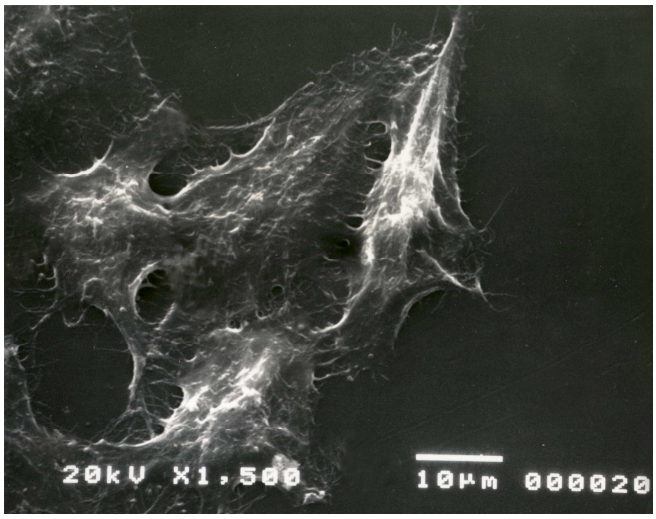


Figure 111 : Melinex® vierge

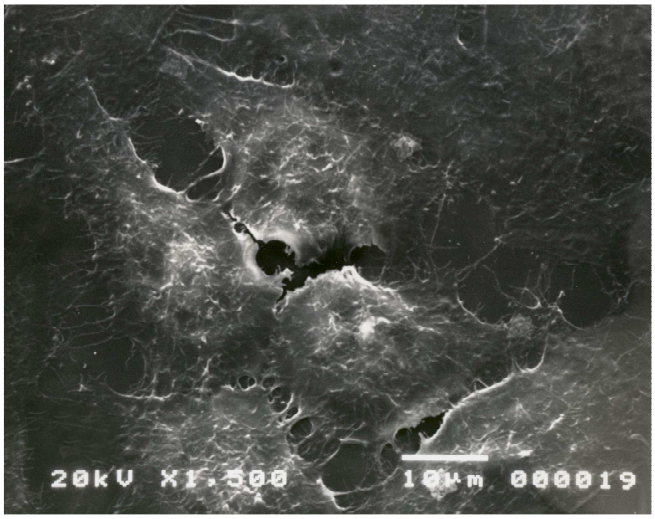


Figure 112 : Melinex® vierge (autre vue)

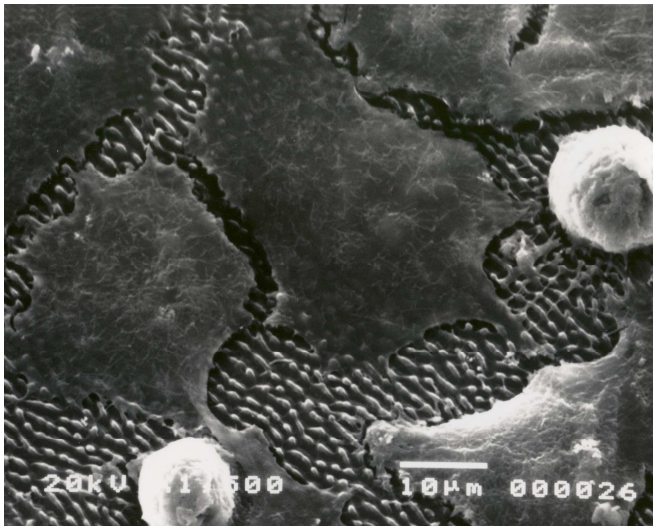


Figure 113 : Melinex® 120mJ/cm²

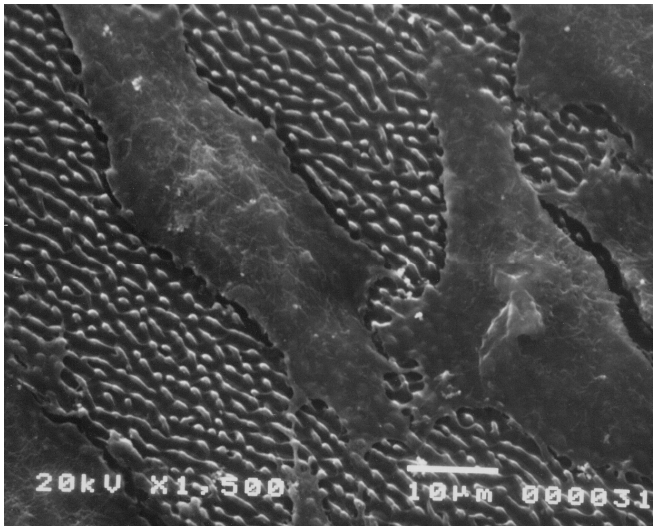


Figure 114 : Melinex® 120mJ/cm² (autre vue)

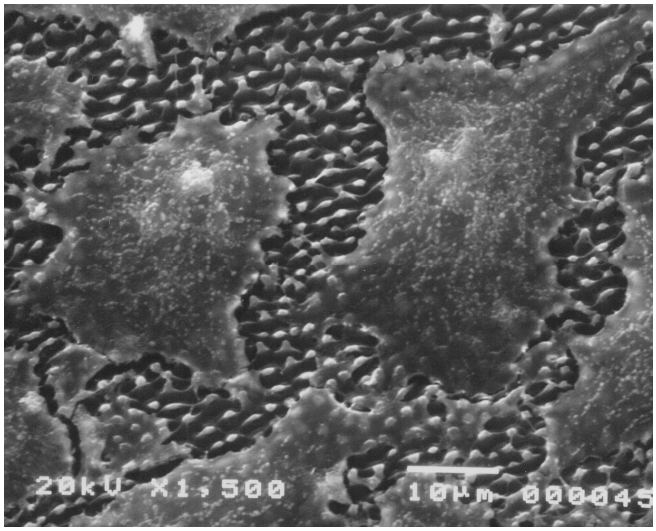


Figure 115 : Melinex® 210mJ/cm²

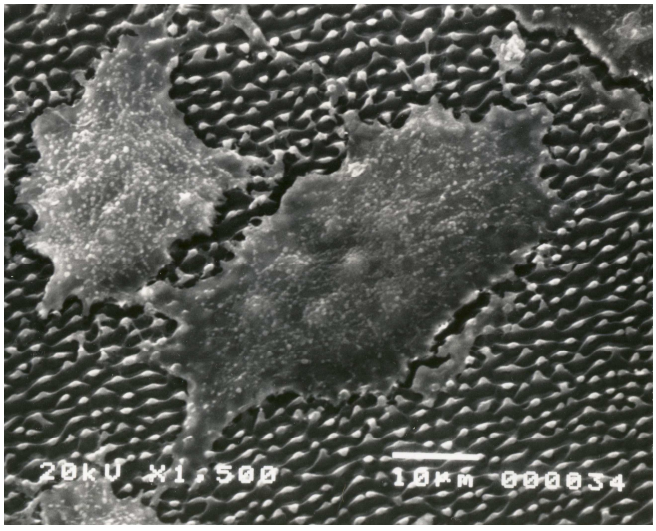


Figure 116 : Melinex® 210mJ/cm² (autre vue)

5.2.5.8. Conclusion sur le LASER EXCIMÈRE 248 nm

Les résultats obtenus avec le LASER excimère 248 nm sont les plus intéressants des cinq LASERS testés. Les expériences physico-chimiques montrent que le PET est sensible à ce type d'irradiation, puisque la rugosité est augmentée de façon progressive, atteignant un palier aux plus fortes énergies, tandis que la mouillabilité est également améliorée, de façon exponentielle cette fois-ci, c'est-à-dire montant rapidement dès les premières énergies d'irradiation, pour atteindre un palier par la suite. Enfin les mesures faites par XPS démontrent une augmentation de la proportion du carbone à la surface du PET, avec une diminution des liaisons ester au profit des liaisons carbonyles.

Ces nombreuses variations de la surface du PET nous permettaient d'attendre des répercussions sur les tests biologiques, sans savoir si les cellules allaient souffrir ou profiter de telles modifications de surface. Les résultats de ces tests biologiques ont été explicites et nous permettent de démontrer que les cellules prospèrent significativement mieux sur une surface irradiée à moyenne énergie, c'est-à-dire à des valeurs d'énergies comprises entre 90 et 120mJ/cm². En effet pour ces valeurs, la prolifération cellulaire est améliorée sans que la vitalité cellulaire n'en souffre. Les courbes d'adhésion montrent déjà une tendance à l'augmentation du nombre de cellules adhérées au support après des temps très courts (situés entre 30 et 120 min), ce qui est confirmé par le marquage de la vinculine qui nous montre de nombreux patchs d'adhésion focale sur le Melinex® irradié à 120 mJ/cm². Seul le cytosquelette semble un peu désorganisé sur les photographies prises lors du marquage de l'actine. La morphologie cellulaire ne semble cependant pas en souffrir pour autant, même si les micrographies MEB montrent une structure de surface moins complexe avec moins de lamellipodes et de pseudopodes.

