



HAL
open science

Greffage de copolymères antibactériens sur des surfaces PVC par chimie Click

Jérôme Lafarge

► **To cite this version:**

Jérôme Lafarge. Greffage de copolymères antibactériens sur des surfaces PVC par chimie Click. Autre. INSA de Rouen, 2012. Français. NNT : 2012ISAM0019 . tel-00840218

HAL Id: tel-00840218

<https://theses.hal.science/tel-00840218v1>

Submitted on 2 Jul 2013

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.

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE ROUEN

THÈSE

Présentée par

M. Jérôme LAFARGE

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'INSA de Rouen

Spécialité : Chimie Macromoléculaire
École Doctorale Normande de Chimie

**GREFFAGE DE COPOLYMERES ANTIBACTERIENS SUR
DES SURFACES PVC PAR CHIMIE CLICK**

Date de soutenance le 20 décembre 2012 devant le jury composé de :

Pr V. LANGLOIS	Institut de Chimie et des Matériaux Paris Est	Rapporteur
Pr T. HAMAIDE	Ingénierie des Matériaux Polymères de Lyon	Rapporteur
Dr CH. BRACHAIS	Université de Bourgogne	Examineur
Pr F. BUREL	INSA de Rouen	Examineur
Dr N. KEBIR	INSA de Rouen	Examineur
Dr JF. BRIERE	INSA de Rouen	Invité

A mes parents, ma famille et à tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces (PBS, UMR 6270) et plus particulièrement dans l'équipe Matériaux Macromoléculaires (L2M) de l'INSA de Rouen sous la direction de Monsieur le Professeur Fabrice BUREL. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et confié ce projet pluridisciplinaire. Je le remercie pour son soutien et ses conseils avisés.

Je remercie particulièrement mon tuteur de thèse, Nasreddine KEBIR (« NAS »), qui m'a continuellement encouragé à me dépasser et m'a toujours soutenu dans les moments les plus difficiles. Il m'a permis d'assimiler et de développer des qualités d'abnégation et de rigueur indispensables au métier de chercheur. Ce fut vraiment un plaisir de travailler avec quelqu'un de si passionné, compétent et accessible au quotidien. Merci pour tout le temps et l'énergie consacrés à me former et m'encadrer.

Je remercie les professeurs Valérie LANGLOIS et Thierry HAMAIDE qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pris le temps d'évaluer mes travaux. Je remercie également Claire-Hélène BRACHAIS Maître de conférences qui a accepté de suppléer Monsieur le professeur Jean-Pierre COUVERCELLE et d'examiner mon manuscrit.

Je tiens à remercier Monsieur Thierry JOUENNE, directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe «Biofilms Résistances Interactions Cellules Surfaces». Je retiens sa large culture scientifique, l'aide et le soutien qu'il m'a apporté dans la partie bactériologique de mes travaux.

Je souhaite remercier également Monsieur Jean-François BRIERE, chargé de recherche au CNRS, de m'avoir conseillé, orienté aux cours de mes travaux et d'avoir bien voulu participer au jury de thèse.

Je voudrais aussi remercier Damien SCHAPMAN pour m'avoir permis de réaliser les analyses microscopiques indispensables à la mise en évidence de l'activité antibactérienne des surfaces innovantes développées. Ses compétences techniques ont été essentielles aux résultats que j'ai présentés. Je retiens son humour et les après-midi passionnants à épier les bactéries... Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Virginie GADENNE pour avoir pris de son temps et permis d'effectuer les analyses par AFM. Sa gentillesse et sa disponibilité m'ont touché. Merci également à tous les thésards du laboratoire PBS : Abdel, Nadine, Ghania, Raphaél, Alexandre, Hayette, Ghina, Sandra, Samir, Mohamed...

Je remercie chaleureusement Monsieur Claude Bunel pour sa gentillesse, ses précieux conseils, ses discussions golfiques passionnantes, son humour, sans oublier : Nicolas pour son aide informatique et sa disponibilité ; Philippe pour son humour « cash » ; Gaëlle pour ses règles de sécurité ; Murielle, Laurence et Daniela pour leur aide et leur soutien ; Catherine notre Assistante Ingénieur toujours prête à défendre les doctorants, Jérémy et Sylvaine pour leur aide au quotidien, ainsi qu'à l'ensemble des doctorants, post-doctorants, techniciens, étudiants et stagiaires du laboratoire : les docteurs Najib (Mister Garo) et Issam pour les discussions footballistiques enflammées ; Louise (toujours la pêche et de bonne humeur) et HanBin avec qui j'ai découvert Prague ; Martin (seul supporter du QSG du labo) pour qui j'ai beaucoup de respect et d'amitié ; Majed pour sa sympathie et ses rigolades au labo ; Yuhui pour ses fou rire et son exubérance, Faten pour sa gentillesse ; Thierry pour son aide en chimie et pour les pauses café ; Vincent toujours prêt à rendre service ; Sandra pour son sérieux ; Antoine pour son très bon stage, sans oublier Samir, Mélanie, Ornella et Marc.

« *La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité.* »

Ernest Renan, 1848.

Résumé

Dans le cadre de ce travail, l'objectif était d'élaborer des surfaces PVC antibactériennes. Deux types de surfaces ont été élaborés, des surfaces bactéricides visant à tuer les bactéries au contact et des surfaces antiadhésives (bactériophobes) empêchant ou limitant l'adhésion bactérienne. Pour ce faire, des copolymères porteurs de groupements cationiques bactéricides ainsi que des copolymères renfermant des structures à effets antiadhésifs de type polysaccharides ou PEG ont été synthétisés et caractérisés. Ces composés ont été ensuite greffés chimiquement par click addition sur des surfaces PVC porteuses de fonctions azoture (PVC-N₃). Les propriétés physico-chimiques des nouvelles surfaces obtenues ont été caractérisées par diverses techniques (IRTF, XPS, angle de contact, AFM, microscopie confocale à fluorescence, ATG et DSC). Les propriétés bactéricides ou antiadhésives ont été évaluées à l'égard de *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis*. La microscopie confocale à fluorescence a mis en évidence le caractère hautement bactéricide des surfaces PVC cationiques via le test Live and Dead. Cette technique a aussi permis de démontrer l'effet antiadhésif de la méthylcellulose, de l'hydroxyéthyl cellulose et du PEG greffés en surface, diminuant d'au moins 10⁴ fois le nombre de bactéries adhérees par rapport aux surfaces témoins.

Abstract

This work aimed to elaborate antibacterial PVC surfaces. Two kinds of surface were prepared, i.e. non leaching bactericidal surfaces killing bacteria by contact and antiadhesive (bacteria repellent) surfaces preventing or limiting bacteria attachment. Thus, copolymers bearing cationic bactericidal groups as well as copolymers bearing polysaccharide or PEG antiadhesive structures were synthesized and characterized. These polymers were then successfully grafted by click chemistry onto PVC surfaces bearing azide groups (PVC-N₃). The physico-chemical properties of the obtained surfaces were assessed by several techniques (FTIR, XPS, contact angle measurements, AFM, confocal fluorescence microscopy, TGA and DSC). The bactericidal and antiadhesive properties were assessed against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. The fluorescence microscopy evidenced the high bactericidal effect of the cationic surfaces, using the Live and Dead test. This microscopy technique has also shown high bacteria repellent effect of the surfaces based on methyl cellulose, hydroxyethyl cellulose and PEG, i.e. decrease of bacteria attachment by more than 10⁴ fold compared to the ungrafted surface.

INTRODUCTION GENERALE.....	6
CHAPITRE I- BIBLIOGRAPHIE.....	8
I INTRODUCTION	8
II LES BIOMATERIAUX.....	9
II.1 Relations structures / propriétés / applications des biomatériaux.....	10
II.1.1 Les métaux ou alliages métalliques.....	11
II.1.2 Les céramiques.....	13
II.1.3 Les matériaux d'origine naturelle.....	14
II.1.4 Les polymères synthétiques.....	15
II.1.4.1 Les polymères synthétiques biostables	16
II.1.4.2 Les polymères synthétiques biodégradables	20
III L'INFECTION BACTERIENNE ET LA FORMATION DE BIOFILMS.....	22
III.1 Quelles sont les différentes étapes de la formation d'un biofilm ?	23
III.2 Quels sont les facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm ?.....	24
III.2.1 Facteurs liés à la surface.....	24
III.2.1.1 Les phénomènes de contamination	24
III.2.1.2 La nature chimique de la surface	24
III.2.1.3 La rugosité de la surface	25
III.2.1.4 La densité de charge en surface	25
III.2.1.5 L'énergie de surface du matériau.....	25
III.2.2 Facteurs liés aux micro-organismes.....	26
III.2.3 Facteurs liés à l'environnement	27
III.2.3.1 L'influence du temps de contact.....	27
III.2.3.2 L'influence de la température du milieu	27
III.2.3.3 L'influence de la force ionique et la nature des sels	27
III.2.3.4 L'influence du pH.....	27
III.2.3.5 L'influence des conditions hydrodynamiques	27
IV LES STRATEGIES DE LUTTE CONTRE L'INFECTION BACTERIENNE DANS LE DOMAINE DES BIOMATERIAUX.....	29
IV.1 Imprégnation par les antibiotiques	29
IV.2 Traitements de surface des biomatériaux.....	31
IV.2.1 Revêtements par des éléments métalliques.....	31

IV.2.2	Revêtements par des polymères antibactériens	31	
V	LE GREFFAGE CHIMIQUE DE POLYMERES ANTIBACTERIENS SUR DES SURFACES DE BIOMATERIAUX.....	32	
V.1	Les polymères antibactériens.....	33	
V.1.1	Les polymères biocides	33	
V.1.2	Les polymères à propriétés d'anti-adhésion	34	
V.2	Les stratégies de greffage des polymères antibactériens sur des surfaces de biomatériaux.....	34	
V.2.1	La méthode de greffage covalent « grafting from»	35	
V.2.1.1	Surfaces en polyuréthanes	35	
V.2.1.2	Surfaces en silicones.....	37	
V.2.1.3	Surfaces en poly(éthylène téréphtalate) (PET)	37	
V.2.1.4	Surfaces en polypropylène ou en verre.....	37	
V.2.2	La méthode de greffage covalent « grafting to ».....	38	
V.2.2.1	Surfaces en verre.....	39	
V.2.2.2	Surfaces en cellulose.....	39	
V.2.2.3	Surfaces en polyuréthanes	39	
V.2.2.4	Surfaces en polypropylène ou polyéthylène	40	
V.2.2.5	Surfaces en polyéthersulfone (PES).....	41	
V.2.2.6	Surfaces en polydiméthylsiloxane (PDMS).....	41	
V.3	Le poly(chlorure de vinyle)	43	
V.3.1	Surfaces PVC à propriétés bactéricides.....	43	
V.3.1.1	Incorporation de molécules biocides	43	
V.3.1.2	Greffage chimique d'agents biocides ou de polymères bactéricides	44	
V.3.2	Surfaces PVC à propriétés antiadhésives	45	
V.3.2.1	Greffage chimique de polymères antiadhésifs par la stratégie « grafting from ».....	45	
V.3.2.2	Greffage chimique de polymères antibactériens par la stratégie « grafting to»	47	
VI	CONCLUSION.....	48	
CHAPITRE II- SURFACES PVC BACTERICIDES.....			54
I	Introduction	54	
II	Synthèses et caractérisations physicochimiques des polymères bactéricides.....	55	
II.1	Les copolymères bactéricides synthétisés à partir du poly(chlorure de benzylvinyle) (PVBC) (copolymères 1 à 3)	57	

II.1.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	58
II.1.2	Caractérisation par RMN ¹ H	59
II.1.3	Analyses thermiques	64
II.1.3.1	Etude de la stabilité thermique par ATG	64
II.1.3.2	Etude des propriétés thermiques par DSC	65
II.2	Synthèse du copolymère 4 à partir du méthacrylate de N,N-diméthylaminoéthyle	66
II.2.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	67
II.2.2	Caractérisation par RMN ¹ H	68
II.2.3	Analyses thermiques	72
II.2.3.1	Etude de la stabilité thermique par ATG	72
II.2.3.2	Etude des propriétés thermiques par DSC	73
III	Préparations et caractérisations des surfaces PVC bactéricides	73
III.1	Traitement physicochimique des surfaces PVC	74
III.2	Greffage des copolymères bactéricides sur les surfaces PVC-N₃.....	75
III.3	Caractérisations physicochimiques des surfaces PVC bactéricides	76
III.3.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	76
III.3.2	Spectroscopie photoélectronique X (XPS)	76
III.3.2.1	Analyse élémentaire des surfaces	76
III.3.2.2	Etudes structurales	77
III.3.3	Dosage fluorimétrique des ammoniums et phosphoniums quaternaires.....	83
III.3.4	Caractérisation par microscopie confocale à fluorescence	86
III.3.5	Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)	88
III.3.6	Mesure des angles de contact	90
III.3.6.1	Mode statique.....	90
III.3.6.2	Mode dynamique	91
III.3.7	Analyses thermiques.....	92
III.3.7.1	Caractérisation par ATG.....	92
III.3.7.2	Caractérisation par DSC	93
IV	Evaluation des propriétés bactéricides	93
IV.1	Choix des bactéries	93
IV.2	Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des copolymères cationiques	94
IV.3	Evaluation des propriétés bactéricides des surfaces cationiques : Test Live and Dead.....	96
V	Conclusion.....	100

CHAPITRE III- SURFACES PVC ANTIADHESIVES (BACTERIOPHOBES)...103

I	Introduction.....	103
II	Synthèses et caractérisations physicochimiques des polymères antiadhésifs	104
II.1	Les copolymères antiadhésifs synthétisés à partir de polysaccharides (copolymères 1 à 5).....	104
II.1.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	105
II.1.2	Caractérisation par RMN ¹ H	106
II.1.3	Analyses thermiques	110
II.1.3.1	Etude de la stabilité thermique par ATG	110
II.1.3.2	Etude des propriétés thermiques par DSC	112
II.2	Le polymère antiadhésif synthétisé à partir d'un poly(éthylène glycol) monométhyl éther (MPEG-0).....	113
II.2.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	114
II.2.2	Caractérisation par RMN ¹ H	114
II.2.3	Analyses thermiques	116
II.2.3.1	Etude de la stabilité thermique par ATG	116
II.2.3.2	Etude des propriétés thermiques par DSC	116
III	Préparations et caractérisations des surfaces PVC antiadhésives	118
III.1	Préparations des surfaces PVC antiadhésives.....	118
III.2	Caractérisations physicochimiques des surfaces PVC préparées.....	119
III.2.1	Caractérisation par IRTF-ATR.....	119
III.2.2	Caractérisation par XPS.....	119
III.2.2.1	Analyse élémentaire des surfaces	119
III.2.2.2	Etudes structurales	120
III.2.3	Caractérisation par Microscopie Confocale à Fluorescence	125
III.2.4	Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)	127
III.2.5	Mesure des angles de contact	131
III.2.5.1	Mode statique.....	131
III.2.5.2	Mode dynamique	131
III.2.6	Analyses thermiques.....	132
IV	Evaluation des propriétés antiadhésives à l'égard des bactéries	133
IV.1	Mise en place du protocole	133
IV.2	Microscopie confocale à fluorescence.....	135

Sommaire

V Conclusion..... 138

CONCLUSION GENERALE.....140

ANNEXES.....142

Les polymères représentent une classe de matériaux très utilisée dans le domaine biomédical. Cependant, leurs applications sont limitées par le phénomène d'infection bactérienne qui constitue une sérieuse problématique. En effet, environ 65% des infections hospitalières sont liées aux implants et au matériel biomédical et sont responsables d'un coût économique et d'une mortalité non négligeables^{1,2}. Afin de pallier ces problèmes, plusieurs stratégies ont été proposées. Parmi celles-ci, l'imprégnation du biomatériau par des antibiotiques avec tous les inconvénients que cela implique, à savoir l'épuisement rapide de l'antibiotique et une apparition éventuelle de phénomènes de résistance. En revanche, le greffage de polymères bioactifs en surface de biomatériaux constitue une stratégie très récente et présente des solutions réellement prometteuses². En effet, le développement de nouvelles approches pour la conception de composés et matériaux antimicrobiens représente un important domaine de recherche³. Le défi majeur dans la conception d'un nouveau biomatériau antibactérien consiste à trouver la structure chimique qui donne le spectre d'activité le plus large vis-à-vis des microorganismes et une durabilité maximum de cette activité dans le temps. De plus, un biomatériau doit présenter des propriétés physico-chimiques et biologiques adéquates à l'application visée, à savoir notamment, des propriétés de résistance à la corrosion, aux contraintes mécaniques et à l'usure ainsi que des propriétés de biocompatibilité dans le cas d'une implantation.

Dans cette optique, le laboratoire développe actuellement une nouvelle thématique de recherche visant à contribuer à la conception de nouveaux biomatériaux polymères à propriétés spécifiques et au développement de moyens de lutte contre le phénomène d'infection bactérienne, très répandu mais cependant peu étudié par les chimistes au niveau national.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous proposons de greffer chimiquement des copolymères antibactériens en surface de PVC, un des biomatériaux les plus utilisés dans le domaine de l'implantation biomédicale. L'avantage de cette stratégie réside dans la conservation des propriétés thermo-mécaniques du biomatériau initial, ce qui permettrait de s'affranchir de sa redéfinition complète et de diminuer le temps d'une éventuelle mise sur le

¹ a) Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., *Science* (1999), 284, 1318-1322. b) Chicurel M., *Nature* (2000), 408, 284-286.

² Pavon-Djavid G., Hélaré G., Migonney V., *ITBM-RBM* (2005), 26, 183-191.

³ Arnt L., Nüsslein K., Tew G.N., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer chemistry* (2004), 42, 3860-3864.

marché. Deux familles de surfaces seront à l'étude. La première concerne des surfaces porteuses de charges cationiques qui attirent les bactéries et les tuent ensuite par contact (surfaces bactéricides). La deuxième famille concerne des surfaces porteuses de certains polymères hydrophiles empêchant ou limitant l'adhésion bactérienne (surfaces antiadhésives ou bactériophobes).

Le présent rapport de thèse est subdivisé en trois chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique portant sur les différentes catégories de biomatériaux, la problématique de la colonisation bactérienne des surfaces de biomatériaux et les différents moyens de prévention existant actuellement. Une attention particulière est ensuite donnée au biomatériau concerné par cette thèse, à savoir le PVC.

Le second chapitre sera consacré, dans un premier temps, à la description de synthèses et de caractérisations de nouveaux copolymères cationiques porteurs de groupements ammonium ou phosphonium quaternaire ainsi que des groupements propargyle (groupements d'ancrage). Dans un second temps, le traitement chimique de surface du PVC donnant accès à des surfaces porteuses de groupements azoture (PVC-N₃) sera décrit. Puis, le greffage des copolymères cationiques sur ces surfaces par chimie click sera présenté. Les surfaces obtenues sont ensuite étudiées quant à leurs propriétés physicochimiques et bactéricides.

Dans le dernier chapitre, nous décrirons des modifications chimiques de quelques polysaccharides et d'un PEG en vue d'y introduire des groupements propargyle. Nous présenterons par la suite le greffage chimique de ces composés sur des surfaces PVC-N₃ par chimie click. Enfin, nous détaillerons l'étude des propriétés physico-chimiques et antiadhésives des nouvelles surfaces obtenues.

I INTRODUCTION

Les polymères sont utilisés depuis presque un siècle dans quasiment tous les domaines de l'activité humaine, notamment le domaine biomédical. Ainsi, de nombreux polymères synthétiques ou naturels concurrencent aujourd'hui les matériaux inorganiques (céramiques, métaux ou alliages métalliques) en tant que biomatériaux.

La première partie de ce chapitre sera consacrée aux différents types de biomatériaux utilisés ainsi que leurs différentes propriétés nécessaires pour répondre aujourd'hui aux exigences du secteur biomédical. Ces biomatériaux seront classés selon leur nature structurelle et mis en relation avec les applications visées. Les qualités des polymères seront particulièrement mises en évidence, notamment leur capacité d'adaptation aux systèmes biologiques externes ainsi que leur très grande fonctionnalité.

Toutefois, l'utilisation des polymères en tant que biomatériaux est limitée par le phénomène d'infection bactérienne. L'adhésion de bactéries ainsi que leur croissance sur une surface constituent une sérieuse problématique impliquant un coût économique et une mortalité non négligeable. Ceci fera l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

Les stratégies de lutte contre l'infection bactérienne dans le milieu médical, seront ensuite développées dans une troisième partie.

Le greffage de polymères antibactériens sur des surfaces de biomatériaux, étant une stratégie chimique émergente et prometteuse, sera exposé en dernière partie. Les différentes catégories de polymères antibactériens seront analysées et classées selon leur mode d'action. La façon de fixer ces macromolécules bioactives sur des surfaces de biomatériaux sera elle aussi examinée.

II LES BIOMATERIAUX

Il est assez difficile de donner une définition totalement satisfaisante des biomatériaux. En 1986, la conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux a décidé d'appeler biomatériaux tout « *matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques* ». Cette définition décrit donc explicitement un biomatériau comme étant un matériau destiné à être implanté, et non pas un matériau d'origine biologique naturelle. En effet, un biomatériau doit avoir pour objectif principal de remplacer, restaurer ou réparer un organe, des tissus ou une fonction de l'organisme dans le but d'améliorer la santé d'un patient. Pour réaliser cet objectif, dans le cas des implants, il est nécessairement en contact avec des fluides ou des tissus biologiques. Cependant, selon Laurent Sedel, président de l'intercommission de l'INSERM et chirurgien orthopédiste, et Christian JANOT, professeur à l'Université Joseph Fourier, cette notion d'interaction entre un biomatériau et le système biologique peut être étendue à de plus larges applications : « *Cet aspect de contact, qui est évident dans le cas d'implants, doit être étendu aux contacts qui se réalisent à la surface ou à l'extérieur du corps comme, par exemple, ceux qui se produisent avec le sang dans l'hémodialyse, ou avec la cornée dans les lentilles de contact. A la limite, elle devrait même être étendue aux produits de diagnostic (microplaques, support de culture, ...) et aux matériaux pour biotechnologies, qui sont en contact avec des cellules vivantes* »¹ .

D'une manière générale, la notion d'interaction d'un matériau vis-à-vis du système biologique mène à la notion de biocompatibilité ou plutôt d'adaptabilité.

Cette notion de biocompatibilité a longtemps été synonyme d'inertie du biomatériau vis-à-vis des attaques de l'organisme. Elle permettait donc de mettre en évidence l'absence de réponse de l'organisme lorsqu'un matériau était implanté. En général, elle englobe tous les phénomènes mis en jeu lors de l'interaction matériau/système biologique, à savoir la non toxicité du matériau pour l'organisme^{2,3}. Les facteurs influant sur la biocompatibilité d'un biomatériau sont donc liés à la fois au biomatériau, au dispositif ainsi qu'à l'hôte (**Tableau I-1**).

Tableau I-1. Facteurs influençant la biocompatibilité lors d'une implantation

Biomatériau	Dispositif médical	Hôte
1- Composition et structure chimique, stabilité chimique	1- Taille	1- Espèces (pour les tests expérimentaux)
2- Propriétés de surface : rugosité, porosité, perméabilité, chimie superficielle, énergie libre de surface, potentiel électrique	2- Forme	2- Age
3- Caractéristiques et natures physiques des produits de dégradation	3- Comportement thermomécanique	3- Sexe
		4- Type de tissu et site d'implantation
		5- Etat pathologique
		6- Traitement en cours

Parmi tous les paramètres concernant le biomatériau, l'étude des propriétés de surface apparaît donc comme primordiale. En effet, c'est à la surface du biomatériau que s'effectuent les échanges et les interactions avec le milieu extérieur^{4,5}. La compréhension de tous ces mécanismes d'interaction a donné lieu à une nouvelle définition par la Société Européenne des Biomateriaux : « *la biocompatibilité est la capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique* ».

Dans le cas d'un biomatériau implantable, la biocompatibilité n'est pas la seule qualité requise. Le biomatériau doit posséder les propriétés adéquates pour répondre au rôle médical qu'il est censé jouer. On parle alors de biofonctionnalité.

II.1 Relations structures / propriétés / applications des biomatériaux

On peut distinguer aujourd'hui, selon leur composition structurale, quatre familles de matériaux pouvant être implantées dans un organisme vivant : les métaux ou alliages métalliques, les céramiques, les polymères synthétiques ainsi que les matériaux d'origine naturelle.

Le choix du biomatériau destiné à être implanté dépend des exigences biomédicales du dispositif (**Schéma I-1**).

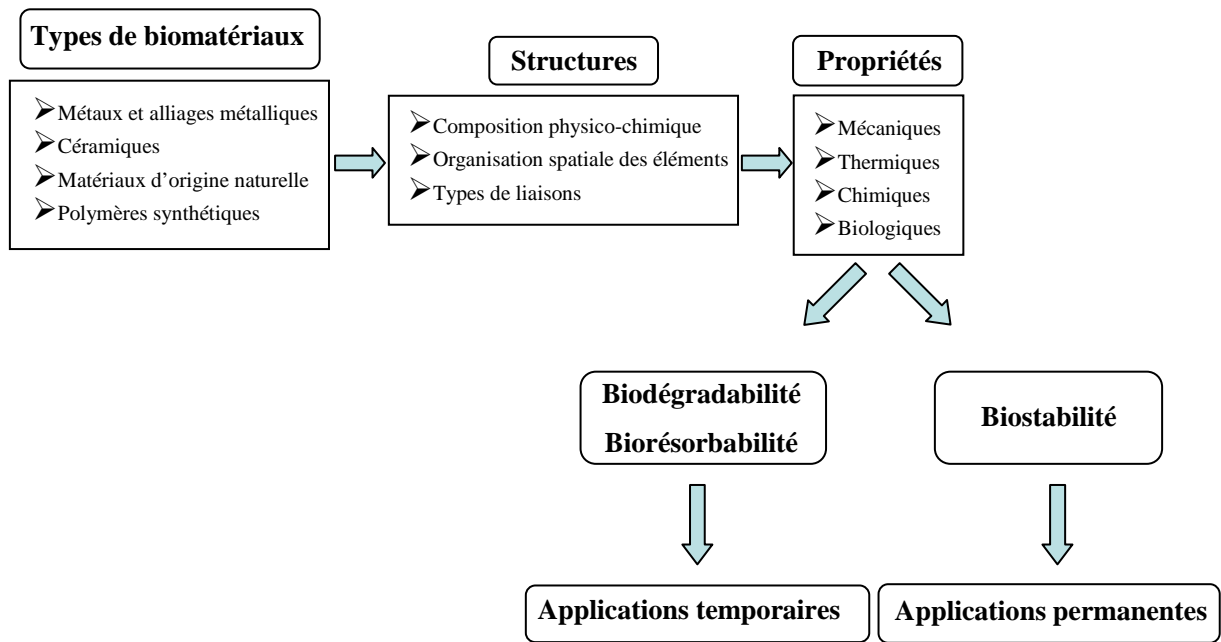


Schéma I-1. Relations biomatériaux / structures / propriétés / types d'applications

II.1.1 Les métaux ou alliages métalliques

Les égyptiens avaient déjà compris que les métaux pouvaient être utilisés pour remplacer des organes défaillants. Le fer, l'or, le cuivre ou l'argent pouvaient être employés en chirurgie dentaire ou orthopédique. Ce sont les premiers implants retrouvés dans l'histoire de l'humanité. Ils ont été choisis en premier lieu parce qu'ils avaient de très bonnes propriétés mécaniques. Cependant tous les métaux ou alliages subissent une forte corrosion lorsqu'ils sont implantés car le corps humain est un milieu particulièrement agressif (présence d'ions chlorures et pH bas comparé à l'environnement industriel).

Parmi les alliages métalliques, l'acier inoxydable 316L est le plus souvent utilisé en chirurgie orthopédique. Cet alliage principalement composé de fer/carbone auquel on ajoute du chrome, nickel, manganèse et molybdène est particulièrement ductile. On le retrouve dans plusieurs dispositifs tels que les vis et plaques de fixation, les pompes et les valves. Toutefois, il se corrode vite et des irrégularités apparaissent à sa surface (effets de « piqûration »).

L'or, non oxydable, possédant moins d'irrégularités de surface, est souvent utilisé en tant que revêtement. Cependant, concernant les implants cardiovasculaires, l'or peut entraîner plus de

« resténoses »⁶ (nouveau rétrécissement de l'artère survenant chez certains patients ayant bénéficié d'une angioplastie ou de l'implantation d'un stent).

Le titane présente une très grande résistance à la corrosion. Sa légèreté et sa très grande résistance mécanique font de lui un des métaux les plus utilisés (malgré son coût élevé). De plus, il possède une qualité toute particulière : la propriété de « mémoire de forme ». Un changement de température entraîne une modification de sa structure cristalline, ce qui a pour résultat de modifier sa forme initiale. Le titane peut donc être déformé pour être introduit à l'intérieur d'un cathéter (il reprend ensuite sa forme grâce au réchauffement du dispositif)^{7,8}. On le retrouve dans des dispositifs médicaux tels que les prothèses, vis (**Figure I-1**), implants dentaires, stents ou filtres à veine cave. Toutefois l'usure par frottement peut parfois entraîner une dégradation de l'implant.

Contrairement au titane, les alliages de cobalt-chrome sont très résistants à l'usure. Ils sont donc utilisés pour des implants subissant un fort frottement tels que les prothèses ou les valves cardiaques. Ils restent cependant un peu plus chers que l'acier inoxydable.

L'alliage superalloy (à base de chrome, nickel, molybdène et cobalt) a fait l'objet de nombreuses publications urologiques. Sa très grande résistance à la traction mécanique, à la corrosion ainsi que sa bonne biocompatibilité^{9,10,11,12} font de lui un candidat idéal pour les implants orthopédiques¹³.

En résumé, malgré leurs propriétés thermomécaniques remarquables, l'utilisation de métaux ou d'alliages métalliques est limitée par plusieurs facteurs : les difficultés de mise en forme en raison de leurs propriétés mécaniques, les phénomènes de corrosion^{14,15}, de dégradation¹⁶ et de libération de débris dans l'organisme¹⁷, des réactions immunitaires et une hypersensibilité¹⁸.



Figure I-1. Vis orthopédiques pour des plats d'os (Acier / Titane)

II.1.2 Les céramiques

Les céramiques sont des composés inorganiques essentiellement constituées d'oxydes, de borures, de sulfures, de carbures et de nitrures. Bien que leur utilisation soit très connue dans la chirurgie dentaire, leur utilisation en tant qu'implants est relativement récente.

Les céramiques sont peu résistantes aux forces de traction ou de flexion mais très résistantes aux forces de compression. Leur principale caractéristique est leur propriété de rupture « fragile » : elles vont casser sans passer par une déformation dite élastique. On peut les classer en deux catégories : celles faisant preuve d'une bonne bioactivité et celles relativement bioinertes. L'alumine (Al_2O_3) et la zircone, étant bioinertes, sont utilisées dans les têtes fémorales (prothèses de hanche) et les implants dentaires¹⁹ (**Figure I-2**). Ces céramiques résistent bien aux phénomènes de corrosion et présentent une résistance élevée à l'usure par friction. Cependant, comme elles sont bioinertes, la reconstruction osseuse reste difficile lors de l'implantation.

Les phosphates de calcium étant bioactifs^{20,21}, tels que l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique β (TCP β), sont ostéoconducteurs^{22,23}. En effet, la composition structurale de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) et celle du phosphate tricalcique β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sont proches de celle de l'os ce qui explique leurs propriétés ostéoconductrices et par ailleurs de biorésorbabilité. Ces matériaux sont donc utilisés sous forme poreuse pour favoriser une colonisation cellulaire rapide^{24,25}

Enfin les vitrocéramiques (à base d'oxyde de silice) utilisées en chirurgie orthopédique sont aussi bioactives et forment une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC) à leurs surfaces ce qui permet une meilleure accroche entre l'implant et l'os^{26,27,28}.



Figure I-2. Bridge en céramique

II.1.3 Les matériaux d'origine naturelle

Parmi les biomatériaux d'origine naturelle on peut citer les plus couramment utilisés et recensés dans la littérature :

L'acide hyaluronique

C'est un polysaccharide composé d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées beta-1,4 et beta-1,3. Il est extrait industriellement des crêtes de coqs ou provient de la fermentation bactérienne. On le retrouve aussi dans les tissus du corps humain, du cartilage et de la peau, ce qui le rend adaptable aux dispositifs implantables. Il est très largement utilisé en chirurgie ophtalmique (remplacement de cornées, cataractes ou glaucomes) et en chirurgie esthétique.

Les protéines

- L'*élastine* est une protéine fibreuse sécrétée par les fibroblastes essentiellement durant la période de croissance. Elle est constituée de monomères de tropoélastine, entre lesquels il y a des ponts stabilisants de desmosine et d'isodesmosine lui conférant de très bonnes propriétés élastiques. Elle est utilisée dans l'ingénierie tissulaire et dans les greffes cutanées^{29,30,31}.
- Le *collagène* est une protéine présente sous forme fibrillaire dans l'organisme, présentant une résistance mécanique à l'étirement élevée contrairement à l'élastine. Ses propriétés hémostatiques, mécaniques et de biodégradabilité trouvent de nombreuses applications dans l'industrie cosmétique et la chirurgie esthétique. Concrètement, elle peut être utilisée pour des pansements, des implants oculaires³² ou encore pour reconstituer des morceaux de peau^{33,34}.

Les polysaccharides

- La *chitine*³⁵ est un polysaccharide linéaire issu de coquilles de crustacés. Son dérivé est le *chitosane*³⁶ (synthétisé à partir de la chitine par désacétylation chimique ou enzymatique). Ces matériaux sont généralement bien supportés par les tissus biologiques. Ils sont utilisés dans le domaine de la cosmétique, la chirurgie réparatrice³⁷ (peau artificielle) ou dans les fils de sutures dues à leurs propriétés cicatrisantes^{38,39}.
- L'*héparine* est un mélange de polymères essentiellement constitués d'unités disaccharidiques trisulfatées. Elle est reconnue pour ses propriétés anticoagulantes vis-à-

vis du sang. En effet, elle est généralement greffée⁴⁰ ou adsorbée (coating)⁴¹ chimiquement sur des implants pour limiter des effets de thromboses notamment sur des prothèses vasculaires en polytétrafluororéthylène (PTFE)⁴².

- Les *fucanes* sont des polysaccharides extraits des algues marines. Ils possèdent de bonnes propriétés antithrombiques et anticoagulantes^{43,44,45}.
- Le *sulfate de chondroïtine* est un mucopolysaccharide. Bien qu'étant un composant de la matrice du cartilage, il peut aussi être issu des os, des tendons, de la peau ou des vaisseaux sanguins. Il est souvent fonctionnalisé puis utilisé dans le cadre d'une chirurgie réparatrice du cartilage⁴⁶.
- La *cellulose*⁴⁷ est utilisée habituellement pour les membranes de dialyse mais on la retrouve aussi dans les ciments de prothèses de hanche. Elle se distingue particulièrement par ses propriétés antiadhésives et antiprolifératives⁴⁸.

Le corail

Le corail est constitué à 97% de carbonate de calcium. Sa macroporosité (100 à 300 µm), sa composition et ses propriétés mécaniques intéressantes (30 à 300 MPa) font de lui un candidat idéal à une utilisation biomédicale, particulièrement dans la chirurgie réparatrice du visage. Depuis une dizaine d'année, le corail est également de plus en plus utilisé pour la réalisation de greffes et de prothèses. En effet, sa composition très proche de l'os lui confère des propriétés ostéoconductrices⁴⁹. De plus, il fait partie des biomatériaux biorésorbables : après un an d'implantation, le corail est totalement remplacé par des tissus osseux.

II.1.4 Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques représentent la classe de biomatériaux la plus variée. Cette famille de matériaux offre une très grande diversité de structures à propriétés spécifiques. Selon l'architecture de la chaîne carbonée, sa taille, sa densité, son uniformité, un polymère va développer des propriétés thermomécaniques, de résistance chimique à la dégradation ou de biostabilité qui lui seront propres et intéressantes pour une application médicale.

Dans le domaine biomédical, on distingue deux catégories de polymères synthétiques : les polymères biostables (applications à visée permanente) et les polymères biodégradables (applications à durée temporaire).

II.1.4.1 Les polymères synthétiques biostables

Les polymères biostables ne voient pas leurs propriétés s'altérer ou se dégrader lorsqu'ils sont introduits dans un organisme vivant. Ils sont présentés de manière non exhaustive (et sont répertoriés dans le **Tableau II-2**).

II.1.4.1.1 Les polyoléfines

Dans le cas du polyéthylène (PE), chimiquement inerte et résistant à l'oxydation, le grade UHMW-PE (ultrahigh molecular weight) est le plus couramment utilisé pour la réalisation de prothèses articulaires et orthopédiques ou des fils de sutures (**Figure I-3**). En effet sa très haute densité (0.97) lui confère des propriétés mécaniques exceptionnelles. Il est très résistant à l'abrasion (6 fois plus que le Nylon®), aux forces de traction (autant que le Kevlar®) tout en étant plus souple. Des études récentes sur la modification de porosité du UHMW-PE ont montré qu'il pouvait aussi servir à la reconstruction crânienne^{50,51}.

Le polypropylène (PP) est quant à lui surtout utilisé dans les prothèses articulaires⁵² car il possède une très grande résistance à la flexion.

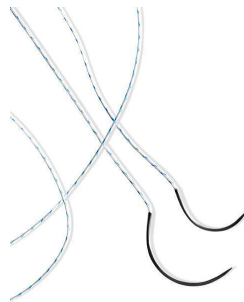


Figure I-3. Fils de sutures en PE

II.1.4.1.2 Les polyuréthanes (PUs)

Les PU sont constitués de deux types de segments: les segments souples constitués majoritairement de polyols de type oligo-PEG ou oligo-ester à extrémités hydroxyles et les segments rigides issus des diisocyanates associés aux allongeurs de chaînes. Ces segments rigides et souples étant liés chimiquement, l'immiscibilité conduit à une microséparation de phases et à la formation de domaines riches en segments rigides dispersés dans une matrice riche en segments souples. La nature structurale des segments rigides et souples influe sur les propriétés mécaniques des polyuréthanes (la contrainte et la déformation à la rupture étant gouvernées par les segments rigides ; la ductibilité et la flexibilité étant gouvernées par les segments souples). Les polyuréthanes sont donc des matériaux particulièrement bien adaptés

pour les cathéters (**Figure I-4**), nécessitant à la fois flexibilité et rigidité (résistance à la pression sanguine) mais aussi pour les substituts ligamentaires et les substituts de dure-mère⁵³ (membrane dure et rigide qui protège le cerveau et la moelle épinière).

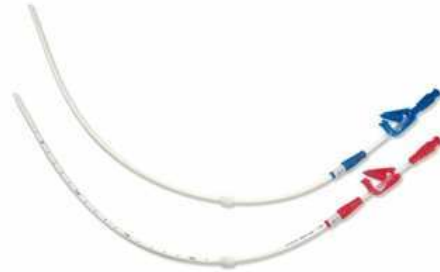


Figure I-4. Cathéters en PU

II.1.4.1.3 Les polyamides

Les polyamides sont des polymères semi cristallins. La concentration en fonctions amides et la régularité de leurs espacements conditionnent leurs propriétés. Ils présentent de très bonnes caractéristiques mécaniques lorsqu'ils sont sous la forme de fibres. Le taux de cristallinité élevé induit par les nombreuses liaisons hydrogène entre les chaînes explique leur très grande résistance à la traction. Leur principale application dans le domaine médical est la réalisation de fils de sutures percutanées (le nylon monofilament)⁵⁴.

II.1.4.1.4 Les polymères fluorés

Ils se caractérisent par une très grande inertie chimique et de très faibles interactions intermoléculaires. Les chaînes perfluorées sont plus stables et plus hydrophobes que les chaînes hydrogénées. L'incapacité de ce type de polymère à former des interactions intermoléculaires de type van der Waals leur confère d'excellentes propriétés antiadhésives⁵⁵. Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) est le fluoro-polymère le plus employé en médecine. Ses propriétés antiadhésives font de lui le biomatériau le plus utilisé dans la réalisation de prothèses vasculaires⁵⁶ (**Figure I-5**).

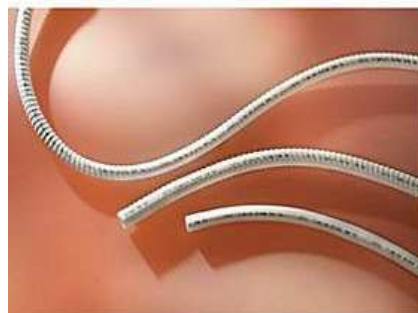


Figure I-5. Prothèses vasculaires en poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE)

II.1.4.1.5 Les résines acryliques

Parmi les polymères acryliques, le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) et le poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) (PHEMA) sont les plus couramment utilisés. Le PMMA est employé pour la fabrication de prothèses orthopédiques car il possède des propriétés mécaniques proches de celles de l'os^{57,58}, une excellente résistance chimique ainsi qu'une très grande biocompatibilité. Le PHEMA réticulé, formant un hydrogel dans l'eau, est destiné à une utilisation ophtalmologique (lentilles de contact ou implants intra-oculaires, **Figure I-6**)⁵⁹. Une étude récente a aussi montré que les paramètres de porosité et de viscoélasticité du PHEMA ont permis d'imiter les propriétés mécaniques de la peau humaine ou de certains tissus biologiques⁶⁰.



Figure I-6. Implant oculaire en poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) (**IrisMatch®**)

II.1.4.1.6 Les polyesters

Les polyesters semi-aromatiques tels que le poly(éthylène téréphtalate) PET et le poly(butylène téréphtalate) (PBT) sont les plus utilisés dans le domaine biomédical.

La surface du PET possède les propriétés physicochimiques adéquates pour favoriser l'adhésion et la recolonisation cellulaire^{61,62,63}. On le retrouve dans la composition des valves cardiaques, des fils de sutures et dans la chirurgie vasculaire⁶⁴ (**Figure I-7**).



Figure I-7. Anneau d'annuloplastie pour valve tricuspide en poly(éthylène téréphtalate) (PET)

II.1.4.1.7 Les silicones

Les silicones sont utilisés majoritairement en tant que revêtements pour augmenter la lubrification des cathéters et réduire l'inflammation des tissus⁶⁵. On les retrouve aussi dans les implants mammaires ou testiculaires (**Figure I-8**). Dans ces cas, ils sont sous la forme d'hydrogels à base de silicone faiblement réticulé.

Certains silicones possèdent des propriétés élastomériques (allongement à la rupture : 200 à 2000 %) et sont directement utilisés en tant que biomatériaux (cathéters ou substituts ligamentaires)⁶⁶.



Figure I-8. Prothèse mammaire en silicone

II.1.4.1.8 Le poly(chlorure de vinyle) (PVC)

Le PVC est un des polymères les plus utilisés dans le secteur médical du fait de sa facilité à être mis en œuvre et de son faible coût de revient. Il est présent dans de nombreux dispositifs tels que les cathéters veineux^{67,68}, les poches de transfusion sanguine⁶⁹ (**Figure I-9**), les emballages médicaux ainsi que les valves cardiaques⁷⁰.



Figure I-9. Poches de transfusion sanguine en PVC

Tableau I-2. Applications biomédicales des polymères biostables

Classes de polymères biostables	Acronymes	Applications biomédicales
Polyoléfines ^{50,51,52}	LMW-PE	flacons unidoses de sérum physiologique, films
	UHMW-PE	prothèses articulaires et orthopédiques, fils de sutures, reconstruction crânienne
	PP	prothèses articulaires, seringues, valves cardiaques, raccords moulés
Polyuréthanes ⁵³	PUs	cathéters, pompes à sang, cœurs artificiels, substituts ligamentaires, substituts dure-mère
Polyamides ⁵⁴	PA	fils de sutures, cathéters, seringues, poches médicales, chambres de goutte à goutte, sachets de stérilisation de dispositifs médicaux
Polymères fluorés ^{55,56,71}	PTFE	prothèses vasculaires, osselets auditifs, cathéters
	PVDF	poches médicales, emballages techniques, montures de lunettes
Polymères acryliques ^{57,58,59,60}	PMMA	prothèses orthopédiques
	PHEMA	lentilles de contact, implants intra-oculaires
Polyesters ^{61,62,63,64}	PET	valves cardiaques, fils de sutures, prothèses vasculaires
	PBT	membranes pour des systèmes de filtration sanguine
Silicone (hydrogels) ⁶⁵		implants mammaires et testiculaires, lubrifiants pour cathéters
Silicone (élastomères) ⁶⁶		cathéters, substituts ligamentaires
Polycarbonate ⁷²	PC	oxygénateurs sanguins, seringues, canules de transfusion
Polymères vinyliques ^{67,68,69,70}	PVC	cathéters, poches de transfusion sanguines, tubes pour anesthésie, emballages médicaux, valves cardiaques
polymères styréniques ⁷¹	PS	emballages médicaux, masques à usage unique, flaconnage, poches à soluté ou à sang, corps de seringue, compte goutte

II.1.4.2 Les polymères synthétiques biodégradables

Ces vingt dernières années ont vu une évolution notable dans le choix des biomatériaux. Le développement de nouveaux polymères biodégradables (subissant des dégradations hydrolytiques et enzymatiques) s'est de plus en plus imposé avec l'apparition des implants à usage temporaire^{73,74,75}. Les exigences éthiques et techniques de la chirurgie ainsi que les

problèmes de biocompatibilité sur le long terme des polymères biostables expliquent aussi cette nouvelle tendance. En effet, le secteur chirurgical (ingénierie tissulaire, sutures, ostéosynthèse, pansements) et la pharmacologie (libération contrôlée de macromolécules bioactives) nécessitent des biomatériaux pouvant se dégrader dans l'organisme.

En tout premier lieu, un polymère biodégradable (utilisé en tant que biomatériau) ne doit pas provoquer de réponse inflammatoire. Il doit aussi répondre à plusieurs exigences⁷⁶ s'il veut être commercialisé :

- Une durée de vie acceptable pour l'application visée.
- Un temps de dégradation en adéquation avec le processus de rétablissement ou de régénération.
- Des propriétés mécaniques appropriées à l'application visée et une variation de celles-ci, au cours de la dégradation, compatible avec le processus de rétablissement ou de régénération.
- Des produits de dégradation non toxiques et assimilables par l'organisme (polymères biorésorbables).

Il existe actuellement plusieurs types de polymères synthétiques biodégradables, qui sont pour la plupart de type polyester⁷⁷ (**Tableau I-3**).

Tableau I-3. Applications biomédicales des polyesters biodégradables

Classes de polyesters		Applications biomédicales
Poly(α -ester) ^{78,79}	Polyglycolide ⁸⁰	dispositifs de fixation orthopédique
	Polylactide ^{81,82}	dispositifs de fixation orthopédique, libération de médicaments
	Poly(lactide-co-glycolide) ^{83,84}	fils de sutures (multifilaments), implants dure-mère, ingénierie tissulaire, libération de médicaments
	Polydioxanone ⁸⁵	fils de sutures (monofilaments), dispositifs de fixation orthopédique
	Polycaprolactone ⁸⁶	ingénierie tissulaire, fils de sutures (monofilaments), libération de médicaments
	Poly(carbonate de triméthylène) ⁸⁷	ingénierie tissulaire, libération de médicaments
Poly(ester amide) ⁷⁷		sutures, libération de médicaments
Poly(ortho esters) ⁸⁸		libération de médicaments
Polyphosphoesters ⁸⁹		libération de médicaments

III L'INFECTION BACTERIENNE ET LA FORMATION DE BIOFILMS

En milieu hospitalier, l'infection bactérienne et les phénomènes de contamination représentent une sérieuse problématique tant sur le plan humain que sur le plan économique. La dernière enquête nationale de prévalence commandée en 2006 par le ministère de la Santé a montré que sur l'ensemble des patients (358353 patients dans 2337 établissements), 5,38% ont contracté une infection nosocomiale. De plus, sur l'ensemble des décès, 4% sont dus à ce type d'infections. Parmi ces infections, 36% sont urinaires, 13% pulmonaires et 11% sont localisées sur la zone opérée. Aujourd'hui les maladies nosocomiales représentent la principale préoccupation de santé publique, du fait du taux de mortalité (50% des pneumopathies nosocomiales sont létales) et des coûts (45000 lits sur 550000, problèmes juridiques...) qu'elles entraînent.

De plus, les microorganismes ne colonisent pas seulement la surface des instruments chirurgicaux et des dispositifs implantables (prothèses, stents, valves) ou percutanés mais aussi les murs des salles d'intervention ou tout autre type d'équipements.

L'adhésion bactérienne sur une surface solide représente la première étape de la formation d'un biofilm. En effet, dans leur environnement naturel, les micro-organismes attachés à une surface sont organisés en communautés structurées, et enrobés dans une matrice d'exopolysaccharides.

Cette forme de vie, appelée biofilm⁹⁰, a trouvé un intérêt tout particulier lorsqu'il a été démontré qu'elle était impliquée dans un grand nombre d'infections bactériennes.

Pour survivre, les bactéries ont besoin d'un support sur lequel elles peuvent s'adhérer et se développer. L'état planctonique, dans lequel les bactéries se trouvent libres et isolées dans le milieu environnemental, pourrait être perçu comme un état transitoire.

Cette partie concernera les mécanismes de formation et de développement d'un biofilm sur une surface. Les paramètres influençant l'adhésion ou non des bactéries seront aussi étudiés. En effet, la compréhension et la maîtrise de ces paramètres d'adhésion sont essentielles pour envisager des stratégies de lutte antibactérienne.

III.1 Quelles sont les différentes étapes de la formation d'un biofilm ?

Pour la plupart des souches bactériennes, le processus de formation d'un biofilm se déroule en cinq étapes⁹¹ (Figure I-10).

- Lorsqu'un matériau est placé dans un environnement naturel non stérile, en quelques minutes, des composés organiques (protéines) ou minéraux environnants (sels) vont s'adsorber sur sa surface. Ce mélange organo-minéral déposé en surface va former une sorte de film conditionnant. Les microorganismes, se déplaçant à proximité de la surface par des mouvements browniens ou tombant par sédimentation, vont alors s'adhérer sur ce film. L'*adhésion réversible* s'effectue principalement par des liaisons chimiques non covalentes ou faibles (liaisons électrostatiques, hydrophobes, de van der Waals et acide/base de Lewis).
- Lorsque ces liaisons sont maintenues suffisamment longtemps, des mécanismes physico-chimiques et biologiques entraînent la formation de molécules protéiques (sous forme de ligands) et des structures telles que les pili (appendices situés à la surface de la paroi de nombreuses bactéries). Ces molécules vont servir de points d'ancrage pour d'autres microorganismes : on parle alors d'*adhésion permanente*.
- Les micro-organismes se divisent et forment rapidement les premières micro-colonies. Cet attachement irréversible entraîne alors de nombreux changements physiologiques au sein des micro-colonies conduisant à la « sécrétion » de substances exopolymériques (essentiellement constituées de polysaccharides et de protéines). Ces substances seront les constituants essentiels de la matrice protectrice. C'est le *début de la maturation*.
- L'étape suivante concerne le développement du biofilm : il s'accroît jusqu'à devenir macroscopique. Ce processus constitue la phase de *maturation*.
- L'étape finale est celle de la *dispersion* (ou *phase planctonique*). En effet, suite à certains stress tels que des carences nutritionnelles ou des modifications physico-chimiques de l'environnement, des microorganismes peuvent se séparer du biofilm et coloniser d'autres surfaces.

Ce cycle de croissance et de dispersion cellulaire favorise la prolifération d'agents parfois pathogènes dans notre environnement.

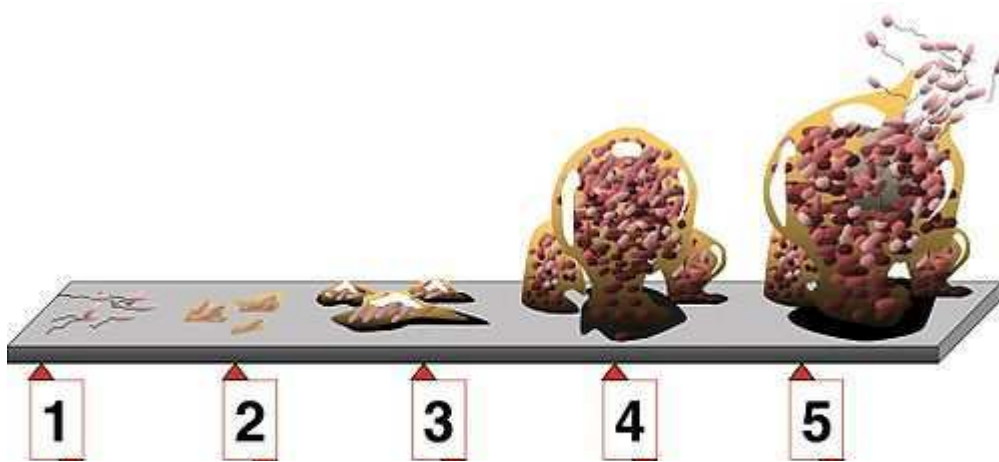


Figure I-10. Les cinq étapes du développement d'un biofilm sur une surface⁹¹

III.2 Quels sont les facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm ?

On peut distinguer trois types de facteurs influençant l'adhésion bactérienne et la formation d'un biofilm.

III.2.1 Facteurs liés à la surface

III.2.1.1 Les phénomènes de contamination

Il existe un phénomène de contamination de toute surface. En effet, du fait de la pollution atmosphérique, une surface est systématiquement recouverte par un dépôt organique pouvant favoriser l'adhésion bactérienne⁹². De plus, même lorsqu'une surface est nettoyée, une re-contamination apparaît de manière à ce que la surface retrouve sa stabilité thermodynamique. De même, tout matériau plongé dans un milieu aqueux, en quelques minutes, voit à sa surface s'adsorber des macromolécules organiques (polysaccharides, protéines) ou inorganiques (sels minéraux)⁹³. Cette couche forme un film qui peut conditionner l'adhésion ou non de micro-organismes.

III.2.1.2 La nature chimique de la surface

Dans la littérature, des comportements bactériens différents ont été établis selon la nature chimique de la surface. En effet la bactérie *Staphylococcus epidermidis* adhère

préférentiellement sur les matériaux polymères alors que la bactérie *Staphylococcus aureus* adhère plutôt sur les métaux, en raison des différences de composition chimique et de polarité de ces surfaces⁹⁴. Toutefois, expliquer uniquement les mécanismes d'adhésion par mimétisme chimique serait quelque peu incomplet.

III.2.1.3 La rugosité de la surface

La rugosité est l'un des paramètres les plus discutés dans la littérature. En effet, selon la topographie de la surface, l'adhésion microbienne peut être influencée positivement ou négativement.

Certains spécialistes établissent que la présence de fissures ou de micro-crevasses augmente l'aire spécifique de contact et favorise donc l'adhésion des bactéries. De plus, ces irrégularités pourraient protéger temporairement les bactéries des phénomènes de cisaillement hydrodynamique et des agents chimiques de désinfection^{95,96,97,98}. Une étude⁹⁹ a montré, sur une surface de titane, que des trous dont les tailles étaient supérieures ou égales à celles des bactéries offrent une meilleure rétention. De même, sur une surface en acier inoxydable, une diminution de l'adhésion a été observée lorsque les irrégularités topographiques avaient des tailles inférieures à celles des bactéries¹⁰⁰.

Il est donc globalement admis qu'une surface polie ou très peu rugueuse retarde l'adhésion bactérienne.

III.2.1.4 La densité de charge en surface

L'interaction électrostatique joue aussi un rôle prépondérant dans les mécanismes d'adhésion car la plupart des bactéries sont chargées négativement au niveau de leur membrane. Par exemple, il a été montré sur plusieurs types de matériaux tels que le verre, des métaux ou des polymères (le polystyrène, le PVC, le PP et le PMMA) qu'une modification de la densité de charge en surface pouvait influencer sur le processus d'adhésion de deux microorganismes (les *Saccharomyces cerevisiae* et les *Acetobacter aceti*).