Ces bons résultats obtenus avec le LASER excimère 248 nm confirment donc ceux obtenus dans la première partie de ce travail, malgré le changement de laboratoire et surtout de source LASER. De plus, par leur plus grande richesse, ils nous permettent de conclure sur l'inutilité de chercher à atteindre des valeurs puissantes d'irradiation, puisque toutes les expériences biologiques démontrent un étiolement des résultats à partir d'une irradiation supérieure à 150 mJ/cm².

5.2.6. COMPARAISON DES DIFFÉRENTS LASERS

Les résultats exposés dans cette partie reprennent les résultats précédemment cités, mais en présentant l'avantage d'être regroupés sur un seul graphique, facilitant ainsi la comparaison des LASERS entre eux.

5.2.6.1. Rugosité

La Figure 117 montre particulièrement bien l'absence de rugosité engendrée par une irradiation avec les LASERS YAG 532 nm et 1064 nm, comparativement aux autres LASERS.

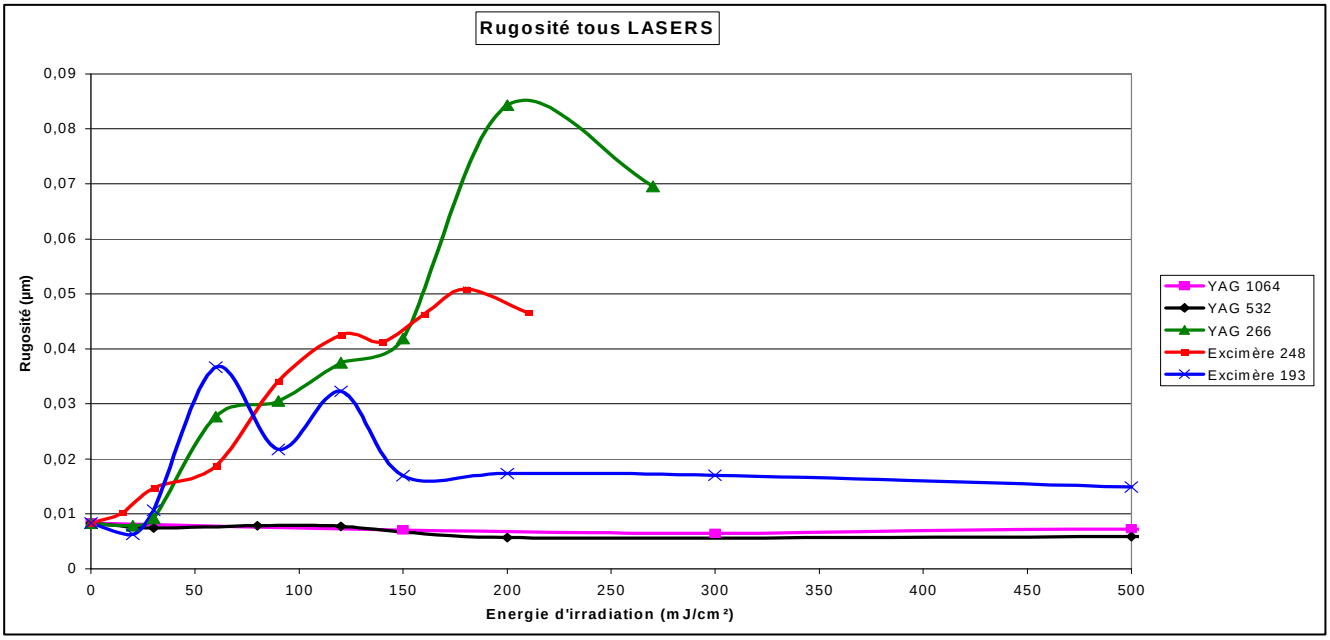


Figure 117 : Rugosité du PET obtenue avec les différents LASERS
Par souci de lisibilité du graphique, les valeurs des LASERS YAG 1064 nm et YAG 532 nm supérieures à 500 mJ/cm² n'ont pas été représentées.

5.2.6.2. Mouillabilité

De même que pour la rugosité, la Figure 118 montre peu d'évolution de la mouillabilité obtenue suite à une irradiation avec les LASERS YAG. Seuls les LASERS excimères sont capables d'augmenter la tension de surface du matériau.

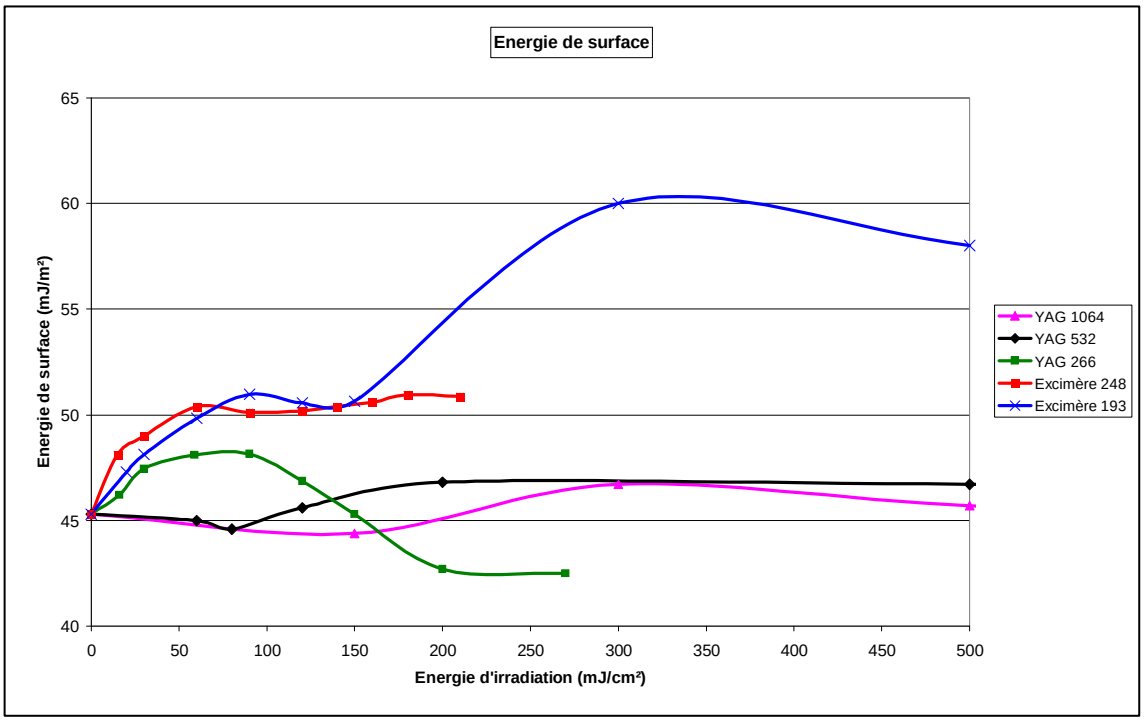


Figure 118 : Energie de surface du PET obtenue avec les différents LASERS
Par souci de lisibilité du graphique, les valeurs des LASERS YAG 1064 nm et YAG 532 nm supérieures à 500 mJ/cm² n'ont pas été représentées.

5.2.6.3. Etat de surface

Les trois micrographies MEB présentées ci-après sont extrêmement intéressantes pour comprendre la différence de comportement biologique des cellules L132 sur la surface du PET traité par les différents LASERS (Figures 119 à 121). En effet, plus que la nature du LASER (excimère ou YAG), c'est la longueur d'onde délivrée par celui-ci qui présente un impact majeur sur la transformation de la surface du matériau. De ce fait, les différences attendues entre les LASERS YAG 266 nm et excimère 248 nm devraient être minimes, puisque la longueur d'onde est très proche. Or les résultats biologiques montrent une différence majeure de comportement cellulaire : la prolifération cellulaire obtenue après une irradiation à 120 mJ/cm² est de 102% pour le LASER YAG après 6 jours de prolifération, contre 126% pour le LASER excimère 248 nm ! Certes, les dissemblances de rugosité et de mouillabilité expliquent en partie ces résultats, mais la différence importante de l'état de surface observé sur ces micrographies est un élément supplémentaire d'explication. Ces trois photographies sont présentées à la même échelle ; il est donc facilement visible que la taille et la morphologie des structures créées à la surface du PET sont totalement différentes : les dimensions de ces structures semblent d'ailleurs directement liées à la longueur d'onde du LASER. De toute évidence, la topographie de la surface « vue » par la cellule est radicalement modifiée d'un LASER à un autre, traduisant le cas échéant un état de surface plus favorable pour les cellules et donc un meilleur comportement biologique.

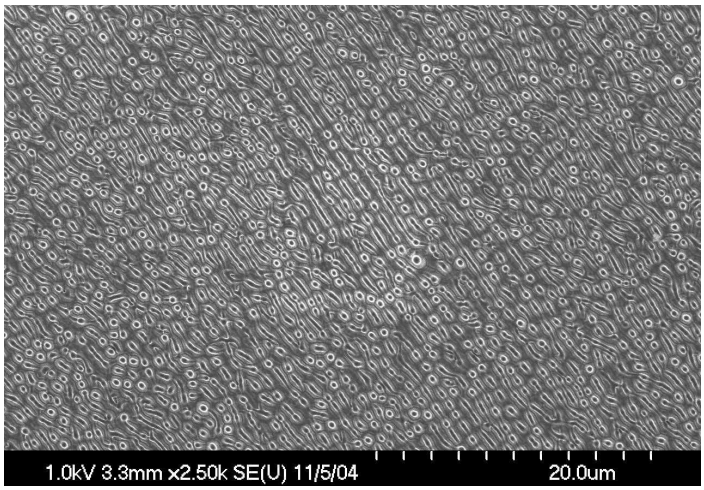


Figure 119 : Micrographie MEB du PET après irradiation par LASER excimère 193 nm (10 coups, 10 Hz, 120 mJ/cm²)

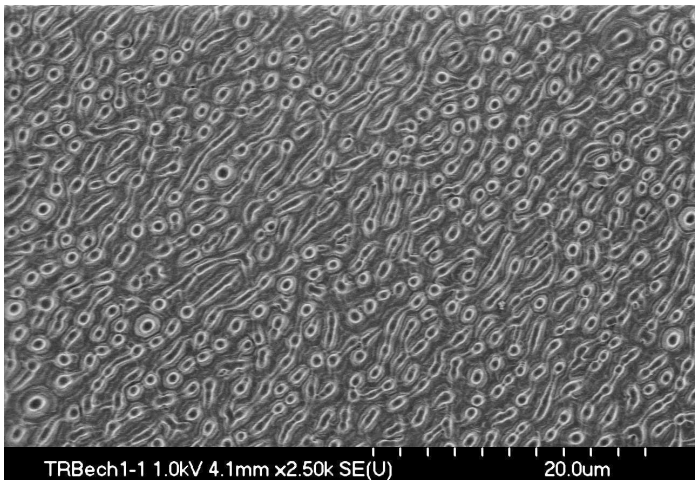


Figure 120 : Micrographie MEB du PET après irradiation par LASER excimère 248 nm (10 coups, 10 Hz, 120 mJ/cm²)

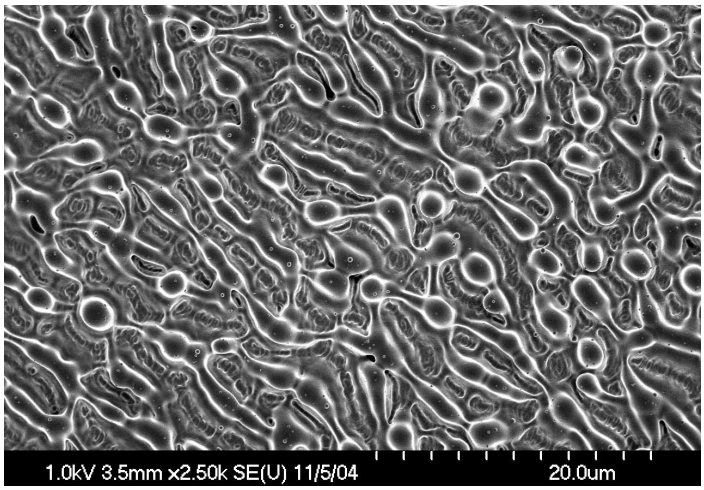


Figure 121 : Micrographie MEB du PET après irradiation par LASER YAG 266 nm (10 coups, 10 Hz, 120 mJ/cm²)

5.2.6.4. Tableau récapitulatif

L'ensemble des résultats physico-chimiques et biologiques a été regroupé dans le Tableau 12. Celui-ci nous permet de confirmer un enseignement majeur : le LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde est le seul capable d'améliorer significativement les résultats, dans la limite des expérimentations réalisées dans ce mémoire.

	YAG 1064 nm	YAG 532 nm	YAG 266 nm	Excimère 193 nm	Excimère 248 nm
Rugosité	=	=	↗↗↗	↗ =	↗↗
Energie de surface	=	=	↗ ↘	↗↗↗	↗↗
Chimie					↗ C ; ↘ O
Prolifération	↘	↘	=	= ↘	↗↗
Vitalité	↘	↘	=	=	= ↗
Adhésion immédiate	=	=	↘ =	↗ =	↗↗
Morphologie MEB					Surface moins complexe
Immunocyto-chimie					Actine : ↘ Vinculine : =

Tableau 12 : Comparaison des résultats généraux entre les différents LASERS

6. DISCUSSION

Le travail présenté dans ce mémoire a pour but principal d'améliorer les propriétés de surface du PET dans un but biomédical [33]. Bien que quelques investigations aient essayé, de façon sporadique, d'augmenter la biocompatibilité de matériaux médicaux à l'aide de LASER excimère, aucune d'entre elle ne renseignait jamais les conditions expérimentales complètes [27,28,31,35]. Cette situation de fait ne manquait pas de porter préjudice à tout chercheur souhaitant soit reproduire les expérimentations proposées, soit comprendre les raisons des modifications des caractéristiques physico-chimiques et biologiques présentées dans l'exposé. Il paraît pourtant évident qu'une connaissance et une sélection minutieuse des paramètres de l'irradiation LASER soient de première importance dans le cas de la fonctionnalisation de surface des polymères [101].

Une analyse critique des multiples conditions d'irradiation s'avérait donc nécessaire, tant les paramètres susceptibles d'évoluer sont nombreux et souvent mal définis par les auteurs. Il fallait ainsi définir une sorte de cahier des charges dans lequel seraient résumées toutes les variables intervenant dans une telle expérimentation. C'est ce que nous avons fait avec les différents tableaux présentés dans ce travail. Il est ainsi aisé de retrouver le seul paramètre variable utilisé dans ce mémoire : l'intensité d'énergie du LASER. Cependant, de nombreuses autres grandeurs seraient également susceptibles de varier, et le champ d'étude offert par ces différentes possibilités est considérablement vaste. Il serait d'ailleurs souhaitable, à l'avenir, de mettre au point un plan d'expériences afin de pouvoir faire varier simultanément plusieurs paramètres dans le même temps.

Les techniques d'irradiation LASER présentent de nombreux avantages par rapport à d'autres techniques conventionnelles : ce sont des procédés précis, rapides, reproductibles, faciles à utiliser, biocompatibles, permettant d'obtenir une surface proprement découpée après traitement [35,40]. En outre, l'irradiation LASER ne requiert l'utilisation d'aucun solvants qui pourraient être nécessaires pour les techniques de modifications chimiques de la surface, réduisant ainsi les risques de pollution environnementale [102,103]. Surtout, il s'agit d'une technique qui permet d'améliorer les propriétés de surface du matériau sans en dégrader les propriétés mécaniques. Ce processus répond ainsi parfaitement bien aux nombreuses exigences imposées par les recherches permettant de faire progresser les qualités d'un dispositif médical. Enfin, cette méthode reste facilement accessible en vue d'une éventuelle industrialisation, puisque les LASERS YAG sont déjà fortement répandus, et que les LASERS excimères connaissent un essor important avec l'avènement des écrans à cristaux liquides de types écrans LCD.

Une relative difficulté qui nous a cependant préoccupé dans cette recherche a consisté à minimiser l'imparfaite stabilité perçue dans les différentes cavités LASERS, pour les irradiations à faible énergie. En effet, l'effort qui leur est demandé pour passer d'une très forte énergie de sortie (370 mJ) à une très faible énergie sur l'échantillon (pouvant descendre jusqu'à 12 mJ/cm²) peut expliquer l'apparition de ces perturbations. De ce fait, une grande

quantité de précautions a été prise pour minimiser ce phénomène. C'est ainsi que nous avons eu recours à l'utilisation d'un masque, d'une technique d'irradiation en mode balayage, et d'un nombre de coups de dix par unité de surface.

Concernant les résultats obtenus dans ce type de projet, il est communément admis que l'analyse de la performance biologique d'un implant fonctionnalisé est un aspect important de la science et de l'élaboration d'un biomatériau. Même si les progrès dans ce domaine ont été très importants, de nombreux aspects restent encore à élucider. La possibilité de contrôler, dans l'espace et dans le temps, les caractéristiques de la surface telles que sa chimie, sa topographie, ou encore sa souplesse permettront de continuer à fournir de nouveaux enseignements dans les aspects fondamentaux des interactions surface - cellule [104]. En effet à l'heure actuelle, aucune théorie n'est encore capable de prédire le résultat de l'interaction entre un tissu ou une cellule et une surface modifiée artificiellement dont on connaît les caractéristiques physico-chimiques [105].