III.2.1.5 L'énergie de surface du matériau

L'énergie de surface des supports est également un paramètre très important conditionnant et influençant l'adhésion bactérienne. En effet, les interactions entre les bactéries et la surface (séparés d'une distance L) ont été évaluées grâce à ce paramètre thermodynamique et à la théorie étendue de DLVO (Derjaguin Landau Verwey Overbeek) afin de prédire l'adhésion

bactérienne^{101,102}. Cependant, l'énergie de surface ne peut expliquer à elle seule l'adhésion d'une bactérie sur un substrat polymère^{103,104}.

III.2.2 Facteurs liés aux micro-organismes

Une étude a montré en 1992 que plus la concentration bactérienne était importante dans un milieu, plus le nombre de bactéries adhérees augmentait sur une surface jusqu'à la recouvrir totalement¹⁰⁵.

De plus, certaines cellules colonisatrices, une fois adhérees sur une surface peuvent faciliter l'adhésion d'autres micro-organismes. Ce phénomène a été découvert dans les secteurs de l'agro-alimentaire¹⁰⁶ et biomédical¹⁰⁷.

En outre, l'adhésion de bactéries sur une surface dépend de leur composition biochimique ainsi que des propriétés physico-chimiques de leur paroi. Les parois membranaires diffèrent selon qu'une bactérie soit à Gram positif ou à Gram négatif (**Figure I-11**). De plus, celles-ci évoluent selon l'étape de croissance et l'état physiologique de la bactérie¹⁰⁸. Ainsi, en 2005, une étude¹⁰⁹ a établi l'influence de la phase de croissance d'une souche *Escherichia coli* K12 (phase exponentielle / phase stationnaire) sur la densité de macromolécules adhérees sur une surface de quartz. Une densité maximale d'adhésion a été observée lorsque les bactéries étaient dans un état de phase stationnaire. Ce phénomène est attribué à la forte hétérogénéité des charges membranaires durant cette phase, entraînant ainsi une diminution globale de la répulsion électrostatique avec le support.

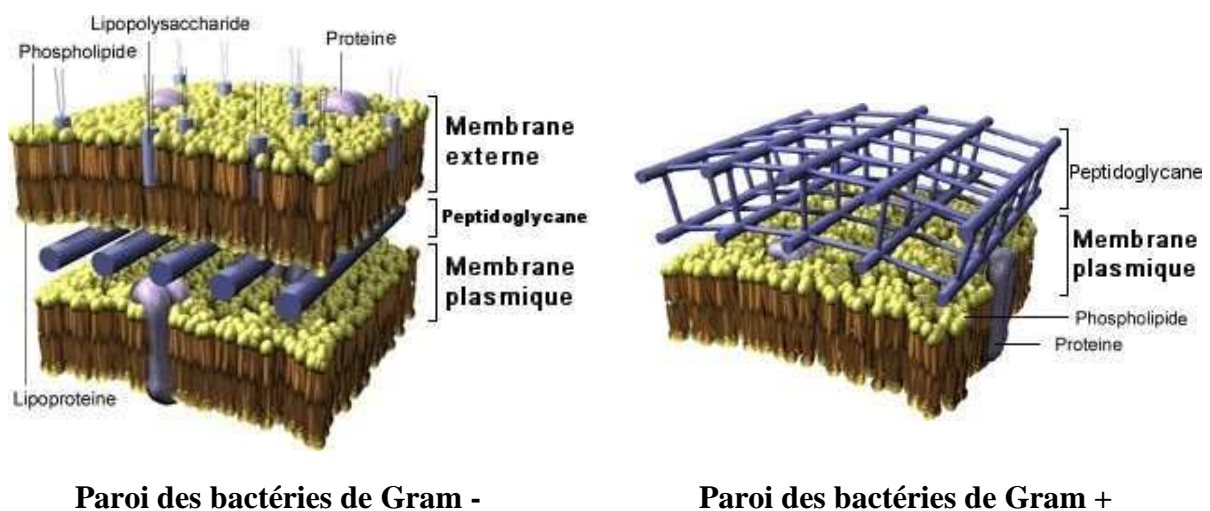


Figure I-11. Structures des parois membranaires pour des bactéries à Gram + et à Gram -

III.2.3 Facteurs liés à l'environnement

III.2.3.1 L'influence du temps de contact

Plus le temps de contact augmente entre la bactérie et le support, plus les liaisons établies sont renforcées¹¹⁰. La technique de microscopie à force atomique (AFM) a permis de vérifier l'augmentation de la force de liaison entre deux souches de *Streptococcus* et une surface d'acier inoxydable 316 avec le temps de contact¹¹¹.

III.2.3.2 L'influence de la température du milieu

La température est un paramètre très important influençant la colonisation bactérienne. Des travaux¹¹² ont mis en évidence une diminution de l'adhésion d'une souche *E. coli* sur une surface de polypropylène lorsque la température passait de 30°C à 12°C. Bien que la plupart des tests se fassent à 37°C, il a été montré qu'il existait, pour chaque type de microorganisme, une température optimale d'adhésion cellulaire¹¹³ (souvent proche de la température optimale de croissance).

III.2.3.3 L'influence de la force ionique et la nature des sels

De nombreux travaux^{114,115} évoquent l'influence de la nature des sels et de la force ionique sur l'adhésion bactérienne. En effet, la force ionique conditionne les interactions électrostatiques entre la bactérie et le support ; la nature des sels conditionne les charges en surface (du support et des bactéries). Ainsi, sur un support de verre, un accroissement du nombre de bactéries *S. cerevisiae* adhérees a été observé avec l'augmentation de la force ionique¹¹⁶.

III.2.3.4 L'influence du pH

Le pH a une influence sur la croissance des bactéries dans le milieu et sur leurs propriétés physico-chimiques de surface. Le pH peut aussi avoir un impact sur la densité surfacique de charges du support, notamment lorsque le matériau est un métal (le pH va conditionner son état d'oxydation)¹⁰⁸.

III.2.3.5 L'influence des conditions hydrodynamiques

Le régime hydrodynamique d'écoulement du milieu environnant peut affecter le mécanisme d'adhésion bactérienne sur une surface.

Lorsque le régime est laminaire, la couche limite à l'interface solide/fluide est épaisse : l'adhésion de microorganismes sur la surface va alors dépendre de leur capacité à franchir cette couche limite¹¹⁷.

Lorsque le régime est turbulent, les mouvements tourbillonnants peuvent faciliter le contact entre un microorganisme et la surface, cependant le temps d'interaction en est réduit (du fait de la diminution de l'épaisseur de la couche limite) ce qui limite l'établissement de liaisons fortes pour rendre possible un attachement irréversible¹⁰⁸.

En conclusion, les mécanismes d'adhésion bactérienne sur une surface sont très complexes et multifactoriels. La compréhension des paramètres inhérents au type de support, aux microorganismes ou à l'environnement permet aujourd'hui de mieux comprendre le phénomène d'infection bactérienne. Les professionnels du milieu biomédical doivent donc se confronter à un challenge quotidien pour éviter la formation et le développement de biofilms. Les différentes stratégies de lutte contre l'infection bactérienne vont donc être développées dans la partie suivante.

IV LES STRATEGIES DE LUTTE CONTRE L'INFECTION BACTERIENNE DANS LE DOMAINE DES BIOMATERIAUX

Malgré une stérilisation préalable, les biomatériaux sont sujets à des infections altérant leur fonctionnement en entraînant des soins annexes très coûteux pour le milieu hospitalier. L'utilisation des traitements préventifs dans le but de limiter la formation d'un biofilm est bien plus intéressante du point de vue économique et humain. En effet, une fois le biofilm installé, il est toujours difficile de l'éliminer. Dans cette optique, plusieurs stratégies ont été développées afin de parer à l'infection des biomatériaux. Toutes ces stratégies visent à entraver la fixation et/ou la prolifération des bactéries en surface (première étape de formation d'un biofilm).

IV.1 Imprégnation par les antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents chimiques, synthétisés par des microorganismes vivants (champignons ou bactéries), exerçant un pouvoir destructeur sur une bactérie tout en étant dépourvus de toxicité vis-à-vis des autres cellules animales. La pénicilline, par exemple, bloque la synthèse de la paroi bactérienne par inhibition de la transpeptidase, inhibant ainsi la synthèse des peptidoglycanes.

L'imprégnation du biomatériau par de telles molécules a longtemps été la principale stratégie de lutte contre les phénomènes d'infection.

En 2004, une étude¹¹⁸ a mis en évidence l'action d'antibiotiques, la rifampine et l'amoxicilline (**Figure I-12**), imprégnés sur des surfaces de cathéters veineux en polyuréthanes (**Figure I-13**) vis-à-vis de d'une souche bactérienne (*S. epidermidis*).

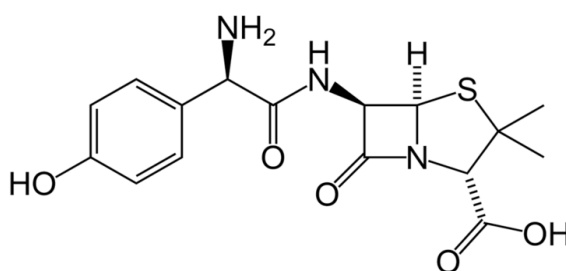


Figure I-12. Structure chimique de l'amoxicilline

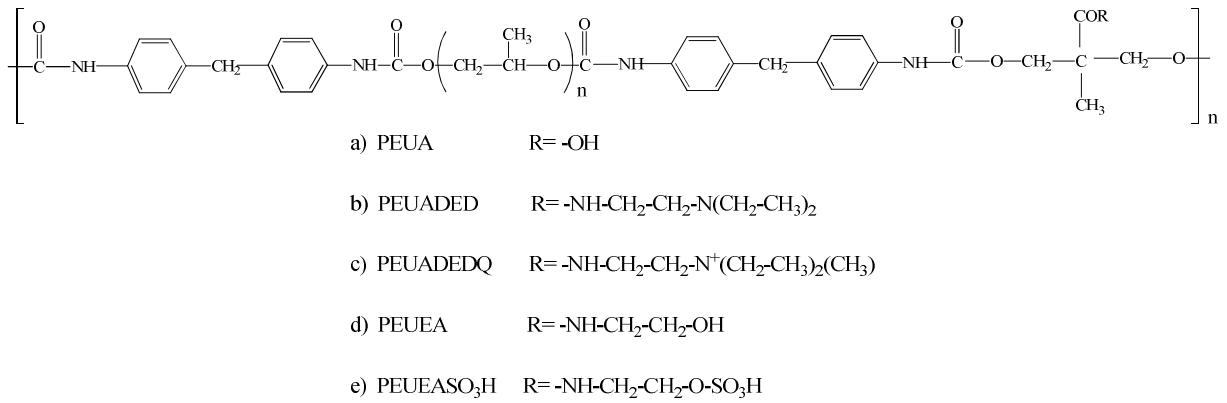


Figure I-13. Structures chimiques de cathéters veineux en PUs¹¹⁸

Cependant, en optant pour cette stratégie, les scientifiques ont dû faire face à deux problèmes majeurs : l'épuisement de l'antibiotique présent en surface du fait de sa libération dans l'organisme (**Figure I-14.**) et l'apparition de phénomènes de résistance chez certaines bactéries. Ce mode de traitement n'est donc valable que pour des implantations à court terme, impliquant des coûts hospitaliers élevés en cas de rejet de l'implant (opération chirurgicale, changement de l'implant...).

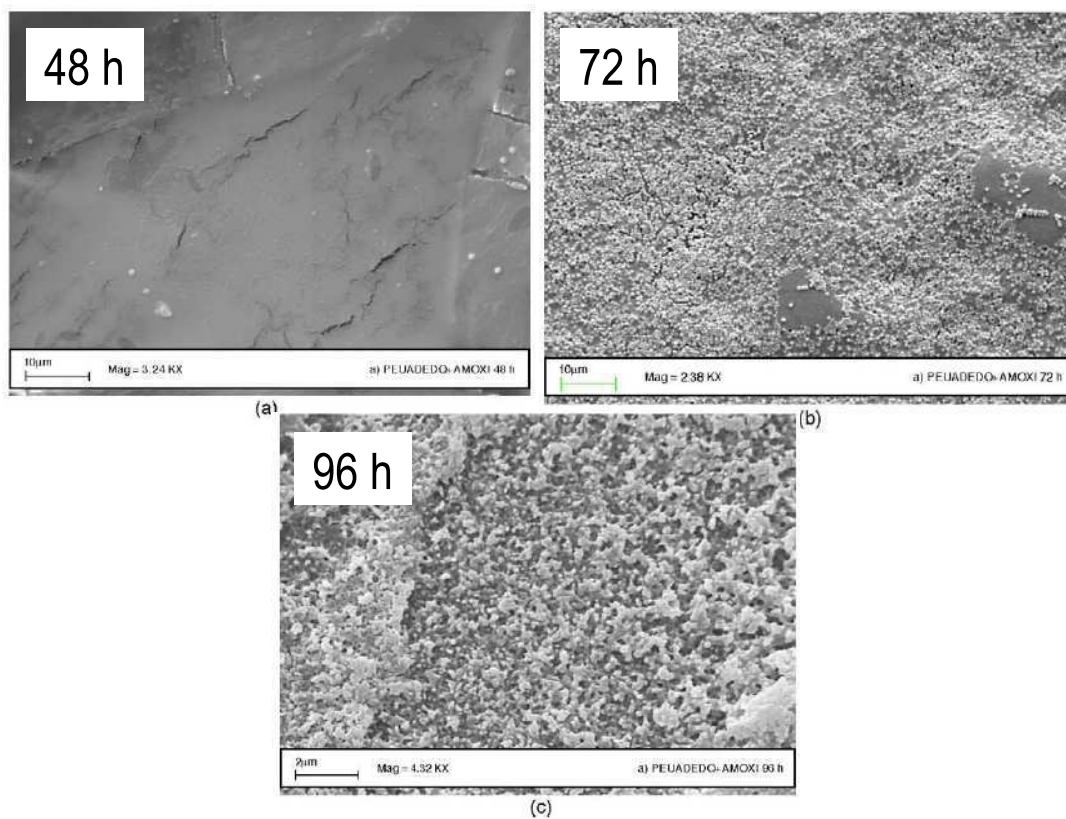


Figure I-14. Illustration de l'épuisement de l'amoxicilline adsorbée sur un cathéter veineux en PUs : croissance bactérienne de la souche *S. epidermidis*¹¹⁸

IV.2 Traitements de surface des biomatériaux

IV.2.1 Revêtements par des éléments métalliques

Les éléments métalliques constituent aussi des agents antimicrobiens très efficaces sur les bactéries et les levures^{119,120,121}. L'or et le platine sont très peu utilisés dans le secteur industriel en raison de leur coût; le mercure est reconnu pour être toxique pour l'homme et l'environnement; le nickel entraîne souvent des réactions allergiques et le zinc possède une activité antibactérienne trop faible. En conséquence, le cuivre et l'argent focalisent l'essentiel des travaux actuels. L'argent est certainement celui qui est le plus utilisé aujourd'hui. Il existe un grand nombre de méthode de déposition d'argent sur des surfaces de polymères à savoir la déposition par plasma, par faisceau d'ions, par vapeurs chimiques et par électrolytes¹²².

Bien que l'activité antimicrobienne des revêtements en argent des surfaces de polymères soit aujourd'hui prouvée dans le domaine médical (cathéters), certains auteurs semblent sceptiques quant à leur réelle efficacité¹²³. C'est pourquoi l'argent est souvent associé à d'autres substances ou particules métalliques. Par exemple, l'activité antibactérienne de différents revêtements (Ag, Ag-Cu et Cu) sur des cathéters a été évaluée¹²⁴ pour différents types de souches (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa*): les revêtements en Ag-Cu ont montré une meilleure efficacité antibactérienne et un spectre d'activité plus large.

Par ailleurs, des travaux ont aussi montré l'efficacité de revêtements par des ions métalliques^{125,126}: une diminution significative de l'adhésion de plusieurs souches bactériennes sur la surface de cathéters a été notée après une imprégnation d'ions Ag⁺.

IV.2.2 Revêtements par des polymères antibactériens

Il est rapidement venu à l'esprit des industriels de vouloir associer certains polymères, possédant des propriétés thermomécaniques adaptées à une application biomédicale bien précise, à d'autres polymères leur apportant des propriétés de biocompatibilité et de biostabilité.

Dans le domaine des cathéters en latex (les cathéters Foley) par exemple, des revêtements en polymères tels que le Téflon, les silicones ou les hydrogels ont amélioré d'une manière remarquable la biocompatibilité lors d'une implantation.

Le polytétrafluoroéthylène (PTFE), de part son faible coefficient de friction est particulièrement bien adapté à une utilisation en tant que revêtement. Sa très forte hydrophobicité ainsi que sa capacité à former des surfaces très lisses laissant peu de points d'ancrage aux bactéries et diminuent fortement tout type d'adhésion cellulaire¹²⁷.

Les hydrogels sont des polymères hydrophiles réticulés possédant un pouvoir d'absorption élevé^{128,129}. Leur capacité d'absorption peut varier de 10 à 98% en masse d'eau. Le gonflement à l'équilibre, n'affectant pas la forme initiale de l'hydrogel¹³⁰, entraîne la formation d'une couche mince d'eau à la surface, la rendant lisse et lubrifiée. Ce type de revêtement est donc particulièrement attrayant pour des cathéters car il facilite leur insertion. L'hydrogel le plus utilisé dans le cadre des revêtements est le poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)¹³¹ (PHEMA).

Les silicones sont quant à eux surtout utilisés, de la même manière que les hydrogels, en tant qu'agents de lubrification limitant ainsi les inflammations des tissus en contact avec les implants¹³¹. Toutefois ce type de revêtement physique de surfaces par des polymères présente quelques inconvénients comme les phénomènes d'infection, d'incrustation ou d'allergie¹²³.

V LE GREFFAGE CHIMIQUE DE POLYMERES ANTIBACTERIENS SUR DES SURFACES DE BIOMATERIAUX

Durant la dernière décade une nouvelle stratégie séduisante a vu le jour : elle consiste à lier chimiquement des agents antibactériens sur la surface d'un biomatériau. De ce fait, la stabilité chimique et thermique ainsi que la longévité sont grandement améliorées en comparaison d'un revêtement classique.

Cependant, le greffage de petites molécules ou de groupements fonctionnels en surface conduit parfois, notamment dans le cas des matériaux souples tels que les silicones¹³², à la diffusion de ces groupements actifs au cœur du matériau. Ceci s'explique par le perpétuel mouvement moléculaire des chaînes polymères. Inévitablement cela conduit à la chute de l'activité biologique en surface. En revanche, l'approche consistant à fixer non pas de petites molécules bioactives, mais des macromolécules telles que les polymères antibactériens, permettrait d'éviter ce type de diffusion au sein même du matériau : la surface serait alors « figée » par réticulation (points d'ancrage supérieurs à deux) ou par l'encombrement stérique des chaînes. L'autre avantage majeur de cette stratégie réside dans la conservation des propriétés thermo-mécaniques du matériau initial permettant ainsi le respect du cahier des charges. Ceci permet aussi de s'affranchir de la redéfinition complète du biomatériau greffé et de diminuer le temps de sa mise sur le marché.

Dans cette partie, les polymères antibactériens connus dans la littérature seront décrits et différenciés selon leur mode d'action sur les microorganismes. On distinguera donc les polymères bactéricides des polymères bactériophobes ou antiadhésifs. Les stratégies chimiques de greffage de polymères antibactériens seront ensuite développées dans le but de situer notre projet de recherche.

V.1 Les polymères antibactériens

Deux classes de polymères antibactériens peuvent être distinguées : les polymères bactéricides (capables de tuer les microorganismes en solution et en surface) et les polymères à propriétés d'anti-adhésion (capables de repousser les microorganismes).

V.1.1 Les polymères biocides

Actuellement, nombre de polymères porteurs de groupements biocides tels que les sels d'ammonium, de phosphonium, de sulfonium, de pyridinium quaternaire et les sels de mono- et de bi-guanidinium sont décrits dans la littérature^{133,134}. Les structures des chaînes principales les plus utilisées sont celles à base de polystyrène ou de polyacrylate (**Figure I-15** et **Figure I-16**). Leurs performances en termes d'activité biocide diffèrent de manière significative. Le choix du polymère biocide utilisé dépend donc de l'application visée et du type de bactéries à éliminer.

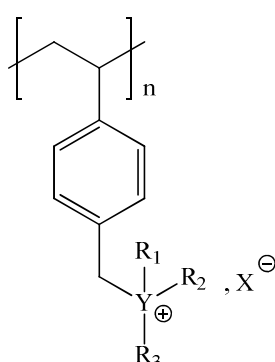


Figure I-15. Structure générale d'un polystyrène possédant un groupement latéral biocide

R_1, R_2, R_3 : Groupes alkyles

Y : P, N or S

X : Cl, BF_4 , ClO_4 or PF_6

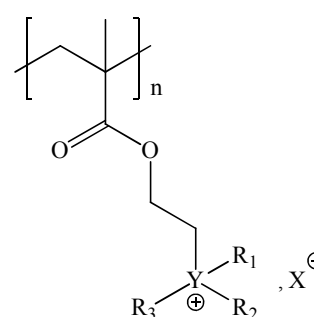


Figure I-16. Structure générale d'un polyacrylate possédant un groupement latéral biocide

V.1.2 Les polymères à propriétés d'anti-adhésion

Ce sont des polymères qui, une fois greffés en surface du biomatériau, modifient l'état physico-chimique de surface de manière à empêcher l'adhésion des bactéries et/ou des protéines. De nombreux travaux ont montré que l'adhésion des bactéries sur des matériaux synthétiques diminue avec l'augmentation de l'énergie de surface¹³⁵. Le poly(éthylène glycol) (PEG) est l'un des polymères les plus utilisés à cet effet. Les polymères porteurs de groupements anioniques tels que les carboxylates et les sulfonates sont également réputés pour leurs propriétés d'anti-adhésion. En effet, leurs groupements anioniques induisent une répulsion des bactéries de type électrostatique¹³⁶. Par ailleurs, des travaux récents ont démontré que certains polysaccharides comme l'hydroxyéthylcellulose, la méthylcellulose^{137,138} ou le chitosane¹³⁹ ainsi que des polymères porteurs de groupements tri(sarcosine), *N*-acétylpiperazine¹⁴⁰ et *N*-Méthyl pyrrolidone présentent à la fois des propriétés d'anti-adhésion et des propriétés antithrombotiques^{137,138}.

V.2 Les stratégies de greffage des polymères antibactériens sur des surfaces de biomatériaux

Il existe différentes façons de greffer chimiquement un polymère antibactérien sur un biomatériau : lorsque le biomatériau ne possède pas de groupements d'ancrage, cela concerne la grande majorité des polymères, le traitement s'effectue en deux étapes (traitement physique ou chimique suivi de la réaction de greffage chimique) ; lorsque le biomatériau possède déjà un groupement d'ancrage, la réaction de greffage chimique s'effectue directement sur sa surface.

Dans les deux cas, les groupements fonctionnels présents en surface permettent la formation ultérieure de liaisons covalentes avec des molécules réactives telles que les monomères ou des polymères fonctionnels. Deux approches chimiques sont donc possibles :

- Lorsque le polymère antibactérien réagit directement avec les groupements d'ancrage présents en surface on parle alors d'une méthode « grafting to ».
- Lorsque le monomère fonctionnel est polymérisé depuis la surface on parle de méthode « grafting from ».

V.2.1 La méthode de greffage covalent « grafting from »

La méthode de greffage « grafting from » consiste dans un premier temps à créer un site d'amorçage de polymérisation à la surface d'un biomatériau. La polymérisation est alors conduite depuis la surface. Si la densité d'amorceurs radicalaires fixés en surface est suffisamment élevée, lorsque vient l'étape de polymérisation, les chaînes formées auront tendance à s'étirer et à ne pas s'enchevêtrer de manière à constituer des « polymères brush »¹⁴¹. Cette méthode de greffage permet donc d'optimiser la densité de greffage de polymères antibactériens en surface et de maximiser les effets antiadhésifs ou bactéricides voulus (**Figure I-17**).

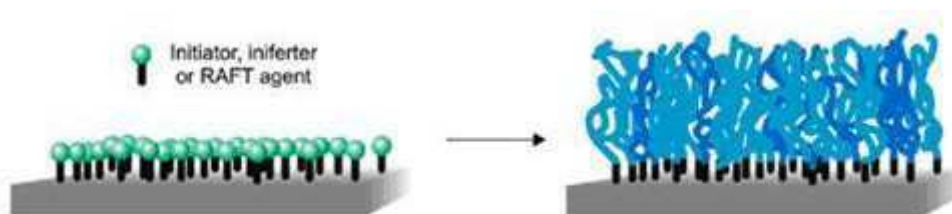


Figure I-17. Illustration de la méthode de greffage « grafting from »¹⁴¹

Cependant le choix des structures de chaînes antibactériennes est assez limité. En effet, les techniques de copolymérisation radicalaire, d'ATRP (Atom Transfert Radical Polymerization) ou de photopolymérisation ne sont utilisables que pour un nombre limité de monomères. Les structures de type polysaccharides ou PEG par exemple ne peuvent pas être générées par la voie « grafting from ». De plus les techniques d'analyses classiques spectroscopiques (RMN, GPC ou IRTF par exemple) des polymères ne peuvent pas être utilisées pour contrôler la structure une fois le polymère antibactérien immobilisé en surface.

Quelques exemples non exhaustifs illustrant cette méthode sont décrits ci-après puis résumés dans le **Tableau I-4**.

V.2.1.1 Surfaces en polyuréthanes

Le traitement par plasma (O_2 et N_2) est très souvent utilisé pour fonctionnaliser les surfaces polyuréthanes. Il génère des groupements peroxydes qui, une fois en contact avec des monomères de types acrylates, permettent une polymérisation depuis la surface. Ainsi une photopolymérisation (sous UV) du 4-vinylpyridine depuis une surface PU prétraitée a été effectuée, suivie d'une étape de quaternisation pour développer de nouvelles surfaces

polyuréthanes bactéricides¹⁴² (**Figure I-18**). De même, après un traitement par plasma, une copolymérisation radicalaire depuis la surface d'un mélange acide acrylique/acrylate de méthyle (AA/MA) a permis la fixation de macromolécules à effet antiadhésif telles que des PEG et de l'héparine¹⁴³ ou du collagène¹⁴⁴.

Le traitement chimique est aussi un moyen de fixer des molécules réactionnelles telles que les acrylates. Deux méthodes de synthèse ont par exemple été envisagées pour polymériser depuis une surface PU le N,N'-diméthyl(méthylméthacryloyléthyl)ammonium propane sulfonate (noté DMAPS) : la première méthode¹⁴⁵ consiste à fixer directement l'acide acrylique sur une surface PU via un agent de couplage (dicyclohexylcarbodiimide noté DCC) puis de copolymériser depuis la surface le DMAPS via un amorceur radicalaire AIBN (**Figure I-19**) ; la seconde méthode¹⁴⁶ consiste à faire réagir préalablement un diisocyanate (le diisocyanate d'hexaméthylène, noté HDI) sur une surface PU puis de fixer l'acide acrylique ou le méthacrylate d'hydroxyéthyle pour enfin copolymériser depuis la surface le DMAPS. Dans les deux cas, le polymère porteur de groupements sulfobétaines s'est révélé fortement antiadhésif et antithrombique^{145,146}.

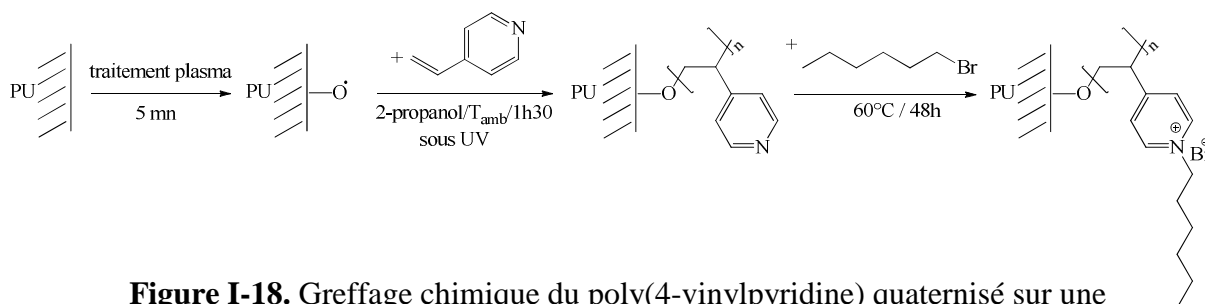


Figure I-18. Greffage chimique du poly(4-vinylpyridine) quaternisé sur une surface PU prétraitée par plasma

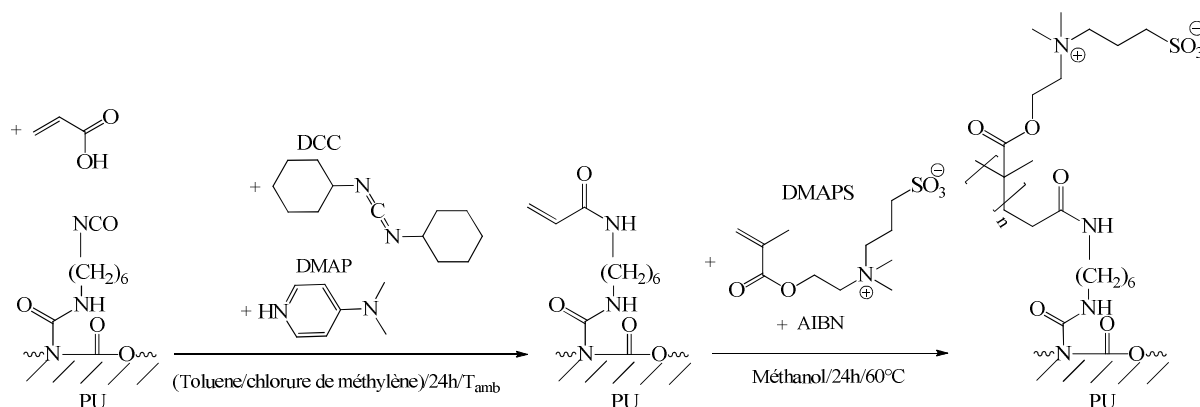


Figure I-19. Greffage chimique d'un polymère porteur de groupements sulfobétaines sur une surface PU prétraitée chimiquement

V.2.1.2 Surfaces en silicones

En 2003, des chaînes polyméthacrylates (PMMA, PEGMA et PDMAEMA) ont pour la première fois été fixées via la méthode ATRP sur des surfaces de silicones (prétraitement chimique sous UV)¹⁴⁷. Depuis, sur des surfaces silicones prétraitées par voie chimique¹⁴⁸ ou par plasma¹⁴⁹, des chaînes polyméthacrylates quaternisées (PDMAEMA ou le poly(méthacrylate de butyle)-co-(méthacrylate d' aminoéthyle)) ont pu être fixées par cette même méthode ATRP afin de développer des surfaces bactéricides capables de lutter contre des souches telles que *E. coli* ou *S. aureus*¹⁴⁹.

V.2.1.3 Surfaces en poly(éthylène téréphtalate) (PET)

Dans le cas du PET, en milieux aqueux, des études ont mis en évidence la possibilité d'une copolymérisation radicalaire depuis la surface sans prétraitement. La copolymérisation radicalaire met en jeu les liaisons C-H du PET avec les doubles liaisons C=C de monomères introduits dans le milieu réactionnel. En effet, en utilisant des radicaux classiquement utilisés dans l'eau, des monomères tels que l'acrylamide^{150,151}, l'acide acrylique^{152,153}, le méthacrylate de méthyle^{154,155}, ou le N-vinyl-2-pyrrolidone¹⁵⁶ ont pu être copolymérisés conférant aux surfaces PET développées des propriétés antiadhésives.

V.2.1.4 Surfaces en polypropylène ou en verre

Sur des substrats tels que le verre¹⁵⁷ ou le PP¹⁵⁸, des chaînes polyméthacrylates comme le PDMAEMA ont aussi été synthétisées depuis la surface par la technique d'ATRP. L'étape finale de quaternisation des ammoniums a généré des surfaces bactéricides vis-à-vis de souches telles que *E. coli*^{157,158} ou *Bacillus subtilis*¹⁵⁷.

Tableau I-4. Quelques exemples d'immobilisation de polymères antibactériens par la méthode « grafting from »

	Prétraitement	Type de polymérisation	Polymères antibactériens immobilisés	Effet antibactérien
Polyuréthanes	Plasma	Photopolymérisation (UV)	Poly(4-vinylpyridine) quaternisé ¹⁴²	surfaces bactéricides
	Plasma	copolymérisation radicalaire	polyacrylates porteurs de groupements PEG ou héparine ¹⁴³	surfaces antiadhésives
	chimique	polymérisation radicalaire	polyacrylates porteurs de groupements sulfobétaines ^{145,146}	surfaces antiadhésives
	Plasma	polymérisation radicalaire	polyacrylate porteur de collagène ¹⁴⁴	surfaces antiadhésives
Verres	chimique	ATRP	polyacrylate quaternisé ¹⁵⁷	surfaces bactéricides
Silicones	UV	ATRP	polyacrylate ¹⁴⁷	surfaces antiadhésives
	chimique	ATRP	polyacrylate quaternisé ¹⁴⁸	surfaces bactéricides
	Plasma	ATRP	polyacrylate quaternisé ¹⁴⁹	surfaces bactéricides
Polypropylène	UV	ATRP	polyacrylate quaternisé ¹⁵⁸	surfaces bactéricides
PET	Aucun traitement	copolymérisation radicalaire	polyacrylates ^{152,153,154,155}	surfaces antiadhésives
	Aucun traitement	copolymérisation radicalaire	polyacrylamides ^{150,151}	surfaces antiadhésives
	Aucun traitement	copolymérisation radicalaire	N-vinyl-2-pyrrolidone ¹⁵⁶	surfaces antiadhésives

V.2.2 La méthode de greffage covalent « grafting to »

La méthode de greffage covalent « grafting to » consiste à faire réagir un polymère antibactérien préalablement synthétisé directement sur la surface d'un substrat (**figure I-20**). Contrairement à la méthode « grafting from », le polymère antibactérien est synthétisé en tout premier lieu. Les variables de synthèse telles que la structure de la chaîne principale, la masse molaire, le groupement d'ancrage, le groupement antibactérien sont bien plus nombreux et permettent d'imaginer un très large spectre de structures à propriétés spécifiques. Quelques exemples non exhaustifs illustrant cette méthode sont décrits ci-après puis résumés dans le **Tableau I-5**.

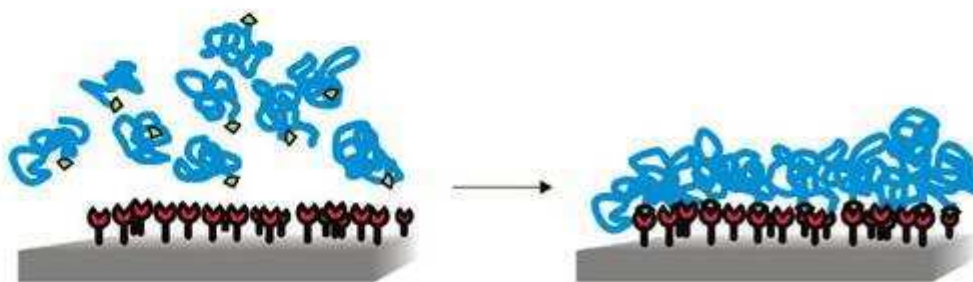


Figure I-20. Illustration de la méthode de greffage « grafting to »¹⁴¹

V.2.2.1 Surfaces en verre

Sur des substrats tels que le verre, des polymères tels que des polyacrylates¹⁵⁹, comme le copolymère à bloc poly(méthacrylate de 2-diméthylaminoéthyle)-b-poly(méthacrylate de 3-triméthoxysilylpropyle) (PDMAEMA/PTMSPMA), préalablement synthétisés par ATRP puis quaternisés sont immobilisés de manière à conférer des propriétés bactéricides à la surface.

Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence le caractère antiadhésif d'une surface en verre suite à une immobilisation de peptides antimicrobiens¹⁶⁰. Après avoir traité chimiquement la surface avec un thiol-silane et additionné l'ester N-[γ -maleimidobutyryloxy] succinimide, des peptides antimicrobiens ont pu être fixés via une réaction de Gabriel (groupements amines des peptides réagissant avec les groupements succinimides).

V.2.2.2 Surfaces en cellulose

Sur des fibres textiles telles que la cellulose, des molécules de chitosane traitées chimiquement pour porter des groupements ammonium quaternaire, ont été fixées via à un intermédiaire réactionnel¹⁶¹ (acide citrique monohydraté) ou directement sur les fonctions hydroxyle de la cellulose¹⁶². Des effets bactéricides ont été mis en évidence vis-à-vis des souches *E. coli* et *S. aureus*.

V.2.2.3 Surfaces en polyuréthanes

De nombreuses études ont mis en évidence la possibilité d'immobiliser chimiquement des polymères à effets antiadhésifs sur des surfaces en polyuréthanes. En effet, le groupement uréthane -CONH- des polyuréthanes est susceptible de réagir avec des intermédiaires bifonctionnels tels que les diisocyanates (**Figure I-21**) permettant la fixation de molécules telles que le chitosane¹⁶³, des lipides tétraétherés¹⁶⁴, des PEG^{165,166,167} ou des molécules biocides telles que le N-Halamine¹⁶⁸. L'héparine¹⁶⁹ a aussi pu être greffée de façon directe sur

une surface PU-NH₂ chimiquement prétraitée à l'aide d'un agent de couplage (hydrochlorure de 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide, noté EDC).

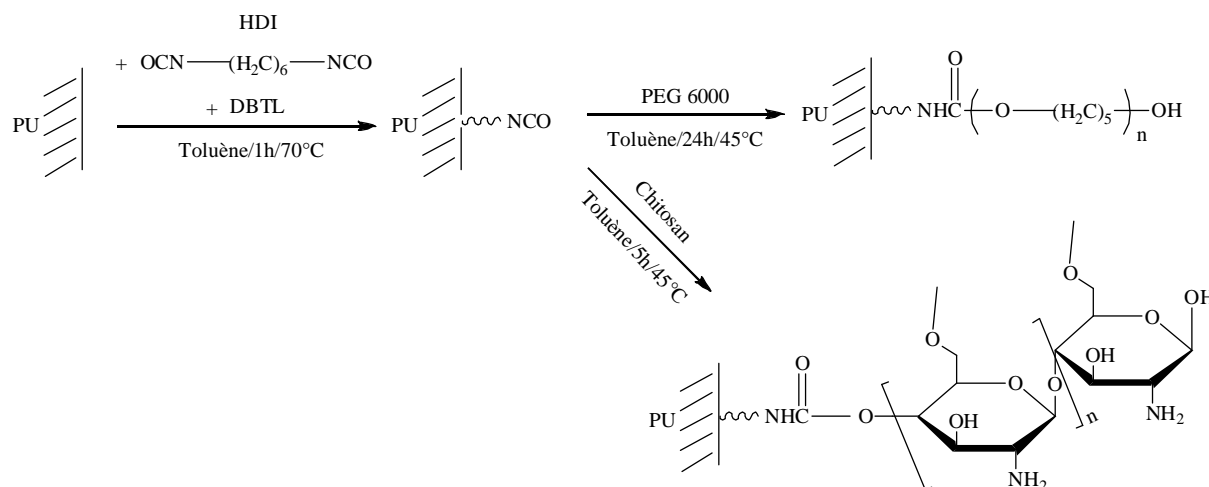


Figure I-21. Greffage chimique d'un PEG ou du chitosane sur une surface PU via un intermédiaire bifonctionnel 1,6-diisocyanatohexane (HDI)

V.2.2.4 Surfaces en polypropylène ou polyéthylène

De même, sur des fibres de polypropylène, préalablement traitées par plasma (N₂, NH₃ et CO₂) de manière à générer des fonctions amines et carboxyliques en extrême surface, le chitosane¹⁷⁰ a pu être chimiquement fixé de deux façons différentes : via un intermédiaire bifonctionnel comme le glutaraldéhyde ou via un agent de couplage tel que le EDC. La même équipe a réussi à fixer une enzyme antibactérienne, l'oxydase de glucose¹⁷¹, sur ce type de fibre via la même approche chimique. En effet, la fixation d'enzyme antibactérienne sur une surface ne peut se faire que par une méthode directe de greffage.

De la même manière, après un traitement par plasma (O₂/H₂O/H₂ ou NH₃/H₂) générant des fonctions COOH et NH₂, l'héparine et l'acide hyaluronique hautement sulfatés ont pu être directement fixés sur des surfaces PE de manière à leur conférer des propriétés antithrombotiques¹⁷².

Par ailleurs, des fibres PE bactéricides¹⁷³ ont aussi été développées : après la fixation de l'anhydride maléique en présence d'un amorceur radicalaire (AIBN), le polyéthylèneimine a pu être fixé puis quaternisé sur la surface PE (**Figure I-22**).

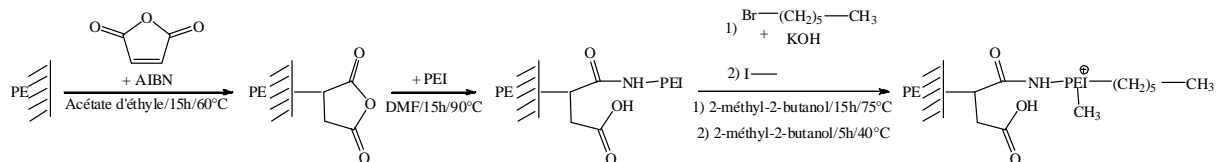


Figure I-22. Greffage chimique d'un PEI quaternisé sur une surface PE

V.2.2.5 Surfaces en polyéthersulfone (PES)

La technique d'irradiation UV couplée à un traitement par l'ozone a été envisagée de manière à générer des groupements peroxydes sur des membranes en PES¹⁷⁴. Ce type de traitement a ensuite permis la fixation de polymères hydrophiles antiadhésifs tels que des PEG, le chitosane et des alcools polyvinyliques.

V.2.2.6 Surfaces en polydiméthylsiloxane (PDMS)

Le PDMS a fait l'objet de nombreux travaux dans le domaine de l'antibactérien. L'approche générale consiste à utiliser les liaisons Si-H résiduelles pour pouvoir greffer chimiquement tout type des macromolécules à effets antiadhésifs portant des groupements vinyliques pendants en une seule étape dans l'eau. Ainsi la méthylcellulose¹³⁸ ou le poly(chlorure de (vinylbenzyl)ammonium) (PVBCA)¹³⁷ préalablement modifiés chimiquement (groupements hydroxyle substitués par des groupements vinyliques pour la méthylcellulose ; groupements chlorures substitués par des groupements vinyliques pour le PVBCA) ont pu être immobilisés sur ce type de surface. L'avantage majeur de ce type de greffage est qu'il ne nécessite pas de traitement préalable de la surface.

Par ailleurs, le traitement par plasma s'est révélé très efficace pour fixer des polymères polypeptidomimétiques fortement antiadhésifs sur ce type de surface^{175,176}.

Tableau I-5. Quelques exemples d'immobilisation de polymères antibactériens par la méthode « grafting to »

	groupe réactionnel du biomatériau	Prétraitement	Polymères antibactériens immobilisés	Effet antibactérien recherché
Polyuréthanes	OCONH	chimique	PEG ^{165,166,167}	surfaces antiadhésives
	OCONH	chimique	Héparine ¹⁶⁹	surfaces antiadhésives
	OCONH	chimique	Chitosane ¹⁶³	surfaces antiadhésives
	OCONH	chimique	Lipides tétraéthérés ¹⁶⁴	surfaces antiadhésives
Verres	Si-H	chimique : lavage piranha	Polyacrylate quaternisé ¹⁵⁹	surfaces bactéricides
	Si-H	chimique	Polypeptides ¹⁶⁰	surfaces antiadhésives
Silicones	Si-H	pas de traitement	Méthylcellulose ¹³⁸	surfaces antiadhésives
	Si-H	pas de traitement	Poly(chlorure de (vinyl benzyl)ammonium) ¹³⁷	surfaces bactéricides
	Si-H	Plasma	polymères peptidomimétiques ^{175,176}	surfaces antiadhésives
Cellulose	OH	UV + chimique	Chitosane quaternisé ¹⁶¹	surfaces bactéricides
	OH	pas de traitement	Chitosane quaternisé ¹⁶²	surfaces bactéricides
Polypropylène	C-H	chimique + plasma	Chitosane ¹⁷⁰	surfaces antiadhésives
	C-H	chimique + plasma	Oxydase de glucose ¹⁷¹	surfaces antiadhésives
Polyéthylène	C-H	Chimique	polyéthylèneimine quaternisé ¹⁷³	surfaces bactéricides
	C-H	Plasma	Héparine ¹⁷²	surfaces antiadhésives
Polyethersulfone	C-H	UV/ozone	Chitosane et PEG ¹⁷⁴	surfaces antiadhésives

Dans ce qui suit, nous allons nous focaliser sur le PVC, biomatériau choisi au cours de ce travail.

V.3 Le poly(chlorure de vinyle)

Le PVC est un des polymères synthétiques les plus utilisés dans le secteur industriel. En effet, au regard de sa production mondiale annuelle (37 millions de tonnes en 2008 avec une augmentation courante de 5% par an), il est le troisième plastique le plus produit après le polyéthylène et le polypropylène. Ses multiples propriétés thermo-mécaniques ainsi que sa haute résistance chimique alliées à un prix abordable ont fait de lui un des matériaux les plus versatiles qui soit. On le retrouve dans de nombreux secteurs tels que le bâtiment (fenêtres, canalisations, tubes et raccords), l'automobile (revêtements de tableaux de bord), les équipements électriques (gainage de câbles électriques), l'agroalimentaire (emballages), les accessoires de mode (bottes, cirés) ainsi que le secteur médical (poches de sang, cathéters, tubes de dialyse, gants hospitaliers, emballages de médicaments, prothèses artificielles, implants...).

Bien que ce polymère soit couramment utilisé en tant que biomatériau dans le secteur biomédical, les travaux de recherches concernant les traitements chimiques de surface, en vue d'améliorer ses propriétés antibactériennes, sont relativement limités (**Tableau I-6**). Les deux parties suivantes permettront de mettre en évidence un état de l'art concernant tous les types de polymères antibactériens immobilisés sur le PVC.

V.3.1 Surfaces PVC à propriétés bactéricides

V.3.1.1 Incorporation de molécules biocides

La plupart des études industrielles visant à conférer des propriétés bactéricides au PVC portent sur l'incorporation d'agents biocides¹⁷⁷ au sein même du matériau. Des agents bioactifs tels que le benzisothiazolinone (BIT)¹⁷⁸, l'oxybisphenoxarsine (OBPA)¹⁷⁹, l'omadine de zinc¹⁷⁹, le triclosane (TCS)^{179,180}, le carbamate de 3-iodo-2-propynylbutyle (IPBC)^{179,181}, le thiabedazole (TBZ)¹⁷⁹, le 3-isothiazolane (IT)¹⁸², le carbamate de 3-iodopropynyl-N-phényle (IPPC)¹⁸¹, le carbamate de 3-iodopropynyle (IPC)¹⁸¹, le pyrithione de zinc¹⁸³, le tri-n-propylétain¹⁸⁴, l'orthophénylphenol¹⁸⁵, et le chlorpyrifos¹⁸⁵ sont ajoutés lors de la mise en œuvre du matériau. La migration progressive de l'agent biocide vers la surface permet de protéger le biomatériau des microorganismes.

V.3.1.2 Greffage chimique d'agents biocides ou de polymères bactéricides

Une autre approche consiste à fixer chimiquement des agents biocides par l'intermédiaire de groupements espaceurs¹⁸⁶. Ainsi, l'agent biocide Irgasan a pu être fixé chimiquement sur des chaînes d'acide polyacrylique (groupements COOH activés par le carbodiimide EDC) fixées par ATRP sur une surface PVC prétraitée¹⁸⁷ (par plasma) (**Figure I-23**). Toutefois, les surfaces PVC développées ont montré une faible activité antibactérienne vis-à-vis des souches *E. coli* et *S. aureus*.

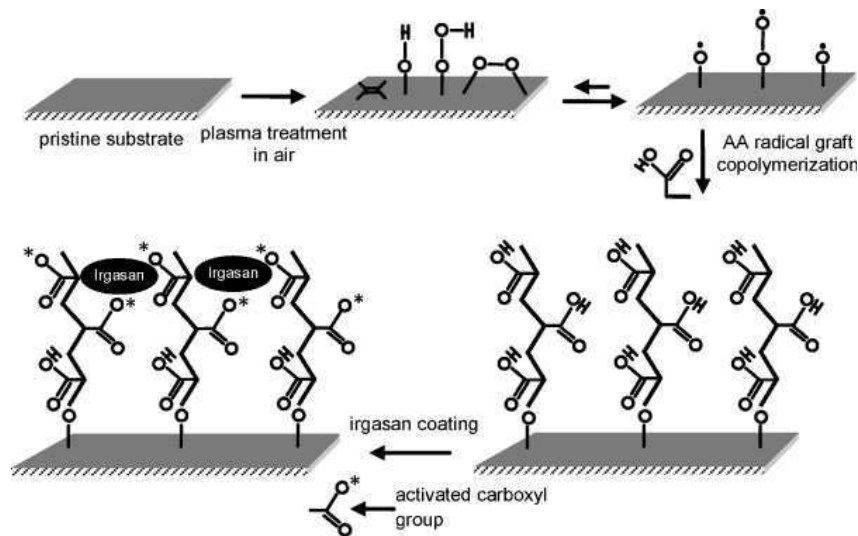


Figure I-23. Immobilisation d'un agent biocide (Irgasan : Triclosan, 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol)) sur une surface PVC¹⁸⁷

Dans le cadre de quelques brevets^{188,189,190}, des polymères biocides porteurs de groupements contenant des ammoniums quaternaires fixés à des chaînes polyméthacrylates ou polyméthacrylamides ont été immobilisés sur des surfaces PVC par activation radicalaire sous l'effet d'un rayonnement ionisant (rayonnement gamma ou bombardement électronique). Toutefois, la mise en œuvre de ce genre de polymérisation représente un investissement industriel important. C'est pourquoi d'autres méthodes plus économiques ont été envisagées comme la photopolymérisation radicalaire suivie d'un greffage covalent de copolymères biocides^{191,192,193} (**Figure I-24**).

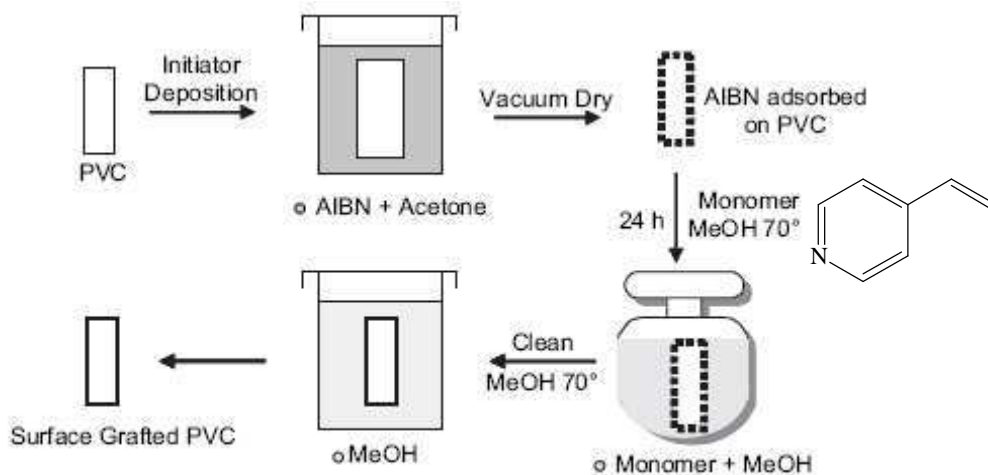


Figure I-24. Procédé de photopolymérisation radicalaire d'un monomère 4-vinylpyridine quaternisable sur une surface PVC¹⁹²

V.3.2 Surfaces PVC à propriétés antiadhésives

V.3.2.1 Greffage chimique de polymères antiadhésifs par la stratégie « grafting from »

La technique SI-ATRP (Surface Initiated Atom Transfer Radical Polymerization) est particulièrement bien adaptée pour fonctionnaliser la surface du PVC. Des chaînes polyacrylates¹⁹² ou polyacrylamides possédant des propriétés d'antisalissure comme le poly(N,N-diméthylacrylamide) (PDMA) ainsi que le poly(N-Isopropylacrylamide) PNIPAAm ont été greffées chimiquement avec succès par cette méthode¹⁹⁴ (**Figure I-25**).

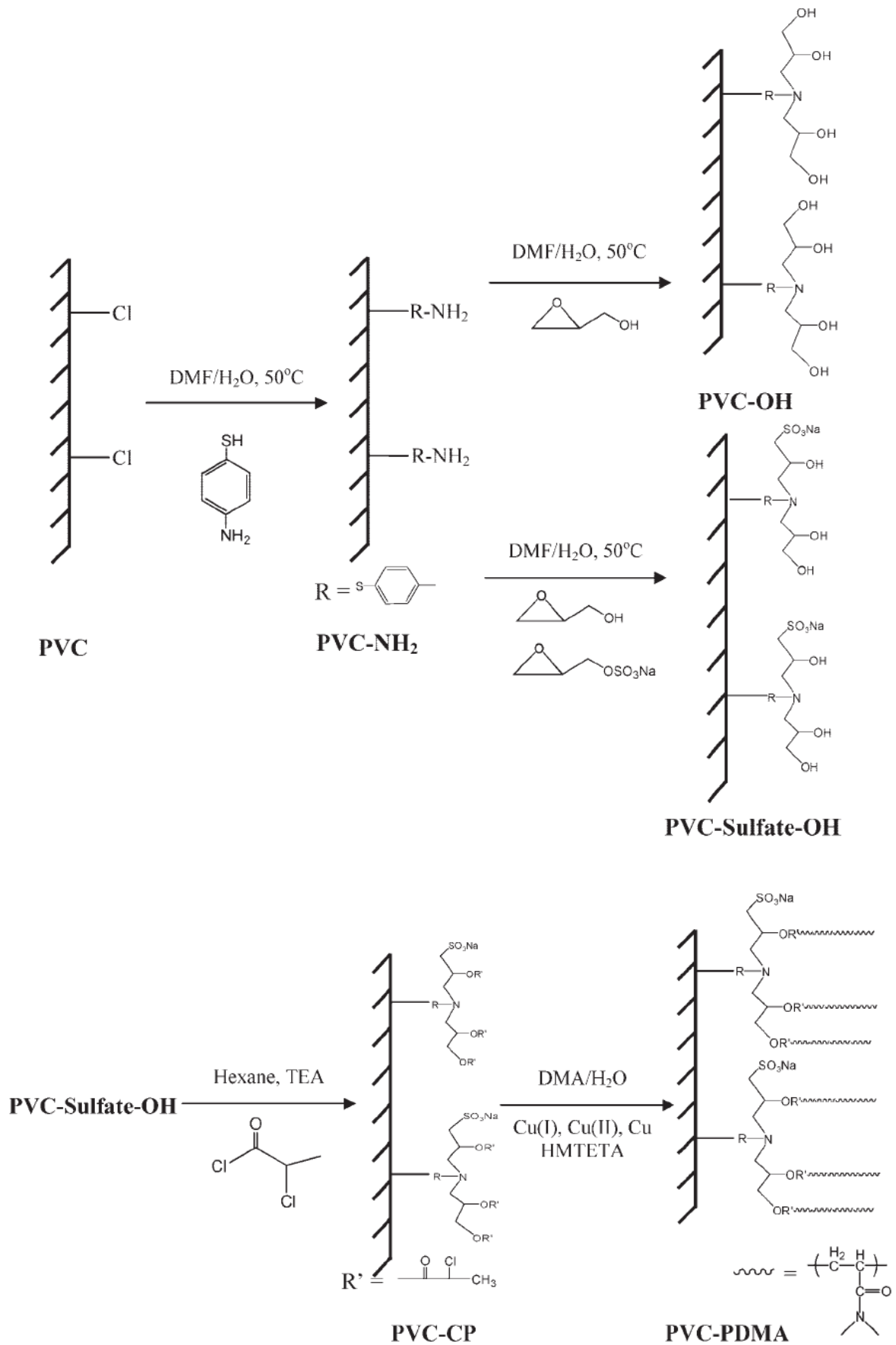


Figure I-25. Greffage d'un polyacrylamide par SI-ATRP sur une surface PVC¹⁹⁴

V.3.2.2 Greffage chimique de polymères antibactériens par la stratégie « grafting to »

La plupart des macromolécules à effet antiadhésif greffées par la méthode « grafting to » sont fixées via un groupement espaceur.

Ainsi, après la fixation d'une diamine sur une surface PVC suivie d'une réaction avec un diisocyanate, des molécules PEG^{195,196} (**Figure I-26**) ont pu être immobilisées. Cela a réduit nettement l'adhésion de plaquettes sanguines.

Une autre approche photochimique a permis de fixer l'héparine^{197,198} (**Figure I-27**) et l'acrylate de sucrose¹⁹⁹ sur des surfaces PVC via la benzophénone. Ces surfaces ont montré d'excellentes propriétés anticoagulantes.

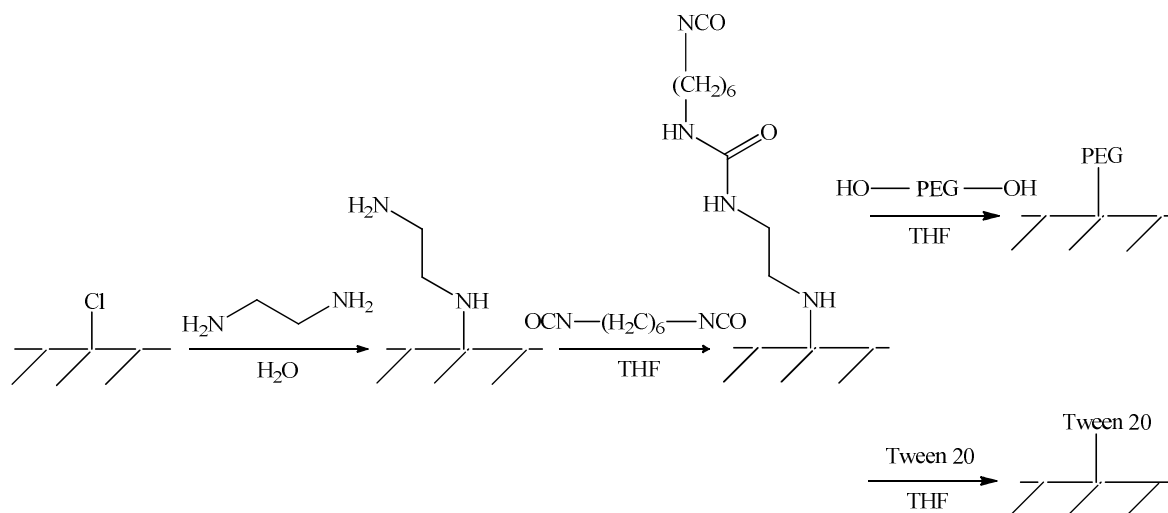


Figure I-26. Fixation d'un PEG¹⁹⁵ ou d'un surfactant (Tween 20)¹⁹⁶ sur une surface PVC

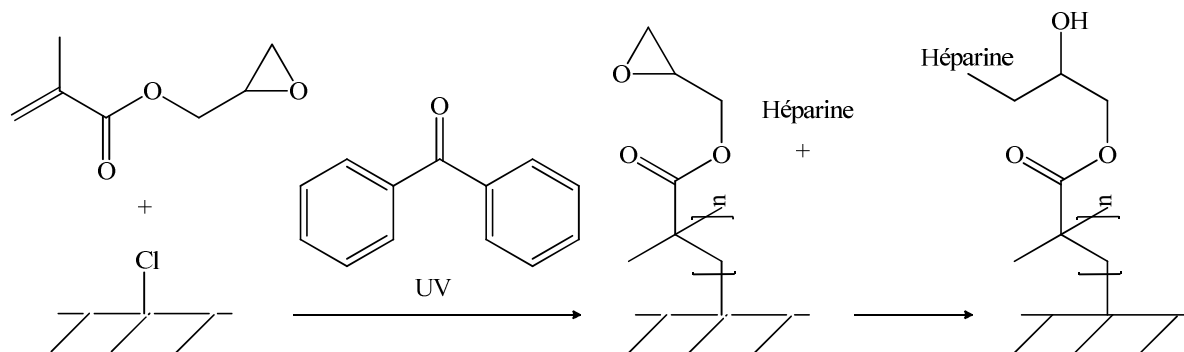


Figure I-27. Fixation de l'héparine¹⁹⁸ sur une surface PVC

Tableau I-6. Résumé de l'état de l'art concernant le greffage chimique de polymères antibactériens sur des surfaces PVC

Biomatériau usuel choisi : le PVC	
Stratégie antiadhésive	Stratégie bactéricide
<p>Polyacrylates^{192,199}</p> <p>PEG^{195,196}</p> <p>Polyacrylamides¹⁹⁴</p> <p>Héparine^{197,198}</p>	<p>Polyméthacrylates et Polyméthacrylamides porteurs d'ammoniums quaternaires ou d'agents biocides^{186,187,188,189,190,191,192,193}</p>

VI CONCLUSION

Le greffage chimique de polymères antibactériens sur des surfaces de biomatériaux constitue une stratégie émergente et très prometteuse pour lutter contre les phénomènes d'infection. Le choix du mode de greffage se fait en prenant en compte les propriétés structurelles du biomatériau mais aussi celles des macromolécules antibactériennes à fixer. Cependant, dans le cas du poly(chlorure de vinyle) (PVC) cette stratégie est encore très peu explorée (**Tableau I-6**).

Ainsi, le projet de recherche qui m'a été confié s'inscrit dans l'optique de développer de nouvelles surfaces PVC antibactériennes en vue de contribuer à la lutte contre les phénomènes d'infection. Pour ce faire, nous avons choisi de synthétiser des séries de copolymères bactéricides et antiadhésifs (ou bactériophobes) porteurs de groupements propargyle. Ces nouveaux copolymères seront par la suite greffés sur des surfaces PVC porteuses de groupements azoture. La réaction mise en jeu est la cyclo-addition 1,3-dipolaire catalysée de Huisgen (CuAAC) entre les groupements alcyne et les groupements azoture, réaction la plus utilisée et la plus populaire en chimie click. D'autre part, l'approche chimique « grafting to » a été choisie car elle permet d'offrir plus de possibilités dans le choix de la structure du polymère, du groupement d'ancrage et du groupement antibactérien.

- ¹ Rapport réalisé sous la coresponsabilité de Laurent SEDEL et Christian JANOT, Intercommission n°1 de l'INSERM : <http://averousl.free.fr/fichiers/Bio-materiaux%20%28Fr%29.pdf>
- ² Chen H., Yuan L., Song W., Wu Z., Li D., *Progress in Polymer Science* (2008), 33, 11, 1059–1087.
- ³ Anderson J.M., *Annual Review Material Research* (2001), 31, 81–110.
- ⁴ Tirrell M., Kokkoli E., Biesalski M., *Surface Science* (2002), 500, 1-3, 61–83.
- ⁵ Zuwei M., Zhengwei M., Changyou G., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2007), 60, 2, 137–157.
- ⁶ Kastrati A., Schomig A., Dirschinger J., Mehilli J., Von Welser N., Pache J., Schuhlen H., Schilling T., Schmitt C., Neumann F.J., *Circulation* (2000), 101, 21, 2478-2483.
- ⁷ El Feninat F., Fiset M., Laroche G., Mantovani D., *Advanced Engineering Material* (2002), 4, 3, 91-104.
- ⁸ Mantovani D., *JOM* (2000), 52, 10, 36-44.
- ⁹ Chiba A., Lee S-H., Matsumoto H., Nakamura M., *Materials Science and Engineering A* (2009), 513–514, 286–293.
- ¹⁰ Shettlemore M.G., Bundy K.J., *Biomaterials* (2001), 22, 16, 2215–2228.
- ¹¹ Lin H.Y., Bumgardner J.D., *Biomaterials* (2004), 25, 7-8, 1233–1238.
- ¹² Hsu H-C., Lian S-S., *Journal of Materials Processing Technology* (2003), 1-3, 138, 231–235.
- ¹³ García-Alonso M.C., González-Carrasco J.L., Pérez P., Haanappel V.A.C., Escudero M.L., Chao J., Stroosnijder M.F., *Journal of Materials Science, Materials in Medicine* (2001), 12, 7, 589-596.
- ¹⁴ Novikova G.E., *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces* (2011), 47, 3, 372-380.
- ¹⁵ Cadosch D., Chan E., Gautschi O.P., Filgueira L., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2009), 91, 4, 1252-1262.
- ¹⁶ Hallab N.J., Jacobs J.J., Skipor A., Black J., Mikecz K., Galante J.O., *Journal of Biomedical Materials Research* (2000), 49, 3, 353-361.
- ¹⁷ Loch L.J., Pedersen M.O., Markholt S., Bihby B.M., Larsen A., Penkowa M., Stoltenberg M., Rungby J., *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (2011), 109, 1, 1-10.
- ¹⁸ Basko-Plluska J.L., Thyssen J.P., Schalock P.C., *Dermatitis* (2011), 22, 2, 65-79.
- ¹⁹ Zaffe D., *Micron* (2005), 36, 7-8, 583-592.
- ²⁰ Klein C., Patka P., Denhollander W., *Biomaterials* (1989), 10, 1, 59-62.
- ²¹ Nagano M., Nakamura T., Kokubo T., Tanahashi M., Ogawa M., *Biomaterials* (1996), 17, 18, 1771-1777.
- ²² Yang R-N., Ye F., Cheng L-J., Wang J-J., Lu X-F., Shi Y-J., Fan H-S., Zhang X-D., Bu H., *Journal of Zhejiang University-Science B* (2011), 12, 7, 582-590.
- ²³ Karageorgiou V., Kaplan D., *Biomaterials* (2005), 26, 27, 5474-5491.
- ²⁴ Yang J-H, Kim K-H, You C-K, Rautray T.R, Kwon T-Y, *Journal of Biomedical Materials Research part B, Applied Biomaterials* (2011), 99, 1, 150-157.
- ²⁵ Roman J., Cabanas M.V., Pena J., Vallet-Regi M., *Science and Technology of advanced biomaterials* (2011), 12, 4, 045003.
- ²⁶ Hench L.L., *Journal of the American Ceramic Society* (1998), 81, 7, 1705-1728.
- ²⁷ Hench L.L., Thompson I., *Journal of the Royal Society Interface* (2010), 6, 7, S379-S391.
- ²⁸ Rahaman M.N., Day D.E., Bal B.S., Fu Q., Jung S.B., *Acta Biomaterialia* (2011), 7, 6, 2355-2373.
- ²⁹ Waterhouse A., Wise S.G., Ng M.K.C., Weiss A.S., *Tissue Engineering part B reviews* (2011), 17, 2, 93-99.
- ³⁰ Daamen W.F., Veerkamp J.H., Van Hest J.C.M., Van Kuppevelt T.H., *Biomaterials* (2007), 28, 30, 4378–4398.
- ³¹ Long J.L., Tranquillo R.T., *Matrix Biology* (2003), 22, 4, 339–350.
- ³² Kleinberg T.T., Tzekov R.T., Stein L., Ravi N., Kaushal S., *Survey of Ophthalmology* (2011), 56, 4, 300-323.
- ³³ Van der Veen V.C., Van der Wal M.B.A., Van Leeuwen M.C.E., Ulrich M.M.W., Middelkoop E., *Burns* (2010), 36, 3, 305-321.
- ³⁴ Shilo S., Roth S., Amzel T., Harel-Adar T., Grynspan F., Shoseyov O., *Wound repair and regeneration* (2012), 20, 2, A40-A40.
- ³⁵ Khor E., *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (2002), 6, 4, 313–317.
- ³⁶ Khor E., Lim L.Y., *Biomaterials* (2003), 24, 13, 2339–2349.
- ³⁷ Dutta P.K., Rinki K., Dutta J., *Advances in Polymer Science* (2011), 244, 45-79.
- ³⁸ Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E., *Progress in Polymer Science* (2011), 36, 8, 981-1014.
- ³⁹ Gobin A.S., Butler C.E., Mathur A.B., *Tissue Engineering* (2006), 12, 12, 3383-3394.
- ⁴⁰ Herrmann K., Groth Th., Seifert B., Romaniuk P., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (1994), 5, 9-10, 728-731.
- ⁴¹ Borowiec J.W., Venge P., Henze A., Nilsson B., Stiernstrom H., *Thoracic and cardiovascular surgeon* (1997), 45, 6, 295-301.
- ⁴² Kirkwood M.L., Wang G.J., Jackson B.M., Golden M.A., Fairman R.M., Woo E.Y., *Vascular and endovascular surgery* (2011), 45, 4, 329-334.

- ⁴³ Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S., *Marine Drugs* (2011), 9, 196-223.
- ⁴⁴ Pomin V.H., Mourao P.A.S., *Glycobiology* (2008), 18, 12, 1016–1027.
- ⁴⁵ Chen S., Hu Y., Ye X., Li G., Yu G., Xue C., Chai W., *Biochimica et biophysica acta-general subjects* (2012), 1820, 7, 989-1000.
- ⁴⁶ Wang D-A., Varghese S., Sharma B., Strehin I., Fermanian S., Gorham J., Fairbrother D.H., Cascio B., Elisseff J.H., *Nature Materials* (2007), 6, 5, 385-392.
- ⁴⁷ Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindstrom T., Ankerfors M., Gray D., Dorris A., *Angewandte Chemie International Edition* (2011), 50, 24, 5438-5466.
- ⁴⁸ Extremina C.I., Da Fonseca A.F., Granja P.L., Fonseca A.P., *International Journal of Antimicrobial Agents* (2010), 35, 2, 164–168.
- ⁴⁹ Zheng Y.H., Su K., Jian, Y.T., Kuang S.J., Zhang Z.G., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2011), 5, 7, 540-550.
- ⁵⁰ Liu J.K., Gottfried O.N., Cole C.D., Dougherty W.R., Couldwell W.T., *Neurosurgical Focus* (2004), 16, 3: Clinical Pearl 1
- ⁵¹ Aparecida A.H., Guastaldi A.C., Fook M.V.L., *Polimeros-Ciencia e Tecnologia* (2008), 18, 4, 277-280.
- ⁵² Muller D.C.D., Curvello D., Pippi N.L., Basso P.C., Schossler J.E.W., Da Rosa M.B., Serafini G.M.C., *Ciencia Rural* (2010), 40, 6, 1327-1334.
- ⁵³ Raul J.S., Godard J., Arbez-Gindre F., Czorny A., *Neurochirurgie* (2003), 49, 83-89.
- ⁵⁴ De Persia R., Guzmán A., Rivera L., Vazquez J., *Mechanics of Biomaterials: sutures after the surgery-Applications of Engineering Mechanics in Medicine, GED – University of Puerto Rico, Mayaguez* (2005).
- ⁵⁵ Vicente J., Ramirez-Camacho R., Trinidad A., Garcia-Berrocal J.R., Lobo D., Pinilla M., *Acta Oto-Laryngologica* (2006), 126, 2, 144-148.
- ⁵⁶ Solouk A., Cousins B.G., Mirzadeh H., Seifalian A.M., *Biotechnology and applied Biochemistry* (2011), 58, 5, 311-327.
- ⁵⁷ Kolmeder S., Lion A., Landgraf R., Ihlemann J., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2011), 105, 2, 705-718.
- ⁵⁸ Charnley J., Follacci F.M., Hammond B.T., *The Journal of bone and joint surgery, British volume* (1968), 50.
- ⁵⁹ Ram J., Gupta N., Sukhija J.S., Chaudhary M., Verma N., *British Journal of Ophthalmology* (2011), 95, 1086-1090.
- ⁶⁰ Holt B., Tripathi A., Morgan J.R., *Journal of Biomechanics* (2011), 44, 8, 1491–1498.
- ⁶¹ Becouarn G., Szmil E., Leroux C., Arnaud J.P., *Journal de Chirurgie* (1996), 133, 5, 229-232.
- ⁶² Cenni E., Granchi D., Ciapetti G., Verri E., Cavedagna D., *Biomaterials* (1997), 18, 6, 489-494.
- ⁶³ Guidollet J., Chignier E., Pillot R., Gayet O., MacGregor J., Louisot P., *Journal of Biomedical Materials Research* (1999), 44, 2, 156-161.
- ⁶⁴ Selvam S., Kundu K., Templeman K.L., Murthy N., Garcia A.J., *Biomaterials* (2011), 32, 31, 7785-7792.
- ⁶⁵ Allegiance Research and Technology; <http://www.allegiance.net/hic/glvhand/Choic100.pdf>, 100, 1999.
- ⁶⁶ Santelices S., Sullivan K.J., Kissoon N., Duckworth L.J., Murphy S.P., *Pediatric emergency care* (2004), 20, 7, 448-452.
- ⁶⁷ Witjes A., Marberger M., Del P.G., Jonsson O., Kaps H., Chapple C.R., Macdonald W., *Neurourology and Urodynamics* (2008), 27, 7, 688-689.
- ⁶⁸ Ahlqvist M., Berglund B., Nordstrom G., Klang B., Wiren M., Johansson E., *Journal of Evaluation in Clinical Practice* (2010), 16, 6, 1108-1115.
- ⁶⁹ Lee J.H., Kim K.O., *Journal of Biomedical Materials Research* (1999), 48, 3, 328–334.
- ⁷⁰ Huang N., Yang P., Leng Y.X., Chen J.Y., Wang J., Wan G.J., Sun H., Wu X., Zhao A.S., *ASBM7: Advanced Biomaterials VII, Key Engineering Materials* (2006), 342-343, 801-804.
- ⁷¹ Eurasanté, Perspectives de la plasturgie dans l'industrie biomédicale : http://www.eurasante.com/fileadmin/web/pdf-publications/Perspective-de-la-plasturgie-dans-l_industrie-biomedicale_Eu_02.pdf
- ⁷² Lanquetot H., Leguen A.F., Corbi P., Brunet J., Fusciardi J., *Revue européenne de biotechnologie médicale* (1999), 21, 48-51.
- ⁷³ Shalaby S.W., Burg K.J.L., *Absorbable and biodegradable polymers: Advances in polymeric materials* (2003).
- ⁷⁴ Domb A.J., Wiseman D.M., *Handbook of Biodegradable Polymers* (1998).
- ⁷⁵ Piskin E., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (1995), 6, 9, 775–795.
- ⁷⁶ Lloyd A.W., *Medical Device Technology* (2002), 13, 18–21.
- ⁷⁷ Nair L.S., Laurencin C.T., *Progress in Polymer Science* (2007), 32, 8-9, 762–798.
- ⁷⁸ Okada M., *Progress in Polymer Science* (2002), 27, 87–133.
- ⁷⁹ Edlund U., Albertsson A.C., *Advance Drug Delivery Review* (2003), 55, 585–609.
- ⁸⁰ Gunatillake P., Mayadunne R., Adhikari R., *Biotechnology Annual Review* (2006), 12, 301–347.

- ⁸¹ Lu H.H., Cooper J.A., Manuel S., Freeman J.W., Attawia M.A., Ko F.K., Laurencin C.T., *Biomaterials* (2005), 26, 23, 4805–4816.
- ⁸² Cooper J.A., Lu H.H., Ko F.K., Freeman J.W., Laurencin C.T., *Biomaterials* (2005), 26, 13, 1523–1532.
- ⁸³ Borden M., Attawia M., Khan Y., Laurencin C.T., *Biomaterials* (2002), 23, 2, 551–559.
- ⁸⁴ Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T., *Journal of Biomedical Materials Research B: Application Biomaterials* (2004), 70B, 2, 286–296.
- ⁸⁵ Ueda H., Tabata Y., *Advance Drug Delivery Review* (2003), 55, 501–518.
- ⁸⁶ Chiari C., Koller U., Dorotka R., Eder C., Plasenzotti R., Lang S., Ambrosio L., Tognana E., Kon E., Salter D., Nehrer S., *Osteoarthritis and Cartilage* (2006), 14, 10, 1056–1065.
- ⁸⁷ Zhang Z., Kuijter R., Bulstra S.K., Grijpma D.K., Feijen J.F., *Biomaterials* (2006), 27, 9, 1741–1748.
- ⁸⁸ Heller J., Barr J., *Biomacromolecules* (2004), 5, 5, 1625–1632.
- ⁸⁹ Li Q., Wang J., Shahani S., Sun S.S.N., Sharma B., Ekusseeff J.H., Leong K.W., *Biomaterials* (2006), 27, 7, 1027–1034.
- ⁹⁰ Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., *Science* (1999), 284, 1318-1322.
- ⁹¹ Monroe D., *PLoS Biology* (2008), 5, 11, e307.
- ⁹² Rouxhet P.G., Mozes N., *Water Science & Technology* (1990), 22(1/2), 1-16.
- ⁹³ Rouxhet P.G., Caillou S., Nonckreman C.J., Alves A., Gerin P., *Matériaux & Techniques* (2005), 93, 13-26.
- ⁹⁴ Gristina A.G., Hobgood C.D., Barth E., *Biomaterial specificity, molecular mechanisms, and clinical relevance of S. epidermidis and S. aureus infections in surgery. In: "Pathogenesis and clinical significance of coagulase-negative staphylococci"* (1987), 143-157.
- ⁹⁵ Pedersen K., *Water Research* (1990), 24, 2, 239-243.
- ⁹⁶ McAllister E.W., Carey L.C., Brady P.G., Heller R., Kovacs S.G., *Gastrointestinal Endoscopy* (1993), 39, 422-425.
- ⁹⁷ Arnold J.W., Bailey G.W., *Poultry Science* (2000), 79, 1839-1845.
- ⁹⁸ Lecleroq-Perlat M.N., Lalande M., *Journal of Food Engineering* (1994), 23, 4, 501- 517.
- ⁹⁹ Whitehead K.A., Colligon J., Verran J., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2005), 41, 129 - 138.
- ¹⁰⁰ Boulange-Petermann L., Rault J., Bellon-Fontaine M.N., *Biofouling* (1997), 11, 3, 201-216.
- ¹⁰¹ Sharma P.K., Hanumantha Rao K., *Advanced in Colloid and Interface Science* (2002), 98, 341-463.
- ¹⁰² Sharma P.K., Hanumantha Rao K., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2003), 29, 21-38.
- ¹⁰³ Gottenbos B., Van der Mei H.C., Busscher H.J., *Journal of Biomedical Materials Research* (2000), 50, 208-214.
- ¹⁰⁴ Karakecili A.G., Gumusderelioglu M., *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* (2002), 13, 185-196.
- ¹⁰⁵ Piette J.P.G., Idziak E.S., *Applied and Environmental Microbiology* (1992), 58, 9, 2783-2791.
- ¹⁰⁶ Trachoo N., Brooks J.D., *Pakistan Journal of Biological Sciences* (2005), 8, 4, 599–605.
- ¹⁰⁷ el-Azizi M., Khardori N., (1999), *Indian Journal of Experimental Biology* (1999), 37, 10, 941–951.
- ¹⁰⁸ Palmer J.S., Flint S.H., Brooks J., *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2007), 34, 577–588.
- ¹⁰⁹ Walker S.L., Redman J.A., Elimelech M., *Langmuir* (2004), 20, 18, 7736-7746.
- ¹¹⁰ Nejadnik M.R., van der Mei H.C., Busscher H.J., Norde W., *Applied and Environmental Microbiology* (2008), 74, 3, 916–919.
- ¹¹¹ Mei L., Van der Mei H.C., Ren Y., Norde W., Busscher H.J., *Langmuir* (2009), 25, 11, 6227-6231.
- ¹¹² Pompermayer D.M.C., Gaylarde C.C., *Food Microbiology* (2000), 17, 4, 361-365.
- ¹¹³ Gallardo-Moreno A.M., Gonzales-Martin M.L., Perez-Giraldo C., Bruque J.M., Gomez-Garcia A.C., *Journal of Colloid and Interface Science* (2004), 271, 351-358.
- ¹¹⁴ Bos R., Van der Mei H.C., Busscher H.J., *FEMS Microbiology Reviews* (1999), 23, 2, 179-230.
- ¹¹⁵ Poortinga A.T., Bos R., Norde W., Busscher H.J., *Surface Science Report* (2002), 47, 1-32.
- ¹¹⁶ Guillemot G., Vaca-Medina G., Martin-Yken H., Vernhet A., Schmitz P., Mercier-Bonin M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2006), 49, 2, 126-135.
- ¹¹⁷ Donlan R.M., *Emerging Infectious Diseases Journal* (2002), 8, 9, 881-890.
- ¹¹⁸ Piozzi A., Francolini I., Occhiaperti L., Venditti M., Marconi W., *International Journal of Pharmaceutics* (2004), 280, 1-2, 173–183.
- ¹¹⁹ Wataha J.C., Lockwood P.E., Schedle A., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2000), 52, 2, 360-364.
- ¹²⁰ Yang H.-C., Pon L.A., *Drug and Chemical Toxicology* (2003), 26, 75-85.
- ¹²¹ Chohan Z.H., Arif M., Akhtar M.A., Supuran C.T., *Bioinorganic Chemistry and Applications* (2006), article ID 83131, 1-13.
- ¹²² Gray J.E., Norton P.R., Griffiths K., *Thin Solid Films* (2005), 484, 1-2, 196-207.
- ¹²³ Lawrence E.L., Turner I.G., *Medical Engineering & Physics* (2005), 27, 6, 443-445.
- ¹²⁴ McLean R.J.C., Hussain A.A., Sayer M., Vincent P.J., Hughes D.J., Smith T.J.N., *Canadian Journal of Microbiology* (1993), 39, 895-899.

- ¹²⁵ Gabriel M.M., Mayo M.S., May L.L., Simmons R.B., Ahearn D.G., *Current Microbiology* (1996), 33, 1-5.
- ¹²⁶ Gabriel M.M., Sawant A.D., May L.L., Simmons R.B., Ahearn D.G., *Current Microbiology* (1995), 30, 17-22.
- ¹²⁷ Pomfret I., *Nursing standard* (2000), 14, 46-51.
- ¹²⁸ Young C-D., Wu J-R., Tsou T-L., *Biomaterials* (1998), 19, 1745-1752.
- ¹²⁹ Nakagawa N., Yashiro N., *American Journal of Roentgenology* (1994), 163, 1227-1229.
- ¹³⁰ Kudela V., *Hydrogels in Polymers: biomaterials and medical applications* (1989), U.J.W.a.S. Inc, Editor, 228-252.
- ¹³¹ Polymer coatings for powder-free medical gloves, Allegiance Research and Technology (1999), <http://www.allegiance.net/hic/glvhand/Choic100.pdf>, 100.
- ¹³² Olah A., Hillborg H., Vancso G.J., *Applied Surface Science* (2005), 239, 3-4, 410-423.
- ¹³³ Arnt L., Nüsslein K., Tew G.N., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer chemistry* (2004), 42, 3860-3864.
- ¹³⁴ Chen Z., Sun Y., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer chemistry* (2005), 43, 18, 4089-4098.
- ¹³⁵ Pavon-Djavid G., Hélarly G., Migonney V., *ITBM-RBM* (2005), 26, 183-191.
- ¹³⁶ Gottenbos B., Van der Mei H.C., Busscher H.J., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* (1999), 10, 12, 853-855.
- ¹³⁷ Kebir N., Semetey V., Method for treating surfaces containing Si-H groups, Patent WO2008041187.
- ¹³⁸ Mussard W., Kebir N., Kriegel I., Esteve M., Semetey V., *Angewandte Chemie International Edition* (2011), 50, 10871-10874.
- ¹³⁹ Baytukalov T.A., Bogoslovskaya O.A., Olkhovskaya I.P., Glushchenko N.N., Ovsyannikova M.N., Lopatin S.A., Varlamov V.P., *Biology Bulletin* (2005), 32, 6, 545-548.
- ¹⁴⁰ Ostuni E., Chapman R.G., Liang M.N., Meluleni G., Pier G., Ingber D.E., Whitesides G.M., *Langmuir* (2000), 17, 20, 6336-6343.
- ¹⁴¹ Edmondson S., Osborne V.L., Huck W.T.S., *Chemical Society Reviews* (2004), 33, 1, 14-22.
- ¹⁴² Yao C., Li X., Neoh K.G., Shi Z., Kang E.T., *Journal of Membrane Science* (2008), 320, 1-2, 259-267.
- ¹⁴³ Bae J-S., Seo E-J., Kang I-K., *Biomaterials* (1999), 20, 6, 529-537.
- ¹⁴⁴ Su C-Y., Lin C-K., Lin C-R., Lin C-H., *Surface & Coatings Technology* (2006), 200, 10 3380-3384.
- ¹⁴⁵ Yuan J.A., Bian R.B., Ling T., Jian S., Lin S.C., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2004), 36, 1, 27-33.
- ¹⁴⁶ Yuan J.A., Chen L., Shen J., Jiang X.F., Lin S.C., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2004), 39, 1-2, 87-94.
- ¹⁴⁷ Yu W.H., Kang E.T., Neoh K.G., Zhu S., *Journal of Physical Chemistry B* (2003), 107, 37, 10198-10205.
- ¹⁴⁸ Murata H., Koepsel R., Matyjaszewski K., Russell A., *Biomaterials* (2007), 28, 32, 4870-4879.
- ¹⁴⁹ Madkour A., Dabkowski J., Nusslein K., Tew G., *Langmuir* (2009), 25, 2, 1060-1067.
- ¹⁵⁰ Coskun R., Sacak M., Karakisla M., *Journal of Applied Polymer Science* (2005), 97, 5, 1795-1803.
- ¹⁵¹ Saçak M., Pulat E., *Journal of Applied Polymer Science* (1989), 38, 3, 539-546.
- ¹⁵² Osipenko I.F., Martinovicz V.I., *Journal of Applied Polymer Science* (1990), 39, 4, 935-942.
- ¹⁵³ Saçak M., Oflaz F., *Journal of Applied Polymer Science* (1993), 50, 11, 1909-1916.
- ¹⁵⁴ Nayak P.L., Lenka S., Mishra M.K., Tripathy A.K., *Journal of Applied Polymer Science* (1981), 26, 8, 2773-2779.
- ¹⁵⁵ Saçak M., Eski N., Talu M., *Journal of Macromolecular Science: Pure Applied Chemistry* (1995), 32, 10, 1735-1749.
- ¹⁵⁶ Hsieh Y.L., Shinawatra M., Catillo M.D., *Journal of Applied Polymer Science* (1986), 31, 2, 509-519.
- ¹⁵⁷ Lee S.B., Koepsel R.R., Morley S.W., Matyjaszewski K., Sun Y., Russell A.J., *Biomacromolecules* (2004), 5, 3, 877-882.
- ¹⁵⁸ Huang J., Murata H., Koepsel R.R., Russell A.J., Matyjaszewski K., *Biomacromolecules* 2007, 8, 5, 1396-1399.
- ¹⁵⁹ Huang J., Koepsel R.R., Murata H., Wu W., Lee S.B., Kowalewski T., Russell A.J., Matyjaszewski K., *Langmuir* (2008), 24, 13, 6785-6795.
- ¹⁶⁰ Kulagina N., Shaffer K., Anderson G., Ligler F., Taitt C., *Analytica Chimica Acta* (2006), 575, 1, 9-15.
- ¹⁶¹ Alonso D., Gimeno M., Olayo R., *Carbohydrate Polymers* (2009), 77, 3, 536-543.
- ¹⁶² Lim S-H., Hudson S.M., *Carbohydrate Polymers* (2004), 56, 2, 227-234.
- ¹⁶³ Alves P., Coelho J.F.J., Haack J., Rota A., Bruinink A., Gil M.H., *European Polymer Journal* (2009), 45, 5, 1412-1419.
- ¹⁶⁴ Sateesh A., Vogel J., Dayss E., Fricke B., Dolling K., Rothe U., *Journal of Biomedical Materials Research PartA* (2008), 84A, 3, 672-681.
- ¹⁶⁵ Archambault J.G., Brash J.L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2004), 33, 2, 111-120.
- ¹⁶⁶ Archambault J.G., Brash J.L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2004), 39, 1-2, 9-16.

- ¹⁶⁷ Tan K., Obendorf S.K., *Journal of Membrane Science* (2006), 274, 1-2, 150-158.
- ¹⁶⁸ Tan K., Obendorf S. K., *Journal of Membrane Science* (2007), 1-2, 289, 199–209.
- ¹⁶⁹ Alferiev I.S., Connolly J.M., Stachelek S.J., Ottey A., Rauova L., Levy R.J., *Biomacromolecules* (2006), 7, 317-322.
- ¹⁷⁰ Vartiainen J., Ratto M., Tapper U., Paulussen S., Hurme E., *Polymer Bulletin* (2005), 54, 4-5, 343-352.
- ¹⁷¹ Vartiainen J., Ratto M., Paulussen S., *Packaging Technology and Science* (2005), 18, 5, 243-251.
- ¹⁷² Favia P., d'Agostino R., Palumbo F., *Journal de Physique IV* (1997), 7, C4, 199-208.
- ¹⁷³ Lin J., Murthy S.K., Olsen B.D., Gleason K.K., Klibanov A.M., *Biotechnology Letters* (2003), 25, 19, 1661–1665.
- ¹⁷⁴ Liu S.X., Kim J.-T., Kim S., *Journal of Food Science* (2008), 73, 3, 143-150.
- ¹⁷⁵ Statz A., Kuang J., Ren C., Barron A.E, Szleifer I., Messersmith P.B., *Biointerphases* (2009), 1, 4, 2, FA22-32.
- ¹⁷⁶ De Prijck K., De Smet N., Rymarczyk-Machal M., Van Driessche G., Devreese B., Coenye T., Schacht E., Nelis H.J., *Biofouling* (2010), 26, 3, 269-275.
- ¹⁷⁷ Domb A.J., Wilder H., Ratner S., Patent WO 2009/027971 A2.
- ¹⁷⁸ Aalto-Korte K., Alanko K., Henriks-Eckerman M-L., Jolanki R., *Archive of Dermatology* (2006), 142, 326-1330.
- ¹⁷⁹ Markarian J., *Plastics Additives & Compounding* (2009), 11, 1, 18-22.
- ¹⁸⁰ Ji J., Zhang W., *Journal of Biomedical Materials Research* (2009) 88A, 2, 448–453.
- ¹⁸¹ Bartko J.P., United States Patent 2006/0229381 A1.
- ¹⁸² Lutz J.T., United States Patent (1973) 3755224.
- ¹⁸³ Burley J.W., United States Patent (2003) 6525117 B1.
- ¹⁸⁴ CIBA SA (1969), FR 1.577.779.
- ¹⁸⁵ Farquharson R.A., Reiersen R.L., Burdett K.A., United States Patent (1987) 4666706.
- ¹⁸⁶ Rondelez F., Bezou P., Bouloussa O., Patent WO 98/04296.
- ¹⁸⁷ Asadinezhad A., Novak I., Lehocky M., Sedlarik V., Vesel A., Junkar I., Saha P., Chodak I., *Plasma Processes and Polymer* (2010), 7, 504–514.
- ¹⁸⁸ Chatelin R., Bourgeois M., Leger B., Bouvier J-C., Picolet J-P., FR 2 695 800.
- ¹⁸⁹ Geribaldi S., Guittard F., Guittard E., Soufi A., Sarrazin C., Do M., Foucher L., Labbe J., Boix M., FR 2 905 271-A1.
- ¹⁹⁰ Chatelin R., Bourgeois M., EP 0591 024-A2.
- ¹⁹¹ Perichaud A., Arnautu M., FR 2 846 970-A1, 2004.
- ¹⁹² McGinty K.M., Brittain W.J., *Polymer* (2008), 49, 20, 4350-4357.
- ¹⁹³ Perichaud A., EP 1 569 989 B1, 2008.
- ¹⁹⁴ Zou Y., Kizhakkedathu J.N., Brooks D.E., *Macromolecules* (2009), 42, 9, 3258-3268.
- ¹⁹⁵ Balakrishnan B., Kumar D.S., Yoshida Y., Jayakrishnan A., *Biomaterials* (2005), 26, 17, 3495-3502.
- ¹⁹⁶ Balakrishnan B., James N.R., Jayakrishnan A., *Polymer International* (2005), 54, 9, 1304-1309.
- ¹⁹⁷ Zhao X., Courtney J.M., Yin H.Q., West R.H., Lowe G.D.O., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2008), 19, 713-719.
- ¹⁹⁸ Xie Y., Yang Q., *Journal of Applied Polymer Science* (2002) 85, 5, 1013-1018.
- ¹⁹⁹ Rios P., Bertorello H., *Journal of Applied Polymer Science* (1997), 64, 6, 1195-1201.

I Introduction

Dans le présent chapitre, l'objectif est de développer de nouvelles surfaces PVC bactéricides. Pour cela, de nouveaux copolymères aléatoires porteurs de groupements biocides d'une part et de groupements d'ancrage de type propargyle d'autre part seront synthétisés et caractérisés par des techniques physicochimiques usuelles. Ces copolymères bactéricides seront ensuite fixés chimiquement sur une surface PVC-N₃ (prétraitement chimique de la surface PVC) par une cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire catalysée par du cuivre (click chemistry) (**Figure II-1**). Les surfaces PVC seront caractérisées et leurs propriétés bactéricides seront évaluées vis-à-vis d'une souche bactérienne à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis*) et d'une souche bactérienne à Gram négatif (*Escherichia coli*).

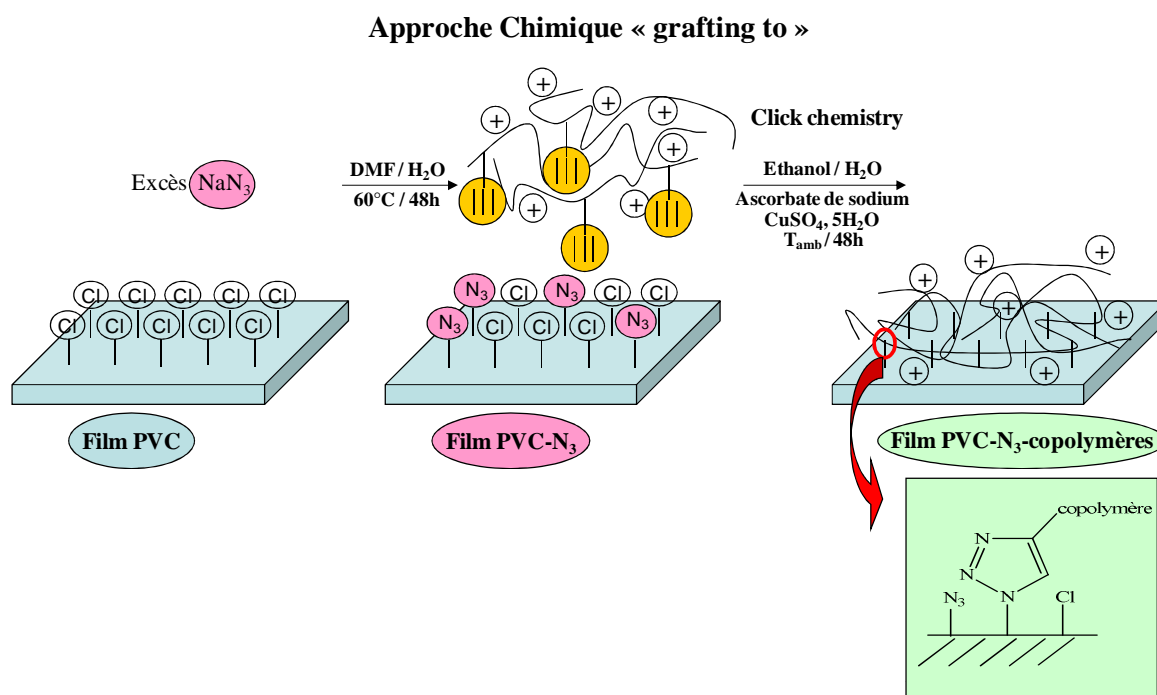


Figure II-1. Stratégie chimique de greffage de copolymères antibactériens sur des surfaces PVC

II Synthèses et caractérisations physicochimiques des polymères bactéricides

Une des stratégies les plus en vogue pour développer des copolymères antibactériens est de fixer des groupements ammonium ou pyridinium quaternaire sur des chaînes carbonées comme des polyméthacrylates ou des polystyrènes¹. En effet, en 1980, deux nouveaux polymères cationiques, le poly(chlorure de vinylbenzyltrialkylammonium) et un polyméthacrylate contenant un groupement biguanide ont été synthétisés avec succès et ont montré une haute activité biocide vis-à-vis de deux souches bactériennes (*E. coli* et *S. aureus*)^{2,3,4}. Ces polymères ont montré une activité nettement supérieure à celle de leurs monomères correspondants. Par ailleurs, une activité antibactérienne très importante des poly(chlorure de trialkyl-3-[(et-4-)vinylbenzyl]phosphonium) a été mise en évidence par Kanazawa *et al.*⁵. En effet, à structure identique, les polymères porteurs de groupements phosphonium quaternaire ont développé une activité antibactérienne deux fois supérieure à leurs homologues porteurs de groupements ammonium quaternaire. L'équipe de Kenawy a développé de nombreuses approches chimiques pour former des sels d'ammonium ou de phosphonium sur des chaînes polyméthacrylates⁶ ou polyamide, 21⁷. Dans les deux cas, les sels de tributyle phosphonium se sont trouvés être les plus efficaces pour éliminer les bactéries et les champignons.

Aujourd'hui, il est communément admis que la destruction d'un microorganisme par des polymères cationiques bactéricides s'effectue en cinq étapes⁸ : l'adsorption initiale du polymère bactéricide sur la surface cellulaire bactérienne suivie de la diffusion de celui-ci à travers les parois cellulaires ; l'adsorption sur la membrane cytoplasmique entraînant la rupture de celle-ci et enfin la libération des constituants cytoplasmiques essentiels à la survie de la bactérie.

L'activité bactéricide de ces polymères est influencée par plusieurs facteurs tels que la masse molaire moyenne, la nature des groupements alkyles, la nature du contre-ion ou la balance hydrophile-hydrophobe⁹.

A titre d'exemple, Kanazawa *et al.*¹⁰ ont examiné l'effet des contre-ions d'une série de sels de poly(chlorure de tri-butyle [3-(et 4-)vinyl benzyle] phosphonium) sur l'activité

antibactérienne vis-à-vis des bactéries *E. coli* et de *S. aureus*. Plus le contre-ion est dissocié du phosphore, meilleure est l'activité antibactérienne (la paroi externe de la bactérie chargée négativement aura tendance à être déstabilisée électriquement puis solubilisée). Ainsi l'anion chlorure a été reconnu comme étant plus efficace que les anions PF_6^- , ClO_4^- ou BF_4^- .

L'activité antibactérienne dépend aussi de la longueur des chaînes alkyles fixées aux groupements phosphonium ou ammonium quaternaire. En effet, ces chaînes alkyles pendantes entraînent une modification de la conformation des macromolécules et de la balance hydrophile-hydrophobe.

L'évolution de l'activité antibactérienne en fonction de la longueur des chaînes pendantes fixées aux ammoniums quaternaires suit une courbe en cloche dont l'optimum est observé pour des chaînes en C6 à C10^{11,12,13}.

De même, la masse molaire moyenne (\overline{M}_w) influence notablement l'efficacité biocide de nombreux polymères porteurs d'ammoniums quaternaires. En effet, l'activité biocide d'un polymère polycationique en fonction de sa masse molaire moyenne passe aussi par un maximum compris entre 50 000 et 100 000 g.mol^{-1} ^{2,3,4,5}.

Sur la base de ces résultats bibliographiques, quatre nouveaux copolymères porteurs de groupements propargyle et de groupements ammonium ou phosphonium quaternaire ont été synthétisés, les trois premiers à partir du poly(chlorure de benzylvinyle) (PVBC) et le quatrième à partir du poly (N,N-diméthylaminoéthyle) (pDMAEMA).

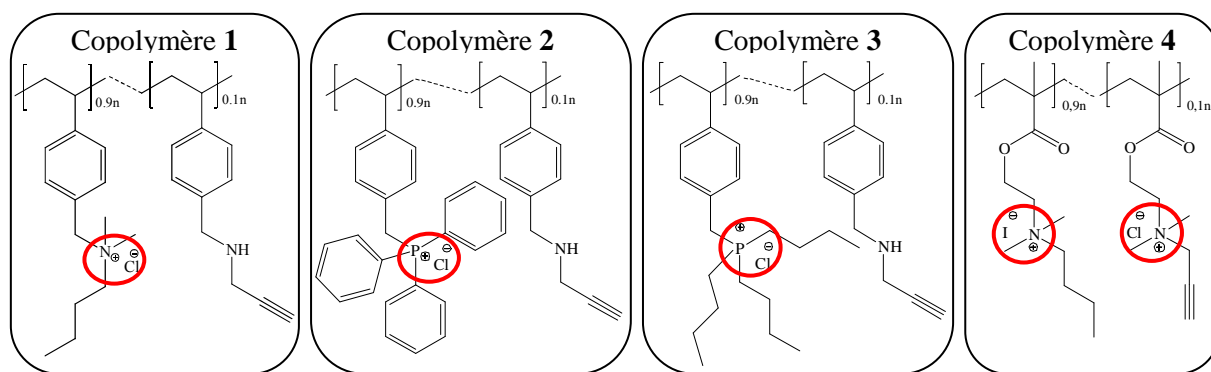
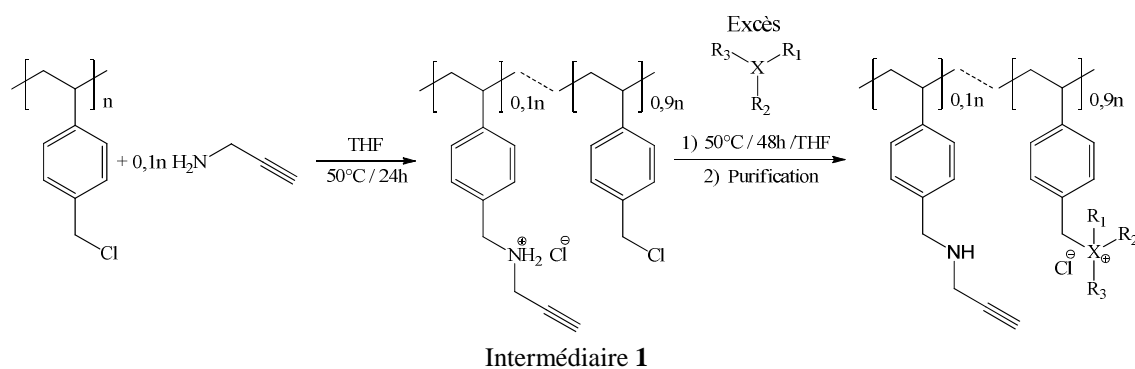


Figure II-2. Copolymères bactéricides synthétisés

II.1 Les copolymères bactéricides synthétisés à partir du poly(chlorure de benzylvinyle) (PVBC) (copolymères 1 à 3)

La synthèse des copolymères **1**, **2** et **3** a été effectuée à partir d'un poly(chlorure de vinylbenzyle) commercial ($I = 1,82$, $\overline{M}_w = 100100$ g/mol). La structure initiale du polymère a été choisie car elle est aisément modifiable par des substitutions nucléophiles et parce que les homopolymères cationiques issus du PVBC tels que le poly(chlorure de trialkyle vinylbenzyle phosphonium)^{14,15} et le poly(chlorure de trialkyle vinylbenzyle ammonium)^{16,17,18} sont reconnus pour leur pouvoir bactéricide.

Au cours de la première étape de synthèse, des groupements porteurs de fonctions alcyne sont introduits de façon aléatoire sur 10% des motifs du PVBC, par substitution nucléophile des atomes de chlore par la propargylamine (intermédiaire **1**). Puis des excès de N,N-diméthylbutylamine (copolymère **1**), de triphénylphosphine (copolymère **2**) ou tributylphosphine (copolymère **3**) ont été directement introduits dans le milieu réactionnel après 24h d'agitation en vue de générer les ammoniums et phosphoniums quaternaires correspondants sur les motifs non modifiés. Les copolymères **1**, **2** et **3** ont été obtenus avec de bons rendements après purification par dialyse et lyophilisation (**Figure II-3**). Le mode opératoire est présenté en annexe 1 (partie expérimentale section II-1).



Copolymère 1 : X = N ; R₁ = CH₃ ; R₂ = CH₃ ; R₃ = (CH₂)₃CH₃ ; Rendement : 87 %

Copolymère 2 : X = P ; R₁ = R₂ = R₃ = C₆H₅ ; Rendement : 72 %

Copolymère 3 : X = P ; R₁ = R₂ = R₃ = (CH₂)₃CH₃ ; Rendement : 81 %

Figure II-3. Synthèse des copolymères **1**, **2**, **3**

Néanmoins, l'intermédiaire **1** n'a pas pu être isolé. En effet, au cours des différentes tentatives lors de l'évaporation du solvant sous vide à 40°C nous récupérons un produit insoluble. Nous avons attribué cela à un déplacement de l'équilibre acide-base entre l'ammonium secondaire (acide) et son amine secondaire (base conjuguée). Il se déplace vers la formation de l'amine secondaire avec un dégagement de HCl. L'amine formée réagirait avec les CH₂ en α du chlore provoquant une réticulation inter-chaîne donnant accès à un produit insoluble (**Figure II-4**).

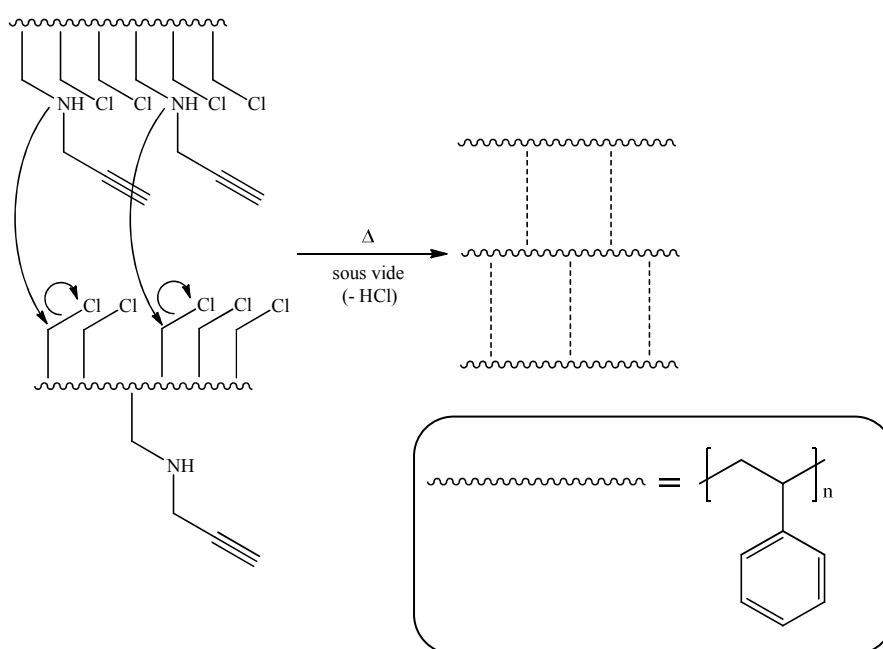


Figure II-4. Mécanisme de réticulation inter-chaîne de l'intermédiaire **1**

II.1.1 Caractérisation par IRTF-ATR

L'IRTF en mode ATR permet l'analyse des modifications structurales du PVBC et des copolymères **1**, **2**, **3** (**Figure II-5**).

Le spectre infrarouge du copolymère **1** révèle la disparition totale de la bande d'élongation de la liaison C-H en α du chlore (1265cm⁻¹) et de la bande de déformation de la liaison C-Cl (675 cm⁻¹). Tous les atomes de chlore présents dans le PVBC ont donc bien été substitués. De même, l'apparition d'une large bande d'élongation située entre 3600 cm⁻¹ et 3100 cm⁻¹ met en évidence l'hygroscopicité du copolymère **1**. La vibration d'élongation de la liaison N-H n'est pas détectable sur ce spectre car elle est noyée dans cette large bande.

Les spectres infrarouge des copolymères **2** et **3** révèlent la présence de deux bandes de déformation de la liaison P-C (740 cm^{-1} , 690 cm^{-1} et 800 cm^{-1} , 710 cm^{-1}) mettant en évidence la présence des groupements triphénylphosphonium ou tributylphosphonium immobilisés sur les chaînes pendantes. Toutefois une bande d'élongation résiduelle de la liaison C-H en α du chlore (1265 cm^{-1}) illustre le fait qu'il doit rester des groupements chlorés non substitués. L'encombrement stérique des groupements phosphonium pourrait expliquer le fait que la réaction ne soit pas totale.

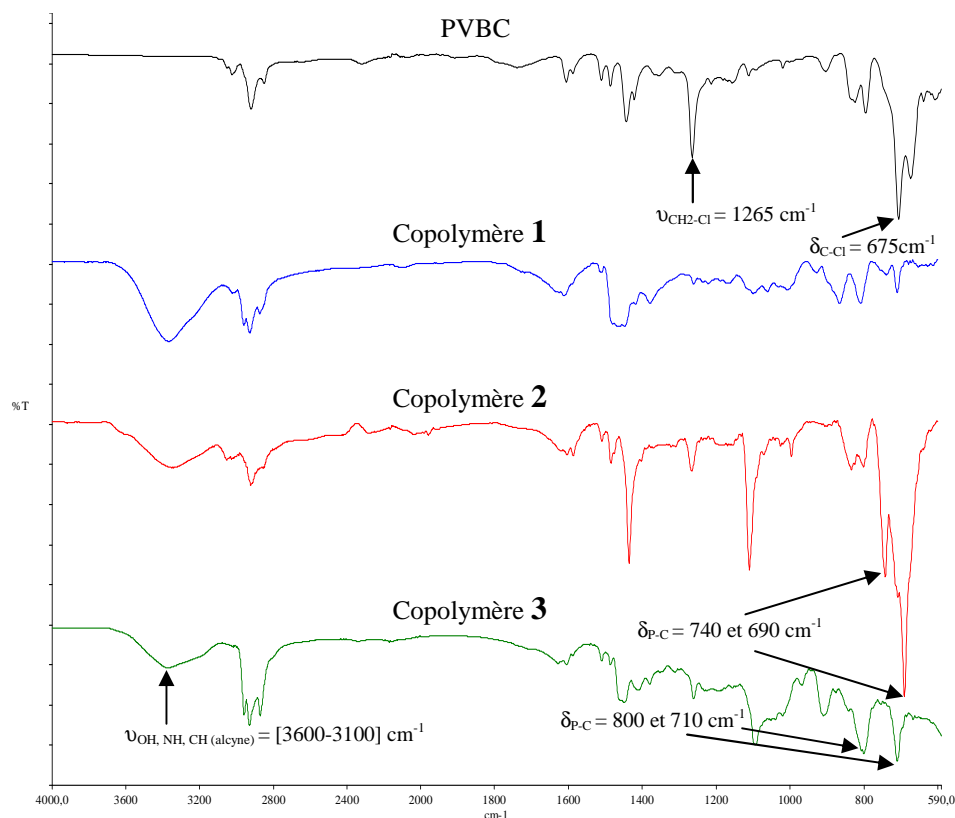


Figure II-5. Spectres IRTF du PVBC, copolymères **1**, **2** et **3**

II.1.2 Caractérisation par RMN ^1H

Des analyses par RMN ^1H ont été ensuite effectuées pour caractériser plus précisément les nouvelles structures synthétisées.

Les copolymères étant chargés, les différentes analyses ont été effectuées en augmentant le temps de relaxation (paramètre d1 fixé à 20 secondes) ainsi que le nombre de scans (16 scans).

Les différents spectres RMN ^1H des copolymères **1**, **2**, **3**, du polymère de référence (PVBC) et de la propargylamine sont reportés dans la **Figure II-6**. Les analyses ont été effectuées dans le méthanol deutéré (CD_3OD) pour les trois copolymères cationiques ainsi que pour la propargylamine alors que celle du PVBC a été faite dans le diméthyle sulfoxyde deutéré ($\text{DMSO-}d_6$).