Il est important dans ce genre d'études de respecter les normes européennes et internationales en terme de culture cellulaire. C'est pourquoi nous avons réalisé tous les tests cellulaires selon les normes internationales ISO 10993-5 et européennes EN 30993-5. En effet, comme le montrent les barres d'erreur des résultats biologiques, les résultats ne sont jamais parfaitement constants, mais montrent toujours une tendance à une légère variabilité. Le fait de respecter les normes imposées par la profession permet de s'affranchir de discussions inutiles quant à l'origine des ces variations. Ces fluctuations restent néanmoins tout à fait similaires à celle des autres études ; certaines d'entre elles avaient même d'ailleurs déjà dressé le constat d'une variabilité bien plus importante [106]. En outre, cette dernière étude avait pu mettre en évidence l'importance du choix de la lignée cellulaire : en effet, les auteurs avaient montré que deux lignées cellulaires différentes pouvaient répondre diversement lorsqu'elles étaient mises en contact avec une même surface. Dans notre étude, nous avons donc conservé une lignée cellulaire qui avait démontré ses capacités à proliférer convenablement suite à une fonctionnalisation de surface par traitement LASER [48] : les cellules L132.

En outre, nous avons mis en place des tests de prolifération cellulaire à 3 et 6 jours, de façon à suivre l'évolution du comportement cellulaire sur une double période. Cette dernière durée est le maximum que l'on puisse tester lorsque l'on ne renouvelle pas le milieu de culture, sinon les cellules manquent de nutriments, faisant décroître immédiatement l'activité cellulaire [106]. Cette remarque explique d'ailleurs en partie les résultats de vitalité cellulaire à 6 jours qui ne sont que peu augmentés par rapport au témoin malgré l'augmentation de la prolifération cellulaire sur les échantillons irradiés avec le LASER excimère 248 nm. En effet, après 6 jours de prolifération, les cellules, plus nombreuses, doivent se partager les nutriments qui, au contraire, sont quasiment épuisés.

S'il est vrai que les résultats des tests biologiques occupent une part prépondérante de notre travail, il n'en reste pas moins vrai que les caractérisations physico-chimiques du matériau après irradiation constituent un aspect important de l'évaluation d'un matériel médical implantable. D'ailleurs, il a été montré que les propriétés de surface du matériau sont un des paramètres clé capables de causer la dégradation ou la thrombogénicité des polymères utilisés en tant que matériel médical [107], démontrant ainsi la nécessité d'une caractérisation précise de la surface du polymère ultérieurement implantable. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser dans cette étude les tests physico-chimiques fondamentaux [108,109,110], capables d'apporter des explications aux modifications des résultats biologiques : aspect de surface (microscopie optique, MEB) ; rugosité (profilomètre) ; composition chimique de surface (XPS) ; énergie de surface (angle de goutte).

Ces résultats dans le domaine physique ne montrent quasiment pas d'effet d'une irradiation par LASER YAG 1064 nm ou LASER YAG 532 nm sur la rugosité ni la mouillabilité. Cette absence d'interaction entre le faisceau LASER et le PET pouvait être attendue au regard des résultats des spectres d'absorption obtenus par spectrométrie. Néanmoins, on ne peut pas dire que l'irradiation par ces LASERS soit sans effet, puisque les valeurs de prolifération cellulaire sont affectées par la surface ainsi traitée, démontrant une tendance à la baisse de la quantité cellulaire. Ces résultats peu encourageants nous font ainsi abandonner ces deux LASERS, puisque la première partie de notre étude nous permet d'être confiants dans la qualité du substrat utilisé. En revanche nous pensions obtenir des résultats biologiques plus prometteurs avec le LASER YAG 266 nm, puisque sa longueur d'onde est très proche du LASER excimère 248 nm qui avait démontré de très bonnes dispositions dans la première partie de cette étude. Pourtant les prolifération, vitalité et adhésion cellulaires ne semblent nullement influencées par le traitement de surface mis en œuvre. En revanche, les mouillabilité et surtout rugosité sont nettement modifiées par le faisceau LASER. Ce constat confirme parfaitement que la réussite ou non d'une fonctionnalisation de surface d'un matériau n'est pas simplement due à l'un ou l'autre de ces paramètres, mais plutôt à un enchevêtrement complexe de ces nombreuses variables : avec le LASER YAG 266 nm (comme avec le LASER excimère 248 nm), les mouillabilité et rugosité sont augmentées, mais pas la prolifération cellulaire. Nous pensons que cette différence entre les deux LASERS est due à l'état de surface explicitement différent, comme l'ont démontré les micrographies prises au microscope électronique à balayage.

Les LASERS YAG n'étant pas à la hauteur des résultats espérés, il nous restait à comparer les LASERS excimères entre eux. Cela a été chose faite avec le LASER excimère à 193 nm de longueur d'onde. Notre étude a démontré une forte capacité de ce LASER à augmenter à la fois la mouillabilité et la rugosité du Melinex®. Pourtant une fois de plus, les résultats cellulaires ne répondent pas favorablement, et ceci malgré une gamme d'énergies

étudiées très vaste (20 à 500 mJ/cm²). Une fois encore, les micrographies MEB ont prouvé que l'état de la surface laissée par le passage du faisceau LASER sur le PET est nettement différent entre les deux LASERS excimères. La taille des structures créées à la surface du PET étant directement liée à la longueur d'onde du LASER, il semblerait que la dimension optimale de celles-ci vis-à-vis du comportement cellulaire soit uniquement obtenue à l'aide du LASER excimère 248 nm.

Incontestablement, les meilleurs résultats biologiques sont donc obtenus avec le LASER excimère travaillant à 248 nm de longueur d'onde, LASER que nous avions eu la chance d'utiliser dès le début de cette étude. Ce LASER a été le seul capable d'augmenter de façon significative le nombre de cellules après six jours de mise en culture, et ceci avec un bon indice de corrélation. De plus, les tests réalisés au Bleu Alamar ont prouvé que le traitement LASER n'altérait pas la vitalité cellulaire. Enfin, les expériences réalisées au *p*-NPP ont démontré la faculté du LASER excimère 248 nm à augmenter la vitesse de l'adhésion cellulaire immédiate. La littérature nous indique que la rugosité et la chimie de surface sont les principaux facteurs permettant d'expliquer l'amélioration de l'adhésion cellulaire [51,97,98]. Néanmoins concernant les résultats biologiques considérés dans leur ensemble, nous pensons que cinq raisons peuvent être avancées pour expliquer un tel progrès : la propreté optimale du matériau après irradiation [35], l'amélioration de l'énergie de surface du PET [45,47,50,65,111], de sa chimie de surface [41,46], de sa rugosité [35,53,98] et finalement de la topographie de la surface après traitement.

La propreté de la surface après traitement LASER n'est pas spécifique au LASER excimère 248 nm, puisque les différents photographies de microscopie optique et micrographies MEB ont démontré un état de surface impeccable, quelque soit le LASER utilisé, et quelle que soit la puissance mise en œuvre sur le substrat. Néanmoins, ce paramètre est important à souligner et les techniques LASERS font partie des rares techniques à permettre d'obtenir systématiquement un tel résultat [35].

Comme d'autres études l'ont montré, la tension de surface du PET est augmentée avec le traitement LASER, rendant donc le polymère plus hydrophile [27,48,49,112]. Comme dans notre étude, Laurens *et al.* [113] avaient déjà démontré le caractère inconstant dans le temps de l'hydrophilie du matériau irradié. En effet, l'angle de goutte de l'eau a tendance à évoluer en fonction du temps, pouvant expliquer en partie les possibles variations observées dans les expériences biologiques. Cette élévation peut être expliquée à la fois par l'augmentation de la rugosité [40], mais aussi par l'apparition de nouveaux groupements chimiques en surface avec la formation de groupements polaires tels que hydroxyle, carboxyle et peroxydes [38], entraînant en retour l'augmentation de l'énergie de surface du PET [87].

Concernant la chimie de la surface, notre étude a mis en évidence une diminution du rapport O/C. Cette donnée est certainement la plus discutée dans la littérature, tant les résultats peuvent être dissemblables d'une étude à une autre [113]. La communication

incomplète des conditions expérimentales peut expliquer en partie ces résultats, de même que la nature du PET utilisé pour l'étude. Néanmoins, les progrès réalisés dans les sciences physico-chimiques permettent de trouver des arguments pour expliquer les résultats : dans le cas d'une diminution du taux d'oxygène, la raison invoquée est une cassure des groupes O = C – O, aboutissant à une élimination de CO et surtout de CO_2. Nos expérimentations menées au moyen d'analyses par XPS nous permettent de confirmer cette hypothèse. Au contraire, ce phénomène est en constante compétition avec une oxydation de surface lorsque le traitement est mené en atmosphère ambiante, la surface devenant alors suffisamment « sensible » pour capter les molécules d'oxygène présentes dans l'atmosphère [8,42,83,101,114]. De toute évidence, l'ensemble de ces phénomènes est capable de se produire lors d'une irradiation LASER, l'un ou l'autre prédominant selon la fréquence de répétition, l'énergie utilisée, ou encore le nombre de coups apportés par unité de surface.