Le spectre RMN ^1H du copolymère **1** met en évidence les déplacements chimiques des protons de la chaîne alkyle pendante liée à l'ammonium quaternaire (H7 à 3,4 ppm, H8 à 1,9 ppm, H9 à 1,4 ppm, H10 à 1,0 ppm) et des deux groupements méthyle (H6 à 2,9 ppm). Ces déplacements chimiques confirment la substitution quantitative des groupements chlorés par le N,N-diméthylbutylamine. En outre, le déplacement chimique du proton H13 à 2,3 ppm valide la substitution des groupements chlorés par la propargylamine. Une analyse RMN ^1H COSY 2D (Annexe 2, **Figure A2-1**) a permis de confirmer les attributions des pics du spectre RMN ^1H .

Le spectre RMN ^1H du copolymère **2** met en évidence les déplacements chimiques des protons H6 (entre 8,5 et 7,5 ppm) des 3 groupements phényle liés au phosphore. De plus les deux protons en position α de l'alcyne H7 sont mis en évidence à 3,6 ppm. Pour ce polymère, l'analyse UV permet aussi d'affirmer que la réaction a eu lieu, avec l'apparition d'une bande spécifique aux groupements triphénylphosphonium (Annexe 2, **Figure A2-2**).

L'analyse RMN ^1H du copolymère **3** met en évidence les déplacements chimiques des protons des trois groupements butyle liés au phosphonium quaternaire (H6 à 2,2 ppm, H7 et H8 entre 1,7 et 1,1 ppm, H9 entre 1,1 et 0,8 ppm) ainsi que les protons en position α de l'alcyne (H11 à 3,6 ppm) et les protons en position α du groupement NH (H10 entre 4,6 et 4,3 ppm).

Des analyses RMN ^{13}C dans CD_3OD des copolymères **1**, **2** et **3** (exemple du copolymère **1** en Annexe 2, **Figure A2-3**) ont aussi été effectuées. Cependant la détection des groupements alcyne s'est révélée infructueuse.

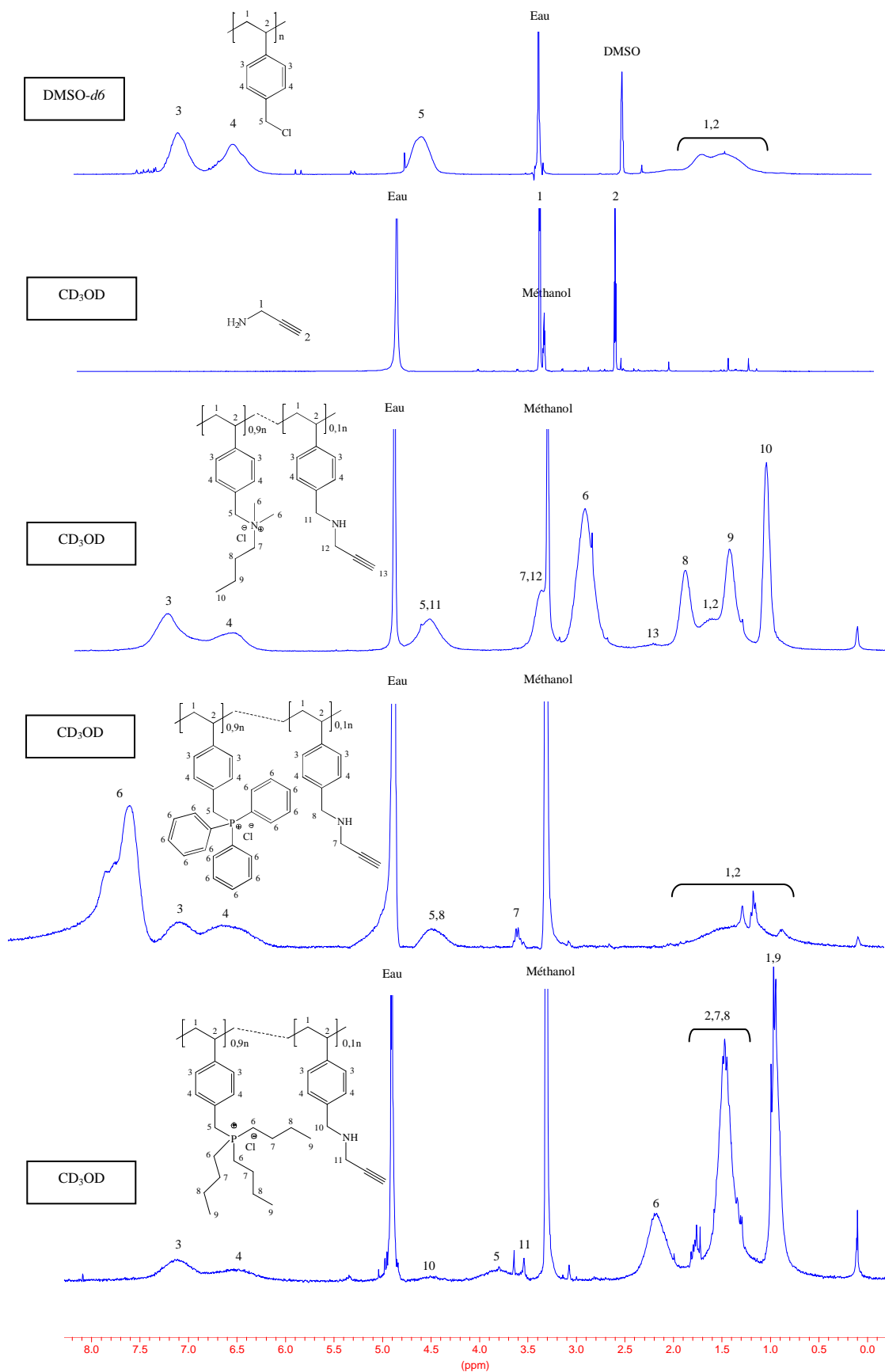


Figure II-6. Spectres RMN ^1H : PVBC, propargylamine, copolymères 1, 2, 3

Afin de mettre ces groupements alcyne en évidence, la synthèse de l'intermédiaire **1** a été effectuée directement dans le DMSO-*d*6 (**Figure II-7**). L'intermédiaire **1** formé *in situ* ne subissant aucun traitement de purification, l'amine propargylique du polymère est sous forme d'ammonium.

Le spectre RMN ^1H révèle deux déplacements chimiques (H7 à 3,72 ppm et H8 à 3,6 ppm), caractérisant la réaction de substitution des groupements chlorés par la propargylamine. De plus l'analyse des intégrations de ces deux déplacements chimiques met en évidence l'aspect quantitatif de cette réaction (substitution de l'ordre de 9%) (**Figure II-8**). Le taux de substitution est calculé de la manière suivante :

Considérant les protons H5 et H6 : $\text{Int}(\text{H5}) + \text{Int}(\text{H6}) = 2,07$ relatif à 2 protons. Chaque proton possède donc une intégration de 1,038 ($2,077 \div 2 = 1,038$).

Considérant les protons H7 et H8 : $\text{Int}(\text{H7}) + \text{Int}(\text{H8}) = 0,190 + 0,095 = 0,285$ relatif à 3 protons. On en déduit le taux de substitution nucléophile des groupements chlorés par la propargylamine : $\text{Taux de substitution} = 100 \times ([\text{Int}(\text{H7}) + \text{Int}(\text{H8})] \div 3) \div 1,038 = 9\%$.

Int(H5) étant l'intégration des protons H5 ; Int(H6) étant l'intégration des protons H6 ; Int(H7) étant l'intégration des protons H7 ; Int(H8) étant l'intégration des protons H8.

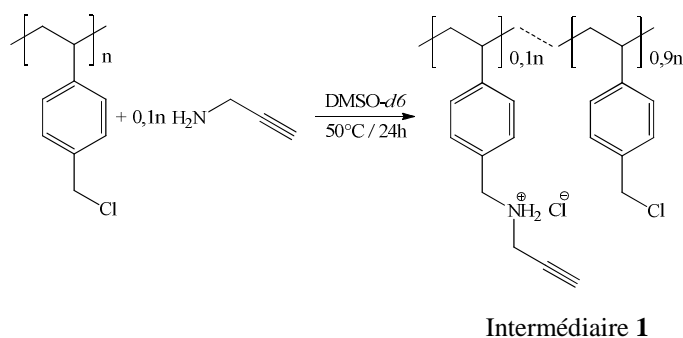


Figure II-7. Synthèse de l'intermédiaire **1** dans DMSO-*d*6

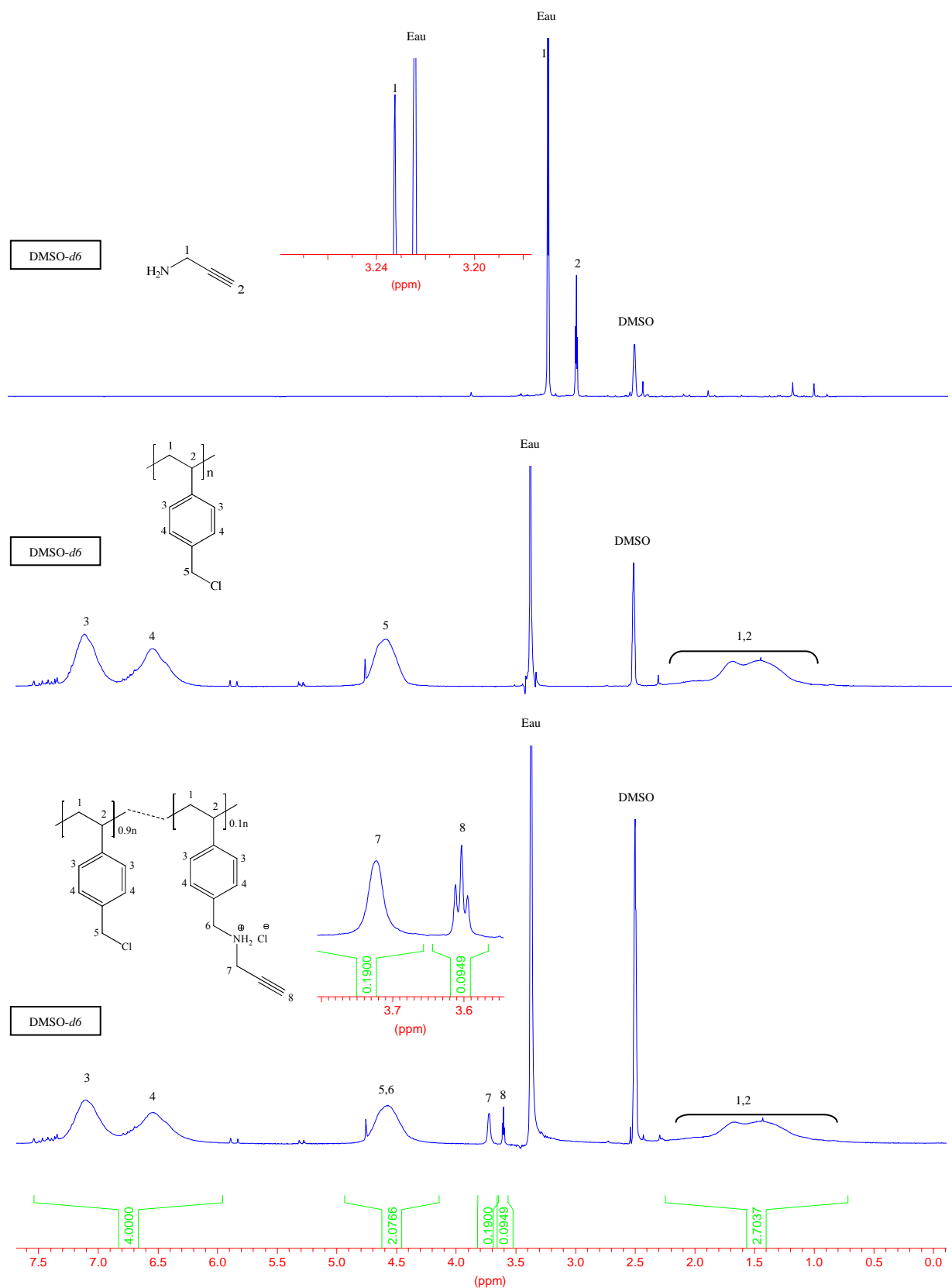


Figure II-8. Spectres RMN ^1H : PVBC, propargylamine et intermédiaire 1

II.1.3 Analyses thermiques

L'étude des propriétés thermiques des copolymères a été réalisée par des analyses thermogravimétriques (ATG) et par des analyses enthalpiques différentielles (DSC).

II.1.3.1 Etude de la stabilité thermique par ATG

Les analyses thermogravimétriques permettant d'étudier la dégradation thermique des copolymères ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage constante de 10°C/min (**Figure II-9**). Quel que soit l'échantillon, un taux important de masse carbonneuse est observé en fin d'analyse.

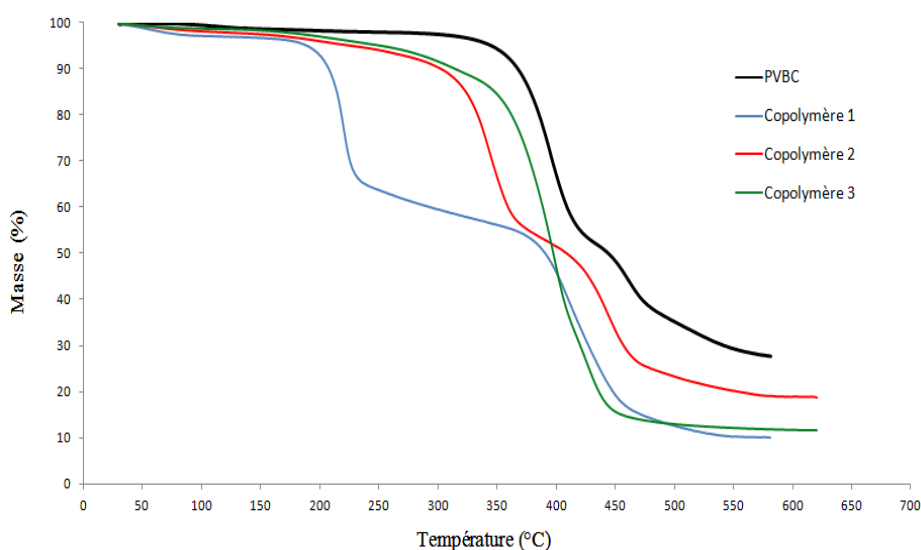


Figure II-9. Analyses ATG des copolymères 1, 2, 3 et du PVBC

La dégradation du polymère PVBC de référence se déroule en deux temps¹⁹ : la première phase de dégradation est observée de 345°C à 420°C, la seconde est observée à partir de 440°C. Lorsque le PVBC est modifié chimiquement par des groupements ammonium quaternaire (copolymère 1) ou phosphonium quaternaire (copolymère 2 et 3), il se dégrade à des températures inférieures.

En effet, l'introduction d'ammoniums quaternaires au sein de la structure fragilise le copolymère. Au cours de la première phase de dégradation du copolymère 1 (170°C à 238°C), la perte de 31% de masse pourrait être attribuée au départ du groupement butyle fixé à l'ammonium via une β -élimination d'Hoffmann^{20,21} (**Figure II-10**). La perte de masse théorique, estimée à 33% (masse de la chaîne butyle partante \times 0,9 / masse du motif du copolymère 1 = 50,4/152,5), est en adéquation avec les données expérimentales.

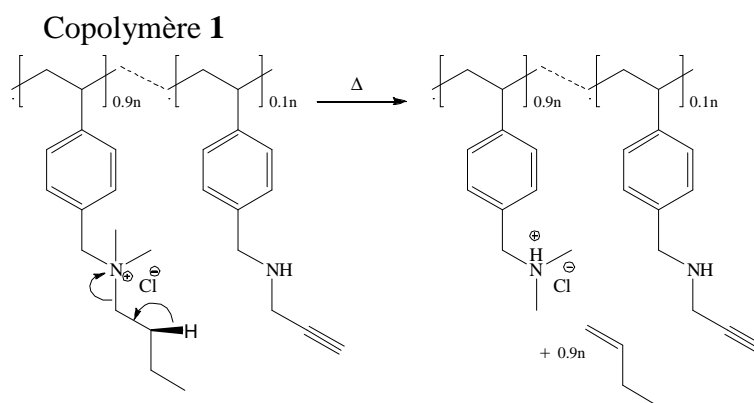


Figure II-10. β -élimination d'Hoffmann

L'introduction de phosphoniums quaternaires au sein de la structure fragilise aussi la structure initiale mais dans une moindre mesure. En effet, les groupements phosphonium, bien qu'ils subissent aussi des éliminations du même type que celles des groupements ammonium, sont plus stables thermiquement^{22,23}.

II.1.3.2 Etude des propriétés thermiques par DSC

Les analyses DSC, permettant d'étudier les propriétés thermiques des copolymères, ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage et de refroidissement constante de 10°C/min. Pour chaque échantillon analysé, trois balayages ont été effectués : une montée en température, un refroidissement puis une nouvelle montée en température. La seconde montée en température a été utilisée pour déterminer les températures de transition vitreuse (T_g) (au $\frac{1}{2} C_p$). Ces résultats sont présentés dans le **Tableau II-1**.

Tableau II-1. Propriétés thermiques du PVBC et des copolymères 1, 2 et 3

	T_g (°C)	ΔC_p (J/(g.°C))
PVBC	80	0,336
Copolymère 1	Non observée	/
Copolymère 2	208	0,621
Copolymère 3	158	0,319

* courbes DSC en annexe 2, **Figure A2-4**

La T_g du PVBC est observée à 80°C et est proche des valeurs de la littérature. Une T_g beaucoup plus élevée est observée pour le copolymère 3 ($T_g = 158^\circ\text{C}$). Cette augmentation de la T_g pourrait être attribuée à la présence d'interactions électrostatiques inter et intra-chaînes

entre les groupements cationiques, l'augmentation de volume libre apportée par les groupements alkyles ayant un effet négligeable. Pour le copolymère **1** la Tg n'est pas observable car probablement au-delà de la température de dégradation. Concernant le copolymère **2** l'encombrement stérique apporté par les trois groupements phényle supplémentaires par motif favorise un déplacement supplémentaire de la Tg vers les hautes températures (Tg = 208°C). Par ailleurs, nous verrons que pour le copolymère **4** l'insertion de groupements butylammonium provoque une augmentation de 130°C de la Tg (**Tableau II-2**). Une telle augmentation place ainsi la Tg du copolymère **1** au-dessus de sa température de dégradation (210°C contre 170°C).

II.2 Synthèse du copolymère 4 à partir du méthacrylate de N,N-diméthylaminoéthyle

Le copolymère **4** a été synthétisé à partir du poly (N,N-diméthylaminoéthylméthacrylate) (pDMAEMA). Le choix de la structure du polymère pDMAEMA s'est effectué pour deux raisons : le monomère méthacrylate de N,N-diméthylaminoéthyle (DMAEMA) est commercialisé et facilement polymérisable ; les chaînes pendantes possèdent une amine tertiaire facilement quaternisable formant ainsi des groupements cationiques bactéricides.

Ainsi, une polymérisation radicalaire conventionnelle du DMAEMA a été effectuée dans le THF anhydre à 60°C pendant 18h (**Figure II-11**). You et al.²⁴ ont décrit l'homopolymérisation du DMAEMA et ont obtenu des masses molaires moyennes en poids de 36400 g/mol (\overline{M}_w) avec un indice de polymolécularité de 1,4. En s'inspirant de ce protocole opératoire, l'objectif étant d'obtenir des masses molaires moyennes les plus élevées possibles (activité antibactérienne maximale pour des \overline{M}_w autour de 100000 g/mol^{11,12,13}), le rapport DMAEMA/AIBN a été maximisé ([DMAEMA] / [AIBN] = 1050). Une analyse par chromatographie d'exclusion stérique a permis de déterminer une masse molaire moyenne en poids (\overline{M}_w) de 97560 g/mol (en équivalent PS) avec un indice de polymolécularité de 3,9 (**Annexe 2, Figure A2-5**).

Une fois le pDMAEMA synthétisé, des groupements porteurs de fonctions alcyne sont introduits de façon aléatoire sur 10% des motifs. La réaction mise en jeu consiste en une substitution nucléophile des atomes de chlore du chlorure de propargyle par l'amine tertiaire du polymère conduisant à des ammoniums quaternaires avec une chaîne propargyle (intermédiaire **2**). L'étape de quaternisation des motifs restants est ensuite effectuée en

introduisant un excès d'iodobutane pour former le copolymère **4** (**Figure II-12**). Le pDMAEMA ainsi que le copolymère **4** ont été obtenus avec de bons rendements.

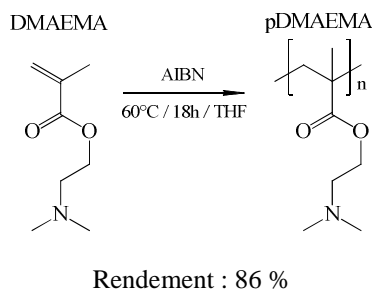


Figure II-11. Synthèse du pDMAEMA

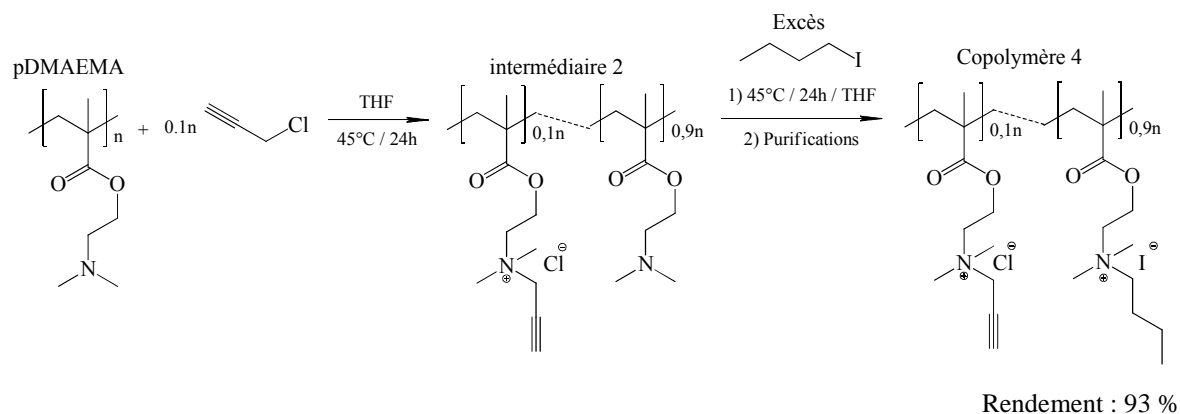


Figure II-12. Synthèse du copolymère **4**

II.2.1 Caractérisation par IRTF-ATR

Les spectres IRTF du DMAEMA, du pDMAEMA, de l'intermédiaire **2** et du copolymère **4** sont présentés ci-dessous (**Figure II-13**).

Le spectre IRTF du DMAEMA révèle les vibrations d'élongation des liaisons C=O (1723 cm^{-1}), C=C (1640 cm^{-1}) et C-O (1150 et 1260 cm^{-1}).

Le spectre IRTF du pDMAEMA révèle la disparition de la bande d'élongation de la liaison C=C du monomère confirmant ainsi sa polymérisation.

De même que pour les copolymères **1**, **2** et **3**, l'apparition d'une large bande d'élongation située entre 3600 cm^{-1} et 3100 cm^{-1} , correspondant à la vibration de valence des molécules d'eau, met en évidence l'hygroscopicité du copolymère **4**. Les bandes de vibration d'élongation

de faibles intensités correspondant aux liaisons N-H et C≡C ne sont pas détectables sur les spectres IRTF de l'intermédiaire **2** et du copolymère **4** car elles sont en faibles concentrations.

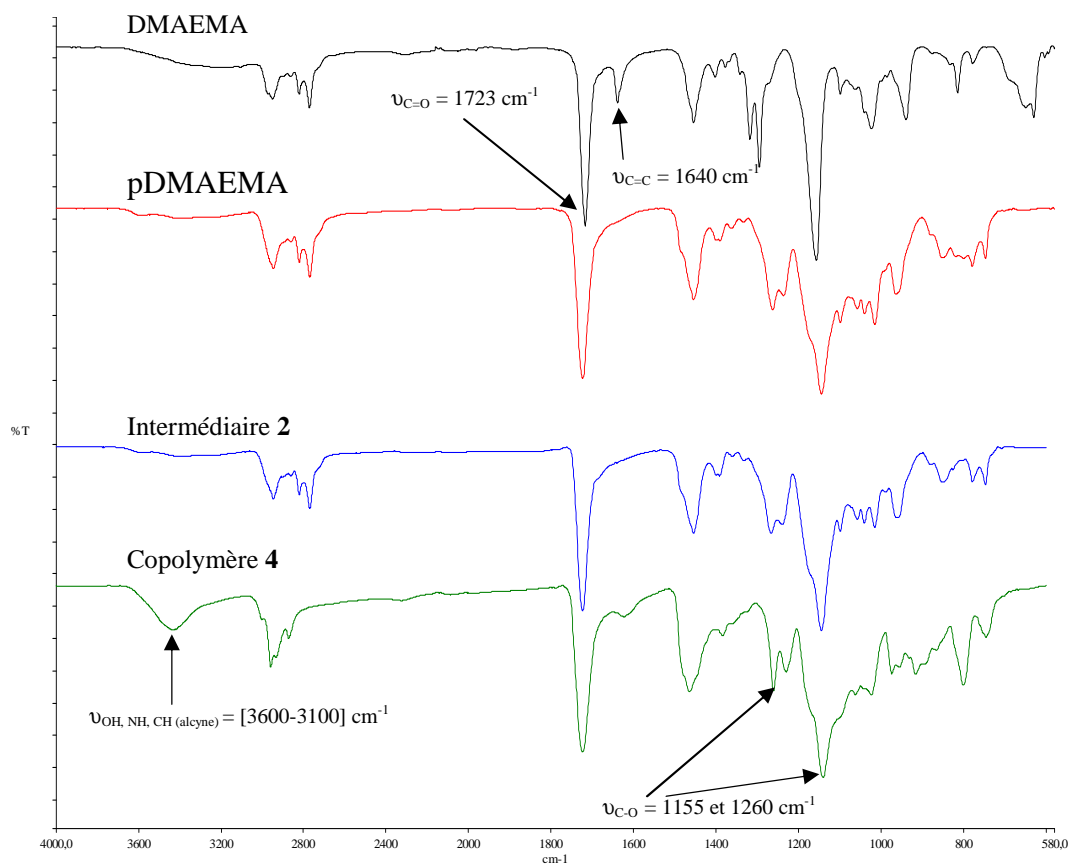


Figure II-13. Spectres IRTF du DMAEMA, du pDMAEMA, de l'intermédiaire **2** et du copolymère **4**

II.2.2 Caractérisation par RMN ¹H

Les spectres RMN ¹H du chlorure de propargyle, du pDMAEMA et de l'intermédiaire **2** dans le CDCl₃ ont été superposés (**Figure II-14**) de manière à identifier les déplacements chimiques des protons de la chaîne pendante modifiée par le chlorure de propargyle (H6, H7, H8). Ces protons se retrouvent déblindés par rapport à ceux du pDMAEMA (H3, H4, H5).

De même, le déblindage des 2 protons en position α de la fonction alcyne (H9 à 4,95 ppm) est observé par rapport aux protons du chlorure de propargyle (H1 à 4,4 ppm). L'analyse des intégrations des protons H7, H8 permet d'estimer le pourcentage de motifs modifiés par le

chlorure de propargyle (de l'ordre de 9%). Le taux de substitution est calculé de la manière suivante :

Considérant les 2 protons H3 : $\text{Int}(\text{H3}) = 2,000$ relatif à 2 protons. Chaque proton possède donc une intégration de 1,000.

Considérant les protons H7 et H8 : $\text{Int}(\text{H7}) + \text{Int}(\text{H8}) = 0,726$ relatif à 8 protons. On en déduit le taux de substitution nucléophile des groupements chlorés par la propargylamine : Taux de substitution = $100 \times ([\text{Int}(\text{H7}) + \text{Int}(\text{H8})] \div 8) \div 1,000 = 9\%$.

$\text{Int}(\text{H3})$ étant l'intégration des protons H3 ; $\text{Int}(\text{H7})$ étant l'intégration des protons H7 ; $\text{Int}(\text{H8})$ étant l'intégration des protons H8.

Le copolymère **4** n'étant pas soluble dans le CDCl_3 , son spectre RMN ^1H a été effectué dans CD_3OD et comparé à celui du pDMAEMA et de l'intermédiaire **2** (**Figure II-15**) de manière à distinguer les déplacements chimiques des protons H11 (3,7 ppm), H12 (1,9 ppm), H13 (1,5 ppm) et H14 (1,0 ppm) de la chaîne pendante modifiée par l'iodobutane.

De plus, on s'aperçoit que les protons H3 (4,6 ppm), H4 (4,1 ppm), H5 (3,4 ppm) du copolymère **4** se retrouvent déblindés par rapport aux protons H3 (4,1 ppm), H4 (2,7 ppm) et H5 (2,4 ppm) de l'intermédiaire **2** justifiant ainsi la présence de l'ammonium quaternaire. Une analyse RMN ^1H COSY 2D (Annexe 2, **Figure A2-6**) a permis de confirmer les attributions des pics du spectre RMN ^1H .

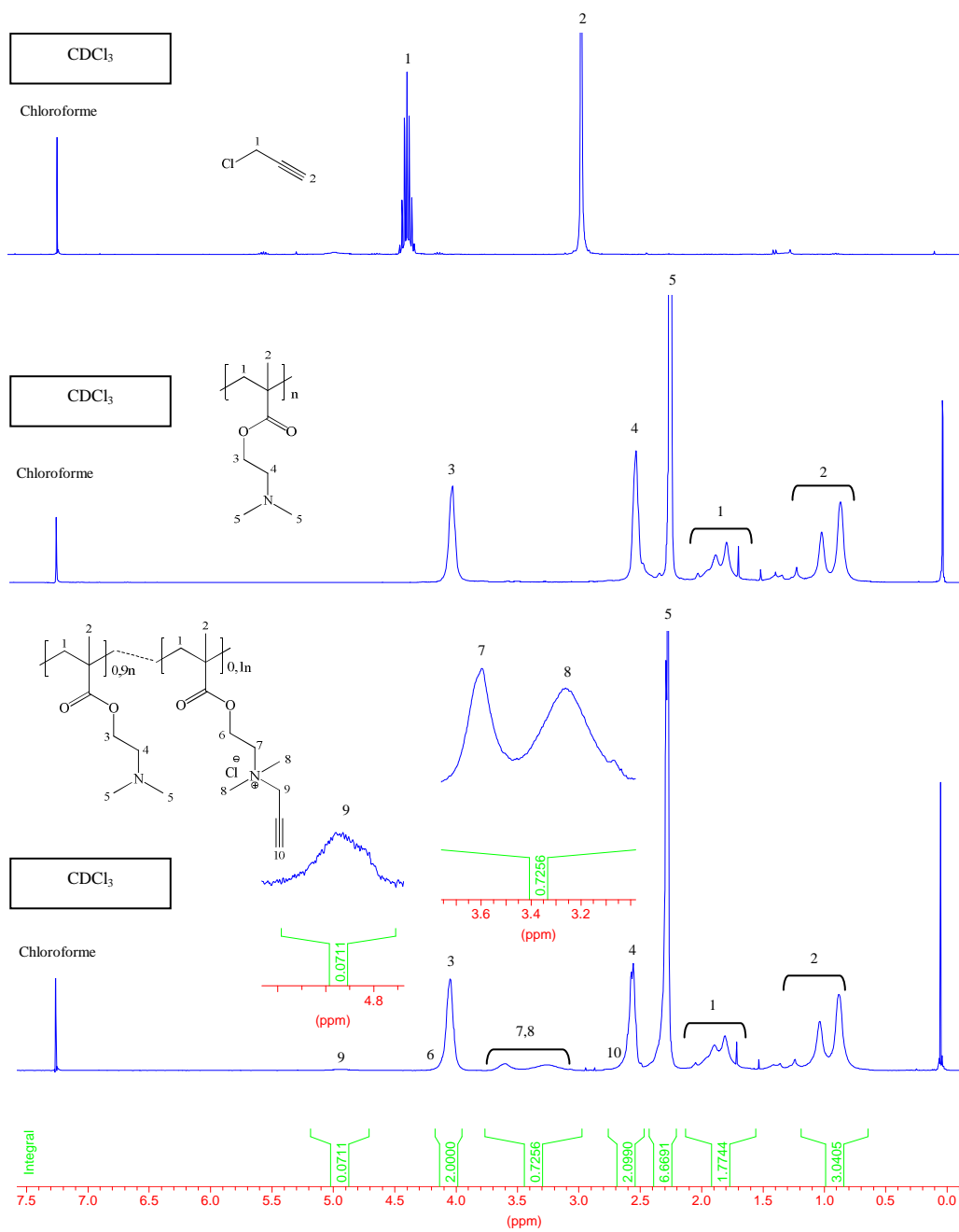


Figure II-14. Spectres RMN ^1H du chlorure de propargyle, du pDMAEMA et de l'intermédiaire 2

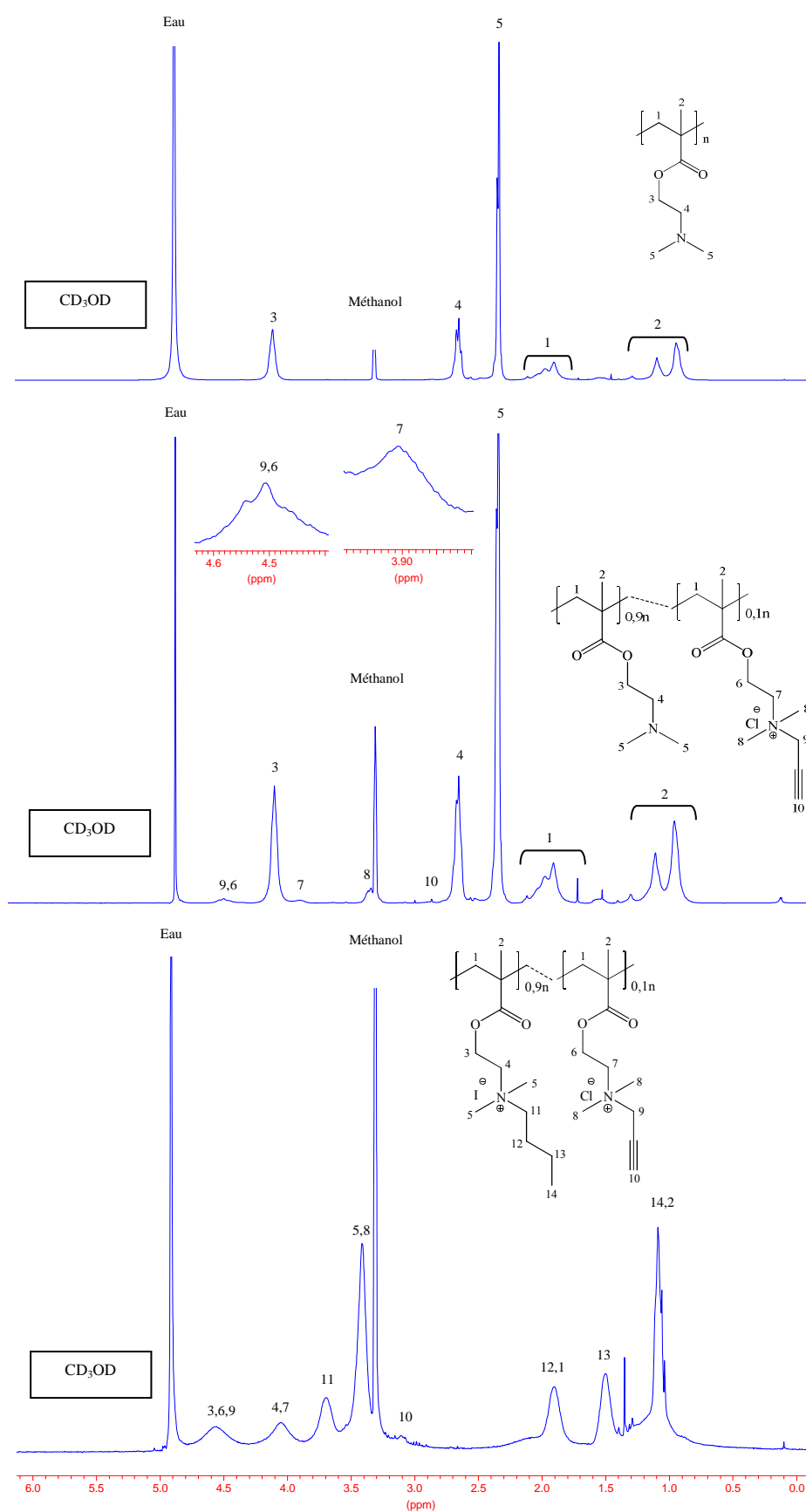


Figure II-15. Spectres RMN ^1H du pDMAEMA, de l'intermédiaire **2** et du copolymère **4**

II.2.3 Analyses thermiques

Les propriétés thermiques du copolymère **4** ont été évaluées par (ATG) et par (DSC) et comparées avec celles du poly(DMAEMA) de référence.

II.2.3.1 Etude de la stabilité thermique par ATG

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage constante de 10°C/mn (**Figure II-16**).

La dégradation du pDMAEMA se déroule en deux temps²⁵: la première phase de dégradation est observée de 225°C à 334°C (perte de masse de 47%), la seconde phase de dégradation se terminant à 450°C. Lorsque le pDMAEMA est modifié chimiquement par des groupements porteurs d'ammoniums (copolymère **4**), il se dégrade plus rapidement.

On s'aperçoit, comme pour les précédents copolymères cationiques, que le copolymère **4** possède une phase de dégradation supplémentaire vis-à-vis du pDMAEMA. En effet, au cours de la première phase de dégradation du copolymère **4**, de 165°C à 248°C, la perte de 50% de masse est provoquée théoriquement par le départ de groupements fixés à l'ammonium via une β -élimination d'Hoffmann. Les deux autres phases de dégradation correspondent aux deux phases de dégradation du pDMAEMA.

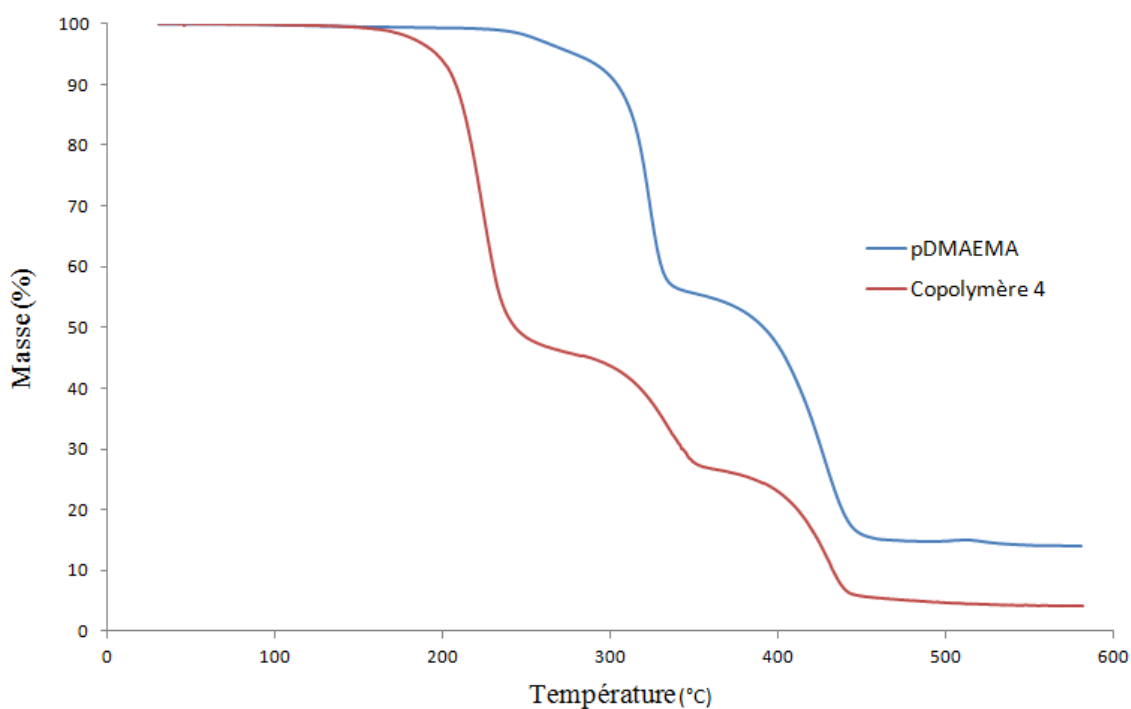


Figure II-16. Analyses ATG du pDMAEMA et du copolymère **4**

II.2.3.2 Etude des propriétés thermiques par DSC

Les analyses de calorimétrie différentielle à balayage ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage et de refroidissement constante de 10°C/min. La seconde montée en température a permis d'analyser la transition vitreuse (T_g) du pDMAEMA ainsi que celle du copolymère **4** (Annexe 2, **Figure A2-7**). Ces résultats sont présentés dans le **Tableau II-2**.

Le copolymère **4** possède une température de transition vitreuse ($T_g = 151,8^\circ\text{C}$) supérieure à celle du pDMAEMA de référence ($T_g = 21,5^\circ\text{C}$). De même que pour les copolymères cationiques précédents, cette augmentation de la T_g est attribuée à une rigidification des chaînes par la présence d'interactions électrostatiques fortes inter et intra-chaînes.

Tableau II-2. Propriétés thermiques du pDMAEMA et de copolymère **4**

	T_g ($^\circ\text{C}$)	ΔC_p (J/g)
pDMAEMA	21,5	0,325
Copolymère 4	151,8	0,257

III Préparations et caractérisations des surfaces PVC bactéricides

Parmi les différents modes de greffage chimique de macromolécules sur une surface, le choix s'est porté sur des réactions de type « click chemistry ».

En effet, ces réactions connaissent un succès grandissant depuis que K.B. Sharpless, prix nobel de chimie 2001, les a définies lors du 217^{ième} congrès annuel de l'American Chemical Society. Pour qu'une réaction soit considérée comme une réaction click, elle doit répondre aux critères suivants :

- être modulable,
- aboutir à des rendements élevés,
- générer uniquement des sous-produits inoffensifs,
- être stéréospécifique,
- s'effectuer selon un protocole simple,
- utiliser des matériaux de base et des réactifs qui sont facilement disponibles.

Aujourd'hui quatre types de réactions click ont été identifiés²⁶ :

- *les réactions nucléophiles d'ouverture de cycle* de composés hétérocycliques électrophiles tels que les aziridines, les époxydes et les sulfates cycliques ;
- *les réactions chimiques mettant en jeu des composés carbonyles* (par exemple lors de la formation de fonctions urées, thiourées, hydrazones, éthers, amides ou hétérocycles aromatiques) hormis les aldols (temps de réaction long, création de sous produits) ;
- *les additions sur des liaisons multiples carbone-carbone* telles que les réactions d'époxydation, d'aziridination, de dihydroxylation ou certaines additions de type Michaels ;
- *les cycloadditions* incluant les réactions de Diels-Alder et les réactions de type Huisgen 1,3-dipolaire.

Parmi les différentes réactions click, la réaction de cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire (HDC) catalysée par du cuivre (I) entre un azoture et un alcyne est celle que nous avons choisi d'utiliser car elle présente de nombreux avantages : elle s'effectue à température ambiante, dans des solvants non polluants (eau et alcools) sur une large gamme de pH^{27,28}. L'unité 1,2,3-triazole formé est très stable dans des conditions standards^{26,29}. La cinétique de réaction est beaucoup plus rapide (temps de réaction 10^7 fois plus court) que son autre version sans catalyseur^{30,31}.

III.1 Traitement physicochimique des surfaces PVC

De manière à pouvoir greffer les copolymères bactéricides porteurs de groupements alcyne, un traitement physicochimique sur les surfaces PVC a été réalisé. La polarisation de la liaison C-Cl du PVC rend ce polymère susceptible de réagir avec des composés nucléophiles^{32,33}. Une réaction de substitution nucléophile a donc été effectuée de manière à fixer des groupements azoture en surface. L'objectif du traitement est de maximiser la densité de greffage des groupements azoture sans pour autant affecter les propriétés thermo-mécaniques des films PVC.

J. Sacristan *et al.*³⁴ ont mis en évidence les facteurs influant sur le degré de substitution des atomes de chlore en surface par l'azoture de sodium : la température, le temps de réaction et la proportion solvant /non solvant du PVC (la présence d'un non solvant empêche la dissolution totale du film PVC).

Il en ressort que travailler à 60°C, pendant 48h dans un mélange DMF/eau sont les conditions optimales permettant l'obtention de bons rendements de substitution dans des délais raisonnables sans affecter les propriétés intrinsèques du film PVC (1 cm × 1 cm × 0,02 cm) (**Figure II-17**). Dans notre cas un mélange DMF/eau (6/1) est un optimum (Annexe 2, **Figure A2-8**).

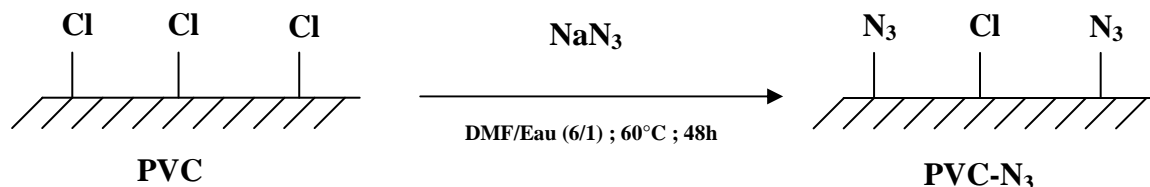
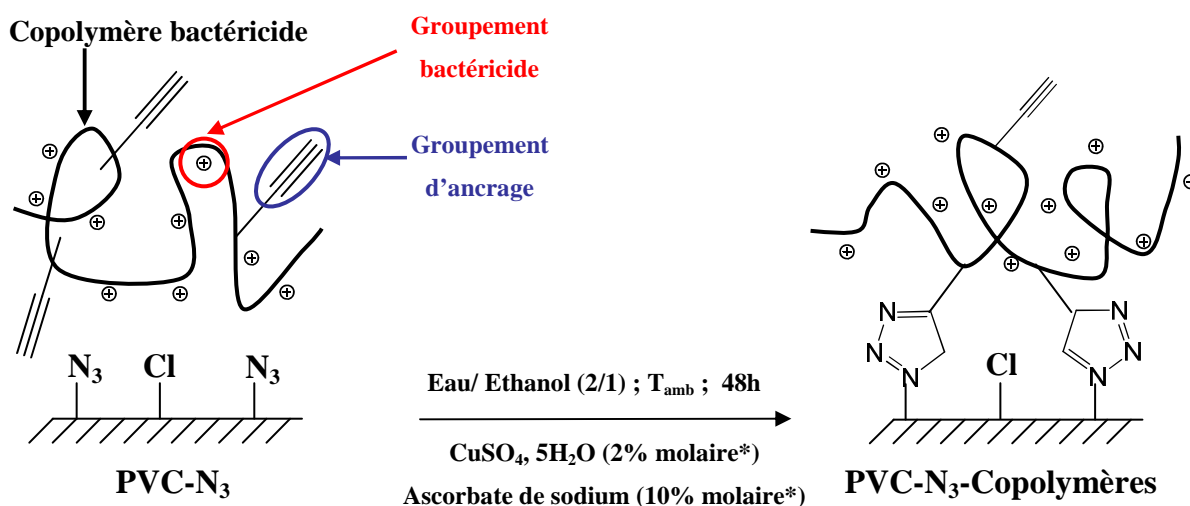


Figure II-17. Traitement chimique des surfaces PVC par l'azoture de sodium.

III.2 Greffage des copolymères bactéricides sur les surfaces PVC-N₃

Il existe de nombreuses façons de générer le catalyseur lors d'une réaction HDC. Dans le cadre de mon projet, la technique utilisée est la réduction in situ de sels de cuivre (II) [le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O)] par l'ascorbate de sodium couramment utilisé pour ce type de réaction^{35,36} (**Figure II-18**).



* Les pourcentages molaires sont donnés en fonction du nombre de moles de motifs porteurs de groupements alcyne

Figure II-18. Greffage des copolymères bactéricides sur des surfaces PVC-N₃ par une réaction d'addition click de type HDC.

III.3 Caractérisations physicochimiques des surfaces PVC bactéricides

III.3.1 Caractérisation par IRTF-ATR

La caractérisation par IRTF des surfaces PVC, PVC-N₃ et des surfaces cationiques bactéricides (Annexe 2, **Figure A2-9**) met en évidence la présence de groupements azoture ($\nu_{N_3} = 2100 \text{ cm}^{-1}$). Cependant les copolymères cationiques fixés en extrême surface ne sont pas détectables car la profondeur d'analyse de l'appareil est trop importante (3-5 μm). En effet, si les copolymères bactéricides sont greffés en surface, ils ne pénètrent pas au sein du matériau et forment une couche monomoléculaire.

III.3.2 Spectroscopie photoélectronique X (XPS)

III.3.2.1 Analyse élémentaire des surfaces

Les surfaces PVC-N₃ cationiques ainsi que leurs témoins PVC et PVC-N₃ ont donc été analysées par XPS. Les spectres complets (Annexe 2, **Figure A2-10**) permettent l'obtention du pourcentage de chaque élément à partir des aires des pics. Les résultats de l'analyse élémentaire de ces surfaces sont consignés dans le **Tableau II-3**.

Tableau II-3 : Analyse élémentaire par XPS des surfaces cationiques et de leurs témoins (PVC et PVC-N₃).

Surface	Analyse élémentaire									
	C (%)	Cl (%)	N (%)	O (%)	Si (%)	N/C (%)	X= %(O)- %(Si) ^a	X/C (%)	P (%) ^b	Autres (%) ^c
PVC	44,24	8,82	0,00	22,87	21,88	0,0	0,99	2,2	0,00	F : 2,18
PVC-N ₃	66,46	15,54	4,27	8,79	3,52	6,4	5,27	7,9	0,00	F : 1,41
PVC-N ₃ -Copo 1	55,22	8,29	3,02	20,14	14,02	5,5	6,12	11,1	0,00	F : 2,31
PVC-N ₃ -Copo 2	64,19	12,20	3,66	12,22	5,78	5,7	6,44	10,0	0,16	F : 1,95
PVC-N ₃ -Copo 3	71,87	14,32	3,78	6,33	1,95	5,3	4,38	6,1	0,12	F : 1,74
PVC-N ₃ -Copo 4	59,00	10,57	3,20	17,09	8,22	5,4	8,87	15,0	0,00	Cu : 1,69

^a Pourcentage d'oxygène dû à l'humidité de l'air et/ou au greffage de polymère.

^b Les pourcentages en P étant très faibles pour être détectés dans les spectres complets, ils ont été calculés à partir des aires des pics dans les spectres à haut résolution des différents éléments.

^c La présence du F est due à une contamination de la surface (Gants, peau, pinces...) ; la présence du Cu est due au catalyseur.

La présence des éléments Si et O dans le film PVC de départ est due à l'utilisation du PDMS en tant que plastifiant du PVC. La nature hydrophobe du PDMS pourrait expliquer son abondance en surface. Dans le cas du PVC-N₃, la diminution des pourcentages de O et Si et l'augmentation de celui du chlore révèlent une diminution de la quantité du PDMS. Ce résultat pourrait s'expliquer par une extraction partielle du PDMS dans le mélange eau/DMF au cours de la réaction HDC. Cependant, cette extraction n'étant pas contrôlée, la composition élémentaire surfacique peut changer d'un échantillon à un autre. Néanmoins, certaines informations restent indépendantes de cela. En effet, la présence de l'atome d'azote montre que l'on a bien greffé de l'azoture en surface. Ainsi, un taux de substitution apparent des Cl par les N₃ peut être calculé : $((\%N)/3)/(\%Cl+(\%N)/3)=0,084$ soit 8,4%. On peut aussi remarquer qu'il y a 5,27% d'oxygène supplémentaire par rapport au % de Si, ce qui peut s'expliquer par une augmentation de l'hydrophilie et de l'hygroscopie de la surface.

Après greffage des copolymères cationiques sur les surfaces PVC-N₃, la composition élémentaire change de manière significative. Nous pouvons remarquer encore une fois que le % du Si dans les différentes surfaces varie fortement et de manière aléatoire, rendant ainsi l'étude comparative de ces surfaces et les calculs prédictifs très difficiles. Toutefois, nous pouvons observer la diminution du % de N et du rapport N/C des surfaces greffées par rapport à la surface PVC-N₃. En effet, l'apport en carbone par le polymère greffé est supérieur à celui en azote. Nous pouvons aussi constater que les surfaces gardent leur caractère hygroscopique et que dans le cas de la surface PVC-N₃-Copo **4** le pourcentage d'oxygène dû au traitement de surface $((\%O)-(\%Si))/(\%C)$ est le plus élevé (15,0%), ce qui peut s'expliquer par la contribution supplémentaire des oxygènes de la fonction ester du copolymère **4** dans l'analyse élémentaire.

Par ailleurs, l'absence de pic de phosphore dans les spectres complets des surfaces greffées avec les copolymères **2** et **3** montre que leurs abondances sont inférieures à 1. Celles-ci ont donc été calculées à partir des spectres à haute résolution décrits ci-après. Ce résultat n'est pas surprenant car la composition élémentaire théorique en phosphore dans les copolymères **2** et **3**, avant le greffage en surface, est autour de 3%.

III.3.2.2 Etudes structurales

Afin de compléter et d'affiner les résultats de l'analyse élémentaire, des études structurales de la surface ont été réalisées en étudiant les spectres à haute résolution des différents éléments. En effet, l'énergie de liaison d'un électron avec son atome peut changer en fonction de l'environnement chimique de cet atome.

Surface PVC:

Le spectre à haute résolution correspondant aux transitions des électrons de l'orbitale 1s du carbone (C 1s) de la surface PVC (Témoin 1) est déconvolué en 3 pics (**Figure II-19**). Les pics à 283,68 et 284,48 eV sont assignés aux carbones des chaînes aliphatiques (C-Si, C-C, C-H). Le pic à 285,68 eV est dû à la liaison C-Cl. On peut remarquer que le rapport des aires entre les deux pics (C-Cl et C-CH) est différent de 1 alors que si le PVC était pur ce rapport serait égal à 1.

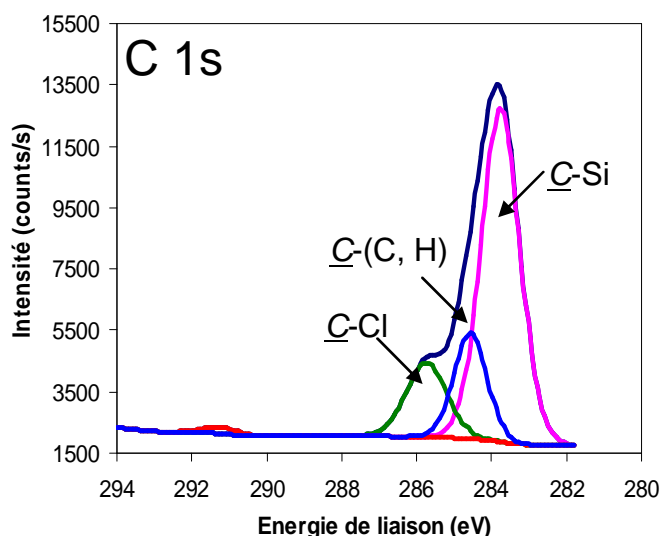


Figure II-19. Pics C 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC.

Le spectre correspondant aux transitions des électrons de l'orbitale 2P du Chlore (Cl 2p) de la surface PVC (Témoin 1) est déconvolué en 4 pics (Annexe 2, **Figure A2-11**). Ceci signifie qu'il y a deux types d'atomes de chlore en surface. En effet, un même atome de chlore présente deux transitions électroniques une correspondant à l'interaction spin-orbite : 3/2 et l'autre correspondant à l'interaction spin-orbite : 1/2. La première est toujours plus intense que la deuxième et est donc utilisée en vue de la quantification. Ainsi, les pics à 199,98 et 201,88 eV correspondent aux énergies de liaison des électrons de spin-orbite : 3/2 et 1/2, respectivement, du chlore du PVC. Le deuxième couple de transitions (201,88 et 203,18 eV) pourrait correspondre aux atomes de chlore du dichlorométhane, qui est resté emprisonné dans le film à l'issue du procédé de préparation des films PVC.

Surface PVC-N₃ :

Certains travaux^{37,38,39} ont montré que les azotures présentait deux pics en XPS à haute résolution (400 et 404 eV) correspondant aux transitions électroniques de l'orbitale 1s de l'azote (N 1s). Dans notre cas, nous observons également ces deux pics. La déconvolution du spectre montre que le premier pic est la superposition de deux pics (399,08 et 400,48 eV) (**Figure II-20**). Ce résultat concorde avec celui de Chen F-F *et al*⁴⁰. Le troisième pic est centré à 403,68 eV.

La déconvolution du pic du carbone (C 1s) révèle 4 pics. Les pics à 283,68 et 284,58 eV correspondent aux carbones des chaînes aliphatiques (C-Si, C-C et C-H). Le pic à 285,78 eV correspond aux carbones des liaisons C-Cl et C-N. Le petit pic à 287,78 eV est difficile à attribuer. Il pourrait correspondre soit à un pic satellite résultant d'une perte d'énergie due à un couplage π - π^* à partir des pics principaux⁴¹, soit à de l'acide ascorbique résiduel piégé en surface.

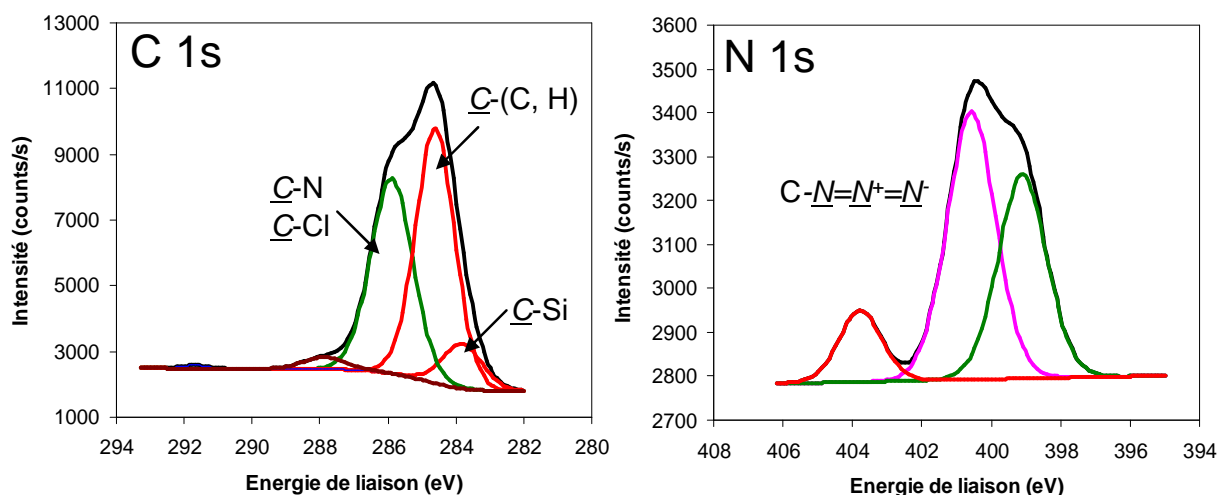


Figure II-20. Pics C 1s et N 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃.

Le spectre du chlore (Annexe 2, **Figure A2-11**) montre la diminution considérable du dichlorométhane en surface du PVC-N₃ par rapport au PVC précurseur. Ce spectre révèle aussi la présence d'ions chlorures résiduels, qui proviennent de la réaction de substitution nucléophile des Cl par les azotures. Ceci indique que le taux de substitution des Cl par les azotures calculé précédemment à partir du spectre complet est sous-estimé.

% réel Cl = % enveloppe (Cl 2p) – % Cl⁻ (Cl 2p) – % Cl dichlorométhane (Cl 2p). On en déduit % réel Cl = 15,54 – 0,22 – 0,40 = 14,92 %. On en déduit un taux de substitution apparent des Cl par les N₃ de 8,7% (formule page 77).

Surface PVC-N₃-Copo 1 :

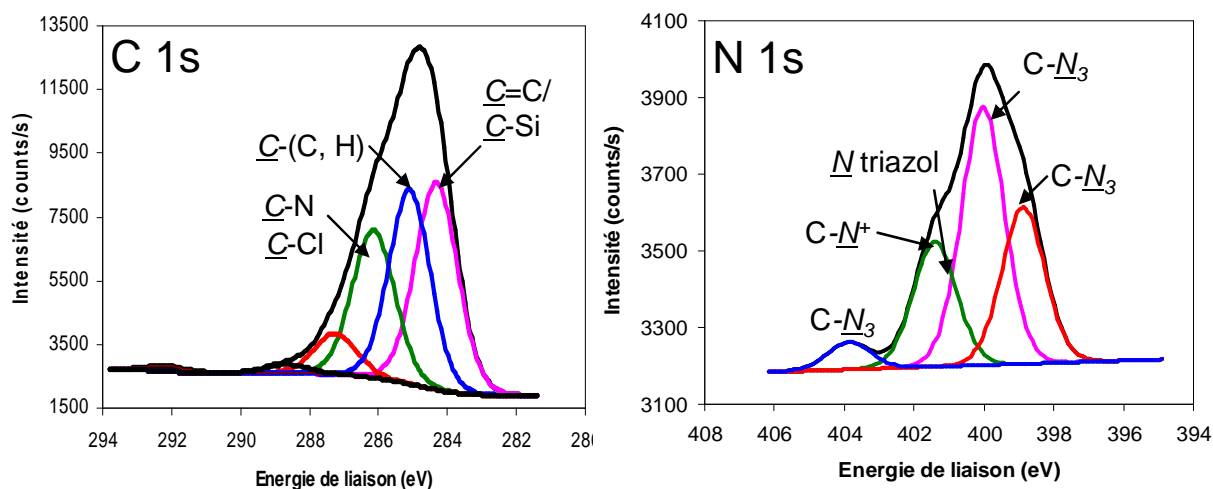


Figure II-21. Pics C 1s et N 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 1.

La déconvolution du pic du carbone (C 1s) révèle 5 pics (**Figure II-21**). Le pic à 284,28 eV correspond aux carbones des liaisons C-Si et C=C. Le pic à 285,08 eV correspond aux carbones des liaisons C-C et C-H. Le pic à 286,08 eV correspond aux carbones liés à tout type d'azote C-N (C-NH, C=N et C-N⁺) et aux carbones de la liaison C-Cl. Les petits pics à 287,28 et 288,68 eV correspondraient à des pics d'impuretés (acide ascorbique résiduel...).

Le spectre de la zone des énergies de liaisons de l'atome d'azote (N 1s) révèle 4 pics (**Figure II-21**). Les pics à 398,78 et 403,78 eV correspondent aux 1^{er} et 3^{ème} pics de l'azoture. Le pic à 399,98 eV correspond à la fois aux atomes des azotures et de l'amine secondaire du copolymère. Le pic à 401,28 eV correspond essentiellement aux N⁺. Le pic du triazole se trouvant dans la zone de chevauchement des pics à 399,98 et 401,28 eV, le calcul du taux de conversion des azotures en triazoles n'a pas pu être réalisé.

Surface PVC-N₃-Copo 2 :

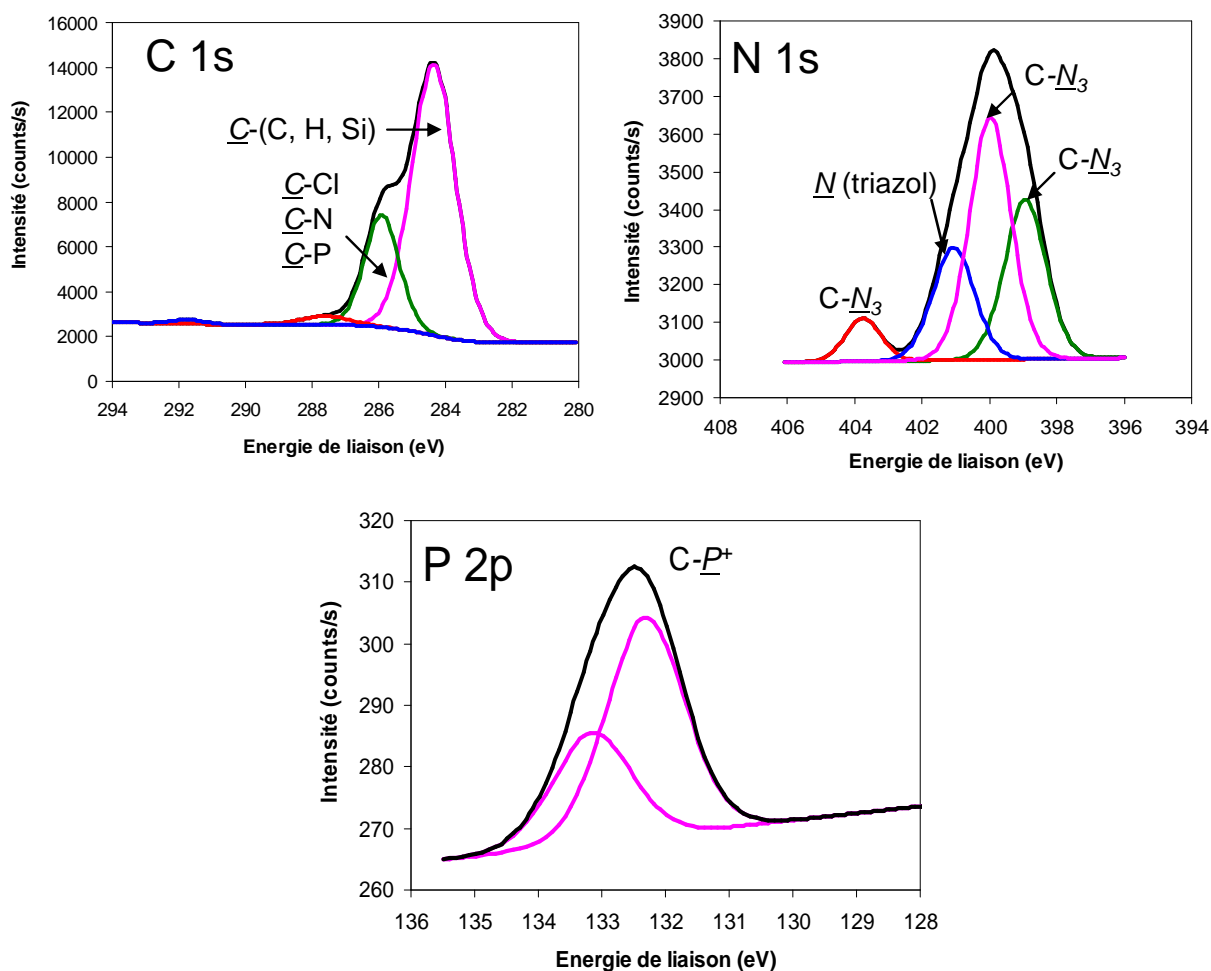


Figure II-22. Pics C 1s, N 1s et P 2p du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 2.

Le spectre à haute résolution de la région du phosphore révèle un signal déconvolué en deux pics à 132,28 et 133,08 eV (P 2p₃ et P 2p₁, respectivement), correspondant à une abondance de 0,16% calculée à partir de l'aire du pic de la 2p₃ (**Figure II-22**).

Les transitions du carbone (C 1s) des liaisons C-C, C-H, C-Si, C=C et C-N donnent un large pic centré à 284,28 eV. Le pic à 285,78 correspond aux carbones des liaisons C-Cl et C-P. Le spectre de la région de l'azote (N 1s) permet de voir en plus des trois pics des azotures, dont un (à 399,88 eV) commun avec l'amine secondaire du copolymère, un pic supplémentaire à 400,98 eV correspondant exclusivement aux cycles triazoles (**Figure II-22**). Ceci nous a permis de calculer un taux de transformation des azotures en triazoles (τ_{triazol}) à l'aide de l'équation suivante :

$$(\tau_{\text{triazol}}) = \text{Aire (triazole)} / (\text{Aire azoture} - \text{Aire (triazole)}/3 + \text{Aire triazole}) = 0,22.$$

Si on se réfère au taux de substitution des Cl par les N₃ calculé précédemment (0,087), le taux de triazole par motif PVC serait de 1,91% ($0,087 \times 0,22 = 0,0191$).

Surface PVC-N₃-Copo 3 :

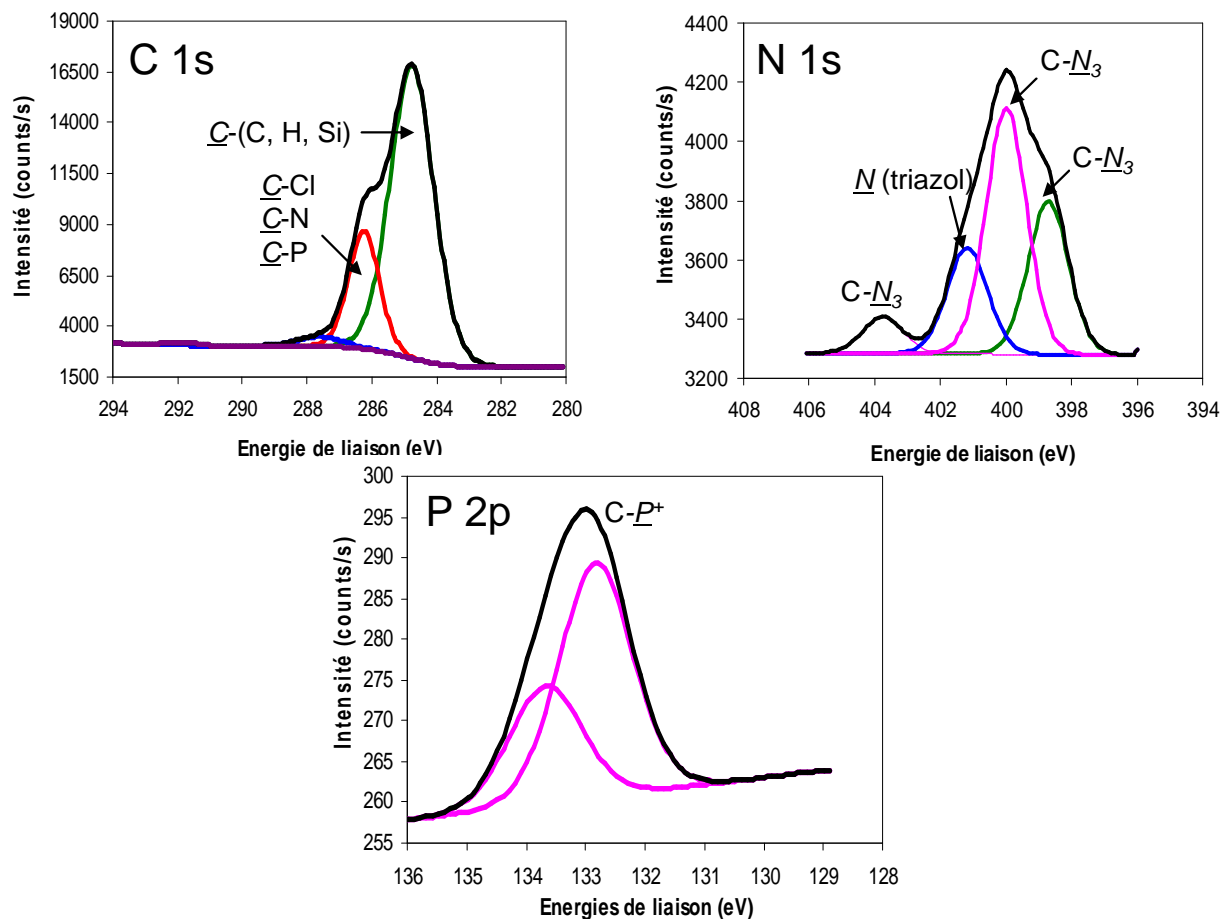


Figure II-23. Pics C 1s, N 1s et P 2p du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 3.

Comme pour la surface précédente, le spectre à haute résolution de la région du phosphore révèle un signal déconvolué en deux pics à 132,78 et 133,68 eV (P 2p₃ et P 2p₁, respectivement) correspondant à une abondance de 0,12% (**Figure II-23**).

Les carbones (C 1s) des liaisons C-C, C-H, C-Si, C=C et C-N donnent un large pic centré à 284,78 eV. Le pic à 286,18 eV correspond aux carbones des liaisons C-Cl et C-P (**Figure II-23**).

Le spectre de la région de l'azote (N 1s) révèle, en plus des trois pics des azotures, dont un (à 399,98 eV) commun avec l'amine secondaire du copolymère, un pic à 401,18 eV correspondant exclusivement aux cycles triazoles (**Figure II-23**).

Le calcul du taux de conversion des azotures en triazole (τ_{triazol}) donne :

$$(\tau_{\text{triazol}}) = \text{Aire (triazole)} / (\text{Aire azoture} - \text{Aire (triazole)}/3 + \text{Aire triazole}) = 0,21.$$

Le taux de triazole par motif PVC serait de 1,83% ($0,087 \times 0,21 = 0,0183$).

Surface PVC-N₃-Copo 4 :

Le spectre du carbone C 1s présente 5 pics. Les pics à 284,08, 284,68 et 248,78 eV correspondent aux carbones des liaisons : C-C, C-H et C-Si. Le pic à 285,98 eV est attribué aux carbones des liaisons : C-Cl, C-N et C-O. Le pic à 288,18 eV est dû au carbone de la fonction ester (**Figure II-24**).

Le spectre de l'azote N 1s révèle 4 pics. Les pics à 398,8 et 404,08 eV correspondent aux 1^{er} et 3^{ème} pics de l'azoture. Le pic à 400,08 eV correspond à la fois aux atomes d'azote des triazoles, des azotures et des amines secondaires. Le pic à 401,78 eV correspond essentiellement aux N⁺ (**Figure II-24**). Pour les mêmes raisons que pour la surface PVC-N₃-Copo 1, le calcul du taux de triazole par motif PVC n'a pas pu être effectué.

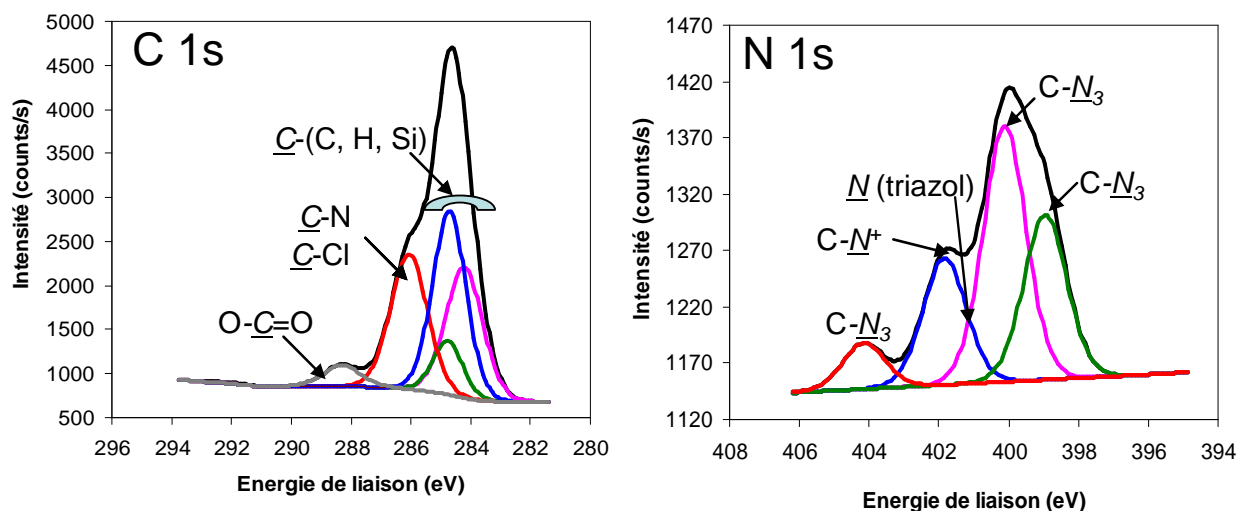


Figure II-24. Pics C 1s et N 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 4.

III.3.3 Dosage fluorimétrique des ammoniums et phosphoniums quaternaires

La densité surfacique des charges accessibles est un paramètre important pour prédire les effets antibactériens des surfaces bactéricides^{12,13,16,17,42,43,44,45,46,47}. Kügler R *et al.*⁴² ont montré qu'il existait un seuil de densité surfacique de charges au delà duquel une surface pouvait être considérée comme bactéricide. Ce seuil dépend de la souche bactérienne mais aussi de son état physiologique. Lorsque les bactéries se trouvent dans des conditions favorables aux divisions cellulaires (milieu nutritif Tryptic Soy Broth (TSB) à 37°C), le seuil se trouve autour de 10^{12} charge.cm⁻² pour une souche *E. coli* et 10^{13} charge.cm⁻² pour une

souche *S. epidermidis*. Cependant dans des conditions défavorables à la croissance bactérienne (solution de tampon phosphate salin (PBS) à 22°C), le seuil est plus élevé : 10^{14} charge.cm⁻² pour les deux souches.

La densité surfacique de charges des surfaces cationiques préparées a pu être mesurée selon une méthode basée sur une complexation fluorimétrique décrite par Tiller *et al.*¹² (Figure II-25).

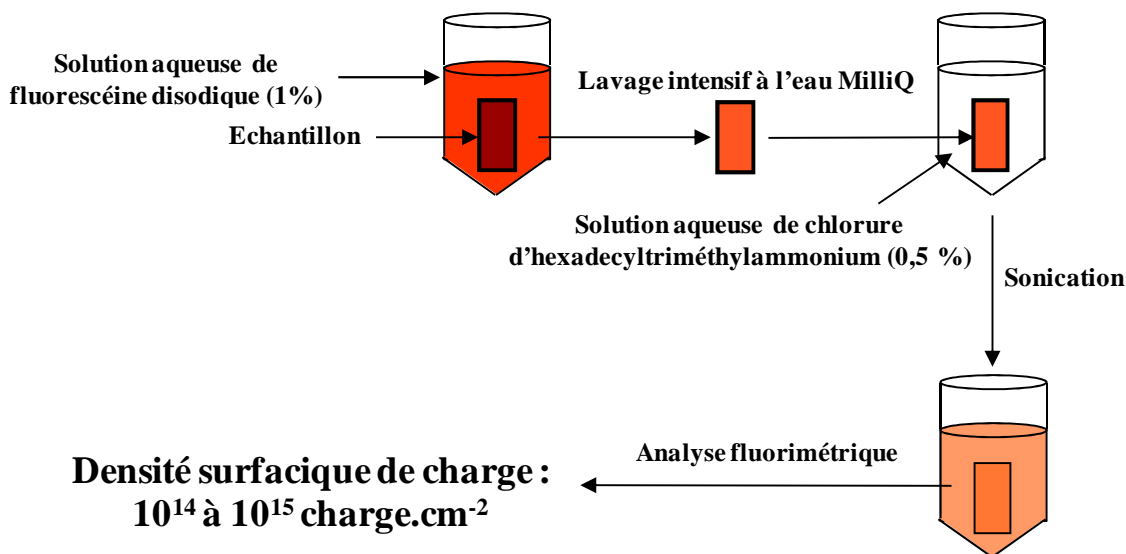


Figure II-25. Principe du dosage fluorimétrique

La fluorescéine disodique est utilisée ici car elle forme un complexe ionique très stable avec les groupements ammonium et phosphonium quaternaire présents en surface. L'excès de fluorescéine qui n'est pas complexée est ensuite éliminé par un lavage intensif à l'eau. Dans un second temps, la fluorescéine complexée est « décrochée » des surfaces cationiques par un très large excès de chlorure d'hexadecyltriméthylammonium (détergent 1) qui joue le rôle de complexant compétitif de la fluorescéine disodique. Les analyses fluorimétriques ont été réalisées à pH =8 (0,3mL d'une solution saturée de NaHCO₃ ajouté aux 2mL de la solution). L'ensemble des densités surfaciques de charges accessibles est répertorié dans le **Tableau II-4**.

Tableau II-4. Densités de charges des différentes surfaces cationiques préparées.

Surfaces	Densités de charges accessibles (charge.cm ⁻²) en 10 ¹⁴
PVC-N ₃ -Copo 1	6,4 ± 1,4
PVC-N ₃ -Copo 2	1,2 ± 0,3
PVC-N ₃ -Copo 3	1,0 ± 0,1
PVC-N ₃ -Copo 4	5,0 ± 1,4
PVC-N ₃	0,097 ± 0,001
PVC	ND

ND : non détectable

Les densités de charges des surfaces témoins PVC et PVC-N₃ correspondent aux densités de molécules de fluorescéine adsorbées de manière non spécifique sur la surface.

Les surfaces cationiques développées présentent toutes des densités surfaciques de charges supérieures à 10¹⁴ charge.cm⁻², répondant ainsi aux critères de l'appellation « surfaces bactéricides ».

Les surfaces PVC-N₃-Copo **1** et PVC-N₃-Copo **4** possédant des groupements ammonium quaternaire (SAQ) présentent des densités de charges du même ordre de grandeur que des surfaces bactéricides obtenues par une approche chimique de type « grafting from ». En effet, l'équipe de Matyjaszewski⁴⁵ a développé des surfaces inorganiques bactéricides (possédant des groupements ammonium quaternaire) par une polymérisation de type ATRP du DMAEMA : les densités de charges ainsi obtenues allaient de 6,5 à 30,5×10¹⁴ charge.cm⁻².

Les surfaces cationiques PVC-N₃-Copo **2** et PVC-N₃-Copo **3** à base de groupements phosphonium quaternaire (SPQ), présentent des densités de charges accessibles légèrement inférieures.

III.3.4 Caractérisation par microscopie confocale à fluorescence

Afin d'évaluer la distribution des charges (et donc la distribution des polymères cationiques bactéricides) sur les surfaces développées et de vérifier si la méthode de dosage de Tiller *et al.*¹² est adaptée à notre système, les surfaces cationiques traitées avec la fluorescéine disodique ont été analysées par microscopie confocale à fluorescence avant et après la mise en contact avec le détergent 1.

Les observations microscopiques ont été effectuées en pH basique (ajout d'une goutte de 40 μL d'une solution saturée de NaHCO_3 sur une surface d' 1 cm^2) pour révéler la fluorescence du fluorochrome en surface. Ces clichés mettent en évidence une homogénéité de greffage des polymères cationiques (**Figure II-26**). De plus, on observe une densité de charges accessibles en surface plus faible pour les SPQ (intensité relative, $I \sim 80$) que pour les SAQ ($I \sim 200$) ce qui confirme les résultats obtenus par dosage fluorimétrique.

Enfin, les clichés des quatre surfaces cationiques obtenus après désorption de la fluorescéine ont dévoilé une très faible fluorescence résiduelle. Le rapport entre l'intensité relative avant et après désorption de la fluorescéine a permis d'obtenir un facteur de correction (**Tableau II-5**) : Facteur de correction : $1 + I(\text{avant désorption}) / I(\text{après désorption})$.

Ce facteur de correction étant proche de 1, on peut estimer la méthode de Tiller adaptée et précise à notre système pour doser des densités surfaciques de charges.

Concernant les surfaces témoins PVC et PVC- N_3 (**Figure II-27**), une adsorption non spécifique de fluorescéine a bien été détectée sur les surfaces PVC- N_3 avec une intensité relative moyenne très faible ($I \sim 21$) alors que pour les surfaces PVC on atteint la limite de détection de l'appareil ($I \sim 7$). Ceci confirme encore une fois les résultats des dosages des charges accessibles par la méthode de Tiller *et al.*¹²

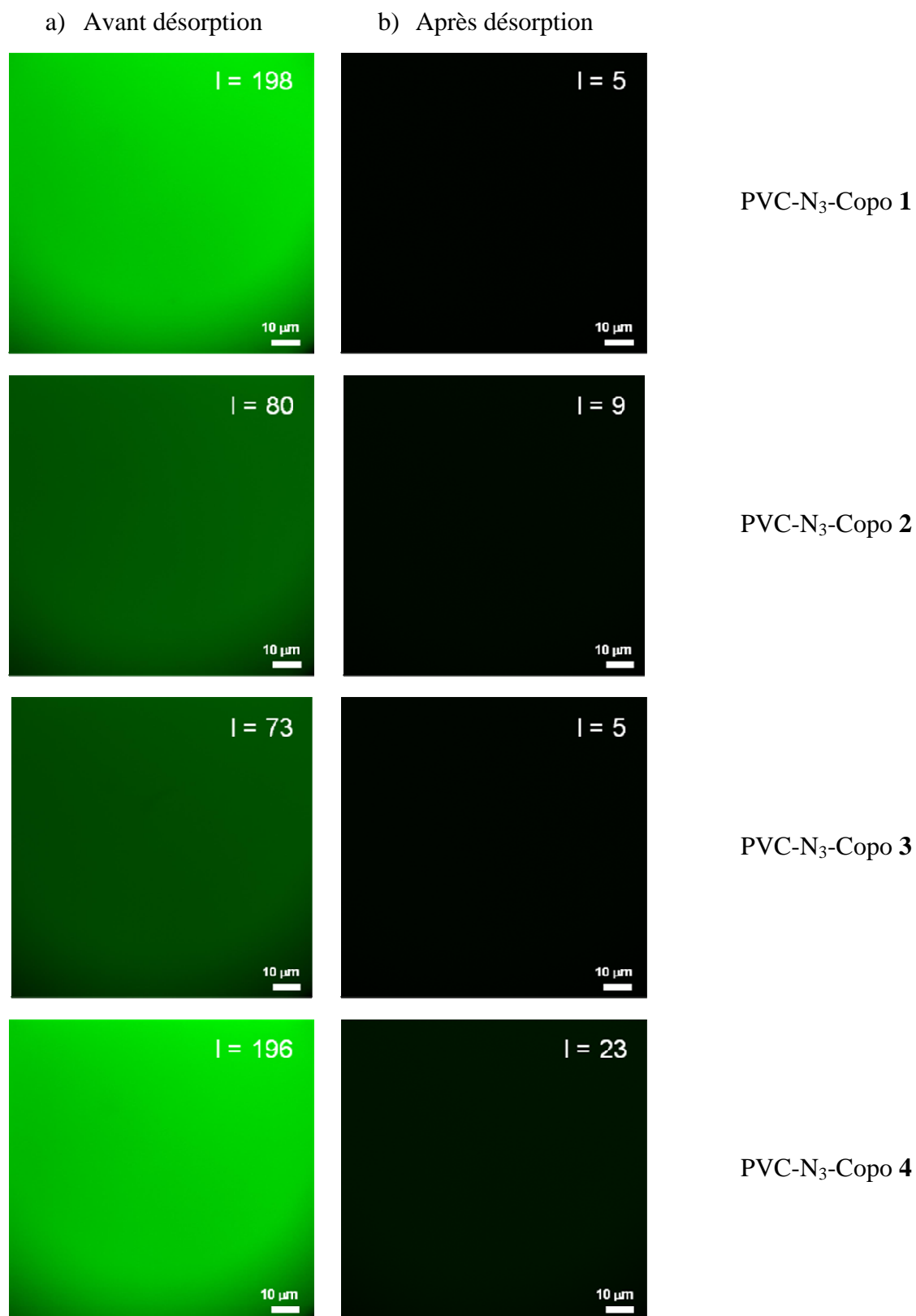


Figure II-26. Clichés des surfaces marquées par la fluorescéine :

a) avant désorption ; b) après désorption

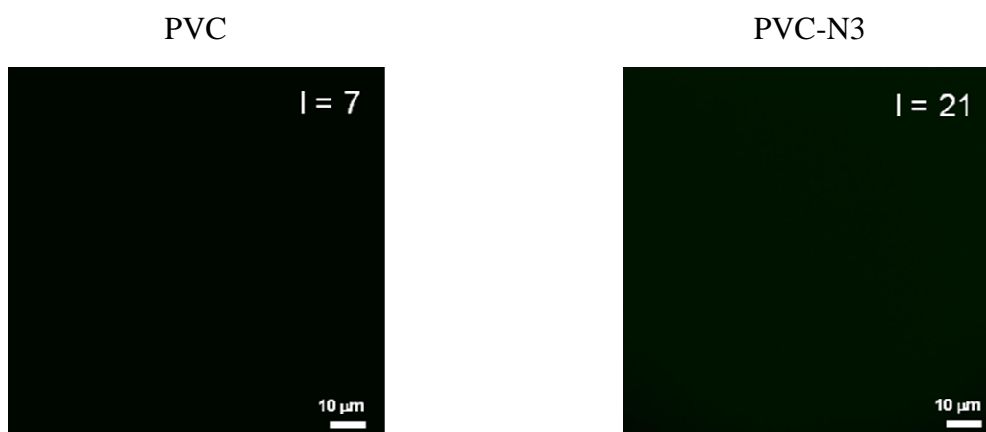


Figure II-27. Clichés des surfaces témoins marquées par la fluorescéine

Tableau II-5. Densités surfaciques cationiques corrigées

	% désorption	Facteur de correction	Densité cationique selon la méthode Tiller (charge/cm ²) en 10 ¹⁴	Densité cationique après correction (charge/cm ²) en 10 ^{14*}
PVC-N ₃ -Copo 1	97,7	1,02	6,4 ± 1,4	6,5 ± 1,4
PVC-N ₃ -Copo 2	91,8	1,08	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3
PVC-N ₃ -Copo 3	95,7	1,04	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
PVC-N ₃ -Copo 4	88,3	1,12	5,0 ± 1,4	5,6 ± 1,4

* Densité cationique après correction = Facteur de correction × Densité cationique selon la méthode de Tiller

III.3.5 Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)

L'AFM a permis d'analyser les changements topographiques et structuraux des surfaces PVC au cours de leurs différents traitements chimiques.

La surface PVC initiale est très lisse avec une rugosité Rms de 0,9 nm (Figure II-28). Lors de la réaction avec l'azoture, la surface subit des traitements chimiques et thermiques relativement importants provoquant une augmentation de la rugosité (Rms = 8,7 nm) (Figure

II-28). Après greffage des copolymères, une rugosité similaire est observée pour chacune des surfaces, sauf pour la surface PVC-N₃-Copo 1 (de manière inexplicable).

	PVC	PVC-N ₃	PVC-N ₃ -Copo 1	PVC-N ₃ -Copo 2	PVC-N ₃ -Copo3	PVC-N ₃ -Copo4
Rugosité (nm)	0,9	8,7	19,0	5,9	5,5	8,9

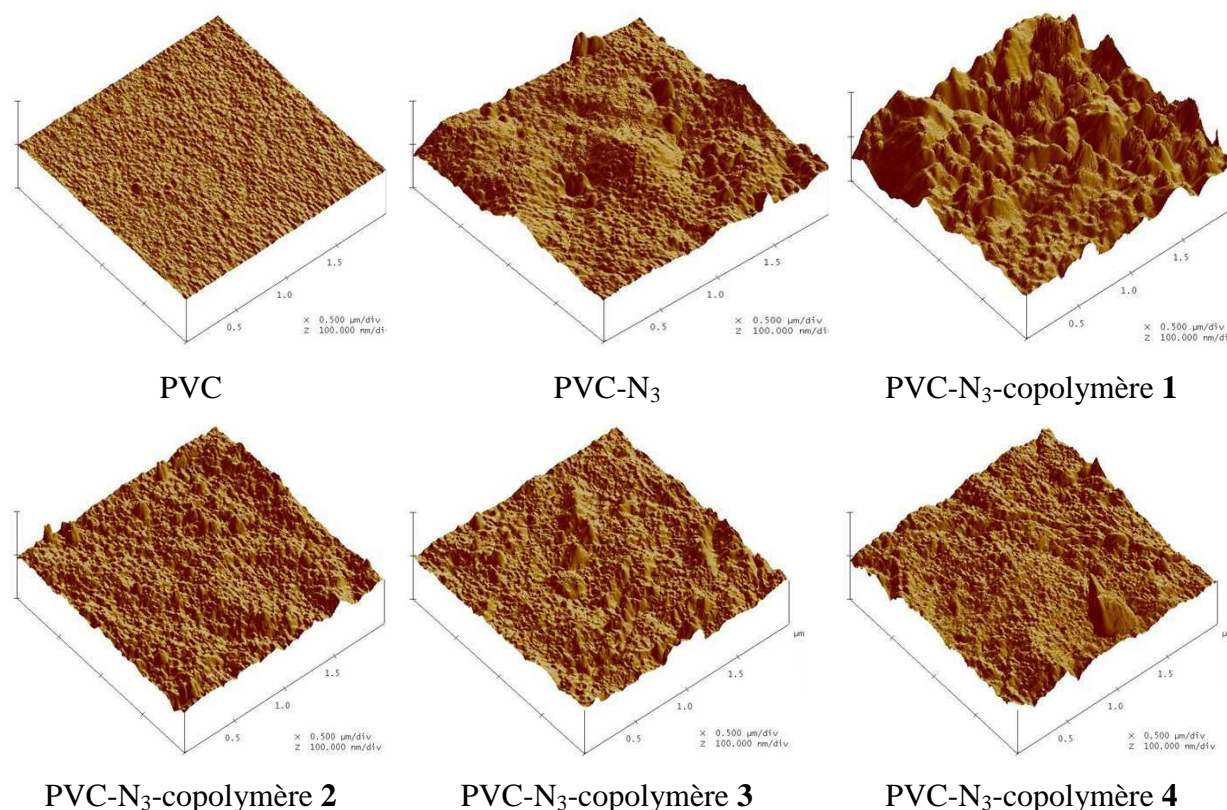


Figure II-28. Images topographiques 3D par AFM des surfaces SAQ, SPQ et des surfaces PVC et PVC-N₃ couplées aux rugosités Rms

Après greffage des copolymères, chaque surface cationique dévoile une topographie et une morphologie qui lui est propre du fait des différentes structures des polymères immobilisés (Annexe 2, **Figure A2-12**).

III.3.6 Mesure des angles de contact

III.3.6.1 Mode statique

Les angles de contact statiques des surfaces cationiques et des surfaces témoins (PVC et PVC-N₃) sont répertoriés dans le **Tableau II-6**.

La surface PVC présente un angle de contact moyen de 90° avec une faible polarité (2,3%), ce qui est caractéristique d'une surface hydrophobe. Après le greffage des azotures (PVC-N₃), on note un gain d'hydrophilie : l'angle de contact statique diminue à 78° et la composante polaire de l'énergie de surface γ^p croît à 3,1 mN/m (polarité : 6,8%). Le greffage des copolymères cationiques sur les surfaces PVC-N₃ entraîne une nouvelle diminution de l'angle de contact statique (autour de 70°). Le caractère hydrophile des surfaces cationiques développées se justifie par l'augmentation de la composante polaire γ^p (entre 5,6 et 7,9 mN/m selon les surfaces) et la diminution de la composante dispersive γ^d (entre 30,9 et 38,3 mN/m selon les surfaces). Les écarts obtenus en termes de polarité (entre 12,8 et 20,4%) s'expliquent par les différences structurales des polymères greffés en surface ainsi que par leur balance hydrophile/hydrophobe.

Tableau II-6. Angles de contact, énergie de surface et rugosité des surfaces cationiques ainsi que des surfaces contrôles

Surfaces	Statique $\theta_{\text{eau}} (^{\circ})$	Dynamique			γ^d (mN/m)	γ^p (mN/m)	Polarité (%)	Rms rugosité (nm)
		$\theta_{\text{eau}} (^{\circ})$		Hys				
		AA	AR					
PVC-N ₃ -copo 1	71 ± 2	75 ± 3	18 ± 8	58 ± 6	30,9 ± 1,7	7,9 ± 0,5	20,4 ± 1,7	19,0
PVC-N ₃ -copo 2	71 ± 2	72 ± 4	16 ± 4	56 ± 6	38,3 ± 1,2	5,6 ± 0,3	12,8 ± 0,8	5,9
PVC-N ₃ -copo 3	71 ± 2	72 ± 2	18 ± 5	54 ± 4	37,2 ± 2,5	6,4 ± 0,4	14,7 ± 1,3	5,5
PVC-N ₃ -copo 4	69 ± 3	73 ± 3	17 ± 7	56 ± 6	37,1 ± 0,6	6,5 ± 0,8	14,9 ± 1,9	8,9
PVC-N ₃	78 ± 1	79 ± 5	13 ± 6	65 ± 5	42,3 ± 1,0	3,1 ± 0,1	6,8 ± 0,3	8,7
PVC	90 ± 3	91 ± 3	47 ± 5	44 ± 6	41,7 ± 0,1	1,0 ± 0,6	2,3 ± 1,4	0,9

III.3.6.2 Mode dynamique

L'angle de contact dynamique rend compte des processus de mouillage (lors de l'augmentation du volume de la goutte, on parle alors d'angle à l'avancée noté AA) et de dé mouillage (lors de la diminution du volume de la goutte, on parle alors d'angle au retrait noté AR) d'un solvant sur une surface. L'angle à l'avancée caractérise la mouillabilité des domaines hydrophobes de la surface (de faible énergie) alors que l'angle au retrait caractérise la mouillabilité des domaines hydrophiles (de haute énergie)⁴⁸.

La différence entre l'angle à l'avancée et l'angle au retrait est appelée hystérèse (Hys). Il existe deux catégories d'hystérèse⁴⁸ : l'hystérèse thermodynamique et l'hystérèse cinétique. L'hystérèse thermodynamique qualifie la différence d'énergie de surface entre les domaines hydrophiles et hydrophobes de la surface, indépendamment du temps d'analyse et de la fréquence de l'analyse : elle est donc parfaitement reproductible. Lorsque ce n'est pas le cas, on parle alors d'hystérèse cinétique (temps d'équilibre très long). Selon ces considérations, les surfaces développées ne présentant pas d'hystérèses parfaitement reproductibles (écarts types variant de 4° à 6°), on peut les qualifier d' « hystérèses cinétiques ».

En outre l'hystérèse permet d'accéder à des informations sur l'homogénéité topographique mais aussi chimique de la surface. En effet, des travaux ont démontré que la valeur de l'hystérèse peut dépendre de la rugosité Rms d'une surface si celle-ci est supérieure à 100 nm^{49,50}. Dans ce cas précis, l'hystérèse augmente avec la rugosité de la surface. Cependant, la rugosité des surfaces développées ne dépassant pas 100 nm (Rms), sa contribution peut être considérée comme négligeable. De la même manière, il est clairement admis qu'une surface chimiquement hétérogène entraîne une augmentation de l'hystérèse. L'homogénéité du greffage chimique ayant été démontrée par le marquage fluorescent ainsi que par l'AFM, cela n'aura aucune influence sur la valeur de l'hystérèse.

La non reproductibilité des hystérèses pour une même surface ne s'explique donc que par des temps d'équilibre lents aux interfaces solide/liquide lors des processus de mouillage et de dé mouillage.

Les angles de contact en mode dynamique ainsi que l'hystérèse des surfaces cationiques et des surfaces témoins (PVC et PVC-N₃) sont répertoriés dans le **Tableau II-6**.

La surface non traitée PVC possède une hystérèse de l'ordre de 44° qui croît à 65° après le greffage de l'azoture (PVC-N₃). L'hystérèse décroît légèrement (entre 54° et 58°) après le greffage des copolymères cationiques suggérant un changement de la nature chimique de la surface.

III.3.7 Analyses thermiques

III.3.7.1 Caractérisation par ATG

La dégradation thermique des différentes surfaces cationiques développées (PVC-N₃-Copo 1, PVC-N₃-Copo 2, PVC-N₃-Copo 3 et PVC-N₃-Copo 4) ainsi que des surfaces témoins (PVC et PVC-N₃) est présentée dans la **Figure II-29**.

La dégradation thermique du PVC s'effectue en trois étapes^{51,52}. La première étape de dégradation est provoquée par le départ de HCl (déshydrochloration) de 250°C à 360°C durant laquelle des structures de type polyènes se forment ainsi que des molécules aromatiques volatiles (benzène, naphthalène et phénanthrène) via des réactions de Diels Alder et des réactions de désalkylation des polyènes. De 360°C à 410°C, les chaînes polyènes se réarrangent via des réactions de cyclisation et des réactions de réticulation (phase de condensation) au cours de laquelle la perte de masse est minime. Enfin, au-delà de 410°C les différentes chaînes condensées se dégradent pour former des résidus carbonés très stables thermiquement (phase de fragmentation).

Après traitement chimique (surfaces PVC-N₃), on observe une fragilisation thermique des chaînes. Le début de la dégradation intervient à 190°C.

Le greffage des copolymères cationiques sur les surfaces PVC-N₃ n'est pas détectable par ATG.

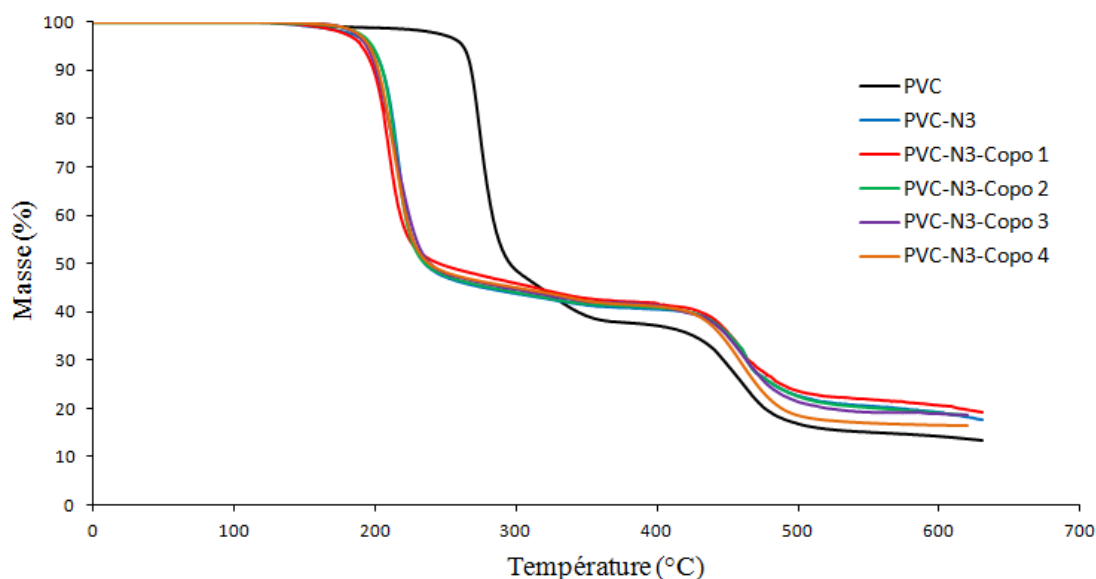


Figure II-29. Analyses ATG des surfaces cationiques et des surfaces témoins PVC et PVC-N₃

III.3.7.2 Caractérisation par DSC

Après le greffage des azotures sur les surfaces PVC, on note un léger durcissement du film. La caractérisation par DSC met en évidence une très faible augmentation de la T_g (T_g (PVC) = 77°C ; T_g (PVC- N_3) = 78°C). Après greffage des copolymères cationiques, aucune modification n'est observée (**Figure II-30**).

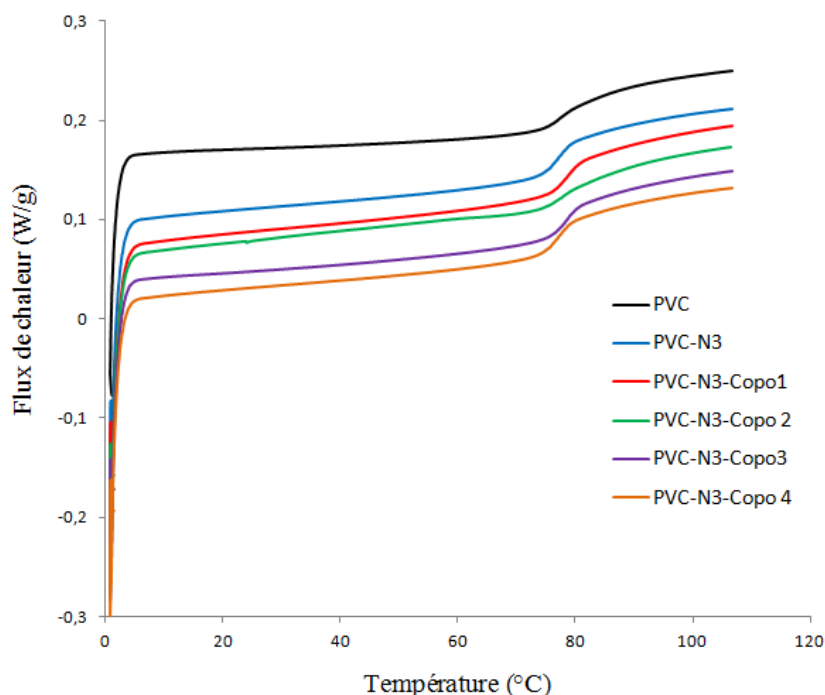


Figure II-30. Analyses DSC des surfaces cationiques et des surfaces témoins PVC et PVC- N_3

IV Evaluation des propriétés bactéricides

IV.1 Choix des bactéries

Notre choix s'est porté sur deux bactéries *E. coli* (Gram négatif) et *S. epidermidis* (Gram positif), en raison de leur très large implication dans les phénomènes de contamination et d'infection rencontrés dans le domaine médical.

Les bactéries *E. coli* sont des bactéries commensales intestinales. Elles représentent la principale cause d'infection nosocomiale (24.7%)⁵³. En cas de contamination, le patient risque de développer des infections urinaires, des gastro-entérites, des diarrhées ou dans les cas les plus graves des méningites.

Les bactéries *S. epidermidis* se retrouvent fréquemment sur la peau et les muqueuses. Elles sont responsables de la majorité des cas d'infections cutanées⁵⁴ (implants percutanés de type orthopédique), neuro-méningées⁵⁵ ou vasculaires^{56,57,58} (cathéters).

Parmi les différentes souches *E. coli* et *S. epidermidis*, les souches K12 (MG 1655) et RP62A (ATCC 35984) respectivement, ont été choisies parce qu'elles ont été parfaitement séquencées par les biologistes.

IV.2 Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des copolymères cationiques

Avant d'évaluer les propriétés bactéricides des surfaces cationiques développées, l'efficacité biocide des copolymères synthétisés a été déterminée en solution. L'indicateur le plus utilisé pour connaître la sensibilité d'une bactérie à un agent antibactérien est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale d'un agent antibactérien suffisante pour inhiber la croissance bactérienne. Cette concentration est susceptible d'être influencée par des facteurs tels que le milieu, la taille de l'inoculum, la température ou le temps d'incubation d'où la nécessité de standardiser un protocole opératoire (Figure II-31).

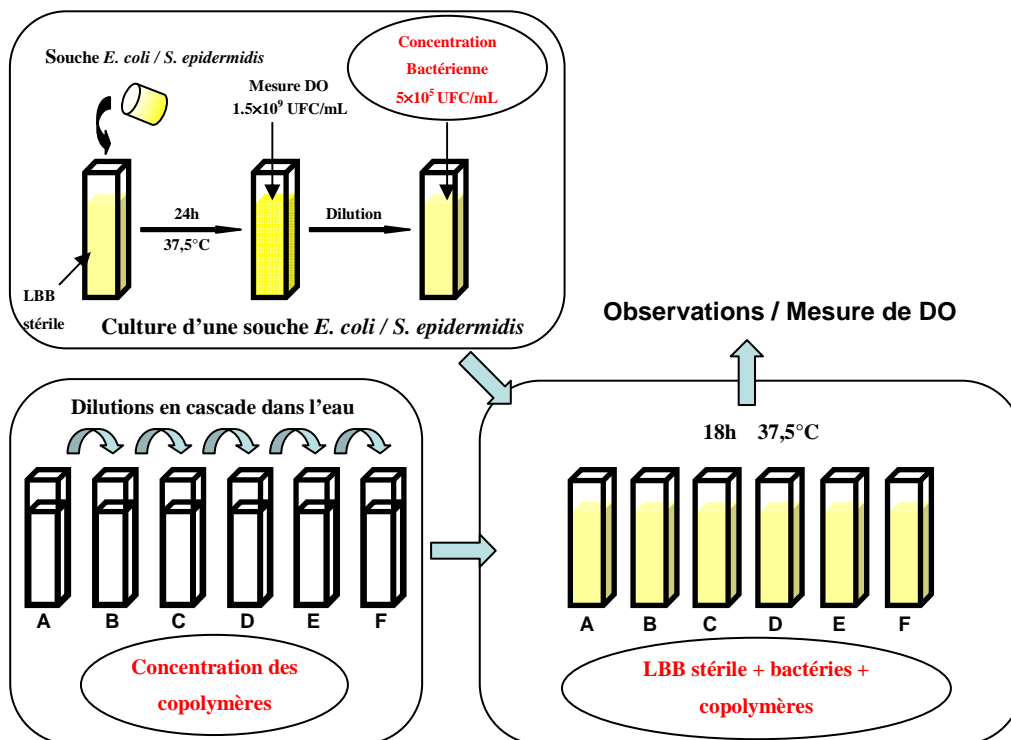


Figure II-31. Protocole opératoire de détermination de la CMI

Des dilutions en cascade ont été préparées à partir d'une solution mère aqueuse en polymères cationiques de manière à obtenir une large gamme de concentration (1 à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Un volume précis de chaque solution est versé dans une solution de milieu nutritif (Luria-Bertani Broth, noté LBB) contenant une concentration connue de bactéries (5×10^5 Unités Formant Colonies par millilitre, notée UFC/mL). Les solutions résultantes sont ensuite mises à 37,5°C sous faible agitation (50 rpm) pendant 18h. Des mesures d'absorbance sont ensuite effectuées pour identifier la solution possédant la concentration minimale inhibitrice à la croissance bactérienne (CMI). Visuellement, pour une solution de concentration en polymère inférieure à la CMI, cela se traduit par l'apparition d'une turbidité (**Figure II-32**). Les valeurs de CMI des copolymères cationiques sont répertoriées dans le **Tableau II-7**.

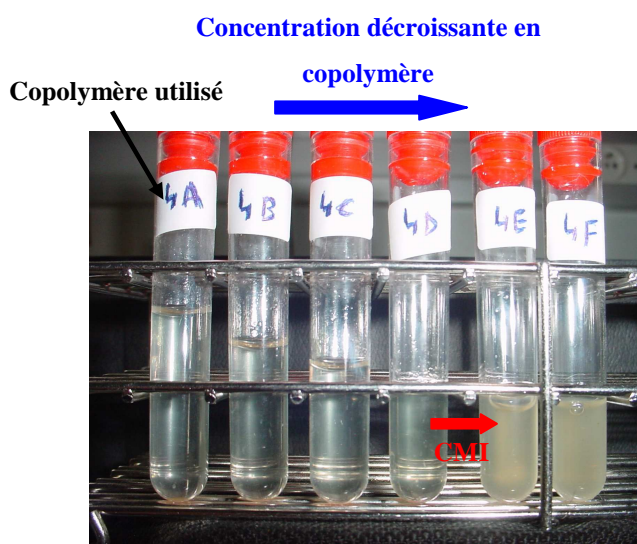


Figure II-32. Détermination visuelle de la CMI.

Tableau II-7. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des copolymères cationiques vis-à-vis des bactéries *E. coli* et *S. epidermidis*.

	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	<i>E. coli</i> (MG1655)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984)
Copolymère 1	25	15
Copolymère 2	ND	ND
Copolymère 3	80	60
Copolymère 4	35	10

Les copolymères **1** et **4** porteurs de groupements ammonium présentent des CMI de 25 et 35 µg/mL vis-à-vis de la bactérie *E. coli* et de 10 et 15 µg/mL vis-à-vis de la bactérie *S. epidermidis*. Le copolymère **3** porteur de groupements phosphonium présente une CMI plus élevée vis-à-vis des deux bactéries. Concernant le copolymère **2** porteur de groupements triphénylphosphonium, les CMI n'ont pas pu être déterminées car ce polymère n'est pas bien soluble dans l'eau ou dans d'autres mélanges permettant la croissance bactérienne (ex : eau/DMSO 97/3)⁵⁹.