Enfin concernant l'état de surface du PET après irradiation, notre étude a démontré la facilité du LASER à augmenter la rugosité du matériau. Cette rugosité accrue du PET va influencer favorablement le comportement cellulaire, mais pas à n'importe quelles conditions. En effet, d'une part le Ra doit être d'ordre micrométrique, car en dessous l'influence sur le comportement cellulaire n'a jamais été démontrée [53-55]. Le LASER excimère 248 nm permet d'obtenir une rugosité d'ordre micrométrique. D'autre part, comme nous l'avons démontré avec les micrographies MEB, la topographie de la surface joue un rôle aussi important que la rugosité. Cette affirmation est nouvelle puisqu'elle n'a jamais été retrouvée dans aucune publication. Néanmoins son importance est considérable, sinon comment expliquer les différences importantes de comportement cellulaire entre une irradiation avec le LASER YAG 266 nm et le LASER excimère 248 nm qui montrent tous les deux une rugosité et une mouillabilité accrues ?

Une observation intéressante s'est glissée dans les résultats de prolifération cellulaire avec le Melinex® : nous nous attendions effectivement à obtenir de meilleurs résultats en dessous du seuil d'ablation, alors que c'est le contraire qui se produit : les meilleurs résultats de prolifération sont obtenus aux alentours de 120 mJ/cm². Peut-être que dans ce cas précis, la rugosité de la surface joue un rôle plus important que la chimie de surface ou la mouillabilité [51]. Cependant l'observation des micrographies réalisées au MEB semble montrer une plus belle morphologie cellulaire pour un PET irradié au dessous du seuil d'ablation qu'au dessus de celui-ci. Il serait alors éventuellement intéressant d'appliquer une simple rugosité au PET avec une autre méthode (par exemple par sablage), et d'étudier l'impact sur les cellules. Il serait alors possible de venir, en complément, irradier à de très faibles énergies pour conjuguer les résultats. Cette solution, séduisante sur le papier, risquerait toutefois d'être difficile à mettre en œuvre : maintenant que l'on connaît l'importance de la propreté de la surface et de sa morphologie, la technique du sablage ne semble pas offrir toutes les garanties à cet égard.

Enfin, nos résultats biologiques montrent que les valeurs de puissance LASER les plus élevées ne sont pas nécessaires car l'augmentation des prolifération et adhésion cellulaires ne sont plus améliorées. Il y aurait alors une consommation d'énergie excessive sans bénéfice complémentaire. Ainsi, l'intérêt de ce travail est qu'il permet de tirer des conclusions claires d'une part sur le choix du LASER à adopter, puisque le LASER excimère 248 nm est de loin celui qui se détache de tous les autres. D'autre part, nous pouvons affirmer que les meilleures valeurs de réglage de l'intensité d'énergie sont situées entre 90 et 120 mJ/cm². En effet, ce sont les deux seules valeurs de prolifération cellulaire qui sont statistiquement plus élevées que le PET vierge. En outre, les tests au Bleu Alamar réalisés sur ces substrats montrent une vitalité cellulaire semblable au témoin, ceci malgré le nombre plus important de cellules, pourtant responsable de l'épuisement des nutriments.

Certes, les meilleures valeurs d'adhésion cellulaire sont obtenues à 180 mJ/cm², mais cette différence n'est pas statistiquement significative ; de plus les résultats de prolifération cellulaire à six jours deviennent moins élevés qu'après trois jours de culture ; enfin les tests de marquage immunocytochimiques et de morphologie cellulaire au MEB montrent une désorganisation du cytosquelette pour des valeurs d'énergie si élevées. On devrait d'ailleurs pouvoir donner une considération plus importante à ces deux derniers tests, car ils sont pratiqués après trois jours de culture cellulaire, contrairement à l'adhésion cellulaire immédiate qui se déroule pendant les deux premières heures de culture. On peut s'imaginer que les cellules cherchent à adhérer par nécessité physiologique et que le temps n'a pas été suffisamment long pour que la structure ou la chimie de la surface puisse avoir un effet réel sur leur comportement. C'est d'ailleurs ce qui avait été remarqué avec les tests d'adhésion sur le Nickel qui montraient une adhésion cellulaire immédiate proche du témoin, alors que le marquage immunocytochimique à trois jours montrait une réelle désorganisation du cytosquelette, car dans ce cas l'action néfaste des ions Nickel libérés à moyen terme a véritablement eu le temps de s'opérer [115]. C'est pour cette raison que nous retiendrons comme paramètre optimal l'utilisation du LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde, utilisé à des énergies de 90 à 120 mJ/cm².

Pour terminer, nous aimerions souligner qu'il s'agit d'un LASER UV (puisque irradiant à une longueur d'onde de 248 nm) qui nous a permis d'obtenir ces excellents résultats. D'autres expérimentations avaient été menées par un procédé simple d'exposition à de la lumière ultra-violette par l'intermédiaire d'une lampe fournissant une longueur d'onde de 172 nm. Dans ce cas, les résultats étaient plutôt décevants puisque les adhésion et prolifération cellulaire n'étaient pas augmentées par rapport aux échantillons de PET non exposés [116]. Ces conclusions confirmaient donc bien notre choix d'utiliser une irradiation LASER plutôt qu'une simple exposition à de la lumière UV. En outre, les données de cette étude confirment que la méthode de stérilisation par la lumière UV que nous avons utilisée avant les tests cellulaires n'influence pas les résultats de nos expérimentations biologiques.

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Comme nous le disions en introduction à ce travail, l'irradiation du PET par LASER excimère dans un but biomédical est une idée qui n'a pas été souvent appliquée dans l'histoire des biomatériaux : seules quelques tentatives ont été effectuées de manière sporadique [27,28,31,35,48]. Mais l'absence de critères d'irradiation correctement définis nous empêche de profiter pleinement des conclusions de ces essais. La première partie de notre travail a donc consisté à démontrer l'importance du choix du matériau sur lequel va s'appuyer par la suite toute notre réflexion pour établir notre plan de recherches. Incontestablement, le Melinex® s'est détaché des deux autres PET étudiés, et nous a permis d'envisager sereinement la poursuite des expérimentations.

La seconde partie de cet ouvrage nous a permis d'étudier différents LASERS dans le but de fonctionnaliser les dispositifs médicaux en PET. Cette étude a été réalisée en connaissant parfaitement le substrat utilisé d'une part, mais aussi les paramètres d'utilisation des LASERS d'autre part. Les résultats qui découlent de ce travail sont encourageants et nous incitent grandement à poursuivre dans cette voie. En effet, des améliorations de la biocompatibilité du matériau ont été nettement obtenues avec le LASER excimère à 248 nm de longueur d'onde, grâce à l'impact du traitement LASER sur les propriétés physico-chimiques du matériau que nous avons constatées : chimie, mouillabilité, rugosité et morphologie de la surface, et le tout dans des conditions irréprochables de propreté. L'importance que nous avons soulignée de connaître et de maîtriser parfaitement l'ensemble des conditions d'irradiation doit permettre d'obtenir la reproductibilité des résultats, préalable indispensable à l'industrialisation du procédé. Notre travail a d'ailleurs permis de confirmer cette hypothèse, puisque les résultats biologiques obtenus avec le LASER Lambda Physik série Compex 205 (LSPES, Mons, Belgique), sont à la hauteur de ceux obtenus avec le LASER GSI Lumonics ipex-848 (CERLA, Villeneuve d'Ascq, France). Enfin, le regain d'intérêt actuel du marché pour les LASERS excimères ne peut que jouer en notre faveur.

Les résultats obtenus avec ce dernier LASER sont donc tout à fait prometteurs, et pourtant seule une petite partie des possibilités offertes par cette technique a été explorée. Effectivement, dans notre étude, nous n'avons fait varier qu'un seul paramètre, qui est l'intensité de l'énergie d'irradiation. Maintenant que nous connaissons parfaitement les différents critères intervenant lors d'une irradiation LASER, et que nous nous sommes directement confrontés aux difficultés liées à de tels champs d'investigation, nous pourrons faire varier d'autres paramètres et étudier leur impact sur le PET. Ainsi il devient possible d'envisager de faire varier la vitesse de balayage, la fréquence d'irradiation (puisque nous utilisons des LASERS pulsés), le nombre de coups par unité de surface, ou encore - et surtout - l'atmosphère dans laquelle aura lieu l'irradiation. Ce dernier paramètre est peut-être le plus important à considérer, puisque l'on sait à quel point le matériau fraîchement irradié est sensible à son environnement. Ainsi, dans le cadre du CERLA, il est facilement envisageable de monter la manipulation en irradiant dans une atmosphère saturée en azote ou en oxygène.

Cette façon d'agir permettrait d'augmenter encore le taux d'oxygène à la surface du matériau, dont de nombreuses études ont démontré le caractère bénéfique sur le comportement cellulaire. En outre, maintenant que les meilleures conditions d'irradiation sont connues, on pourrait envisager d'irradier directement des prothèses en PET sous forme tissée ou tricotée, de façon à confirmer l'ensemble des résultats obtenus dans ce mémoire. En conséquence, nous garderons toujours un œil ouvert sur les possibilités d'application de ce procédé original visant à faire du PET non plus un matériau inerte, mais au contraire une prothèse véritablement intégrée capable de se confondre dans son milieu environnant.