Les différents résultats obtenus permettent de retenir 2 points :

- Les copolymères cationiques **1** et **4** présentent une efficacité bactéricide supérieure à celle du copolymère **3** vis-à-vis des bactéries *E. coli* et *S. epidermidis*.
- La bactérie *E. coli* est plus résistante que la bactérie *S. epidermidis* vis-à-vis des copolymères cationiques synthétisés. Ceci s'explique par sa double paroi membranaire externe (spécifique aux bactéries à Gram négatif) qui forme une meilleure barrière protectrice.

IV.3 Evaluation des propriétés bactéricides des surfaces cationiques : Test

Live and Dead

Les propriétés bactéricides des surfaces cationiques ont été évaluées vis-à-vis des deux bactéries *E. coli* et *S. epidermidis* par microscopie confocale à fluorescence. Pour cela, deux marqueurs fluorescents commerciaux ont été utilisés : le SYTO 9[®] (acide nucléique) et l'iodure de propidium (IP). Ces deux marqueurs se distinguent par leur caractéristique spectrale (SYTO 9[®] : excitation/émission 480/500 nm ; iodure de propidium : excitation/émission 490/635 nm) et leur capacité à interagir avec des cellules bactériennes. Le SYTO 9[®] est capable de marquer tout type de bactéries (mortes ou vivantes) alors que l'iodure de propidium n'est actif que lorsque les parois membranaires bactériennes sont endommagées (bactéries mortes)⁶⁰.

L'association de ces deux marqueurs permet donc de distinguer les bactéries vivantes (le SYTO 9[®] émet dans le vert) des bactéries mortes (l'iodure de propidium émet dans le rouge).

En effet, la fluorescence de l'iodure de propidium est prédominante car il possède un rendement quantique nettement supérieur à celui du SYTO 9®.

Ainsi, une goutte de 15 µL d'un mélange (SYTO 9 + iodure de propidium + suspension aqueuse bactérienne de $3,7 \times 10^8$ UFC/mL) est déposée et étalée via une lamelle en verre sur les surfaces cationiques ainsi que sur les surfaces témoins (PVC et PVC-N₃) (**Figure II-33**). Après un temps de contact de 50 min permettant aux bactéries de sédimenter et de bien s'adhérer en surface, un lavage à l'eau est réalisé afin d'éliminer les bactéries non adhérentes ou adhérentes de manière non spécifique. Puis, une goutte d'eau est déposée et étalée en surface pendant 10 min avant l'observation au microscope confocal à fluorescence.

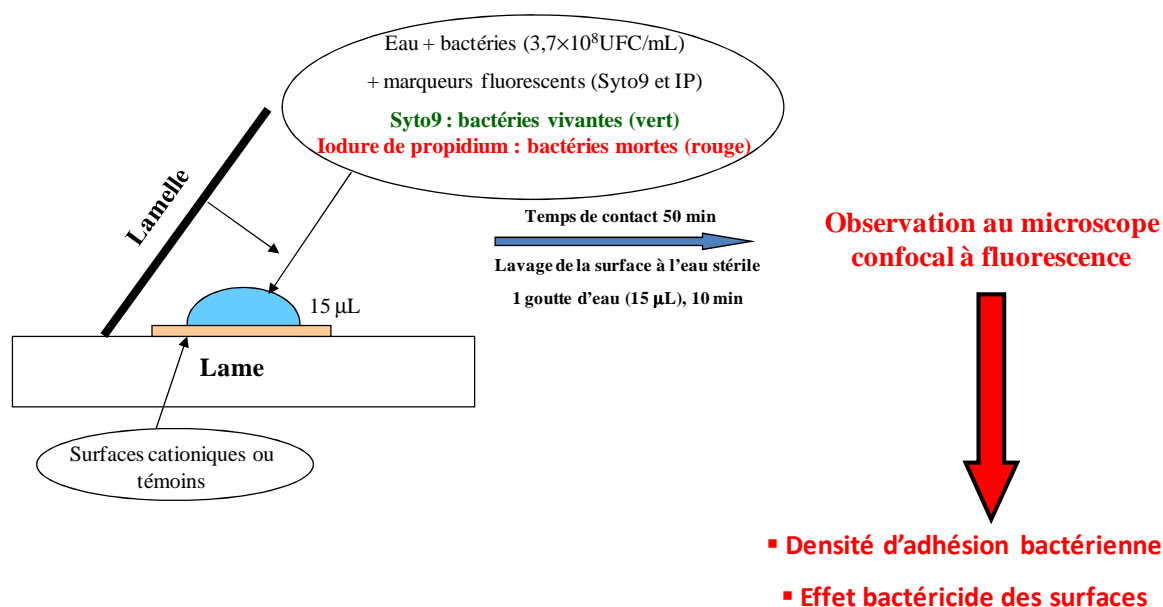


Figure II-33. Protocole opératoire du Test *Live and Dead*

Sur les surfaces cationiques, l'attraction électrostatique entre les groupements phosphonium ou ammonium quaternaire et les parois membranaires des bactéries (chargées négativement) permet à celles-ci de s'adhérer. Par contre, sur les surfaces contrôles (PVC et PVC-N₃), après 50 min de sédimentation, le nombre de bactéries adhérentes est extrêmement faible car aucune interaction électrostatique n'a lieu.

La surface couverte par une bactérie étant d'environ $1 \mu\text{m}^2$, une surface de 1cm^2 peut être recouverte au maximum par 10^8 bactéries si celles-ci sont réparties de manière parfaitement

homogène. Ainsi, les densités de bactéries adhérees dépendant de la densité de charges en surface, ne peuvent excéder 10^8 cellule.cm⁻².

Les densités de bactéries adhérees ainsi que leur taux de mortalité sur les surfaces SAQ, SPQ et les surfaces contrôles sont répertoriés dans le **Tableau II-8**.

Tableau II-8. Propriétés bactéricides des surfaces cationiques vis-à-vis de *E. coli* et *S. epidermidis*

	Densité de <i>E. coli</i> (MG1655) (cellule.cm ⁻²)	Taux de mortalité (%)	Densité de <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984) (cellule.cm ⁻²)	Taux de mortalité (%)
PVC-N ₃ -Copo 1	$5,0 \pm 1,6 \times 10^5$	98	$4,0 \pm 2,0 \times 10^5$	98
PVC-N ₃ -Copo 2	$1,8 \pm 0,4 \times 10^5$	96	$5,7 \pm 1,8 \times 10^5$	86
PVC-N ₃ -Copo 3	$2,8 \pm 0,5 \times 10^5$	95	$1,1 \pm 0,5 \times 10^6$	96
PVC-N ₃ -Copo 4	$5,1 \pm 1,3 \times 10^5$	98	$4,3 \pm 1,9 \times 10^5$	99
PVC-N ₃ *	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0
PVC	0	0	0	0

* Sur certaines zones quelques bactéries ont été détectées sur des surfaces PVC-N₃

Les surfaces SAQ (PVC-N₃-Copo 1 et PVC-N₃-Copo 4) présentent des densités d'adhésion de bactéries *E. coli* de l'ordre de 5×10^5 cellule.cm⁻² et des densités d'adhésion de bactéries *S. epidermidis* de l'ordre de 4×10^5 cellule.cm⁻². Ces surfaces sont hautement bactéricides car le taux de mortalité bactérien avoisine 99% après 1h de contact.

D'après la littérature, les densités de bactéries adhérees sont en accord avec les densités surfaciques de charges obtenues (de l'ordre de 6×10^{14} charge.cm⁻²). Semetey et Kébir¹⁷ ont greffé chimiquement ce type de copolymères sur des surfaces PDMS (via des réactions entre des fonctions alcènes du copolymère et des fonctions Si-H de la surface). Les surfaces SAQ obtenues ont présenté des taux de mortalité variant de 98 à 100% au bout de 30 minutes de contact selon les souches bactériennes mises en présence. Les densités de bactéries *E. coli* variaient de $3,8 \times 10^5$ à $1,6 \times 10^6$ cellule.cm⁻² pour des densités surfaciques de charge variant de 2×10^{14} à $1,2 \times 10^{15}$ charge.cm⁻². Par ailleurs, l'équipe de Matyjaszewski et celle de

Russell^{44,45,46} ont greffé chimiquement un PDMAEMA quaternisé ($M_n > 10000 \text{ g.mol}^{-1}$) sur une surface de polypropylène via la technique ATRP et ont obtenu un taux de mortalité de 100% vis-à-vis des bactéries *E. coli* après 1h de contact.

Les surfaces SPQ (PVC-N₃-Copo **2** et PVC-N₃-Copo **3**) présentent une efficacité bactéricide inférieure à celle des surfaces SAQ. En effet, après 1h de contact, le taux de mortalité est respectivement de 86 et 96% vis-à-vis des bactéries *S. epidermidis* et de 96 et 95% vis-à-vis des bactéries *E. coli*. Cependant, les densités de bactéries *S. epidermidis* adhérentes sur ces surfaces SPQ (de 0,6 à $1,1 \times 10^6 \text{ cellule.cm}^{-2}$) sont supérieures à celles des surfaces SAQ alors que leurs densités surfaciques de charges sont inférieures (environ $1,2 \times 10^{14} \text{ charge.cm}^{-2}$). Les mécanismes d'adhésion de cette bactérie ne semblent donc pas être uniquement gouvernés par des forces d'attraction électrostatique.

Un exemple de cliché pour chaque type de bactérie est présenté en **Figure II-34**.

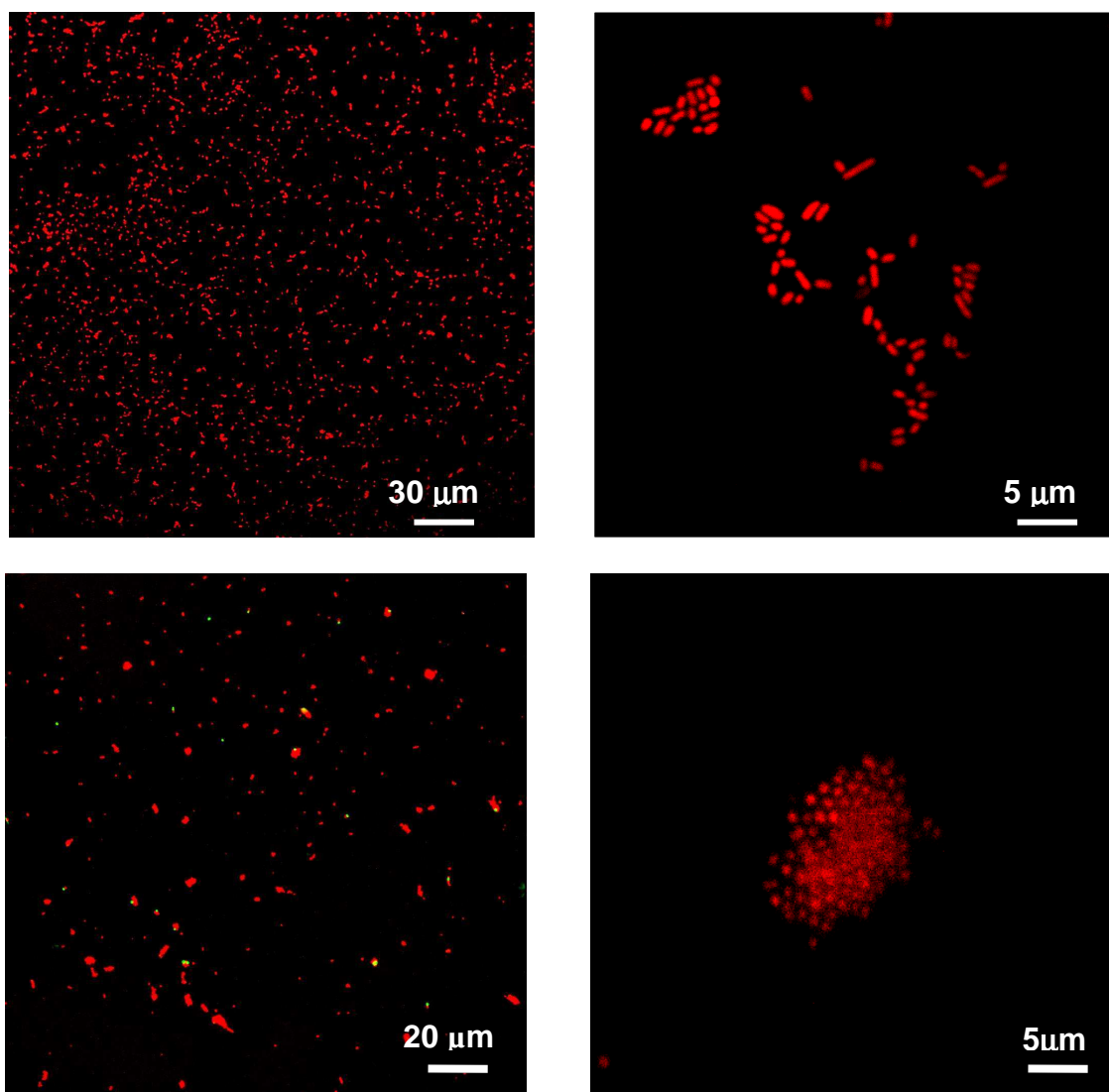


Figure II-34. Test *Live and Dead*: surface PVC-N₃-Copo **4** Haut (*E. coli*), Bas (*S. epidermidis*)

Les surfaces développées possédant des groupements ammonium quaternaire ont montré une efficacité bactéricide supérieure à celles possédant des groupements phosphonium quaternaire, ce qui est en accord avec leur activité en solution (test CMI).

V Conclusion

Quatre copolymères aléatoires cationiques porteurs de groupements alcyne ont été synthétisés, caractérisés par des techniques usuelles d'analyse (IRTF, RMN ^1H , CES, UV-visible, ATG et DSC) et ont révélé une activité bactéricide en solution (CMI). Ces copolymères ont ensuite été greffés avec succès sur des surfaces PVC- N_3 via une réaction de cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire. Les densités surfaciques de charges, variant de $1,1$ à $6 \times 10^{14} \text{ N}^+ \cdot \text{cm}^{-2}$, ainsi que leurs répartitions ont pu être estimées par fluorescence. Les analyses par AFM, XPS et les mesures d'angle de contact (mode statique et dynamique) ont aussi permis de témoigner du greffage chimique de ces copolymères sur les surfaces PVC- N_3 (taux de cycle triazole par motif PVC de l'ordre de 2% selon l'analyse XPS). Par l'intermédiaire de phénomènes électrostatiques, ces surfaces cationiques ont présenté des densités d'adhésion bactérienne élevées variant de $1,8 \times 10^5$ à $1,1 \times 10^6 \text{ cellule} \cdot \text{cm}^{-2}$ vis-à-vis de deux bactéries (*E. coli* et *S. epidermidis*) alors que les surfaces témoins en étaient quasiment dépourvues à cause d'un temps de contact court. Le test *Live and Dead* a permis de vérifier que ces surfaces cationiques étaient hautement bactéricides vis-à-vis des deux bactéries étudiées. Les surfaces possédant des groupements ammonium quaternaire se sont révélées être plus efficaces que celles possédant des groupements phosphonium quaternaire. Toutefois, certains travaux^{61,62,63} ont démontré le caractère cytotoxique des groupements ammonium quaternaire lorsque ceux-ci ne sont pas immobilisés sur une surface (en solution). Cependant, les surfaces cationiques peuvent attirer d'autres espèces chargées telles que les protéines provoquant ainsi sa passivation. L'utilisation de ce type de surfaces sur des implants, en contact direct avec le sang, serait probablement compromettante. Elles pourraient présenter un risque d'apparition de phénomènes de thrombose. En perspective, il serait donc nécessaire d'étudier la biocompatibilité de ces surfaces.

- ¹ Gabriel G.J, Som A., Madkour A.E., Eren T., Tew G.N., *Materials Science and Engineering R* (2007), 57, 1-6, 28–64.
- ² Ikeda T., Ledwith A., Bamford C.H., Hann R.A., *Biochemica et Biophysica Acta* (1984), 769, 1, 57-66.
- ³ Ikeda T., Yamaguchi H., Tazuke S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1984), 26, 2, 139-144.
- ⁴ Ikeda T., Tazuke S., Suzuki Y., *Makromolekulare Chemie* (1984), 185, 869-876.
- ⁵ Kanazawa A., Ikeda T., Endo T., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* (1993), 31, 2, 335.
- ⁶ Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I., El-Shanshoury A., El-Newehy M.H., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* (2002), 40, 14, 2384–2393.
- ⁷ Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I., Shahada L., El-Shanshoury A., El-Newehy M.H., *Journal of Applied Polymer Science* (2006), 102, 5, 4780–4790.
- ⁸ Ikeda T., Hirayama H., Yamaguchi H., Tazuke S., Watanabe M., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1986), 30, 132-136.
- ⁹ Kenawy E.R., Worley S.D., Broughton R., *Biomacromolecules* (2007), 8, 5, 1359-1384.
- ¹⁰ Kanazawa A., Ikeda T., Endo T., *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* (1993), 31, 6, 1441-1447.
- ¹¹ Chen C.Z., Beck-Tan N.C., Dhurjati P., van Dyk T.K., LaRossa R.A., Cooper S.L., *Biomacromolecules* (2000), 1, 3, 473–480.
- ¹² Tiller J.C., Liao C.J., Lewis K., Klibanov A.M., *Proceedings of the National Academy of Science* (2001), 98, 5981–5985.
- ¹³ Tiller J.C., Lee S.B., Lewis K., Klibanov A.M., *Biotechnology and Bioengineering* (2002), 79, 4, 465–471.
- ¹⁴ Kanazawa A., Ikeda T., Endo T., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* (1993), 31, 2, 335-343.
- ¹⁵ Kanazawa A., Ikeda T., Endo T., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* (1993), 31, 6, 1441-1447.
- ¹⁶ Bouloussa O., Rondelez F., Semetey V., *Chemical Communications* (2008), 8, 951-953.
- ¹⁷ Semetey V., Kébir N., WO patent No. 2008041187, 2008.
- ¹⁸ Ikeda T., Tazuke S., *Die Makromolekulare Chemie Rapid Communications* (1983), 4, 7, 459–461.
- ¹⁹ Ozden S., Celik S.U., Bozkurt A., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* (2010), 48, 22, 4974–4980.
- ²⁰ Zang Y.L., Xu W.J., Qiu D.Y., Chen D., Chen R., Su S.P., *Thermochimica Acta* (2008), 474, 1-2, 1–7.
- ²¹ Xie W., Gao Z.M., Pan W.P., Hunter D., Singh A., Vaia R., *Chemistry of Materials* (2001), 13, 9, 2979-2990.
- ²² Xie W., Xie R.C., Pan W.P., Hunter D., Koene B., Tan L.S., Vaia R., *Chemistry of Materials* (2002), 14, 11, 4837-4845.
- ²³ Su S.P., Jiang D.D., Wilkie C.A., *Polymer Degradation and Stability* (2004), 84, 2, 269-277.
- ²⁴ You Y.Z., Manickam D.S., Zhou Q.H., Oupicky D., *Journal of Controlled Release* (2007), 122, 3, 217–225.
- ²⁵ Wang Y., Jiang G.H., Zhang M., Wang L., Wang R.J., Sun X.K., *Soft Matter* (2011), 7, 11, 5348-5352.
- ²⁶ Kolb H.C., Sharpless K. B., *Drug Discovery Today* (2003), 8, 24, 1128–1137.
- ²⁷ Bock V.D., Hiemstra H., Maarseveen J. H.-V., *European journal of organic chemistry* (2006), 1, 51–68.
- ²⁸ Zhan W. H., Barnhill H. N., Sivakumar K., Tian H., Wang Q., *Tetrahedron Letters* (2005), 46, 10, 1691–1695.
- ²⁹ Brase S., Gil C., Knepper K., Zimmermann V., *Angewandte Chemie International Edition* (2005), 44, 33, 5188–5240.
- ³⁰ Punna S., Diaz D.D., Li C., Sharpless K.B., Fokin V.V., Finn M.G., *Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry)* (2004), 45, 778-779.
- ³¹ Lee L.V., Mitchell M.L., Huang S.-J., Fokin V.V., Sharpless K.B., Wong C.-H., *Journal of American Chemical Society* (2003), 125, 9588-9589.
- ³² Kameda T., Ono M., Grause G., Mizoguchi T., Yoshiok T., *Polymer Degradation and Stability* (2009), 94, 1, 107–112.
- ³³ Herrero M., Tiemblo P., Reyes-Labarta J., Mijangos C., Reineck H., *Polymer* (2002), 43, 9, 2631-2636.
- ³⁴ Sacristan J., Reinecke H., C. Mijangos C., *Polymer* (2000) 41, 15, 5577–5582.
- ³⁵ Davies M.B., *Polyhedron* (1992), 11, 3, 285-321.
- ³⁶ Creutz C., *Inorganic Chemistry* (1981), 20, 12, 4449-4452.

- ³⁷ Cao P., Xu K., Heath J.R., *Journal of American Chemical Society* (2008), 130, 45, 14910–14911.
- ³⁸ Collman J.P., Devaraj N.K., Eberspacher T.P.A., Chidsey C.E.D., *Langmuir* (2006), 22, 2457–2464.
- ³⁹ Devadoss A., Chidsey C.E.D., *Journal of American Chemical Society* (2007), 129, 5370–5371.
- ⁴⁰ Chen F-F., Wang F., *Molecules* 2009, 14, 7, 2656-2668.
- ⁴¹ Soto G., Sámano E.C., Machorro R., Castellón F.F., Farías M.H., Cota-Araiza L., *Superficies y Vacío* (2002), 15, 34-39.
- ⁴² Kügler R., Bouloussa O., Rondelez F., *Microbiology* (2005), 151, 1341-1348.
- ⁴³ Milovic N.M., Wang J., Lewis K., Klibanov A.M., *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 90, 6, 715-722.
- ⁴⁴ Lee S.B., Koepsel R.R., Morley S.W., Matyjaszewski K., Sun Y., Russell A.J., *Biomacromolecules* (2004), 5, 3, 877-882.
- ⁴⁵ Murata H., Koepsel R.R., Matyjaszewski K., Russell A.J., *Biomaterials* (2007), 28, 32, 4870-4879.
- ⁴⁶ Huang J., Murata H., Koepsel R.R., Russell A.J., Matyjaszewski K., *Biomacromolecules* (2007), 8, 5, 1396–1399.
- ⁴⁷ Lin J., Tiller J.C., Lee S.B., Lewis K., Klibanov A.M., *Biotechnol Lett* (2002), 24, 801-805.
- ⁴⁸ Andrade J.D., Smith L.M., Gregonis D.E., *Surface and interfacial aspect of biomedical polymers* (1985), 1, 272-289.
- ⁴⁹ Eick J.D., Good R.J., Neumann A.W., *Journal of Colloid and interface Science* (1975), 53, 2, 235-238.
- ⁵⁰ Olivier J.F., Huh C., Mason S.G., *Colloids Surfaces* (1980), 1, 1, 79-104.
- ⁵¹ Anthony G.M., *Polymer Degradation and Stability* (1999), 64, 3, 353-357.
- ⁵² Marongiu A., Faravelli T., Bozzano G., Dente M., Ranzi E., *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003), 70, 2, 519-553.
- ⁵³ Pole Santé Sécurité Soins du médiateur de la république (2006),
http://www.securitesoins.fr/fic_bdd/pdf_fr_fichier/12405659920_LES_INFECTIIONS_NOSOCOMIALES.pdf
- ⁵⁴ Higaki S., Morohashi M., Yamagishi T., Hasegawa Y., *International Journal of Dermatology* (1999), 38, 4, 265-269.
- ⁵⁵ Archer G.L., *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, New York: Churchill Livingstone (1995), 1777-1784.
- ⁵⁶ Banerjee S.N., Emori T.G., Culver D.H., Gaynes R.P., Jarvis W.R., Horan T., Edwards J.R., Tolson J., Henderson T., Martone W.J., *The American Journal of Medicine* (1991), 91, 3, supplement 2, S86-S89.
- ⁵⁷ Espersen F., Wurr M., Corneliussen L., Håg A.L., Rosdahl V.T., Frimodt-Møller N., Skinhøj R., *Journal of Medical Microbiology* (1994), 40, 37-42.
- ⁵⁸ Espersen F., Wilkinson B.J., Gahrn Hansen B., Thamdrup Rosdahl V., Clemmensen I., *APMIS* (1990), 98, 1-6, 471-478.
- ⁵⁹ Wadhvani T., Desai K., Patel D., Lawani D., Bahaley P., Joshi P., Kothari V., *The Internet Journal of Microbiology* (2009), 7, 1.
- ⁶⁰ Molecular Probes, product information : <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf>
- ⁶¹ Debbasch C., St Jean M.D., Pisella P.J., Rat P., Warnet J.M., Baudouin C., *Journal Français d' Ophtalmologie* (1999), 22, 9, 950-958.
- ⁶² Fischer D., Li Y.X., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T., *Biomaterials* (2003), 24, 7, 1121-1131.
- ⁶³ Nikawa H., Ishida K., Hamada T., Satoda T., Murayama T., Takemoto T., Tamamoto M., Tajima H., Shimoe S., Fujimoto H., Makihira S., *Dental Materials Journal* (2005), 24, 4, 570-582

I Introduction

Dans ce chapitre, l'objectif principal est de développer de nouvelles surfaces PVC à effets antiadhésifs à l'égard des bactéries. Pour cela, de nouveaux polymères bioactifs porteurs de groupements d'ancrage de type propargyle ont été synthétisés, caractérisés puis greffés sur des surfaces PVC-N₃ par une cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire (**Figure III-1**). Les surfaces ainsi obtenues ont été caractérisées et leurs propriétés antibactériennes ont été évaluées à l'égard des bactéries *S. epidermidis* et *E. coli*.

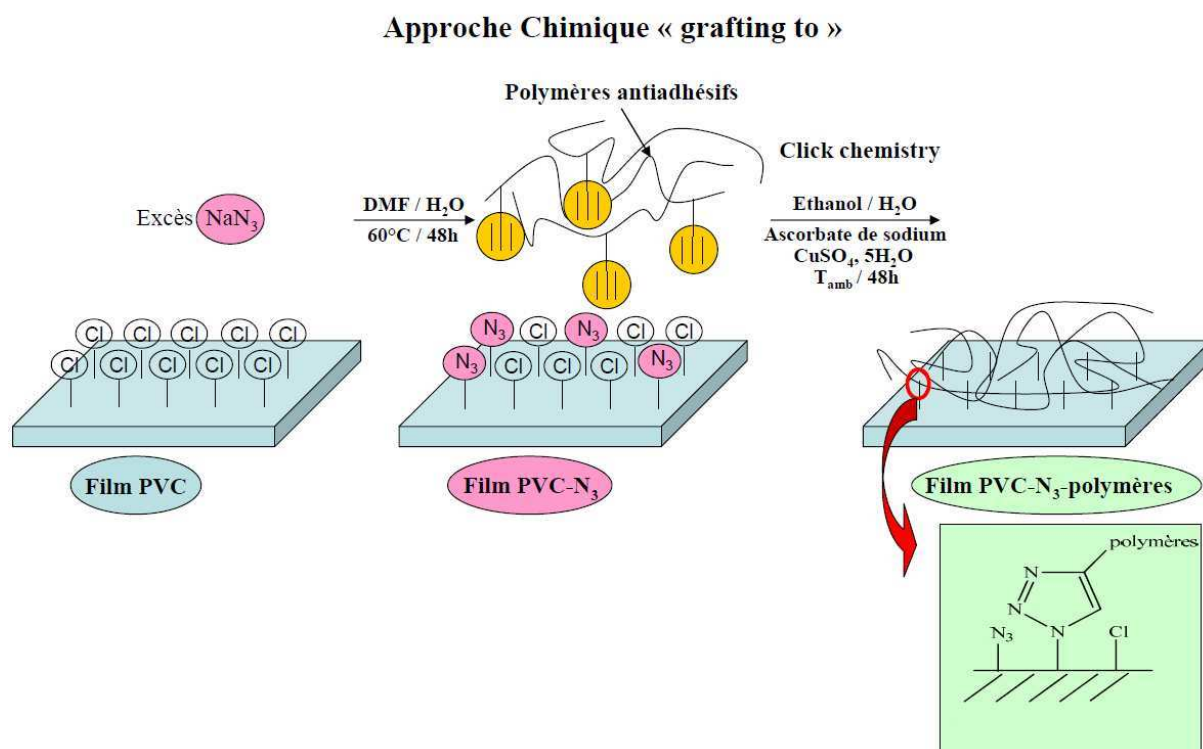


Figure III-1. Stratégie chimique de greffage de polymères antiadhésifs sur des surfaces PVC

II Synthèses et caractérisations physicochimiques des polymères antiadhésifs

II.1 Les copolymères antiadhésifs synthétisés à partir de polysaccharides (copolymères 1 à 5)

Dans le chapitre I, quelques polysaccharides ont été répertoriés en tant qu'agents antiadhésifs une fois immobilisés sur une surface de biomatériaux. Contrairement aux effets connus de l'héparine (polysaccharide porteur de groupements sulfonate), qui agit par répulsion électrostatique, ou du chitosane qui présente un pouvoir bactéricide grâce à ses ammoniums quaternaires, certains dérivés cellulosiques bien que très récemment étudiés^{1,2}, ont développé des propriétés antiadhésives remarquables. Dans ce cadre, deux types de copolymères ont été synthétisés à partir du 2-hydroxyéthyl cellulose et de la méthylcellulose possédant des masses molaires différentes afin d'évaluer l'influence de la longueur des chaînes polysaccharides sur l'effet antiadhésif escompté. Par ailleurs, nous avons voulu tester un autre type de polysaccharide à savoir le dextrane qui est un des exo-polysaccharides secrétés par divers microorganismes tels que les *Leuconostoc mesenteroides*³. En effet, certains travaux ont démontré que les exo-polysaccharides bactériens pouvaient avoir une action antiadhésive à l'égard de certaines bactéries⁴.

La synthèse des copolymères **1** et **2** s'est effectuée à partir du 2-hydroxyéthyl cellulose (\overline{M}_w respectivement de 720 000 g/mol et 250 000 g/mol). Les copolymères **3**, **4** et **5** ont été synthétisés respectivement à partir de la méthylcellulose (\overline{M}_n respectivement de 88 000 g/mol et 110 000 g/mol) et du dextrane (\overline{M}_w de 250 000g/mol) (**Figure III-2**).

Au cours de cette synthèse, des groupements porteurs de fonctions alcyne sont introduits de façon aléatoire sur les chaînes polysaccharides via une réaction de substitution nucléophile. Le pourcentage de modification de groupements hydroxyle visé est de l'ordre de 10%.

Pour cela, une solution de chlorure de propargyle dans le 1,4-dioxane contenant du NaI en quantité catalytique est additionnée à une solution aqueuse de NaOH contenant de l'hydroxyéthyl cellulose, de la méthylcellulose ou du dextrane. Les copolymères **1**, **2**, **3**, **4** et **5** sont obtenus après purification par dialyse et lyophilisation (**Figure III-3**).

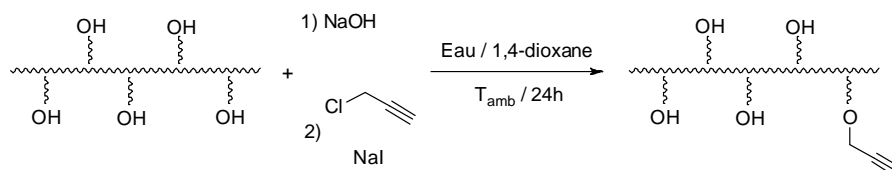


Figure III-2. Synthèse des copolymères 1 à 5

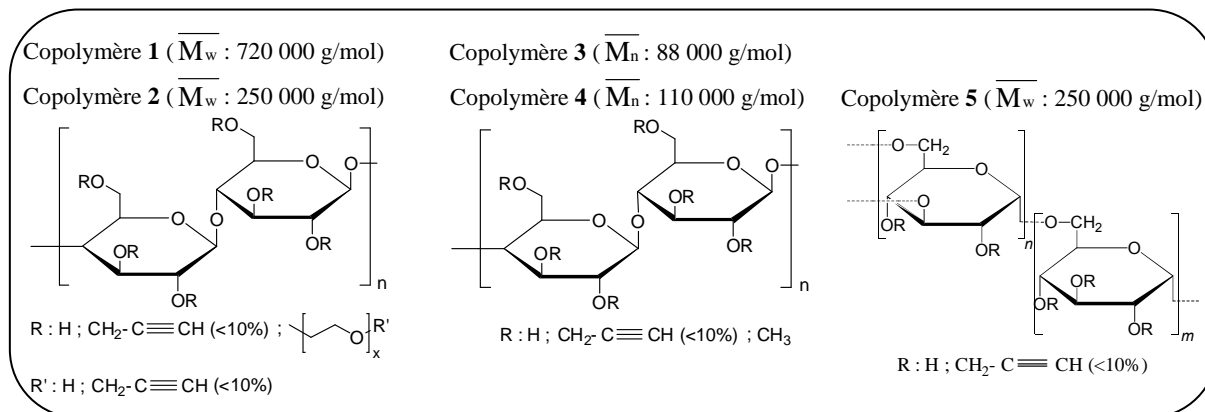


Figure III-3. Structures des copolymères 1 à 5

II.1.1 Caractérisation par IRTF-ATR

Les spectres IRTF des copolymères **1**, **3** et **5** ont été superposés avec ceux de leurs précurseurs, le 2-hydroxyéthyl cellulose, la méthylcellulose et le dextrane (Annexe 3, **Figure A3-1**). Les modifications chimiques des polysaccharides ne sont pas détectables car le taux de modification visé est faible ($\leq 10\%$ des groupements hydroxyle). De plus, la bande de vibration d'élongation de la liaison $\nu_{\text{CH(alcyne)}}$ se situe dans la large bande de vibration des liaisons OH ($3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$).

Toutefois, on peut noter deux points :

- La large bande de vibration des liaisons OH ($3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) est moins intense sur les spectres IRTF de la méthylcellulose et du copolymère **3** que sur les autres polysaccharides confirmant ainsi la méthylation d'une partie des fonctions OH.
- La bande de vibration des liaisons CH ($2990\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) est plus intense sur les spectres du 2-hydroxyéthyl cellulose et du copolymère **2** que sur les autres polysaccharides mettant ainsi en évidence les chaînes latérales PEG.

II.1.2 Caractérisation par RMN ¹H

Les spectres RMN ¹H des polysaccharides précurseurs dans D₂O ont été comparés avec ceux des copolymères **1**, **3** et **5** en vue de caractériser les changements structuraux (**Figure III-4**, **Figure III-5** et **Figure III-6**).

Le spectre RMN ¹H du copolymère **1** révèle le déplacement chimique des protons H9 en position α de l'alcyne (4,21 ppm) caractérisant ainsi la substitution d'une partie des groupements par le chlorure de propargyle (**Figure III-4**). Toutefois, ce déplacement chimique est difficilement quantifiable. Par ailleurs, on retrouve les déplacements chimiques des protons des chaînes PEG latérales et du cycle (4,1 à 2,9 ppm) ainsi que le déplacement chimique des protons H1 en position α des liaisons O-osidiques (4,3 ppm).

A contrario, les protons en position α de l'alcyne du copolymère **3** ne sont pas détectables (**Figure III-5**). En effet, aucun déplacement chimique ne le distingue de la méthylcellulose suggérant un taux de substitution trop faible pour pouvoir être décelé.

Le spectre RMN ¹H du copolymère **5** révèle des déplacements chimiques supplémentaires (par rapport à ceux du dextrane) entre 4.2 et 4.5 ppm (**Figure III-6**). Ces signaux pourraient être attribués aux protons H7 en position α de l'alcyne liés à différents alcools primaires et secondaires.

Dans tous les cas, l'analyse RMN ¹H n'apporte que très peu d'information sur les nouveaux copolymères synthétisés.

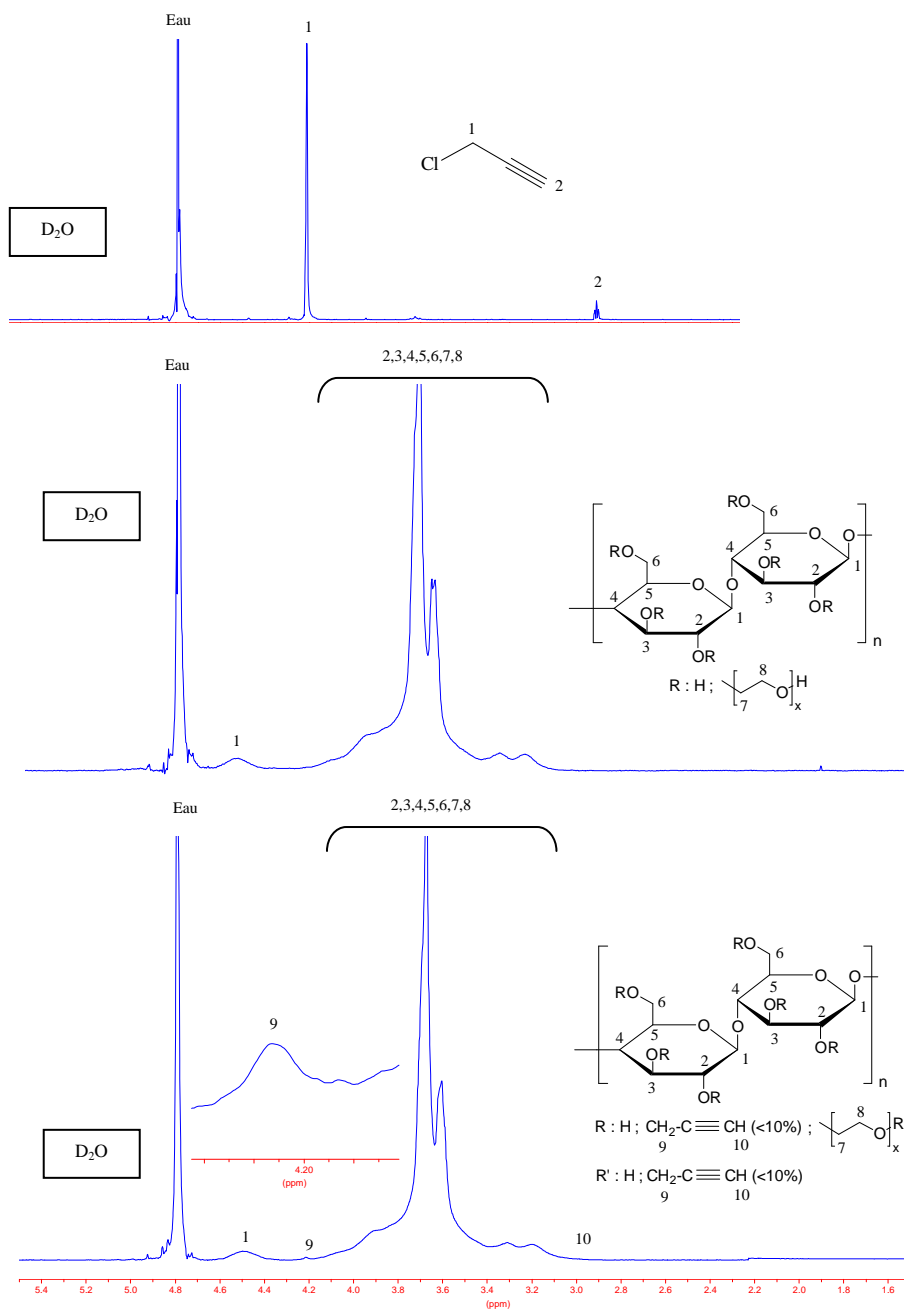


Figure III-4. Spectres RMN ^1H du chlorure de propargyle, du 2-hydroxyéthyl cellulose et du copolymère 1

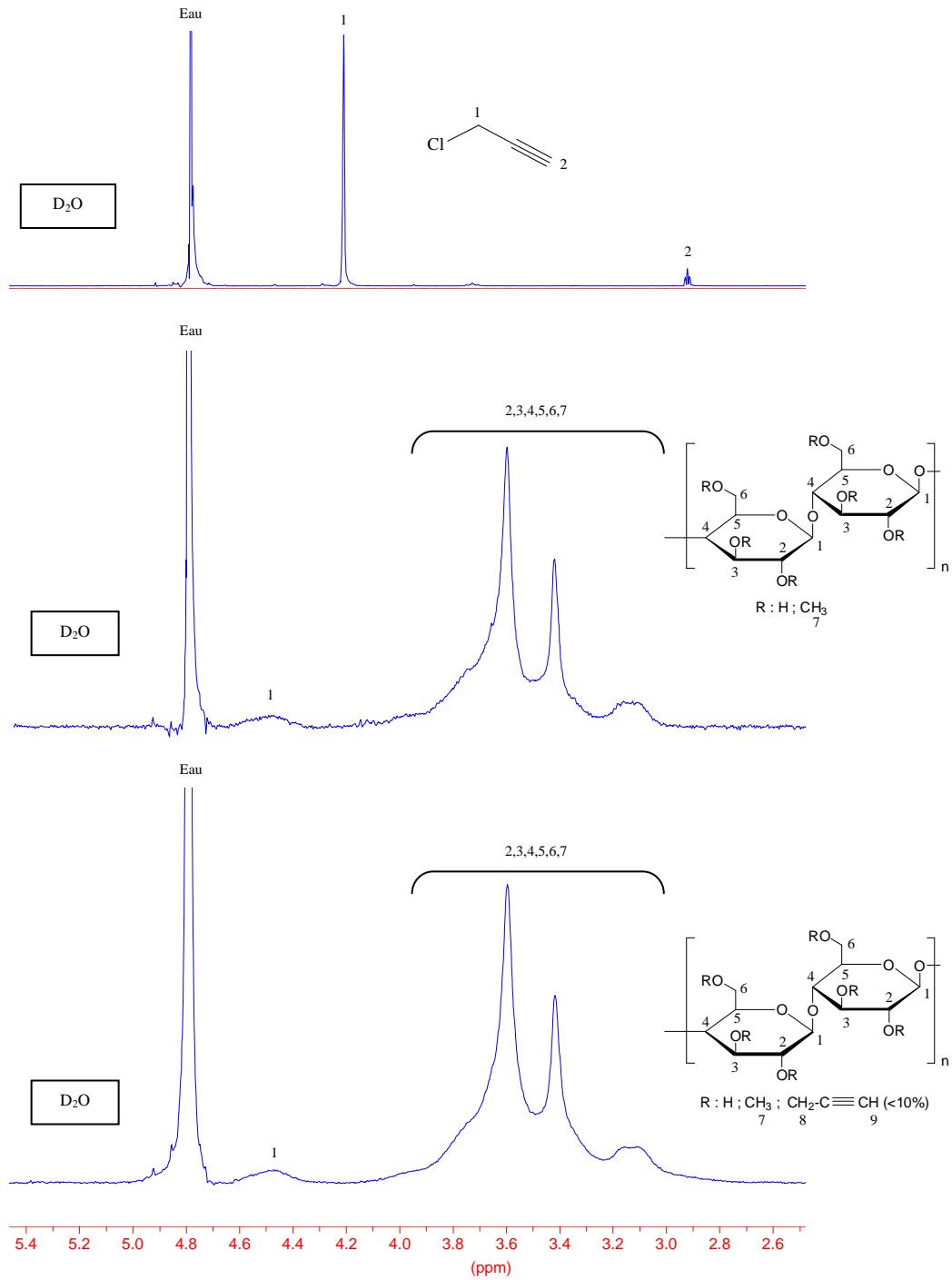


Figure III-5. Spectres RMN ^1H du chlorure de propargyle, de la méthylcellulose et du copolymère 3

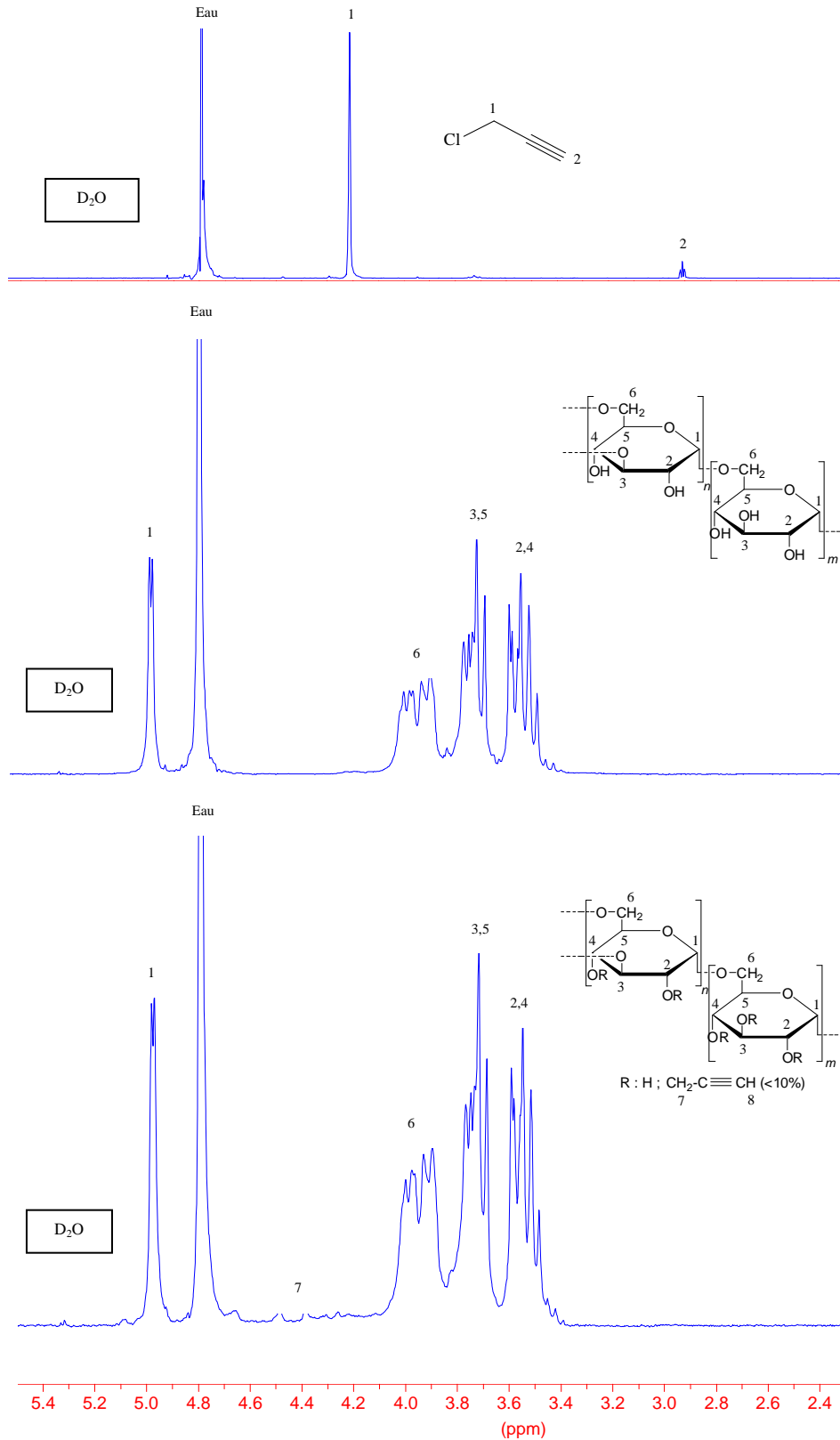


Figure III-6. Spectres RMN ^1H du chlorure de propargyle, du dextrane et du copolymère 5

II.1.3 Analyses thermiques

L'étude des propriétés thermiques des copolymères **1** à **5** a été réalisée par des analyses thermogravimétriques (ATG) et par des analyses enthalpiques différentielles (DSC).

II.1.3.1 Etude de la stabilité thermique par ATG

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage constante de 10°C/min. Les polysaccharides et les copolymères synthétisés ont été séchés sous vide à 60°C une nuit avant l'analyse ATG (désorption des molécules d'eau).

La dégradation du 2-hydroxyéthyl cellulose se déroule en deux étapes⁵ : tout d'abord les chaînes latérales PEG ainsi que certains cycles de la chaîne principale se dégradent (formation et évacuation de CO₂ et d'hydrocarbures), puis s'ensuit une phase de pyrolyse et de carbonisation (**Figure III-7**). La température de première dégradation dépend du degré de substitution DS (nombre moyen d'OH substitués par cycle) et de la masse molaire moyenne. Le nombre moyen de motifs PEG de la chaîne latérale par cycle (MS) influe sur la perte en masse lors de la première étape de dégradation. Pour un même degré de substitution DS, le 2-hydroxyéthyl cellulose est plus stable thermiquement lorsque sa masse molaire moyenne en poids \overline{M}_w est élevée. En effet, la température de première dégradation (T_{d1}) de HEC1 (2-hydroxyéthyl cellulose, $\overline{M}_w = 720000$ g/mol, MS = 2,5, DS = 1,0, $T_{d1} = 270^\circ\text{C}$) est plus élevée que celle de HEC2 (2-hydroxyéthyl cellulose, $\overline{M}_w = 250000$ g/mol, MS = 2,0, DS=1,0, $T_{d1} = 220^\circ\text{C}$). De même, on s'aperçoit que la perte en masse de HEC2 (69%) en fin de première dégradation (autour de 360°C) est inférieure à celle de HEC1 (74%). En effet, plus les chaînes PEG latérales sont longues (MS (HEC1) > MS (HEC2)), plus la perte en masse induite lors de la dégradation sera importante⁶.

En comparant les dégradations thermiques des copolymères **1** et **2** avec celles de HEC1 et HEC2, on pourrait faire le même constat. Toutefois, leur première phase de dégradation est moins brutale, caractérisant ainsi un changement structural. De plus, au-delà de 400°C, la masse résiduelle des copolymères **1** et **2** est plus importante que celle des composés HEC1 et HEC2.

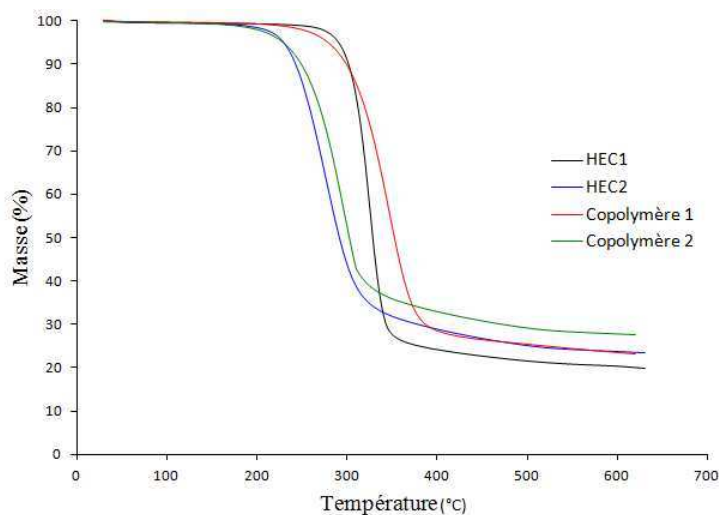


Figure III-7. Analyses ATG des copolymères 1, 2, HEC1 et HEC2

La dégradation thermique des composés méthylcellulose est plus brutale que celle des composés hydroxyéthyl cellulose (Figure III-8). Toutefois, ces polysaccharides ne sont pas fragilisés thermiquement par des chaînes latérales PEG ce qui les rend plus stables⁶. L'analyse ATG des composés MEC1 ($\overline{M}_n = 88000$ g/mol, DS = [1,5-1,9]), MEC2 ($\overline{M}_n = 110000$ g/mol, DS = [1,5-1,9]) ainsi que des copolymères 3 et 4 confirme ces observations ($T_{d1} = 310^\circ\text{C}$). Bien que les copolymères 3 et 4 suivent la même dégradation thermique que MEC1 et MEC2, on s'aperçoit tout de même que la masse résiduelle carbonisée est différente au-delà de 400°C . On peut imaginer, de la même façon que pour les copolymères 1 et 2, un effet du groupement alcyne sur la stabilité thermique à haute température.

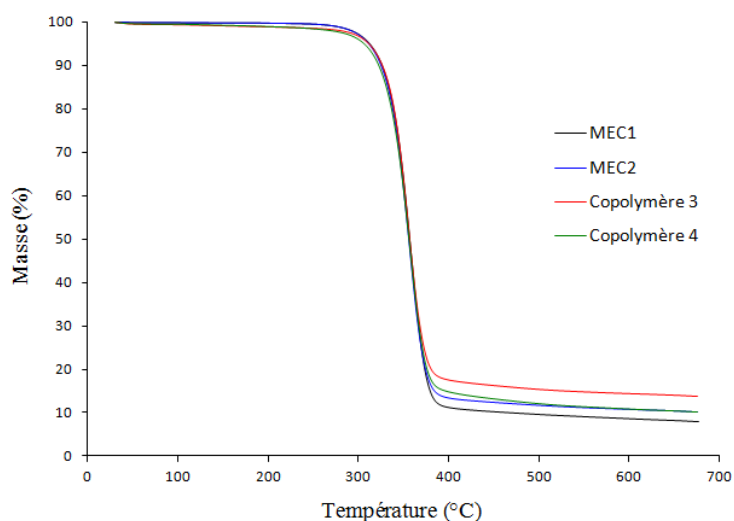


Figure III-8. Analyses ATG des copolymères 3, 4, MEC1 et MEC2

La comparaison de la courbe de dégradation thermique du dextrane et du copolymère **5** permet clairement de mettre en évidence un changement structural : le copolymère **5** se dégrade à une température inférieure à celle du dextrane ($T_{d1}(\text{dextrane}) = 275^{\circ}\text{C}$; $T_{d1}(\text{copolymère } \mathbf{5}) = 260^{\circ}\text{C}$) mais sa dégradation est plus lente (**Figure III-9**). De même que pour les copolymères **1**, **2**, **3** et **4**, on note une masse résiduelle finale carbonisée supérieure à celle du polysaccharide initial. On note aussi que ces composés sont plus hygroscopiques que les composés méthylcellulose et hydroxyéthyl cellulose (malgré le séchage sous vide, une perte de masse de l'ordre de 2 à 3% est décelée).

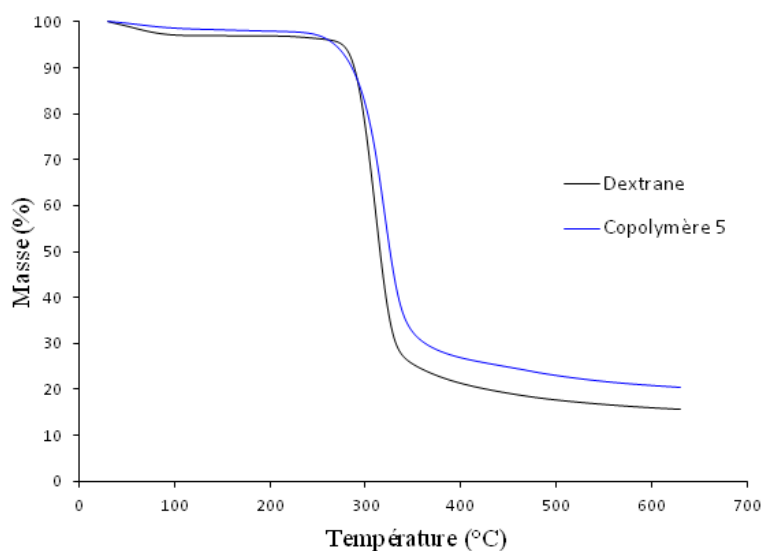


Figure III-9. Analyses ATG du copolymère **5** et du dextrane

En conclusion, les modes de dégradation thermique des copolymères **1**, **2** et **5** se distinguent respectivement des polysaccharides HEC1, HEC2 et dextrane caractérisant ainsi un changement structural (une température de dégradation inférieure, une dégradation plus lente et masse résiduelle finale plus importante). Concernant les copolymères issus des méthylcellulose, le changement structural ne se voit qu'au delà de 400°C.

En outre, la stabilité thermique de tous les composés est cohérente avec la littérature^{7,8}: $T_d(\text{HEC}) < T_d(\text{dextrane}) < T_d(\text{MEC})$.