De plus, une ouverture possible de notre sujet de recherche dans le domaine biomédical, et plus particulièrement dans la spécialité de l'Odontologie, est la voie de l'implant palatin en PET. Cette technique chirurgicale récente (les premières publications datent de 2004 [117,118,119,120]) a pour but de diminuer l'intensité des ronflements chez les patients concernés. Le traitement consiste à introduire dans le palais mou des implants en PET (Pillar procedure, Restore Medical, Inc., St. Paul, Minnesota). Cette thérapeutique peu invasive, simple et de faible coût [121], donne de bons résultats sur le plan clinique : trois mois après l'intervention, 90% des conjoints recommanderaient ce traitement à un proche [20]. Cependant, il arrive régulièrement qu'un implant soit rejeté : l'étude de Maurer *et al.* relève 11% de perte d'implants à deux mois post-opératoires [21]. Ces rejets peuvent être attribués à une biocompatibilité insuffisante de l'implant en PET, ou encore à des micro-mouvements du PET dans son site d'implantation, liés à une mauvaise « liaison » entre l'implant et les tissus mous, entretenant ainsi une inflammation permanente au niveau du site implanté [122]. La fonctionnalisation de surface de ces implants en PET pourrait ainsi apporter une réponse efficace à ce type d'évènements indésirables.

Enfin, notre formation de chirurgien-dentiste aidant, d'autres idées d'applications de ce matériau fonctionnalisé dans les domaines odontologique ou maxillo-facial pourraient être envisageables. Ainsi, il serait intéressant par exemple d'utiliser le polyéthylène téréphtalate dans les remplacements des grandes pertes osseuses de la mandibule, pour lesquelles très peu de solutions existent pour le moment. Le but recherché serait esthétique dans un premier temps, par conservation du soutien des tissus mous de la face, puis, le cas échéant, fonctionnel dans un second temps, en étudiant la possibilité d'implanter la prothèse en PET alors intégrée. Les perspectives d'avenir dans cette branche sont très importantes puisque l'idée est toute nouvelle, qu'aucune étude n'a donc été menée, et qu'elle touche des causes aussi différentes que les origines génétiques, morbides (cancers de la cavité buccale) ou encore accidentogènes (traumatismes par balle, par coups, par accidents de la route).

8. BIBLIOGRAPHIE

[1] KURELLA A, DAHOTRE NB. Review paper : surface modification for bioimplants : the role of laser surface engineering. *J Biomater Appl 2005;**20:**5-50*.

[2] O'BRIEN T, COLLIN J. Prosthetic vascular graft infection. *Br J Surg 1992;**79:**1262-7*.

[3] HAULON S, DEVOS P, WILLOTEAUX S, MOUNIER-VEHIER C, SOKOLOFF A, HALNA P, BEREGI JP, KOUSSA M. Risk factors of early and late complications in patients undergoing endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg 2003;**25:**118-24*.

[4] ALAERTS JA, DE CUPERE VM, MOSER S, DE AGUILAR PVB, ROUXHET PG. Surface characterization of poly(methyl methacrylate) microgrooved for contact guidance of mammalian cells. *Biomaterials 2001;**22:**1635-42*.

[5] SATRIANO C, CONTE CE, MARLETTA G. Surface chemical structure and cell adhesion onto ion beam modified polysiloxane. *Langmuir 2001;**17:**2243-50*.

[6] GOESSL A, GARRISON MD, LHOEST JB, HOFFMAN AS. Plasma lithography thin-film patterning of polymeric biomaterials by RF plasma polymerization I: Surface preparation and analysis. *J Biomater Sci Polym Ed 2001;**12:**721-38*.

[7] SCHÜTZ A, JEONG JY, BABAYAN SE, PARK JY, SELWYN GS, HICKS RF. The atmospheric pressure plasma jet : a review and comparison to other plasma sources. *IEEE Trans Plasma Sci 1998;**26:**1685-94*.

[8] LAUDE L, MARTINEZ D, DICARA C, HANUS F, KOLEV K. The ablation of polymers under excimer laser irradiation : the physics of the process and the polymer structure. *Nucl Instr and Meth in Phys Res B 2001;**185**:147-55.*

[9] WILLIAMS DF. Definitions in Biomaterials : Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, 3-5 March 1986. *In : Williams D, ed. Progress in biomedical engineering. Vol. 4. Amsterdam : EIsevier Science, 1987.*

[10] WILLIAMS DF, BLACK J, DOHERTY PJ. Consensus report of second conference on definitions in biomaterials. *In : Doherty P, Williams R, Williams D, Lee A, eds. Biomaterial-tissue interfaces. Vol. 10. Amsterdam : EIsevier, pp. 525-533, 1992*.

[11] BRANEMARK PI, ADELL R, BREINE U, HANSSON BO, LINDSTROM J, OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scan J Plast Reconstr Surg 1969;**3:**81-100*.

[12] RATNER BD. Surface modification of polymers : chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors & Bioelectronics 1995;**10:**797-804.*

[13] RATNER BD. Plasma deposition of organic thin film – control of film chemistry. *ACS Polym Prepr 1993;**34:**643-4.*

[14] HOMSY CA, MC DONALD KE, AKERS WW, SHORT C, FREEMAN BS. Surgical Suture-Canine tissue interaction for six common suture types. *J Biomed Mater Res 1968;**2:** 215-30.*

[15] AMIS A, CAMBURN M, KEMPSON S, RADFORD W, STEAD A. Anterior cruciate ligament replacement with polyester fibre. *J Bone Joint Surg 1992;**74:**605-13.*

[16] SEITZ H, MARLOVITS S, SCHWENDENWEIN I, MÜLLER E, VĖCSEI V. Biocompatibility of polyethylene terephthalate augmentation device in repair of the anterior cruciate ligament. *Biomaterials 1998;**19:**189-96.*

[17] KLINGE U, KLOSTERHALFEN B, CONZE J, LIMBERG W, OBOLENSKI B, ÖTTINGER A, SCHUMPELICK V. Modified mesh for hernia repair that is adapted to the physiology of the abdominal wall. *Eur J Surg 1998;**164:**951-60.*

[18] SOARES B, GUIDOIN R, MAROIS Y, MARTIN L, KING M, LAROCHE G, ZHANG Z, CHARARA J, GIRARD J. In vivo characterization of a fluoropassivated gelatin-impregnated polyester mesh for hernia repair. *J Biomed Mater Res 1996;**32:**293-305.*

[19] VON RECUM AF. Applications and failure modes of percutaneous devices : a review. *J Biomed Mater Res 1984;**18:**323-36.*

[20] ROMANOW JH, CATALANO PJ. Initial U.S. pilot study : palatal implants for the treatment of snoring. *Otolaryngol Head Neck Surg 2006;**134:**551-7.*

[21] MAURER JT, HEIN G, VERSE TH, HÖRMANN K, STUCK BA. Long-term results of palatal implants for primary snoring. *Otolaryngol Head Neck Surg 2005;**133:**573-8.*

[22] HARRISON JH. Synhetic materials as vascular prostheses. I. A comparative study in small vessels of nylon, Dacron, orlon, ivalon sponge and Teflon. *Am J surg 1958;**95:**3-15.*

[23] HARRISON JH. Synhetic materials as vascular prostheses. II. A comparative study of nylon, Dacron, orlon, ivalon sponge and Teflon in large blood vessels vath tensile strength studies. *Am J surg 1958;**95:**16-28.*

[24] STRUSZCZYK MH, BEDNAREK P, RACZYNSKI K. Synthetic vascular prostheses. *Polim Med 2002;**32:**13-22.*

[25] WHITE GH, MAY J, WAUGH RC, CHAUFOUR X, YU W. Type III and type IV endoleak : toward a complete definition of blood flow in the sac after endoluminal AAA repair. *J End Surg 1998;**5:**305-9.*

[26] WHITE GH, YU W, MAY J, CHAUFOUR X, STEPHEN MS. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms : classification, incidence, diagnosis, and management. *J End Surg 1997;**4:**152-68.*

[27] DADSETAN M, MIRZADEH H, SHARIFI-SANJANI N, SALEHIAN P. In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephtalate surface. *J Biomed Mater Res 2001;**54:**540-6.*

[28] DADSETAN M, MIRZADEH H, SHARIFI-SANJANI N, DALIRI M. Cell behaviour on laser surface-modified polyethylene terephtalate in vitro. *J Biomed Mater Res 2001;**57:**183-9.*

[29] SAITO N, YAMASHITA S, MATSUDA T. Laser-Irradiation-Induced surface graft polymerization method. *J Polym Sci A : Polym Chem 1997;**35:**747-50.*

[30] DUNN DS, OUDERKIRK AJ. Chemical and Physical Properties of Laser-Modified Polymers. *Macromolecules 1990;**23**:770-4.*

[31] HUNT JA, WILLIAMS RL, TAVAKOLI SM, RICHES ST. Laser surface modification of polymers to improve bio-compatibility. *J Mater Sci : Mater Med 1995;**6:**813-7.*

[32] SHALABY SW, HOFFMAN AS, RATNER BD, HORBETT TA. Polymers as biomaterial. *New-York: Plenum press 1984:135-47.*