II.1.3.2 Etude des propriétés thermiques par DSC

Les analyses DSC des copolymères **1** à **5** ont été effectuées sous azote en utilisant une vitesse de chauffage et de refroidissement constante de 10°C/min.

La seconde montée en température a permis de déterminer la température de transition vitreuse (T_g) du copolymère **5** (138°C , $\Delta C_p = 0,6417 \text{ J}/(\text{g}\cdot^\circ\text{C})$) ainsi que celle du dextrane (198°C , $\Delta C_p = 0,3838 \text{ J}/(\text{g}\cdot^\circ\text{C})$). Après le greffage des groupements alcyne, les interactions inter-chaines diminuent (les liaisons hydrogène étant moins nombreuses) ce qui explique la diminution de la température de transition vitreuse.

Les analyses DSC des copolymères **1** à **4** ainsi que celles de HEC1, HEC2, MEC1 et MEC2 n'ont révélé aucune transition vitreuse nette. En effet, ces transitions vitreuses se situent très certainement au-delà des températures de dégradation de ces composés. Les courbes DSC sont répertoriées en Annexe3, **Figure A3-2**, **Figure A3-3** et **Figure A3-4**.

II.2 Le polymère antiadhésif synthétisé à partir d'un poly(éthylène glycol) monométhyl éther (MPEG-0)

Les PEG sont reconnus pour conférer à des surfaces des propriétés antiadhésives remarquables. Ils ont la particularité d'avoir une chaîne très flexible permettant d'obtenir des densités de greffage très élevées. De plus, les fonctions hydroxyle en bout de chaîne permettent de réaliser aisément des substitutions nucléophiles en vue de greffer d'autres groupements fonctionnels. Chen *et al.*⁹ ont testé l'adsorption de certaines protéines plasmatiques sur des surfaces PDMS sur lesquelles ont été greffées chimiquement des chaînes PEG mono ou bifonctionnelles de différentes tailles. Au delà de 1000 g/mol , l'effet antiadhésif des chaînes PEG commence à s'estomper. C'est pourquoi un α -hydroxyl, ω -méthoxy PEG (MPEG-0) d'une masse molaire moyenne en poids \overline{M}_w de l'ordre de 750 g/mol a été choisi pour réagir avec le chlorure de propargyle de manière à lui conférer une fonction d'ancrage en bout de chaîne (MPEG-1) (**Figure III-10**).

Ainsi, dans un premier temps, un groupement alcoolate est formé en bout de chaîne du PEG lors d'une réaction avec NaH dans le THF à 0°C . On ajoute ensuite progressivement un excès de chlorure de propargyle. Après 24h de réaction à 45°C , le solide formé est lavé et séché de manière à évacuer le chlorure de propargyle n'ayant pas réagi.

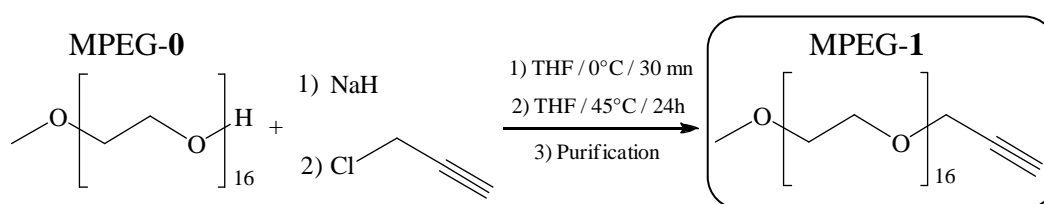


Figure III-10. Synthèse du MPEG-1

II.2.1 Caractérisation par IRTF-ATR

Les spectres IRTF des MPEG-0, MPEG-1 et du chlorure de propargyle ont été superposés dans la **Figure III-11**. La disparition de la bande de vibration d'élongation de la liaison O-H (entre 3600 et 3300 cm^{-1}) ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande de vibration $\nu_{\text{CH(alcyne)}}$ à 3245 cm^{-1} caractérise la réaction de substitution effectuée. De plus, les bandes de vibration des liaisons C-H (CH_2Cl) (1265 cm^{-1}) et C-Cl (707 cm^{-1} ; 642 cm^{-1}) caractéristiques du chlorure de propargyle ont totalement disparu : l'excès de chlorure de propargyle a bien été évacué.

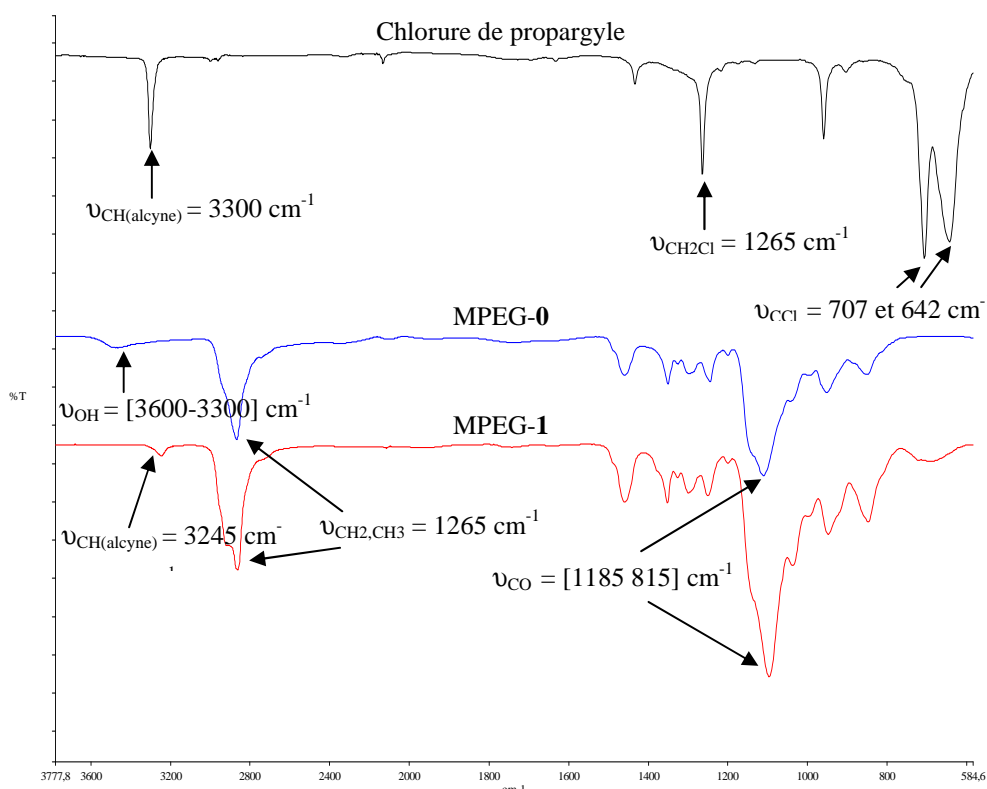


Figure III-11. Spectres IRTF des MPEG-0, MPEG-1 et du chlorure de propargyle

II.2.2 Caractérisation par RMN ^1H

Les analyses RMN ^1H des MPEG-0, MPEG-1 et du chlorure de propargyle ont été réalisées dans le solvant CDCl_3 (**Figure III-12**).

Le spectre RMN ^1H du MPEG-1 met en évidence le déplacement chimique des deux protons H3 en position α de l'alcyne (4,19 ppm). L'intégration de ce déplacement chimique (1,8H) confirme les résultats obtenus par l'analyse IRTF-ATR. En effet, la réaction de substitution

nucléophile est quantitative. De même, le déplacement chimique du proton H4 de l'alcyne se révèle à 2,4 ppm intégrant pour 0,8H. L'intégration des déplacements chimiques des protons H2 de la chaîne PEG (62,5±0,5H) permet d'estimer la masse molaire moyenne en nombre de MPEG-0 et MPEG-1 : \overline{M}_n (MPEG-0)= 719,5±5,5 g/mol ; \overline{M}_n (MPEG-1)= 757,5±5,5 g/mol. Le calcul est effectué de la façon suivante :

$$\overline{M}_n \text{ (MPEG-0)} = 32 + n \times (14+14+16) ; \text{ avec } 4 \times n = 62,5 \pm 0,5H.$$

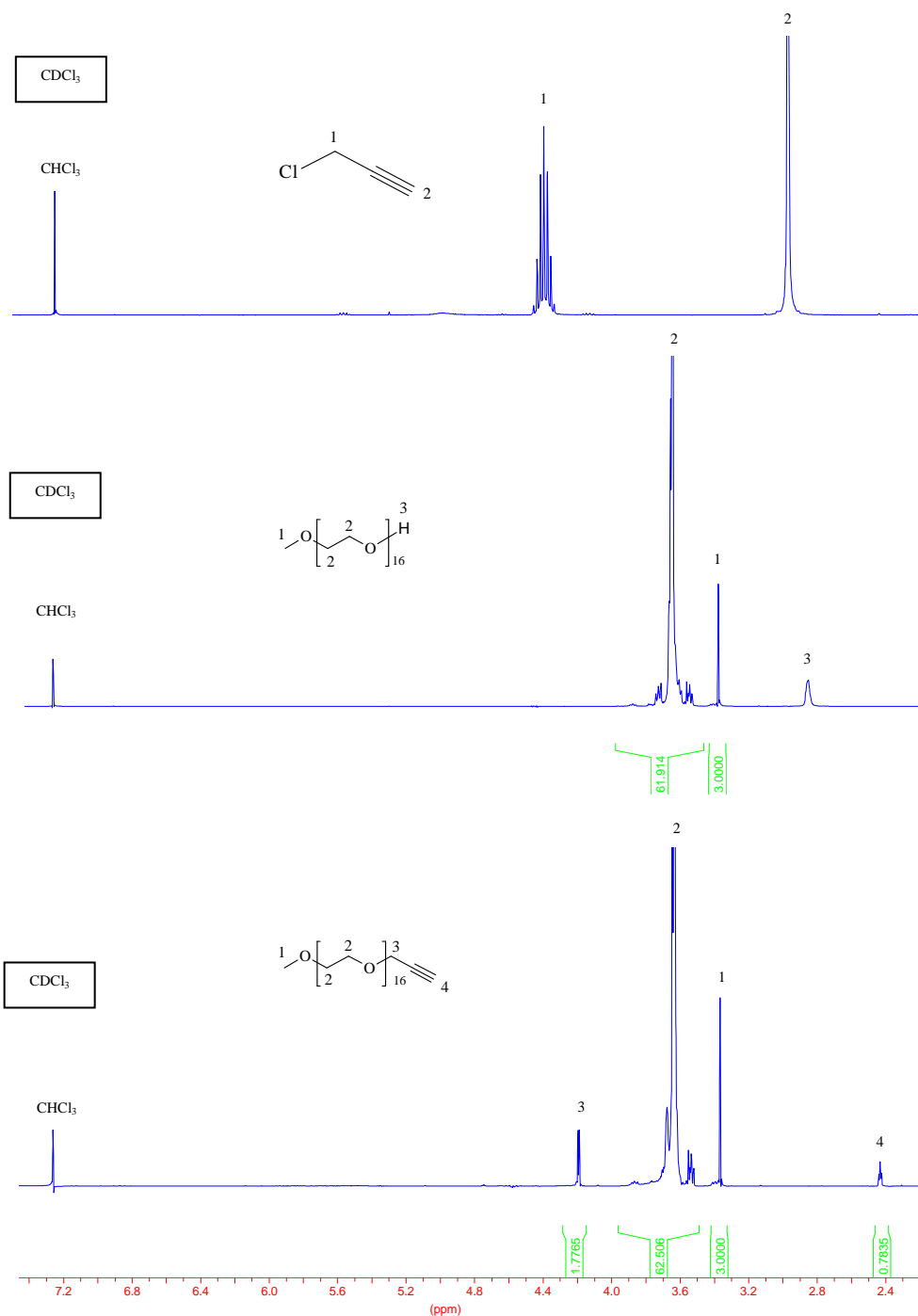


Figure III-12. Spectres RMN ¹H de MPEG-0, MPEG-1 et du chlorure de propargyle

II.2.3 Analyses thermiques

L'étude des propriétés thermiques des composés MPEG-0 et MPEG-1 a été réalisée par des analyses ATG et DSC.

II.2.3.1 Etude de la stabilité thermique par ATG

Les dégradations thermiques de MPEG-0 et MPEG-1 sont présentées dans la **Figure III-13**.

Le processus de dégradation thermique d'un polyéther du type MPEG-0 s'opère par une scission aléatoire des liaisons éther dans la chaîne¹⁰. Autour de 250°C, l'énergie apportée est suffisamment forte pour rompre ce type de liaisons via des mécanismes radicalaires complexes de dégradation.

Le polymère MPEG-1 est moins stable thermiquement que le MPEG-0. Il commence à se dégrader à partir de 150°C. Le processus de scission des chaînes pourrait s'effectuer depuis le groupement alcyne placé en bout de chaîne. Cette analyse met donc en évidence l'importance du groupe terminal sur la stabilité de ce type de polyéther.

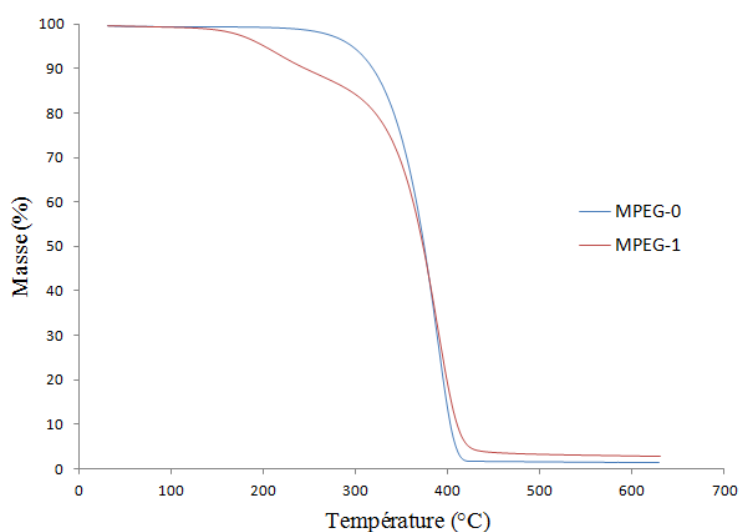


Figure III-13. Analyses ATG de MPEG-0 et MPEG-1

II.2.3.2 Etude des propriétés thermiques par DSC

L'analyse DSC n'apporte aucune information supplémentaire sur le comportement thermique du polymère synthétisé MPEG-1 (**Figure III-14**). En effet, la température de transition

vitreuse n'est pas décelable car elle se situe à des températures inférieures au seuil de détection de l'appareil (autour de -80°C). Seule la température de fusion est visible lors de la deuxième montée en température ($10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$): T_f (MPEG-0) = T_f (MPEG-1) = 27°C . Néanmoins une diminution de l'enthalpie de fusion est observée (ΔH (MPEG-0) = $142,2 \text{ J/g}$; ΔH (MPEG-1) = $104,8 \text{ J/g}$) ce qui met en évidence l'importance des extrémités de chaînes sur le taux de cristallinité.

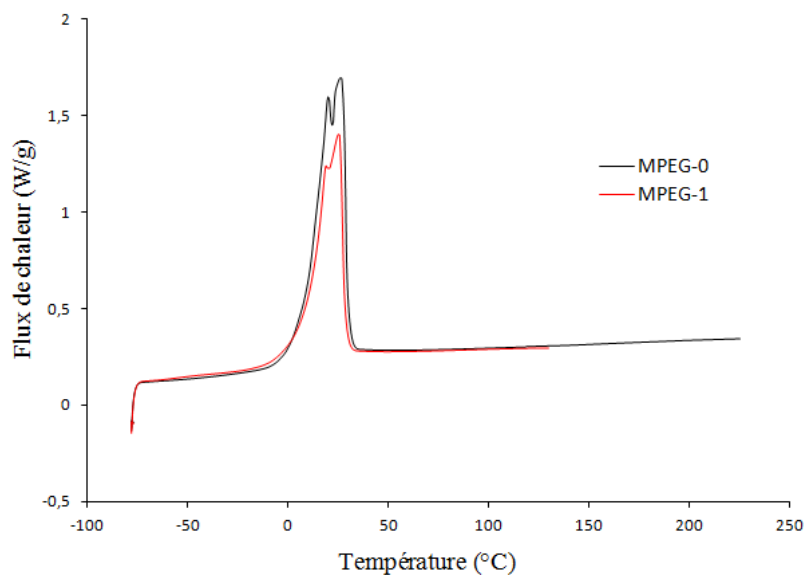


Figure III-14. Analyses DSC de MPEG-0 et MPEG-1

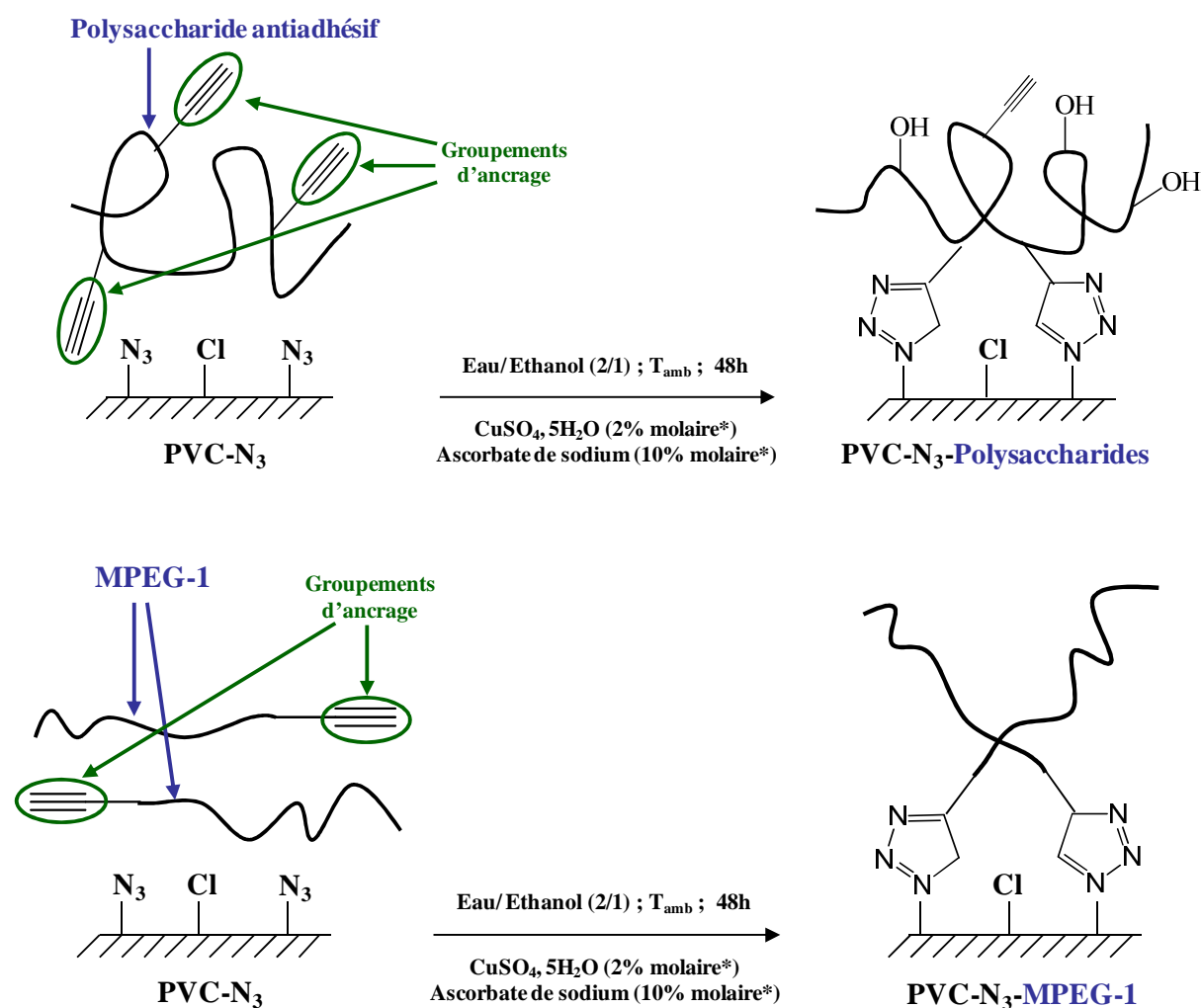
Conclusion

Les analyses IRTF et RMN ^1H ne permettent pas de définir clairement les modifications structurales des polysaccharides lors de la réaction de substitution nucléophile. Les taux de substitution des groupements hydroxyle par le chlorure de propargyle n'ont donc pas pu être estimés via ces techniques d'analyses spectroscopiques. Cependant des changements de dégradation thermique ont été observés (analyses ATG) sur tous les copolymères synthétisés. En revanche, les analyses spectroscopiques (IRTF et RMN ^1H) ont pu révéler l'aspect quantitatif de la réaction nucléophile effectuée sur le polyéther MPEG-0. Le polymère synthétisé MPEG-1 s'est révélé bien moins stable thermiquement que son précurseur (analyses ATG).

III Préparations et caractérisations des surfaces PVC antiadhésives

III.1 Préparations des surfaces PVC antiadhésives

Les polymères antiadhésifs synthétisés ont été greffés sur des surfaces PVC-N₃, par cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire, dans des conditions identiques à celles décrites dans le chapitre précédent (**Figure III-15**).



* Les pourcentages molaires sont donnés en fonction du nombre de moles de motifs porteurs de groupements alcyne

Figure III-15. Greffage de polysaccharides ou de MPEG-1 sur des surfaces PVC-N₃

III.2 Caractérisations physicochimiques des surfaces PVC préparées

III.2.1 Caractérisation par IRTF-ATR

De même que pour les surfaces PVC-N₃ bactéricides, la caractérisation par IRTF des surfaces PVC-N₃ antiadhésives ne permet pas de détecter les copolymères greffés en extrême surface. En effet, ces polymères forment une couche monomoléculaire dont l'épaisseur est nettement inférieure à celle analysée par l'appareil.

III.2.2 Caractérisation par XPS

III.2.2.1 Analyse élémentaire des surfaces

Les surfaces PVC-N₃ greffées par les polysaccharides (méthylcellulose, hydroxyéthyl cellulose et dextrane) et par le PEG ainsi que leurs témoins PVC et PVC-N₃ ont été analysées par XPS. Les spectres complets (Annexe 3, **Figure A3-5**) ont permis l'obtention du pourcentage de chaque élément à partir des aires des pics, Les résultats de l'analyse élémentaire de ces surfaces sont consignés dans le **Tableau III-1**.

Tableau III-1 : Analyse élémentaire par XPS des surfaces greffées et de leurs témoins (PVC et PVC-N₃)

Surface	Analyse élémentaire								
	C (%)	Cl (%)	N (%)	O (%)	Si (%)	N/C (%)	X = % (O)- % (Si) ^a	X/C (%)	Autres (%) ^b
PVC	44,24	8,82	0,00	22,87	21,88	0,0	0,99	2,2	F : 2,18
PVC-N ₃	66,46	15,54	4,27	8,79	3,52	6,4	5,27	7,9	F : 1,41
PVC-N ₃ -Copo 5	58,85	13,09	4,69	13,12	4,05	8,0	9,07	15,4	F : 6,20
PVC-N ₃ -Copo 1	60,50	16,67	4,21	10,88	2,29	7,0	8,59	14,2	F : 5,45
PVC-N ₃ -Copo 3	69,88	14,63	5,13	7,76	1,70	7,3	6,06	8,7	F : 0,91
PVC-N ₃ -MPEG- 1	60,39	9,62	4,45	11,90	3,27	7,4	8,63	14,3	F : 10,37

^a Pourcentage d'oxygène dû à d'autres espèces que le PDMS.

^b La présence du F est due à une contamination de la surface (Gants, peau, pinces...).

Après greffage des polysaccharides et du PEG sur les surfaces PVC la composition élémentaire change de manière significative. Cependant, nous pouvons remarquer encore une fois que le pourcentage du Si des différentes surfaces varie fortement et de manière aléatoire. De plus, une forte contamination par un dérivé fluoré est observée pour trois de ces surfaces. D'autre part, nous pouvons observer l'augmentation du rapport N/C des surfaces greffées par rapport à la surface PVC-N₃. Ceci indique une contamination organique de la surface. Cette contamination peut être due à la présence de protéines naturelles résiduelles contenues dans les polysaccharides. Elle peut aussi être due à l'espèce fluorée détectée en surface.

Nous pouvons aussi constater que le rapport $[(\%O)-(\%Si)]/(\%C)$, représentant l'apport en oxygène en excluant l'oxygène du PDMS, augmente après le greffage des polysaccharides. Cette augmentation peut être attribuée non seulement au polymère greffé mais aussi à l'hygroscopie de la surface et éventuellement aux différents contaminants précités.

III.2.2.2 Etudes structurales

Afin de compléter et d'affiner les résultats de l'analyse élémentaire, des études structurales de la surface ont été réalisées en étudiant les spectres à haute résolution des différents éléments (les pics Cl 2p des spectres XPS à haute résolution sont répertoriés en Annexe 3, **Figure A3-6**).

Surface PVC-N₃-Copo 5 :

La déconvolution du pic du carbone (C 1s) révèle 4 pics (**Figure III-16**). Le pic large centré à 284,78 eV correspond aux carbones des liaisons C-Si, C-C et C-H. Le pic large centré à 286,16 eV correspond aux carbones des liaisons C-N, C-O et C-Cl. Le pic à 287,78 eV correspond à un carbone présentant deux simples liaisons (O-C-O) dans les fonctions hémiacétal et acétal des polysaccharides. Ce pic peut aussi correspondre à un carbone établissant une double liaison avec un oxygène (O=C) dans les fonctions amides des éventuelles protéines résiduelles^{11,12}. Le pic à 292,08 eV correspond à une espèce fluorée porteuse d'un groupement CF₃ contaminant la surface.

Le spectre de la zone des énergies de liaisons de l'atome d'azote (N 1s) révèle 4 pics (**Figure III-16**). Les pics à 398,78 et 403,78 eV correspondent aux 1^{er} et 3^{ème} pics de l'azoture. Le pic à 399,98 eV correspond à la fois aux atomes d'azote des azotures, des amines et/ou amides des protéines. Le pic à 401,28 eV correspond aux atomes d'azote du cycle triazole.

Ceci nous a permis de calculer un taux de transformation des azotures en triazoles (τ_{triazol}) à l'aide de l'équation suivante :

$$(\tau_{\text{triazol}}) = \text{Aire (triazole)} / \text{Aire totale} = 0,26.$$

Si on se réfère au taux de substitution des Cl par les N_3 calculé précédemment (0,087), le taux de triazole par motif PVC serait de 2,28% ($100 \times 0,087 \times 0,26 = 2,28$). Ce taux est sous estimé car la contribution des fonctions amides et/ou amines résiduelles est prise en compte dans la valeur de l'aire totale.

Le pic de O 1s est symétrique et ne se prête donc pas à la déconvolution. Ce pic correspond à la fois aux atomes d'oxygène du dextrane, du PDMS et éventuellement des contaminants (protéines, espèce fluorée).

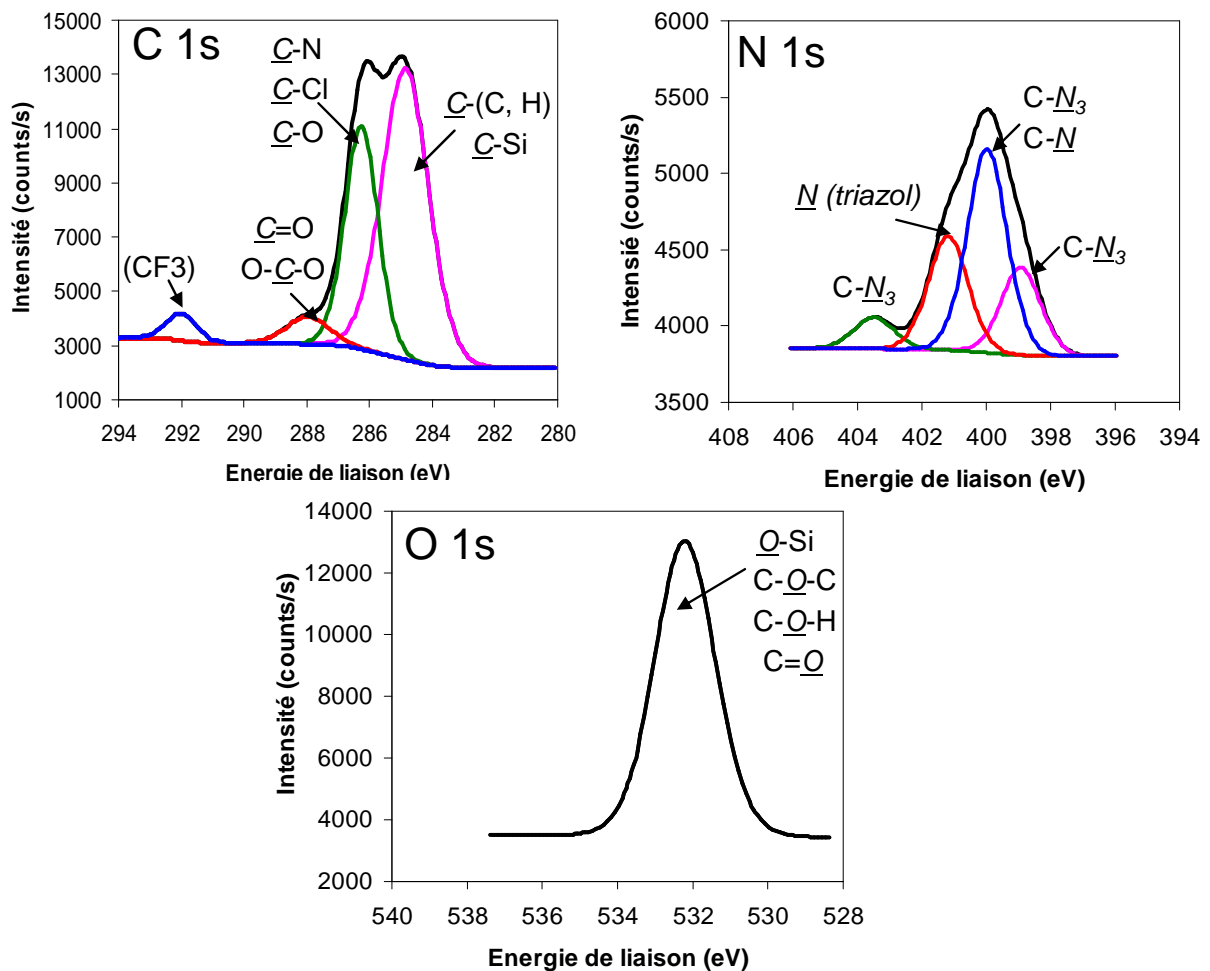


Figure III-16. Pics C 1s, N 1s et O 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 5.

Surface PVC-N₃-Copo 1 :

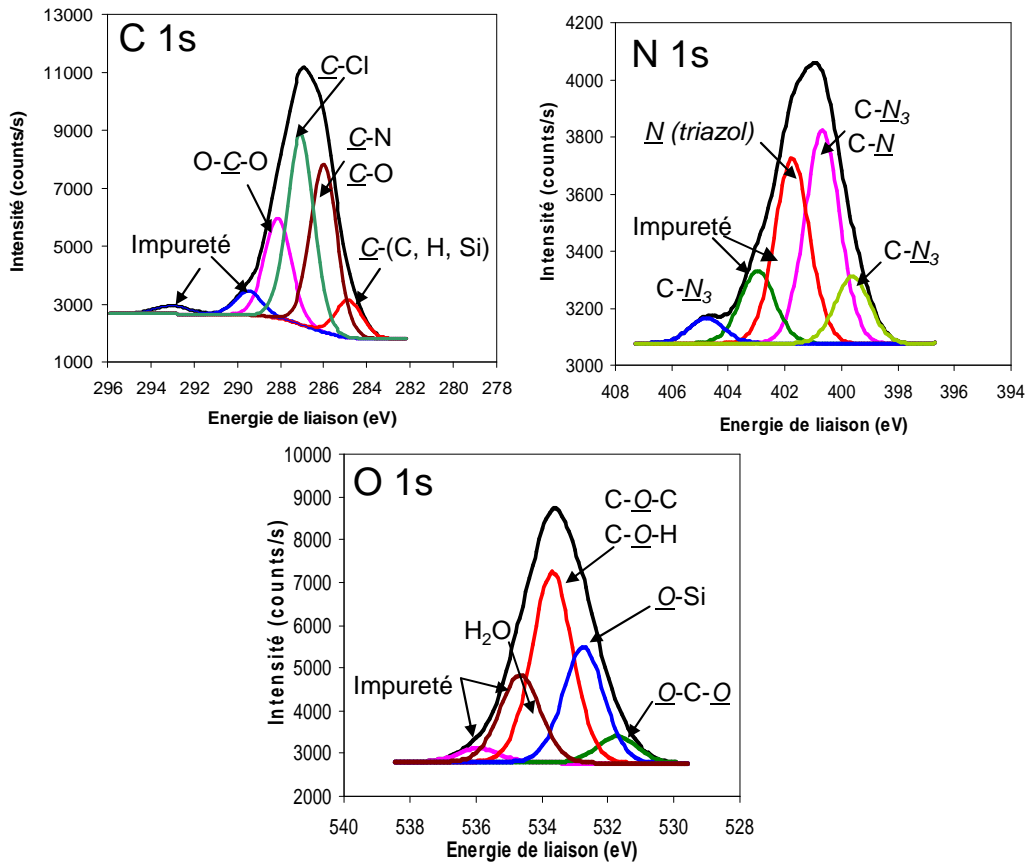


Figure III-17. Pics C 1s, N 1s et O 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 1

Le spectre XPS à haute résolution du carbone C 1s de la surface PVC-N₃-Copo 1 est bien déconvolué du fait de son asymétrie (**Figure III-17**).

Le pic à 285,98 eV correspond aux carbones des liaisons C-N et C-O. Le pic à 286,98 eV correspondant au carbone de la liaison C-Cl se distingue bien cette fois-ci du pic précédent. Le rapport des aires entre le pic de C-Cl et celui des C-N et C-O est en accord avec le rapport des pourcentages de ces hétéroéléments (**Tableau III-1**). Le pic à 289,38 eV correspondrait au carbone d'une fonction acide (O=C-O) portée soit par des protéines résiduelles soit par l'acide ascorbique qui serait resté piégé dans la matrice polysaccharide surfacique. Le pic à 292,88 eV correspond à l'impureté fluorée.

De même que pour la surface PVC-N₃-Copo 5, le spectre XPS à haute résolution de l'azote (N 1s) (**Figure III-17**) révèle les pics des azotures à 399,58, 400,58 et 404,78 eV. Le pic à 400,58 eV pourrait aussi correspondre à des N de fonctions amines ou amides portées par des protéines. Le pic à 401,68 eV correspond aux atomes d'azote du cycle triazole. Le pic à 402,88 eV pourrait correspondre à des ammoniums (C-NH₃⁺) portés par des protéines.

La contribution du triazole ne pouvant pas être déterminée de façon précise (présence d'impuretés), le taux de triazole par motif PVC n'a pas pu être estimé.

Le spectre XPS à haute résolution de l'oxygène (O 1s) (**Figure III-17**) est déconvolué en plusieurs pics confirmant la présence d'impuretés. Le pic à 531,68 eV correspond aux oxygènes des fonctions hémicétyl et acétyl des polysaccharides. Le pic à 532,68 eV correspond à l'oxygène de la liaison O-Si du plastifiant (PDMS). Le pic large centré à 533,68 eV correspond à l'oxygène de l'eau et à ceux des fonctions alcool et éther. Les pics à 534,58 et 535,98 eV correspondent aux impuretés contaminant la surface (protéines, acide ascorbique...).

Surface PVC-N₃-Copo 3 :

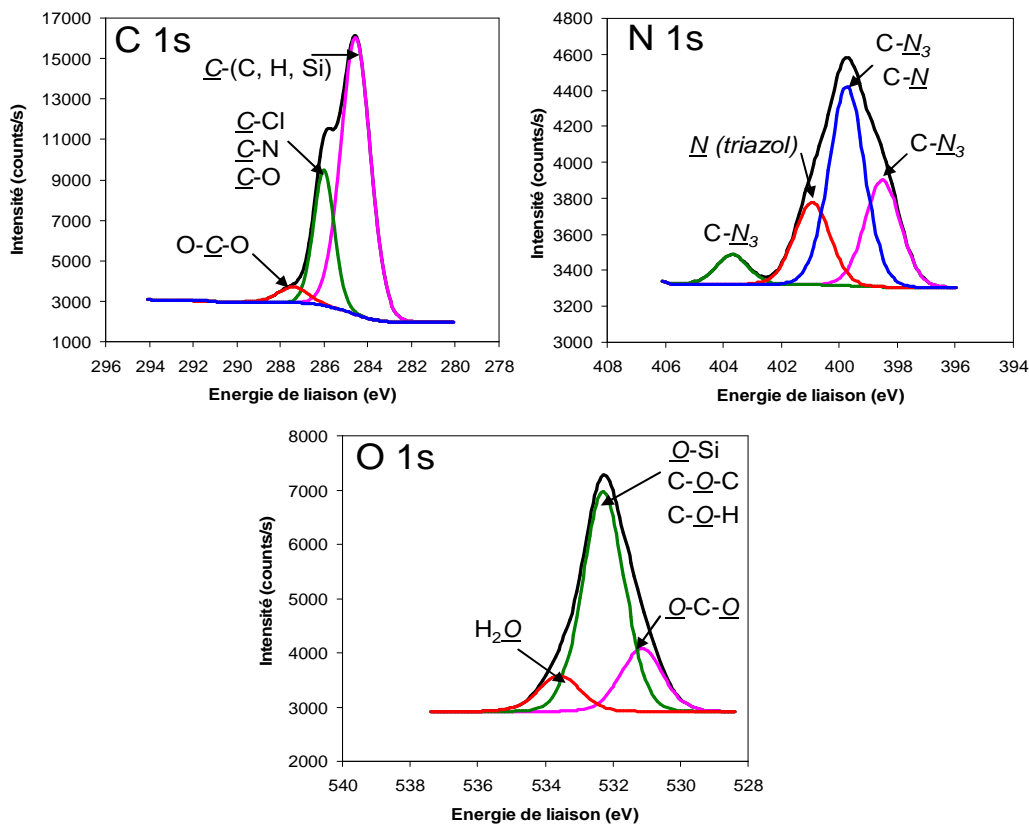


Figure III-18. Pics C 1s, N 1s et O 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-Copo 3

Le spectre de la région de l'azote (N 1s) révèle, en plus des pics des azotures, un pic à 401,18 eV correspondant aux N du cycle triazole (**Figure III-18**). La présence de protéines n'ayant pas été détectée, une estimation précise du taux de transformation des azotures en triazoles a pu être effectuée à l'aide de l'équation suivante : $(\tau_{\text{triazol}}) = \text{Aire (triazole)} / \text{Aire totale} = 0,20$.

Si on se réfère au taux de substitution des Cl par les N₃ calculé précédemment (0,087), le taux de triazole par motif PVC serait de 1,73% ($100 \times 0,087 \times 0,20 = 1,73$).

Le spectre de O 1s révèle un pic à 531,08 eV correspondant aux oxygènes des fonctions acétal et hemi-acétal. Le pic large centré à 532,18 eV correspond aux oxygènes des fonctions alcool et éther. Le pic à 533,48 eV correspond à l'oxygène de l'eau.

Surface PVC-N₃-MPEG-1 :

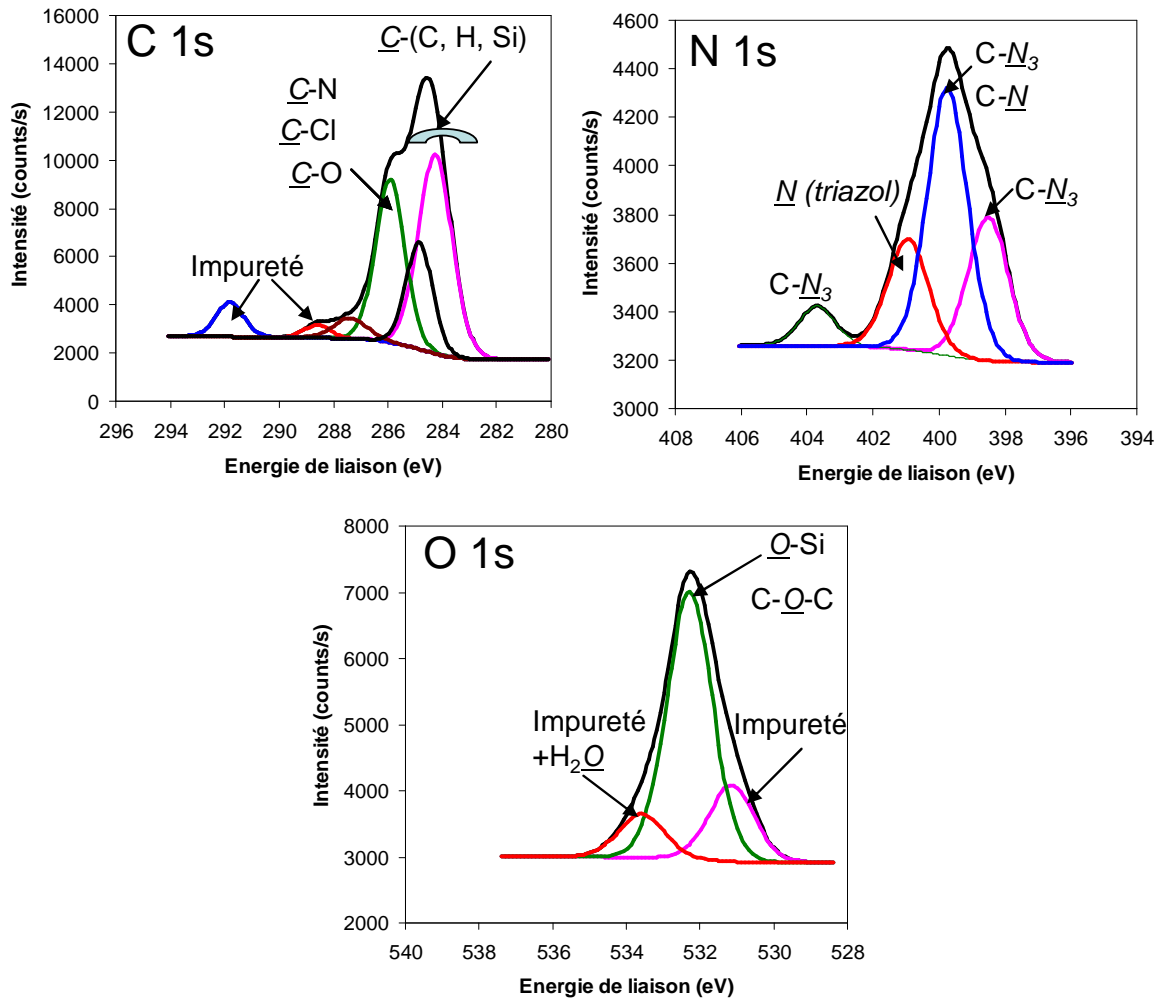


Figure III-19. Pics C 1s, N 1s et O 1s du spectre XPS à haute résolution de la surface PVC-N₃-MPEG-1

Le spectre de l'azote N 1s révèle les trois pics de l'azoture à 398,48, 499,68 et 403,68 eV ainsi qu'un pic à 400,88 eV correspondant aux atomes d'azote des triazoles (**Figure III-19**). Par les deux mêmes relations vues précédemment, on en déduit un taux de triazole par motif PVC de 1,73%.

III.2.3 Caractérisation par Microscopie Confocale à Fluorescence

La fluorescéine isothiocyanate (FITC) est souvent utilisée pour révéler des polysaccharides ou des protéines en microscopie confocale à fluorescence. En effet, sa fonction isothiocyanate réagit avec des groupements amine et thiol des protéines, ou des groupements hydroxyle des polysaccharides. De nombreux kits commerciaux tels que FITC-protéines (FITC-albumine par exemple) ou FITC-polysaccharides (FITC-dextrane) sont utilisés aujourd'hui dans la recherche biomédicale pour étudier la perméabilité et le transport de cellules dans les tissus. De manière à évaluer la répartition des chaînes polysaccharides (copolymères **1** à **5**) sur les surfaces PVC-N₃, une méthode de marquage fluorescent de la surface par la FITC a été envisagée. Les surfaces polysaccharides ainsi que les témoins (PVC et PVC-N₃) ont été immergées pendant 15h à 25°C dans une solution d'acétonitrile contenant un large excès de FITC (**Figure III-20**). Le dibutyldilaurate d'étain (DBTL) a été utilisé pour catalyser la réaction (1% molaire par rapport au nombre de moles de FITC). Après avoir lavé intensivement les surfaces à l'acétonitrile puis à l'eau (afin d'évacuer les molécules FITC n'ayant pas réagi), les surfaces sont observées au microscope confocal à fluorescence (**Figure III-21**).

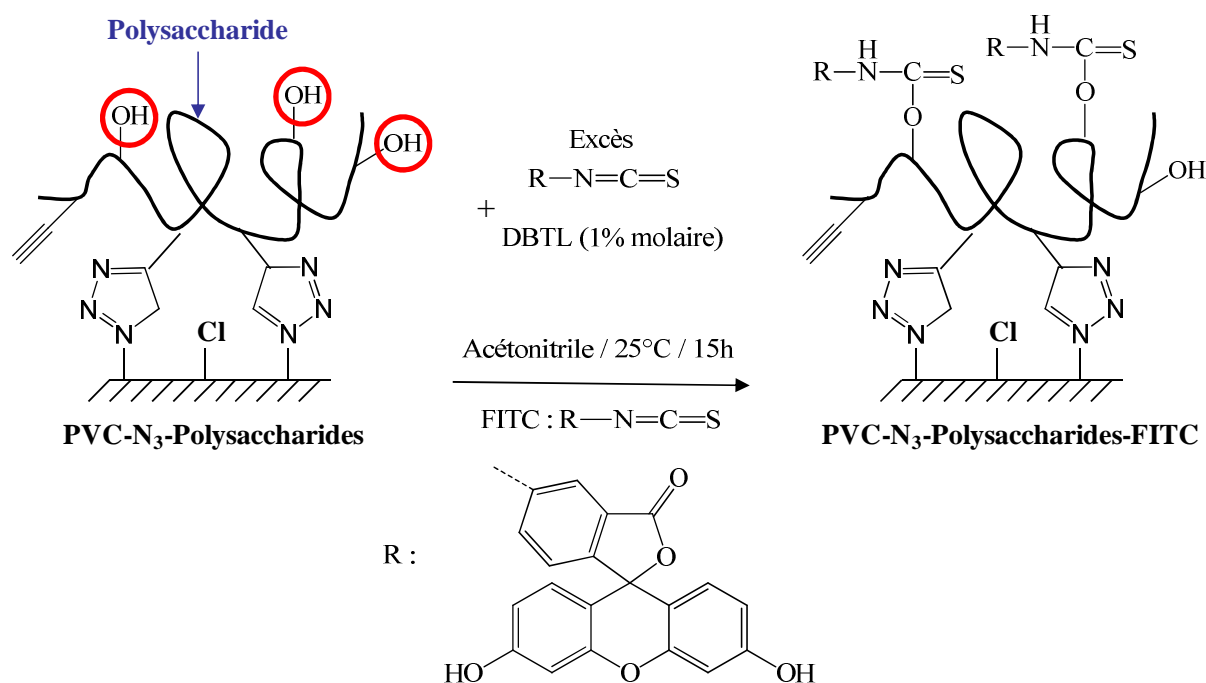


Figure III-20. Réaction de couplage FITC-polysaccharides sur les surfaces polysaccharides développées

L'intensité de fluorescence quasi nulle des surfaces témoins PVC et PVC-N₃ permet d'affirmer que le marqueur FITC ne s'adsorbe pas de manière non spécifique sur ce type de surface ; l'intensité de fluorescence des surfaces polysaccharides provient donc uniquement du couplage FITC-polysaccharides.

Les clichés représentant les cinq surfaces polysaccharides marquées mettent en évidence une homogénéité dans la distribution du marqueur FITC suggérant une homogénéité du greffage des copolymères **1** à **5**. Toutefois, l'intensité de fluorescence n'est pas la même selon le type de polysaccharide immobilisé en surface. Les surfaces PVC-N₃-Copo **3** et PVC-N₃-Copo **4** présentent des intensités de fluorescence plus faibles que les autres surfaces développées : le taux de substitution initial des groupements hydroxyle (DS : 1.5-1.9 groupements méthyle par cycle pour MEC1 et MEC2) entraîne une diminution du nombre de OH par cycle disponibles pouvant réagir avec le marqueur FITC. De même, on remarque que les intensités de fluorescence des surfaces PVC-N₃-Copo **1** et PVC-N₃-Copo **2** sont moins intenses que celle de la surface PVC-N₃-Copo **5**. On peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène. Les copolymères **1** et **2** (issus du 2-hydroxyéthyl cellulose) possèdent des motifs plus volumineux (chaînes latérales PEG) que ceux du copolymère **5** (issu du dextrane). Ainsi, pour un même nombre de OH par motif, la densité de OH sur les surfaces PVC-N₃-Copo **1** et PVC-N₃-Copo **2** est inférieure à celle de la surface PVC-N₃-Copo **5**. On peut aussi imaginer une répartition des chaînes différentes sur la surface selon le type de copolymère immobilisé. Des informations supplémentaires (analyse des surfaces par AFM) sont nécessaires pour pouvoir valider ce genre d'hypothèses.

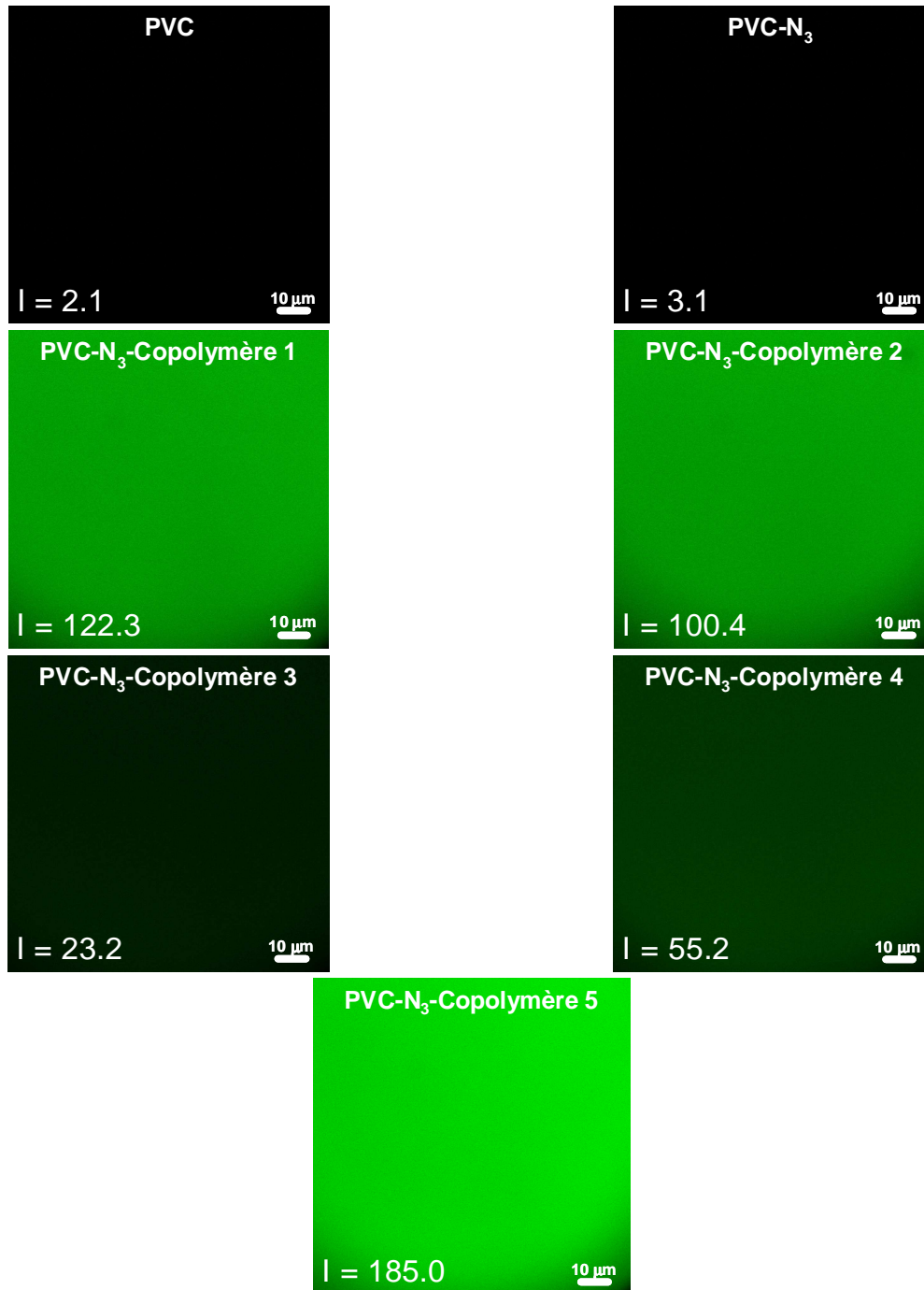


Figure III-21. Clichés des surfaces PVC-N₃-copolymère 1 à 5 et des surfaces témoins marquées par FITC

III.2.4 Caractérisation par microscopie à force atomique (AFM)

Les surfaces PVC-N₃-Copo 1 à 5 et PVC-N₃-MPEG-1 ont été observées par AFM de manière à mettre en évidence les changements topographiques et morphologiques de l'extrême surface après greffage.

Chaque type de copolymère fixé présente une morphologie et une façon d'occuper l'espace qui lui sont propres. Les chaînes des copolymères issus du 2-hydroxyéthyl cellulose (copolymère **1** et copolymère **2**) se répartissent en formant un réseau filamenteux multidirectionnel (diamètre : 5 à 10 nm). Ce phénomène a été observé par AFM sur des fines couches de copolymères hydroxyéthyl cellulose-co-PLA¹³ immobilisées sur des surfaces en silicone. Ce type de morphologie (**Figure III-22**) montre que les chaînes sont étirées et aplaties sur la surface. On remarque que les espaces inter-chaînes sont plus réduits dans le cas du copolymère **2**, ce qui implique une morphologie de type « nid d'abeille ». Ces chaînes se distinguent des chaînes des copolymères issus de la méthylcellulose (copolymère **3** et copolymère **4**) qui s'étalent par petits paquets compacts (diamètre des sphères : 50 à 100 nm) (**Figure III-23**). Elles ne sont donc pas étirées mais recroquevillées sur elles mêmes. Cette particularité provient des propriétés structurales de la méthylcellulose, produite industriellement via une étherification de la cellulose. Toutefois, ce type de substitution est hétérogène¹⁴ ce qui conduit à produire en solution des micro-domaines hydrophobiques (interactions hydrophobiques entre les parties méthylées des chaînes) et hydrophiliques (interactions de type « liaison hydrogène » entre les parties de chaînes non substituées ou peu substituées) présentés sous la forme d'agrégats¹⁵. La méthylcellulose a présenté le même type de morphologie par AFM une fois déposée sur une surface de graphite pyrolytique hautement orienté qu'en solution¹⁶.

Le taux d'hydratation des polysaccharides joue aussi un rôle important dans la morphologie observée sur les clichés AFM. Plus le taux d'hydratation est important, plus les liaisons intermoléculaires seront nombreuses et plus les chaînes auront tendance à se regrouper sous la forme de grosses sphères¹⁷. Ainsi, les chaînes du copolymère **5** issu du dextrane (**Figure III-24**), ayant tendance à s'étaler de manière homogène sur la surface par petits paquets sphériques de 20 à 40 nm, retiennent moins d'eau que les chaînes des copolymères **3** et **4**.