[33] HORNEZ JC, BLANCHEMAIN N, HAULON S, HILDEBRAND HF, KIRKPATRICK CJ, LAUDE LD. Traitement de polymères et silicones au laser UV pour fonctionnalisation de surfaces en vue d'applications biomédicales. *Enveloppe Soleau n° 124660, enregistré le 14/02/2002.*

[34] LAZARE S, LOPEZ J, WEISBUCH F. High aspect ratio microdrilling in polymerics materials with intense KrF laser radiation. *Appl Phys A - Mat Sci & process 1999;**69:**S1-S6.*

[35] DUNCAN AC, WEISBUCH F, ROUAIS F, LAZARE S, BAQUEY CH. Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth. *Biosensors & Bioelectronics 2002;**17**:413-26.*

[36] ASHFOLD MN, CLAEYSSENS F, FUGE GM, HENLEY SJ. Pulsed laser ablation and deposition of thin films. *Chem Soc Rev 2004;**33**:23-31.*

[37] LAZARE S, BENET P. Surface amorphization of Mylar films with excimer laser radiation above and below ablation threshold : Ellipsometric measurements. *J Appl Phys 1993;**74:** 4953-7.*

[38] LAURENS P, OULD BOUALI M, MEDUCIN F, SADRAS B. Characterization of modifications of polymer surfaces after excimer laser treatments below the ablation treshold. *Appl Surf Sci 2000;**154-155**:211-6.*

[39] WATANABE H, TAKATA T, TSUGE M. Polymer surface modification due to excimer laser radiation – Chemical and physical changes in the surface structure of poly(ethylene terephthalate). *Polym Int 1993;**31**:247-54.*

[40] PETIT S, LAURENS P, AMOUROUX J, AREFI-KHONSARI F. Excimer laser treatment of PET before plasma metallization. *Appl Surf Sci 2000;**168**:300-3.*

[41] RAMIRES PA, MIRENGHI L, ROMANO AR, PALUMBO F, NICOLARDI G. Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells. *J Biomed Mater Res 2000;**51**:535-9.*

[42] NIINO H, YABE A. Positively charged surface potential of polymer films after excimer laser ablation : application to selective-area electroless plating on the ablated films. *Appl Phys Lett 1992;**60**:2697-9.*

[43] WAN H, WILLIAMS RL, DOHERTY PJ, WILLIAMS DF. A study of cell behaviour on the surfaces of multifilament materials. *J Mater Sci : Mater Med 1997;**8**:45-51.*

[44] DEWEZ JL, DOREN A, SCHNEIDER YJ, ROUXHET PG. Competitive adsorption of proteins : Key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials 1999;**20**:547-59.*

[45] DE BARTOLO L, MORELLI S, BADER A, DRIOLI E. Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials 2002;**23**:2485-97.*

[46] ITO Y. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials 1999;**20**:2333-42.*

[47] CATAPANO G, DI LORENZO MC, DELLA VOLPE C, DE BARTOLO L, MIGLIARESI C. Polymeric membranes for hybrid liver support devices : the effect of membranes surface wettability on hepatocyte viability and functions. *J Biomater Sci Polym Ed 1996;**7**:1017-27.*

[48] HAULON S. Endoprothèses couvertes de l'aorte abdominale : fuites de type II et traitements de surface. *Thèse de doctorat d'université, Lille 2, mai 2002.*

[49] DADSETAN M, MIRZADEH H, SHARIFI N. Effect of CO_2 laser radiation on the surface properties of polyethylene terephtalate. *Radiat Phys Chem 1999;**56**:597-604.*

[50] LEE JH, KHANG G, LEE JW, LEE HB. Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient. *J Col Interf Sci 1998;**205**:323-30.*

[51] CURTIS A, WILKINSON C. Review : Topographical control of cells. *Biomaterials 1997;**18**:1573-83.*

[52] WATANABE H, YAMAMOTO M. Chemical structure change of a KrF-laser irradiated PET fiber surface. *J Appl Polym Sci 1999;**71:**2027-31*.

[53] FLEMMING RG, MURPHY CJ, ABRAMS GA, GOODMAN SL, NEALEY PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials 1999;**20**:573-88.*

[54] XIE Y, SPROULE T, LI Y, POWELL H, LANNUTTI JJ, KNISS DA. Nanoscale modifications of PET polymer surfaces via oxygen plasma discharge yield minimal changes in attachment and growth of mammalian epithelial and mesenchymal cells in vitro. *J Biomed Mater Res 2002;**61**:234-45.*

[55] BALL MD, PRENDERGAST U, O'CONNELL C, SHERLOCK R. Comparison of cell interactions with laser machined micron- and nanoscale features in polymer. *Exp Mol Pathol 2007;**82:**130-4.*

[56] YU F, LI P, SHEN H, MATHUR S, LEHR CM, BAKOWSKY U, MÜCKLICH F. Laser interference lithography as a new and efficient technique for micropatterning of biopolymer surface. *Biomaterials 2005;**26:**2307-12*.

[57] YU F, MÜCKLICH F, LI P, SHEN H, MATHUR S, LEHR CM, BAKOWSKY U. In vitro cell response to a polymer surface micropatterned by laser interference lithography. *Biomacromolecules 2005;**6:**1160-7*.

[58] LAMPIN M, WAROCQUIER-CLEROUT R, LEGRIS C, DEGRANGE M, SIGOT-LUIZARD MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res 1997;**36:**99-108*.

[59] KOKAI F, SAITO H, FUJIOKA T. Characterization of Polymer Surfaces after KrF Laser Ablation by Infrared Spectroscopy. *Macromolecules 1990;**23**;676-8.*

[60] HORNEZ JC, LEFEVRE A, JOLY D, HILDEBRAND HF. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomolecular Engineering 2002;**19**:103-18.*

[61] IKADA Y. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials 1994;**15**:725-36.*

[62] HORBETT TA, SCHWAY MB. Correlations between mouse 3T3 cell spreading and serum fibronectin adsorption on glass and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers. *J Biomed Mater Res 1988;**22:**763-93*.

[63] LEWANDOWSKA K, PERGAMENT E, SUKENIK CN, CULP LA. Cell-typespecific adhesion mechanisms mediated by fibronectin adsorbed to chemically derivatized substrata. *J Biomed Mater Res 1992;**26:**1343-63*.

[64] HOFFMAN AS. Letter to the Editor : a general classification schema for “hydrophilic” and “hydrophobic” biomaterial surface. *J Biomed Mater Res 1986;**20:**ix-xi.*

[65] REDEY SA, NARDIN M, BERNACHE-ASSOLANT D, REY C, DELANNOY P, SEDEL L, MARIE PJ. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite : Role of surface energy. *J Biomed Mater Res 2000;**50**:353-64*.

[66] QUENSIERRE J-D. Modification de l’énergie libre de surface de corps poreux par traitement plasma froid : applications industrielles aux articles d’écriture. *Thèse de doctorat d’université, Lille 1, 1998.*

[67] DAVIS EV, BOLIN VS. Continuous cultivation of isogenous cell lines from human embryo. *Fed Proc 1960;**19:**386*.

[68] HILDEBRAND HF, D’HOOGHE MC, SHIRALI P, BAILLY C, KERCKAERT JP. Uptake and biological transformation of beta NiS and alpha Ni3S2 by human embryonic pulmonary epithelial cells (L132) in culture. *Carcinogenesis 1990;**11:**1943-50*.

[69] HILDEBRAND HF, HORNEZ JC. Biological response and biocompatibility. *In: Helsen J, Breme H, eds. Metals as biomaterials. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, pp. 265-290, 1998*.

[70] FRAZIER ME, ANDREWS TK. In: KHARASCH N, editor. Trace metals in health and disease. *New-York: Raven Press; 1979. p. 71–81*.

[71] PUCK TT, MARCUS PI. A rapid method for viable cell titration and clone production with HELA cells in tissue culture - the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *USA: Proc Natl Acad Sci 1955;**41:**432-7*.

[72] O'BRIEN J, WILSON I, ORTON T, POGNAN F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mamalian cell toxicity. *Eur J Biochem 2000;**267:**5421-6*.

[73] TROCHON V, MABILAT-PRAGNON C, BERTRAND P, LEGRAND Y, SORIA J, SORIA C, DELPECH B, LU H. Hyaluronectin blocks the simulatory effect of hyaluronan-derived fragments on endothelial cells during angiogenesis in vitro. *FEBS letter 1997;**418:**6-10*.

[74] KOOLMAN J, ROHM KH. Atlas de biochimie. *Editions Flammarion, Paris, Médecine-Sciences, 1994*.

[75] BURRIDGE K, FATH K, KELLY T, NUCKOLLS G, TURNER C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol 1988;**4:**487-525*.

[76] BURRIDGE K, CHRZANOWSKA-WODNICKA M. Focal adhesion, contractility and signaling. *Annu Rev Cell Biol 1996;**12:**463-519*.

[77] LINEZ-BATAILLON P. Contribution à l'étude du mécanisme de l'adhésion d'ostéoblastes (MC3T3-E1) sur des alliages implantaires polis miroir. *Thèse de doctorat d'université, Lille 2, 2004.*

[78] KRUGER J, NIINO H, YABE A. Investigation of excimer laser ablation threshold of polymers using a microphone. *Appl Surf Sci 2002;**197:**800-4.*

[79] WATANABE H, YAMAMOTO M. Laser ablation of poly(ethylene terephtalate). *J Appl Polym Sci 1997;**64:**1203-9*.

[80] LAZARE S, GRANIER V. Excimer laser light induced ablation and reactions at polymers surfaces as measured with a quartz-crystal microbalance. *J Appl Phys 1988;**63:**2110-5.*

[81] DYER PE, SIDHU J. Excimer laser ablation and thermal coupling efficiency to polymers films. *J Appl Phys 1985;**57:**1420-2.*

[82] WAGNER F, HOFFMANN P. Novel structure formation in poly(ethylene therephthalate) by scanning excimer laser ablation. *Appl Surf Sci 2000;**154-155:**627-32.*

[83] WONG W, CHAN K, YEUNG KW, LAU KS. Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) induced by laser treatment. *Textile Res J 2001;**71:**117-20.*

[84] HOPP B, CSETE M, REVESZ K, VINKO J, BOR Z. Formation of the surface structure of polyethylene terphthalate (PET) due to ArF excimer laser ablation. *Appl Surf Sci 1996;**96-98:**611-6.*

[85] KLOSE S, ARENHOLZ E, HEITZ J, BAUERLE D. Laser-induced dendritic structures on PET (polyethylene terephthalate) : the importance of redeposited ablation products. *Appl Phys A - Mat Sci & process 1999;**69:**S487-S490.*

[86] LINEZ-BATAILLON P, MONCHAU F, BIGERELLE M, HILDEBRAND HF. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomol Eng 2002;**19:**133-41*.

[87] DADSETAN M, MIRZADEH H, SHARIFI N. Effect of CO2 laser radiation on the surface properties of polyethylene terephthalate. *Radiat Phys Chem 1999;**56:**597-604.*

[88] KIM YJ, KANG IK, HUH MW, YOON SC. Surface characterization and in vitro blood compatibility of poly(ethylene terephtalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge. *Biomaterials 2000;**21:**121-30.*

[89] CSETE M, BOR Z. Laser-induced periodic surface structure formation on polyethylene terephthalate. *Appl Surf Sci 1998;**133:**5-16.*

[90] WEISBUCH F, TOKAREV VN, LAZARE S, DEBARRE D. Viscosity of transient melt layer on polymer surface under conditions of KrF laser ablation. *Appl Surf Sci 2002;**186:**95-9.*

[91] KRAJNOVICH DJ. Near-threshold photoablation characteristics of polyamide and poly(ethylene terephthalate). *J Appl Phys 1997;**82:**427-35.*

[92] LIPPERT T, YABE A, WOKAUN A. Laser ablation of doped polymer systems. *Adv Mater 1997;**9:**105-19*.

[93] LI P, BAKOWSKY U, YU F, LOEBACH C, MÜCKLICH F, LEHR CL. Laser ablation patterning by interference induces directional cell growth. *IEEE T Nanobiosci 2003;**2:**138-45*.

[94] CHENG YT, RODAK DE. Is the lotus leaf superhydrophobic? *Appl Phys Lett 2005;**86:**144101*.

[95] GUO Z, ZHOU F, HAO J, LIU W. Stable biomimetic super-hydrophobic engineering materials. *J Am Chem Soc 2005;**127:**15670-1*.

[96] NARHE RD, BEYSENS DA. Water condensation on a super-hydrophobic spike surface. *Europhys Lett 2006;**75:**98-104*.

[97] NAKAYAMA Y, MATSUDA T. Microporous polymer surfaces prepared by an excimer laser ablation technique. *ASAIO J 1994;**40:**590-3*.

[98] BRITLAND S, PERRIDGE C, DENYER M, MORGAN H, CURTIS A, WILKINSON C. Morphogenetic guidance cues can interact synergistically and hierarchically in steering nerve cell growth. *Exp Biol Online - EBO 1996;**1:**2.*

[99] ROCHER Ph. Evaluation de la biocorrosion et de la biocompatibilité d'alliages dentaires avec une attention particulière pour un alliage NiTi superélastique. *Thèse de doctorat d'université, Lille 2, 2004.*

[100] DIENER A, NEBE B, LUTHEN F, BECKER P, BECK L, NEUMANN HG, RYCHLY J. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials 2005;**26:**383-92*.

[101] WONG W, CHAN K, YEUNG KW, LAU KS. Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) by excimer irradiation of high and low intensities. *Mat Res Innov 2001;**4:**344-9.*

[102] WONG W, CHAN K, YEUNG KW, TSANG YM, LAU KS. Surface structuring of poly(ethylene terephthalate) fibres with a UV excimer laser and low temperature plasma. *J Mater Process Technol 2000;**103:**225-9.*

[103] WONG W, CHAN K, YEUNG KW, LAU KS. Surface structuring of poly(ethylene terephthalate) by UV excimer laser. *J Mater Process Technol 2003;**132:**114-8.*

[104] FALCONNET D, CSUCS G, GRANDIN HM, TEXTOR M. Review : surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials 2006;**27:**3044-63.*

[105] VITTE J, BENOLIEL AM, PIERRES A, BONGRAND P. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface? *Eur Cell Mater 2004;**7:**52-63.*

[106] BALL MD, SHERLOCK R, GLYNN T. Cell interactions with laser-modified polymer surfaces. *J Mater Sci Mater Med 2004;**15:**447-9.*

[107] KANNAN RY, SALACINSKI HJ, VARA DS, ODLYHA M, SEIFALIAN AM. Review paper : principles and applications of surface analytical techniques at the vascular interface. *J Biomater Appl 2006;**21:**5-32.*

[108] WERNER C, JACOBASCH HJ. Surface characterization of polymers for medical devices. *Int J Artif Organs 1999;**22:**160-76.*

[109] ALBERT DE. The important role of material and chemical characterisation in device evaluation. *Med Device Technol 2004;**15:**15-8.*

[110] MERRETT K, CORNELIUS RM, MCCLUNG WG, UNSWORTH LD, SHEARDOWN H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. *J Biomater Sci Polym 2002;**13:**593-621.*

[111] ALTANKOV G, GRINNELL F, GROTH T. Studies on the biocompatibility of materials : fibroblasts reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res 1996;**30:**385-91.*

[112] HIRAOKA H, LAZARE S. Surface modifications of Kapton and cured polyimide films by ArF excimer laser : applications to imagewise weting and metallization. *Appl Surf Sci 1990;**46:**264-71*.

[113] LAURENS P, PETIT S, AREFI-KHONSARI F. Study of PET surfaces after laser or plasma treatment : surface modifications and adhesion properties towards Al deposition. *Plasmas and Polymers 2003;**8:**281-95*.

[114] KOKAI F. X-Ray Photoelectron Spectroscopy studies on modified poly(ethylene terephthalate) surfaces after KrF laser ablation. *Japan J Appl Phys 1990;**29:**158-61*.

[115] PETERS K, UNGER RE, BARTH S, GERDES T, KIRKPATRICK CJ. Induction of apoptosis in human microvascular endothelial cells by divalent cobalt ions. Evidence for integrin-mediated signalling via the cytoskeleton. *J Mater Sci Mater Med 2001;**12:**955-8.*

[116] HEITZ J, GUMPENBERGER T, KAHR H, ROMANIN C. Adhesion and proliferation of human vascular cells on UV-light modified polymers. *Biotechnol Appl Biochem 2004;**39:**59-69.*

[117] HO WK, WEI WI, CHUNG KF. Managing disturbing snoring with palatal implants : a pilot study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2004;**130:**753-8.*

[118] KUHNEL TS, HEIN G, HOHENHORST W, MAURER JT. Soft palate implants: a new option for treating habitual snoring. *Eur Arch Otorhinolaryngol 2005;**262:**277-80*.

[119] NORDGARD S, WORMDAL K, BUGTEN V, STENE BK, SKJOSTAD KW. Palatal implants : a new method for the treatment of snoring. *Acta Otolaryngol 2004;**124:**970-5*.

[120] MAURER JT, VERSE T, STUCK BA, HORMANN K, HEIN G. Palatal implants for primary snoring : short-term results of a new minimally invasive surgical technique. *Otolaryngol Head Neck Surg 2005;**132:**125-31*.

[121] NORDGARD S, STENE BK, SKJOSTAD KW, BUGTEN V, WORMDAL K, HANSEN NV, NILSEN AH, MIDTLYNG TH. Palatal implants for the treatment of snoring : long-term results. *Otolaryngol Head Neck Surg 2006;**134**:558-64.*

[122] JAIN R, VON RECUM AF. Fibroblast attachment to smooth and microtextured PET and thin cp-Ti films. *J Biomed Mater Res 2004;**68A:**296-304*.