Une étude a mis en évidence la morphologie des chaînes PEG une fois fixées sur une surface silicone¹⁸. La diminution notable de la rugosité ($R_{ms} = 3.1$ nm) et la morphologie type des chaînes MPEG-1 (**Figure III-24**) mettent donc en évidence, non seulement une haute densité de greffage mais aussi une répartition homogène des chaînes sur la surface. De plus, les interactions entre la pointe de l'appareil et les chaînes PEG sont visibles (**Figure III-25**). Ces interactions peuvent s'expliquer par la façon dont sont disposées les chaînes PEG sur la surface. Si les chaînes étaient adsorbées sur la surface, elles seraient étalées de manière

homogène. Or les interactions chaînes-pointe impliquent qu'elles soient disposées en mode « brush », confirmant ainsi que l'on est dans le cas d'un greffage chimique.

Les clichés AFM confirment les résultats obtenus par XPS, à savoir la présence des copolymères de type polysaccharides ou du polymère (MPEG-1) en extrême surface. En termes d'homogénéité de greffage, ces résultats sont aussi en adéquation avec les analyses par microscopie confocale à fluorescence. De plus, l'écart d'intensité de fluorescence entre les surfaces PVC-N₃-Copo 1 et PVC-N₃-Copo 2 et la surface PVC-N₃-Copo 5 noté après le marquage peut s'expliquer par l'observation des clichés AFM. En effet, les chaînes des copolymères issus du 2-hydroxyéthyl cellulose occupent un espace plus important sur la surface PVC-N₃ (espaces inter-chaînes) que celles du dextrane du fait des phénomènes de répulsion stérique ce qui se traduit par une densité de groupements hydroxyle moins importante.

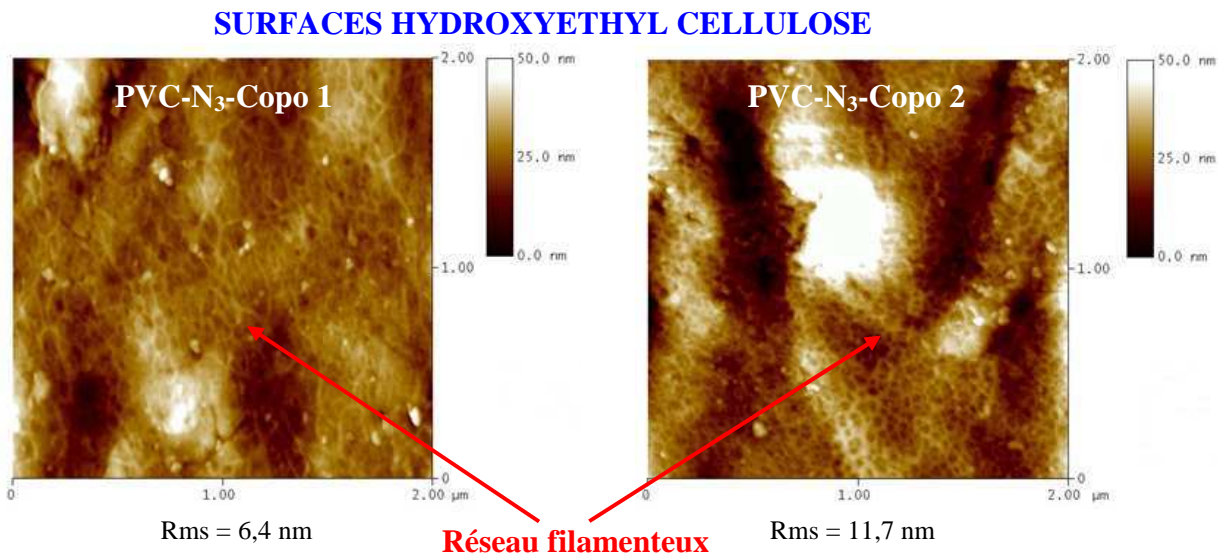


Figure III-22. Images AFM 2D des surfaces PVC-N₃-Copo 1 et PVC-N₃-Copo 2

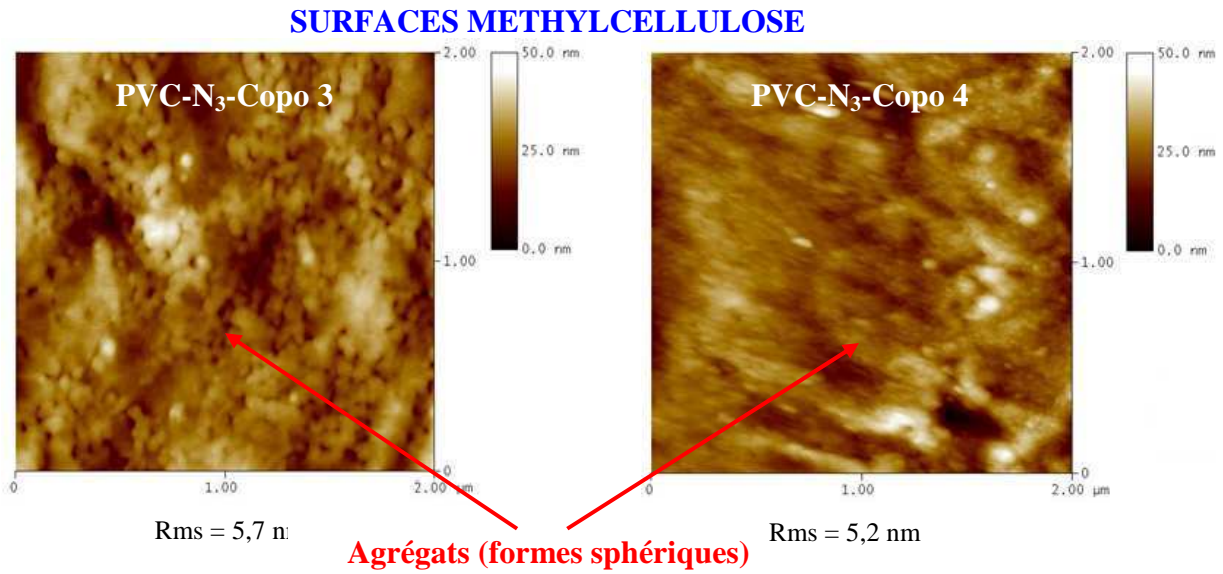


Figure III-23. Images AFM 2D des surfaces PVC-N₃-Copo 3 et PVC-N₃-Copo 4

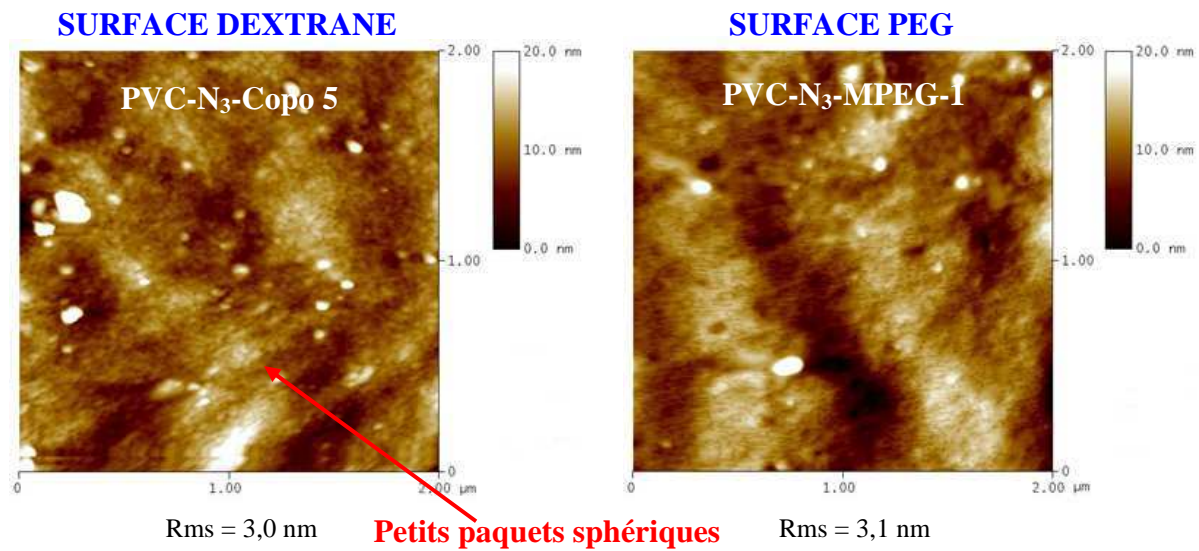


Figure III-24. Images AFM 2D des surfaces PVC-N₃-Copo 5 et PVC-N₃-MPEG-1

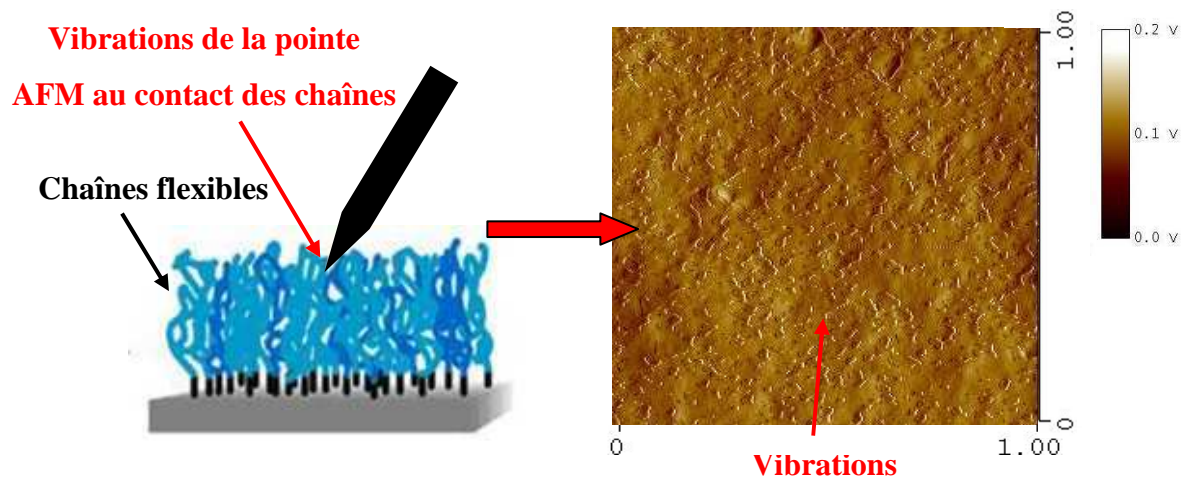


Figure III-25. Image de l'amplitude par AFM de la surface PVC-N₃-MPEG-1

III.2.5 Mesure des angles de contact

III.2.5.1 Mode statique

Les angles de contact statiques des surfaces antiadhésives et des surfaces témoins sont répertoriés dans le **Tableau III-2**.

Le caractère hydrophile des nouvelles surfaces antiadhésives développées est mis en évidence par la diminution de l'angle de contact avec l'eau. Les surfaces greffées par les copolymères issus de l'hydroxyéthyl cellulose (PVC-N₃-Copo **1** et PVC-N₃-Copo **2**) ainsi que la surface PVC-N₃-MPEG-**1** présentent des angles de contact statiques de l'ordre de 70°, avec des polarités de l'ordre de 13,0 %. D'autre part, les surfaces greffées par les copolymères issus du dextrane et de la méthylcellulose (PVC-N₃-Copo **3**, PVC-N₃-Copo **4** et PVC-N₃-Copo **5**) présentent des angles de contact inférieurs (de l'ordre de 60°) avec des polarités variant de 17,6 à 22,3%. Les écarts obtenus en termes de polarité s'expliquent par des balances hydrophile/hydrophobe différentes des polymères greffés en surface.

III.2.5.2 Mode dynamique

Les angles de contact en mode dynamique des surfaces antiadhésives et des surfaces témoins (PVC et PVC-N₃) sont également répertoriés dans le **Tableau III-2**.

Les surfaces développées ne présentent pas d'hystérèses parfaitement reproductibles (écarts types variant de 4° à 6°), ce sont donc des « hystérèses cinétiques » dues à de lents équilibres d'interactions.

En outre, comme pour les surfaces bactéricides, la répartition des polymères antiadhésifs en surface étant homogène et la rugosité surfacique étant inférieure à 100 nm, leurs contributions dans la valeur de l'hystérèse est négligeable^{19,20}.

Par ailleurs, on note une diminution globale des valeurs d'hystérèses après greffage. Les surfaces méthylcellulose (PVC-N₃-Copo **3** et PVC-N₃-Copo **4**) présentent des valeurs d'hystérèses inférieures (de 39° à 46°) à celles des autres surfaces polysaccharides ou PEG (de 50° à 55°). Cela peut s'expliquer en termes de mouillabilité des parties hydrophobes. En effet, l'angle à l'avancée (AA), caractérisant la mouillabilité des domaines hydrophobes, est plus faible pour ce type de surfaces (de l'ordre de 60°). Ceci met en évidence une capacité d'hydratation supérieure des chaînes méthylcellulose à celle des autres copolymères fixés. Ce résultat confirme les morphologies observées par AFM.

Tableau III-2. Angles de contact, énergie de surface et polarité des surfaces antiadhésives ainsi que des surfaces témoins

Surface	Statique	Dynamique			γ^d	γ^p	Polarité
	$\theta_{\text{eau}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{eau}} (^{\circ})$			(mN/m)	(mN/m)	(%)
		AA	RA	Hys			
PVC-N ₃ -Copo 1	70 ± 4	69 ± 3	15 ± 4	55 ± 4	37,4 ± 1,1	5,8 ± 1,6	13,4 ± 3,7
PVC-N ₃ -copo 2	70 ± 3	70 ± 3	17 ± 5	53 ± 6	37,4 ± 0,5	5,5 ± 0,6	12,8 ± 1,5
PVC-N ₃ -copo 3	61 ± 1	60 ± 5	22 ± 4	39 ± 6	39,8 ± 0,6	8,5 ± 0,7	17,6 ± 1,5
PVC-N ₃ -copo 4	60 ± 4	61 ± 5	15 ± 4	46 ± 6	39,0 ± 0,6	9,9 ± 1,5	20,2 ± 3,1
PVC-N ₃ -copo 5	60 ± 2	64 ± 5	15 ± 3	50 ± 4	36,6 ± 0,5	10,5 ± 0,7	22,3 ± 1,6
PVC-N ₃ -MPEG-1	69 ± 2	69 ± 1	13 ± 4	56 ± 3	38,5 ± 0,1	5,6 ± 0,8	12,7 ± 1,8
PVC-N3 (contrôle 2)	78 ± 1	79 ± 5	13 ± 6	65 ± 5	42,3 ± 1,0	3,1 ± 0,1	6,8 ± 0,3
PVC (contrôle 1)	90 ± 3	91 ± 3	47 ± 5	44 ± 6	41,7 ± 0,1	1,0 ± 0,6	2,3 ± 1,4

III.2.6 Analyses thermiques

Les propriétés thermiques des matériaux PVC à surfaces antiadhésives restent inchangées vis à vis des surfaces PVC-N₃ : T_g = 78°C ; T_{d1} = 190°C. Les courbes ATG et DSC sont reportées en Annexe 3, **Figure A3-7** et **Figure A3-8**.

IV Evaluation des propriétés antiadhésives à l'égard des bactéries

Les propriétés antiadhésives des nouvelles surfaces développées ont été évaluées à l'égard des bactéries *E. coli* et *S. epidermidis* par microscopie confocale à fluorescence.

IV.1 Mise en place du protocole

L'objectif principal est de comparer le nombre de bactéries adhérees sur les nouvelles surfaces développées avec le nombre de bactéries adhérees sur les surfaces témoins (PVC et PVC-N₃). Pour cela, il a fallu trouver les conditions opératoires permettant d'obtenir une adhésion bactérienne maximale sur les surfaces témoins.

Chaque surface témoin (0,5 cm x 0,5 cm) est immergée dans un milieu nutritif (Luria-Bertani Broth, LBB) dans lequel est introduit un aliquot de la souche bactérienne considérée. Le mélange est placé sous faible agitation (60 rpm) à 37,5°C pendant un temps t. Les surfaces sont ensuite prélevées, lavées à l'eau stérile (10 min dans un bain d'eau stérile) puis déposées sur une lame de microscopie. Une goutte de 20 µL de SYTO 9[®] est alors étalée sur la surface à l'aide d'une lamelle de verre pendant 15 min afin de marquer les bactéries. L'observation au microscope confocal à fluorescence permet ensuite d'évaluer la densité de bactéries adhérees sur les surfaces témoins.

Les paramètres intervenant dans ce protocole sont : le type de milieu dans lequel la surface est plongée, la température, la vitesse d'agitation et le temps d'incubation. Afin de maintenir le plus longtemps possible les bactéries en vie, le choix du milieu nutritif LBB s'est tout d'abord imposé. Le milieu a été maintenu à 37,5°C car c'est à cette température que l'activité bactérienne atteint son paroxysme. De manière à favoriser le contact des bactéries avec la surface, une faible vitesse d'agitation a été choisie. Toutefois, celle-ci doit être suffisante (60 rpm) pour remuer le milieu nutritif et favoriser la circulation du dioxygène dissous.

Le temps de contact bactérien a tout d'abord été fixé à 48h. En effet, une densité maximale d'adhésion cellulaire est théoriquement obtenue lorsque les bactéries sont dans un état de phase stationnaire (chapitre I, section II). Les résultats obtenus sur les surfaces témoins (**Tableau III-3**) n'ont pas été satisfaisants (nombre de bactéries *E. coli* ou *S. epidermidis* adhérees insuffisant). L'expérience a donc été renouvelée avec un temps de contact bactérien plus long. A partir de 96h, une adhésion bactérienne très importante a été détectée sur les

surfaces PVC et PVC-N₃ avec la souche *E. coli*. Toutefois, concernant la souche *S. epidermidis*, les densités d'adhésion sont restées insuffisantes.

D'autres conditions opératoires ont été testées en vue de maximiser l'adhésion des bactéries *S. epidermidis*. Dans la littérature, une équipe de recherche²¹ a mis au point un protocole d'adhésion conduisant à la formation d'un biofilm avec cette même souche sur une surface PVC. Toutefois, après avoir suivi ce même protocole (agitation de 60 rpm, 37,5°C, 48h), introduit les bactéries dans le même milieu TBS (solution saline tampon) et utilisé les mêmes méthodes de lavage, les densités bactériennes observées par microscopie confocale à fluorescence sont restées du même ordre de grandeur que celles obtenues dans les précédentes analyses (inférieures à 10⁴ cellule.cm⁻²).

Ainsi, l'étude de l'adhésion bactérienne s'est restreinte aux seules bactéries *E. coli*. Le temps de contact a donc été fixé à 96h dans le milieu LBB. Le protocole opératoire est présenté dans la **Figure III-26**.

Tableau III-3. Densités de bactéries *E. coli* et *S. epidermidis* adhérees sur les surfaces témoins après 48h et 96h de contact

	Densité <i>E. coli</i> (MG1655) (cellule.cm ⁻²)		Densité <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35984) (cellule.cm ⁻²)	
	48h	96h	48h	96h
PVC	(5,7±3,6) × 10 ⁵	(9,3±1,9) × 10 ⁶	< 10 ⁴	< 10 ⁴
PVC-N3	(3,6±2,9) × 10 ⁵	(8,3±3,8) × 10 ⁶	< 10 ⁴	< 10 ⁴

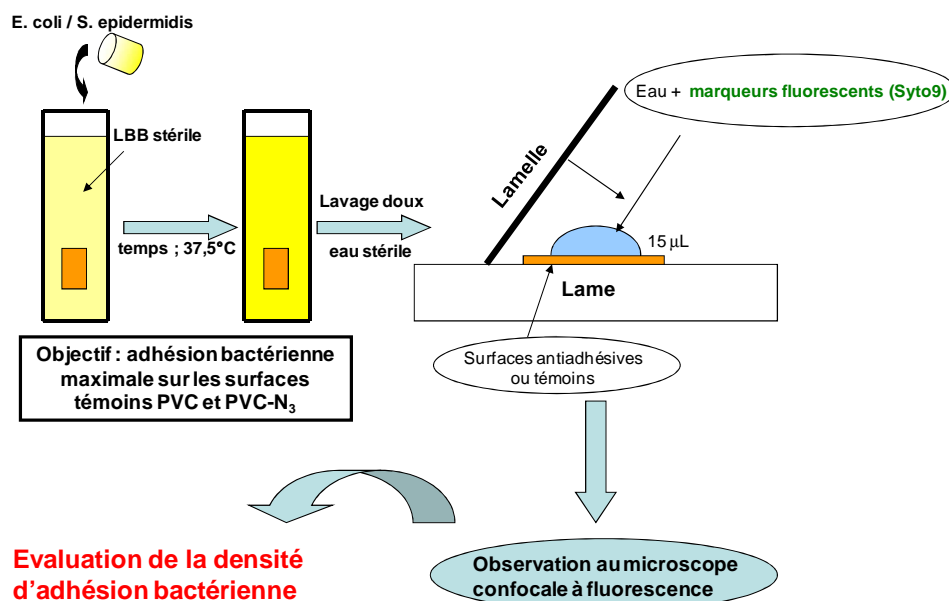


Figure III-26. Protocole opératoire visant à mettre en évidence le caractère antiadhésif des nouvelles surfaces développées.

IV.2 Microscopie confocale à fluorescence

Les densités de bactéries *E. coli* adhérentes sur les surfaces greffées et leurs témoins sont répertoriées dans le **Tableau III-4**.

Sur les surfaces témoins PVC et PVC-N₃, on note des densités d'adhésion bactérienne proches de 10⁷ cellule.cm⁻² ce qui témoigne d'un recouvrement important de la surface (**Figure III-27**).

Sur les surfaces PVC-N₃-Copo **1** à **4** et PVC-N₃-MPEG-**1**, l'estimation de la densité d'adhésion bactérienne est nettement plus complexe (**Figure III-28** et **Figure III-29** et **Figure III-30**). En effet, l'observation du plan focal de la surface ne peut se faire qu'à l'aide de repères. Ces repères sont justement les bactéries adhérentes qui fluorescent. Or sur la très grande majorité de la surface, aucune bactérie n'a été détectée, d'où la difficulté de faire une moyenne statistique avec un écart type cohérent. La microscopie confocale à fluorescence nous apporte la preuve de l'effet antiadhésif apporté par les copolymères **1** à **4** et le MPEG-**1**. Cet effet peut s'expliquer par différentes raisons. Les dérivés de méthylcellulose et d'hydroxyéthyl cellulose possèdent des structures proches du glycocalix, élément constitutif des parois membranaires des cellules. En greffant ce type de polysaccharides sur une surface, on « mime » la structure membranaire protectrice des cellules, provoquant ainsi la chute de l'adhésion bactérienne. L'influence de la longueur des chaînes ainsi que de leurs effets hydrodynamiques perturbateurs en extrême surface est aussi à prendre en compte. Ainsi les masses molaires moyennes utilisées ($\overline{M}_w = 720000$ g/mol et 250000 g/mol pour les copolymères **1** et **2** issus de l'hydroxyéthyl cellulose ; $\overline{M}_n = 88000$ g/mol et 110000 g/mol pour les copolymères **3** et **4** issus de la méthylcellulose) auraient pu jouer un rôle dans le phénomène d'adhésion. Des longueurs de chaînes trop importantes ou trop faibles n'auraient pas l'effet antiadhésif escompté. Toutefois, parce que l'effet antiadhésif s'est révélé identique selon les masses molaires moyennes choisies, les longueurs des chaînes des copolymères synthétisés peuvent être considérées comme faisant partie d'une « gamme idéale d'activité ». Selon ces observations, on peut considérer que les copolymères **1** à **4** issus de polysaccharides (hydroxyéthyl cellulose et méthylcellulose) possèdent un effet antiadhésif remarquable vis-à-vis des bactéries *E. coli*. En effet, l'adhésion bactérienne est au moins 10000 fois inférieure à celles des surfaces témoins.

L'observation d'une forte adhésion bactérienne (6×10⁶ bactérie/cm²) sur la surface PVC-N₃-copo **5** (**Figure III-30**) montre que cette surface n'est pas antiadhésive vis-à-vis de

E. coli. Cette surface à base de dextrane, qui est un exo-polysaccharide bactérien, doit proposer des sites d'adhésion spécifiques aux bactéries *E. coli*.

La surface PVC-N₃-MPEG-1 présente des densités d'adhésion bactérienne du même ordre de grandeur que celles des surfaces PVC-N₃-copolymère 1 à 4. Dans la littérature, il est démontré qu'une haute densité de greffage de chaînes PEG empêche les bactéries d'accéder et de se fixer sur une surface pour deux raisons^{22,23,24,25,26,27,28,29,30}. La première raison vient de la gêne stérique engendrée par l'effet « brush ». La seconde raison vient du caractère hydrophile de ces chaînes. En effet, un film d'eau protecteur se forme au niveau des chaînes PEG empêchant les bactéries ou les protéines de s'adhérer.

Tableau III-4. Densités de bactéries *E. coli* adhérees sur l'ensemble des surfaces développées après 96h de contact

Surface	Densité de bactéries <i>E. coli</i> (MG1655) (cellule.cm ⁻²)
PVC-N ₃ -Copo 1	< 10 ³
PVC-N ₃ -Copo 2	< 10 ³
PVC-N ₃ -Copo 3	< 10 ³
PVC-N ₃ -Copo 4	<10 ³
PVC-N ₃ -Copo 5	(5,87±1,3) ×10 ⁶
PVC-N ₃ -MPEG-1	<10 ³
PVC-N ₃ (contrôle 2)	(8,3±3,8) ×10 ⁶
PVC (contrôle 1)	(9,3±1,9) ×10 ⁶

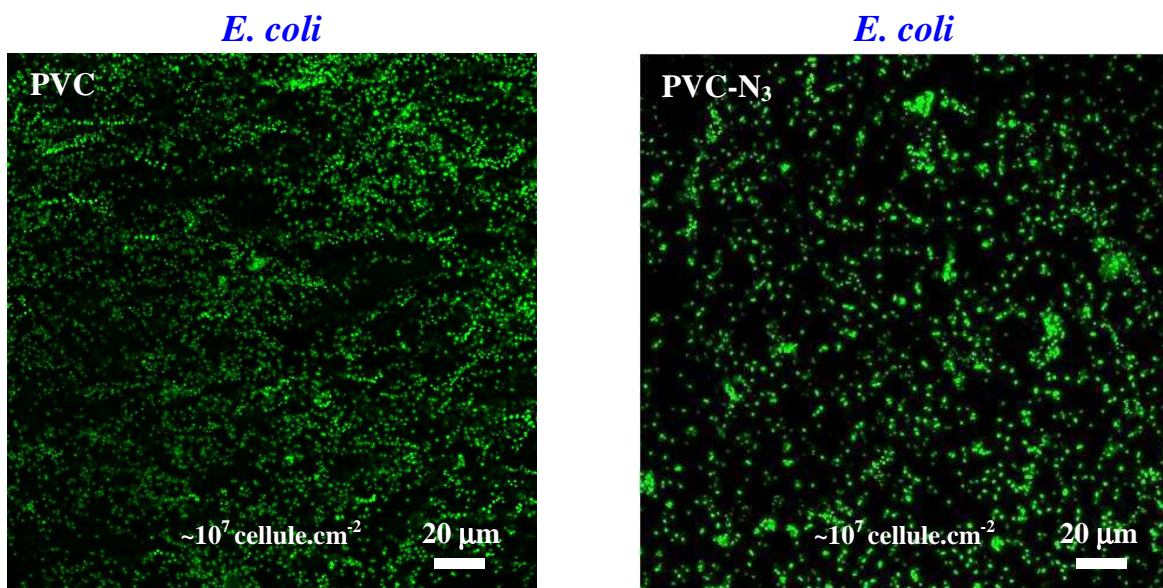


Figure III-27. Images obtenues par microscopie confocale à fluorescence des surfaces témoins PVC et PVC-N₃ après 96h de contact avec *E. coli*.

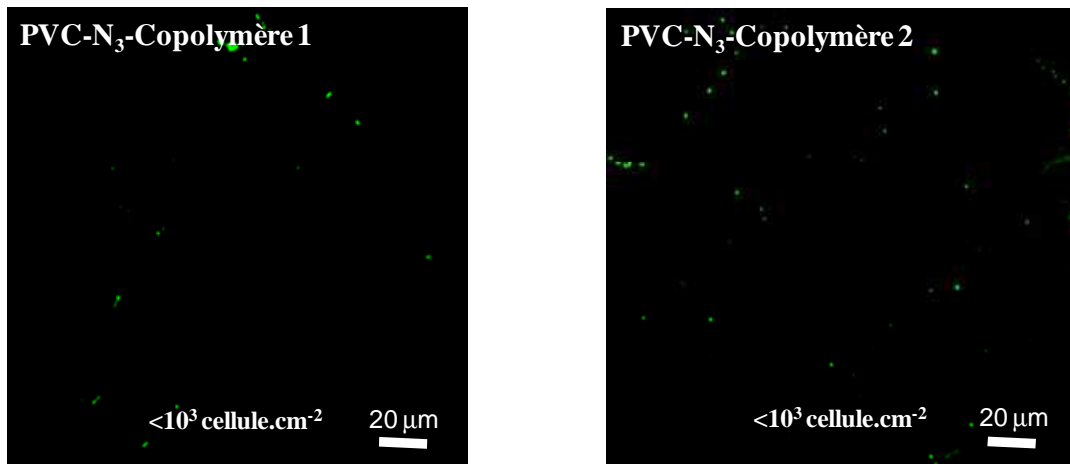


Figure III-28. Images obtenues par microscopie confocale à fluorescence des surfaces PVC-N₃.Copo 1 et 2 après 96h de contact avec *E. coli*

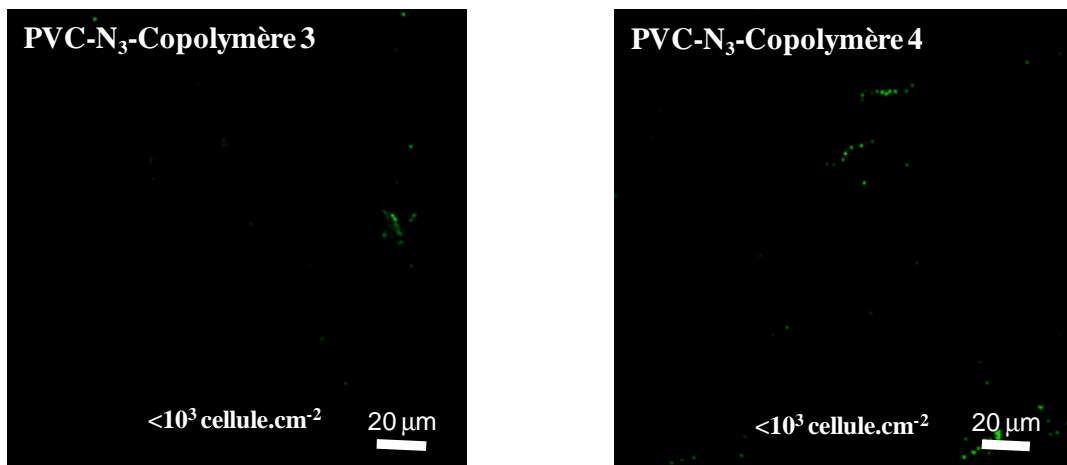


Figure III-29. Images obtenues par microscopie confocale à fluorescence des surfaces PVC-N₃.Copo 3 et 4 après 96h de contact avec *E. coli*

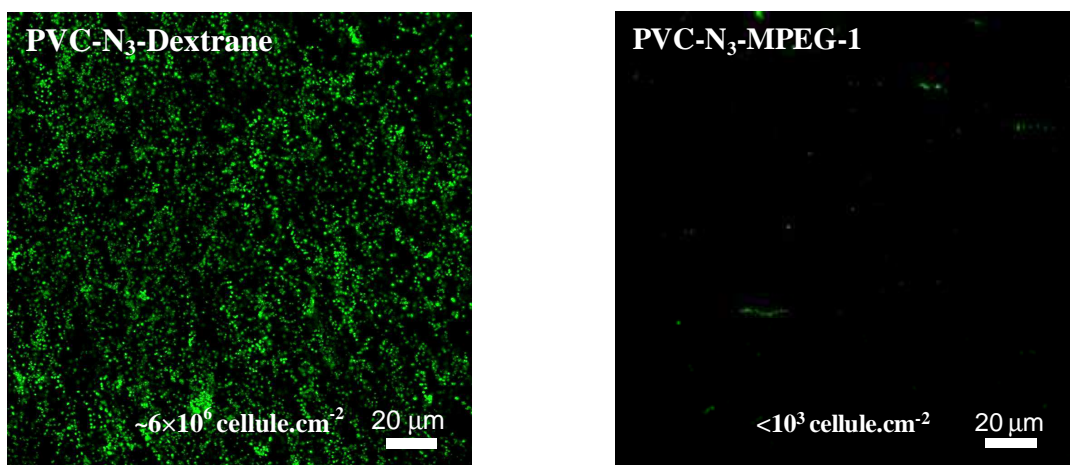


Figure III-30. Images obtenues par microscopie confocale à fluorescence des surfaces PVC-N₃.Copo 5 et PVC-N₃.MPEG-1 après 96h de contact avec *E. coli*

V Conclusion

Cinq copolymères de type polysaccharide et un polymère PEG porteurs de groupements alcyne ont été synthétisés, caractérisés par des techniques usuelles d'analyse (IRTF, RMN ^1H , ATG et DSC). Ces copolymères ont ensuite été greffés avec succès sur des surfaces PVC-N₃ via une réaction de cycloaddition de type Huisgen 1,3-dipolaire. L'homogénéité du greffage chimique sur les surfaces polysaccharides développées a été vérifiée par une technique de marquage fluorescent des groupements hydroxyle. L'analyse AFM a permis de confirmer l'homogénéité du greffage et d'observer les morphologies des différents types de chaînes fixées en extrême surface. L'analyse XPS a permis de valider et de quantifier le greffage chimique (taux de cycle triazole par motif PVC de l'ordre de 2% pour l'ensemble des surfaces). Les mesures d'angle de contact (mode statique et dynamique) ont pu témoigner du caractère hydrophile spécifique de chaque polymère présent sur les surfaces PVC-N₃.

L'étude de l'effet antiadhésif des surfaces préparées à l'égard de deux bactéries, *E. coli* et *S. epidermidis*, a été menée par microscopie confocale à fluorescence dans des conditions optimisées. La bactérie *S. epidermidis* ne présentant pas d'affinité avec les surfaces témoins, seule *E. coli* a été retenue. Cette étude a mis en évidence le caractère antiadhésif remarquable des surfaces méthycellulose, hydroxéthyl cellulose et PEG. Cependant, la surface dextrane (exo-polysaccharide bactérien), présente une forte adhésion bactérienne. Ceci peut s'expliquer par la présence de sites de reconnaissance aux bactéries *E. coli* impliquant de l'adhésion spécifique.

Enfin, des études récentes ont aussi démontré que l'activité antiadhésive de ce type de polymères ne se limitait pas aux bactéries mais aussi aux protéines et aux cellules plasmatiques^{2,9,22,23,24,25,26,27,28,29,30}. Des effets antithrombotiques puissants sont donc aussi attendus. Ainsi en perspective, l'étude de la biocompatibilité de nos surfaces doit être réalisée en vue de vérifier la possibilité de leurs applications dans le domaine de l'implantation médicale.

- ¹ Kebir N., Semetey V., Method for treating surfaces containing Si-H groups, patent WO2008041187 (Brevet Institut Curie – CNRS, 10/04/2008).
- ² Mussard W., Kebir N., Kriegel I., Esteve M., Semetey V., *Angewandte Chemie International Edition* (2011), 50, 10871-10874.
- ³ Leathers T.D., Coté G.L., *Applied Microbiology and Biotechnology* (2008), 78, 6, 1025-1031.
- ⁴ Rendueles O., Travier L., Latour-Lambert P., Fontaine T., Magnus J., Denamur E., Ghigo J.M., *MBio* (2011), 2, 3, article number : e00043
- ⁵ Chen R., Yi C., Wu H., Guo S., *Carbohydrate Polymers* (2010), 81, 188–195.
- ⁶ Li X-G., Huang M-R., BAI H., *Journal of Applied Polymer Science* (1999), 73, 2927–2936.
- ⁷ Zohuriaan M.J., Shokrolahi F., *Polymer Testing* (2004), 23, 575–579.
- ⁸ Fathia E., Atyabia N., Imanib M., Alinejad Z., *Carbohydrate Polymers* (2011), 84, 145–152.
- ⁹ Chen H., Zhang Z., Chen Y., Brook M.A., Sheardown H., *Biomaterials* (2005), 26, 2391-2399.
- ¹⁰ Dekker M., *Thermal stability of polymers* (1970), 1, 423-425.
- ¹¹ Saad M., Gaiani C., Mullet M., Scher J., Cuq B., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011), 59, 1527-1540.
- ¹² Genet M.J., Dupont-Gillain C.C., Rouxhet P.G., *Chapitre : XPS Analysis of Biosystems and Biomaterials, Medical Applications of Colloids. Première édition, Springer Science+Business Media, LLC, Potsdam, New York, USA* (2008).
- ¹³ Eissa A.M., Khosravi E., Cimecioglu A.L., *Carbohydrate Polymers* (2012), 90, 2, 859-869.
- ¹⁴ Arisz P.W., Kauw H.J.J., Boon J.J., *Carbohydrate Research* (1995), 271, 1-14.
- ¹⁵ Haque A., Morris E.R., *Carbohydrate Polymers* 1993, 22, 3, 161-173.
- ¹⁶ Yokota S., Ueno T., Kitaoka T., Tatsumi D., Wariishi H., *Biomacromolecules* (2007), 8, 12, 3848-3852.
- ¹⁷ Tasker S., Matthijs G., Davies M.C., Roberts C.J., Schacht E.H., Tandler S.J.B., *Langmuir* 1996, 12, 6436-6442.
- ¹⁸ Sharma S., Johnson R.W., Desai T.A., *Biosensors and Bioelectronics* (2004), 20, 227–239.
- ¹⁹ Eick J.D., Good R.J., Neumann A.W., *Journal of Colloid and interface Science* (1975), 53, 2, 235-238.
- ²⁰ Olivier J.F., Huh C., Mason S.G., *Colloids Surfaces* (1980), 1, 1, 79-104.
- ²¹ Zhao G.Q., Ye L.H., Huang Y.C., Yang D.K., Li L., Xu G., Lei Y.J., *Cell Biochemistry and Biophysics* (2011), 61, 2, 371-376.
- ²² Zhang M.Q., Desai T., Ferrari M., *Biomaterials* (1998), 19, 10, 953-960.
- ²³ Desai N.P., Hossainy S.F.A., Hubbell J.A., *Biomaterials* (1992), 13, 7, 417-420.
- ²⁴ Drumheller P.D., Hubbell J.A., *Journal of Biomedical Materials Research* (1995), 29, 2, 207-215.
- ²⁵ Krsko P., Kaplan J.B., Libera M., *Acta Biomaterialia* (2009), 5, 2, 589-596.
- ²⁶ Higuchi A., Sugiyama K., Yoon B.O., Sakurai M., Hara M., Sumita M., Sugawara S-C., Shirai T., *Biomaterials* (2003), 24, 19, 3235–45.
- ²⁷ Chen H., Brook M.A., Sheardown H., *Biomaterials* (2004), 25, 2273–2282.
- ²⁸ Lan S., Veiseh M., Zhang M., *Biosensors and Bioelectronics* (2005), 20, 9, 1697–1708.
- ²⁹ Zhang F., Kang E.T., Neoh K.G., Huang W., *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* (2001), 12, 515–531.
- ³⁰ Li Y.L., Neoh K.G., Cen L., Kang E.T., *Biotechnology and Bioengineering* (2003), 84, 3, 305–313.

Ce travail de thèse avait pour objectif de développer de nouvelles surfaces de type PVC à propriétés antibactériennes. Deux séries de surfaces ont été visées à savoir, des surfaces bactéricides et des surfaces antiadhésives à l'égard de bactéries. Pour ce faire, nous avons jeté notre dévolu sur une stratégie émergente et prometteuse qui consiste à greffer chimiquement des copolymères bioactifs en surface du biomatériau. L'approche chimique retenue consistait à introduire des groupements d'ancrage dans la structure chimique du copolymère bioactif et sur la surface. Notre choix s'est porté sur les groupements propargyle et azoture, respectivement. Ces groupements sont ensuite engagés dans une réaction de cycloaddition catalysée de type Huisgen 1,3-dipolaire (HDC), qui est la réaction la plus répandue et la plus populaire en chimie click. Ce choix de réaction se justifie par différentes raisons :

- elle est simple à mettre en œuvre ;
- elle peut se faire en milieux aqueux et alcooliques dans lesquels sont solubles nos copolymères ;
- elle se fait avec des rendements quantitatifs et sans produits secondaires.

Dans un premier temps, des copolymères cationiques porteurs de groupements ammonium ou phosphonium quaternaire ont été synthétisés, soit par voie de modification chimique d'un polymère précurseur (PVBC), soit par voie de polymérisation suivie de modifications chimiques. Les copolymères cationiques obtenus ont été caractérisés par des techniques usuelles (IRTF, RMN, UV, CES, TGA, DSC). Le caractère bactéricide de ces copolymères a été vérifié en solution aqueuse par mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les structures à ammoniums quaternaires se sont révélées légèrement plus efficaces que les structures à phosphoniums quaternaires.

Dans un second temps, un traitement chimique de la surface PVC a été réalisé dans des conditions optimisées, en vue d'y introduire des groupements azoture (PVC-N₃). Ainsi, les copolymères cationiques préparés ont été greffés en surface du PVC-N₃ par click addition. Les surfaces cationiques obtenues ont été caractérisées par diverses techniques. L'analyse XPS s'est révélée une technique de choix pour mettre en évidence le lien covalent, via le cycle triazole, entre les copolymères cationiques et la surface (PVC-N₃). Les mesures d'angle de contact ont révélé une augmentation de l'hydrophilie et de la polarité surfacique après greffage des copolymères. Ces surfaces présentaient des distributions homogènes des charges cationiques avec des densités allant de 1,0 à $6,5 \times 10^{14}$ charge/cm². Par ailleurs, ces surfaces

présentaient des topographies variées avec des rugosités (RMS) allant de 5,5 à 19 nm. Les propriétés bactéricides ont été caractérisées par microscopie à fluorescence au moyen du test LIVE and DEAD. Ce test a révélé un grand pouvoir bactéricide des surfaces cationiques attesté par un pourcentage de mortalité très élevé des bactéries *E. coli* et *S. epidermidis*, au contact de ces surfaces. Néanmoins, les surfaces phosphonium étaient légèrement moins efficaces que les surfaces ammonium notamment vis-à-vis des *S. epidermidis*.

Concernant la partie surfaces antiadhésives, des groupements propargyle ont été introduits dans des polysaccharides de type méthylcellulose, hydroxyéthyl cellulose et Dextrane -de masses molaires variées- ainsi qu'à une extrémité d'un PEG monofonctionnel. Ces polymères ont été ensuite greffés par click addition sur les surfaces PVC-N₃. Les surfaces greffées ont été caractérisées par diverses techniques. L'XPS a permis de confirmer le succès de la réaction de greffage via les cycles triazole. Cependant, cette technique a révélé l'existence d'impuretés qui pourraient correspondre notamment à des protéines provenant du milieu naturel des polysaccharides utilisés. Les mesures d'angle de contact ont montré une augmentation de l'hydrophilie et de la polarité surfacique après greffage des polymères. Le marquage fluorescent a permis de constater une distribution homogène de ces polymères en surface. L'analyse par AFM a mis en évidence des topographies et des structures variées, propres à chaque type de polymère greffé. Un protocole opératoire a été élaboré et optimisé afin d'évaluer les propriétés antiadhésives de ces surfaces. Ainsi, les surfaces greffées et leurs témoins ont été incubés avec des bactéries dans un milieu de culture à 37,5°C pendant 4 jours. Après marquage au Syto 9[®], la microscopie à fluorescence a été utilisée pour rendre compte du nombre de bactéries adhérees par unité de surface. Dans ces conditions, les surfaces témoins ainsi que la surface greffée par du Dextrane ont présenté une forte adhésion bactérienne (de l'ordre de 10⁷ bactérie/cm²). Les surfaces méthylcellulose, hydroxyéthyl cellulose et PEG quant à elles, ont révélé un grand pouvoir antiadhésif à l'égard des bactéries.

Enfin, les perspectives qui s'offrent à ce travail sont très nombreuses. L'étude prioritaire est sans doute l'analyse de la biocompatibilité et de la cytotoxicité de nos surfaces. En effet, cette étude est essentielle afin de déterminer si elles peuvent prétendre à des applications dans le domaine de l'implantation biomédicale. Les propriétés antithrombiques des surfaces antiadhésives peuvent notamment être évaluées via des tests *in vitro* (tests d'adhésion plaquettaire et tests d'adhésion de protéines plasmatiques) et des tests *in vivo* (implantation sur l'animal).

ANNEXE 1 : Partie expérimentale

I-DESCRIPTION DES APPAREILLAGES ET TECHNIQUES D'ANALYSE UTILISEES

I.1. Spectroscopie RMN

Les spectres RMN du proton et du carbone ainsi que les COSY (H-H) (2D) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker 300 MHz. Plusieurs solvants deutérés (CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$) ont été utilisés selon la solubilité des produits. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par millions (ppm) par rapport au singulet du TMS utilisé comme référence interne ($\delta = 0$) dans les échantillons.

I.2. Spectroscopie infrarouge

Les spectres IRTF ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Perkin Elmer Spectrum 2000 muni d'un système ATR (Attenuated Total Reflection) type MKII, Specac. Les produits sont placés sur une platine comportant une cellule carrée en diamant de 2 mm de côté. Une vis réglable en hauteur permet de maintenir l'échantillon contre la cellule de mesure. Une mesure à blanc de l'air est effectuée avant chaque analyse. Une dizaine de scans est réalisée de 4000 à 600 cm^{-1} pour chaque spectre IRTF.

La platine ATR possède les caractéristiques suivantes :

- platine chauffante permettant d'atteindre des températures allant jusqu'à 200°C ,
- accessoire permettant de fixer une fibre optique reliée à une lampe UV au dessus du cristal d'analyse,
- cristal diamant d'indice $n_1 = 2,4$ à 1000 cm^{-1} ,
- angle d'incidence $\vartheta = 45^\circ$,
- système monoréflexion.

I.3. Spectroscopie UV-Visible

Le spectrophotomètre UV-Visible utilisé est un Lambda 16 de Perkin Elmer double faisceau équipé d'une lampe deutérium et d'une lampe tungstène. Les spectres d'absorption ont été

réalisés entre 300 et 600 nm pour des trajets optiques de 1 mm. La vitesse de balayage en longueur d'onde est de $60 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ et la référence est une cuve remplie d'acétonitrile.

I.4. Spectroscopie de fluorescence

Les analyses en spectroscopie de fluorescence ont été réalisées en utilisant un spectrophotomètre : Varian Cary Eclipse (France). Une courbe d'étalonnage Intensité = f ([fluorescéine disodique]) a été réalisée dans les conditions du dosage des d'ammonium en surface.

I.5. Analyse enthalpique différentielle (DSC)

L'appareil utilisé est un appareil TA Instruments DSC Q2000 (**Figure 1**). Le schéma du système est donné **Figure 2**. Le principe de mesure de la DSC à flux de chaleur est basé sur la mesure de différence des flux de chaleur échangés entre l'échantillon et la référence.



Figure 1. Appareil DSC Q2000

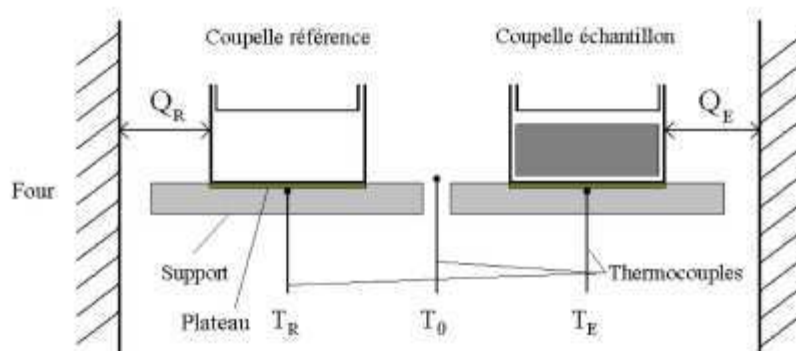


Figure 2. Principe de l'appareil DSC utilisé.

Lorsque le four subit une rampe linéaire ascendante ou descendante en température, les températures T_E de l'échantillon et T_R de la référence sont mesurées grâce à des thermocouples fixés en dessous des plateaux supportant les coupelles. La température T_0 du four est mesurée grâce à un thermocouple placé entre les deux coupelles. Les flux de chaleur Q_R et Q_E échangés entre le four et respectivement la référence et l'échantillon sont ainsi calculés. Le signal tracé en sortie est obtenu par la différence des flux de chaleur Q_R et Q_E entre l'échantillon et la référence. Le refroidissement du bloc est assuré par un système permettant d'atteindre -90°C . L'étalonnage en température et en énergie a été effectué avec pour standard l'indium ($T_f = 156,6^\circ\text{C}$ et $\Delta H_f = 28,45 \text{ J.g}^{-1}$). Toutes les analyses ont été réalisées sous azote (50 mL.min^{-1}) avec des prises d'essai variant de 6 à 15 mg.

I.6. Analyse thermogravimétrique (TGA)

Un appareil TA Instrument Q500 a été utilisé (Figure 3). Il est composé de deux éléments principaux : une microbalance très sensible couplée à un four régulé en température. La microbalance est capable de détecter une variation de $0,1 \mu\text{g}$ pour une capacité maximale de 1,3 g. L'échantillon est placé dans une coupelle en platine et le fléau maintient le plateau en équilibre via un courant proportionnel à la masse supportée. La température est régulée entre 30°C et 1000°C avec des montées en température jusqu'à $200^\circ\text{C.min}^{-1}$. Un thermocouple à proximité de l'échantillon assure un suivi de la température et régule la puissance de chauffage. L'étalonnage a été effectué avec de l'Alumel et du Nickel dont les points de Curie sont respectivement de 163°C et 358°C . Toutes les analyses ont été réalisées entre 30 et 600°C avec une vitesse de montée en température fixée à $10^\circ\text{C.min}^{-1}$, sous azote (20 mL.min^{-1}), avec des prises d'essai variant de 5 à 15 mg.



Figure 3. Appareil TGA Q500

I.7. Mesures des angles de contact (statiques et dynamiques) et calculs des énergies de surface

Les angles de contact en mode statique ont été mesurés en utilisant un goniomètre Digidrop ASE de la société GBX. Trois liquides (eau, diiodométhane, glycérol) de paramètres surfaciques connus¹ sont déposés sous forme de gouttes de 3 μL sur les deux faces des matériaux. L'angle de contact θ_i est mesuré après stabilisation de l'étalement de la goutte (soit après 3 secondes) grâce à une caméra reliée à un logiciel d'analyse d'image. Les énergies de surface du matériau ont ensuite été calculées en utilisant la méthode d'Owens-Wendt à 2 composantes **Eq. 1**.

Tableau 1 : Tensions superficielles, composantes polaires et apolaires des liquides utilisés.

Liquide	Tension superficielle γ_i (mN.m^{-1})	Composante polaire γ_i^p (mN.m^{-1})	Composante dispersive γ_i^d (mN.m^{-1})
Eau	72,8	51,0	21,8
Diiodométhane	49,8	1,3	48,5
Glycérol	64,0	30,0	34,0

Dans ce modèle, on considère que l'énergie de surface du solide s'exprime sous la forme $\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$, avec γ_s^d la composante dispersive et γ_s^p la composante polaire du matériau étudié. L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit alors :

$$\text{Eq. 1. } \frac{(1 + \cos \theta_i) \gamma_i}{2\sqrt{\gamma_i^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \times \sqrt{\frac{\gamma_i^p}{\gamma_i^d}} + \sqrt{\gamma_s^d}$$

où γ_i , γ_i^d , γ_i^p sont les paramètres de tension superficielle des liquides utilisés (**Tableau 1**).

Il suffit alors de tracer $\frac{(1 + \cos \theta_i) \gamma_i}{2\sqrt{\gamma_i^d}}$ en fonction de $\sqrt{\frac{\gamma_i^p}{\gamma_i^d}}$, une régression linéaire (3 points) nous donnant les composantes polaires et dispersives du matériau.

¹ Logiciel Windrop ++, goniomètre GBX Digidrop ASE.

De plus, la polarité du matériau peut être calculée grâce à $P = \frac{\gamma_s^p}{\gamma_s} \times 100$.

Les mesures de l'angle de contact en dynamique ont été réalisées avec l'eau. La manipulation consiste à former progressivement une goutte d'eau sur la surface d'étude puis l'aspirer progressivement à l'aide d'un pousse seringue automatique piloter par le logiciel Logiciel Windrop ++. Des séquences vidéos sont alors enregistrées puis traitées afin d'étudier l'évolution de l'angle de contact en fonction de la largeur de la base de la goutte (courbe d'hystérèse). Cette courbe nous donne l'angle à l'avancée (AA), l'angle au retrait (AR) et l'hystérèse de mouillage (Hys=AA-AR).

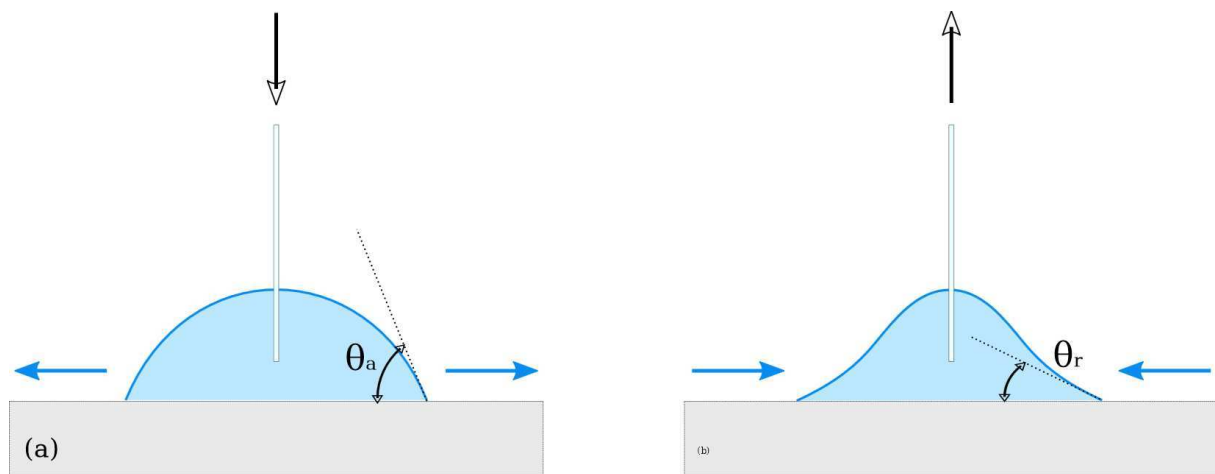


Figure 4. Principe des mesures des angles de contact en dynamique.

I.8. Microscopie confocale

L'appareil utilisé est un microscope confocal droit TCS SP2 AOBS avec un statif DM RXA-2UV et une lampe Hg 50W.

Caractéristiques techniques :

- Objectifs: x63(oil)
- Raies laser: 405, 458, 476, 488, 514, 543, 594 et 633 nm.
- Modules de post-acquisition: Multicolor, Materials Package, Physiology et 3D visualization.



Figure 5. Microscope confocal droit TCS SP2 AOBs

I.9. Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)

Les masses molaires moyennes en nombre (\overline{Mn}), les masses molaires moyennes en poids (\overline{Mw}) et les indices de polymolécularité ($I_p = \overline{Mw} / \overline{Mn}$) des différents échantillons ont été mesurés par Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) sur un système Varian 50 plus équipé : d'une pré-colonne (Polymer Laboratories, PL gel 5 μ m Guard, 50x7,5 mm) complétée par deux colonnes (Polymer Laboratories, 2 PL gel 5 μ m MIXED-D columns, 2x300x7,5 mm) et d'un détecteur RI (réfractomètre différentiel : Sensibilité 2,5 x 10⁷ RIU / mV, Longueur d'onde 880 \pm 30 nm). Le THF a été utilisé comme éluant avec un débit de 1mL.min⁻¹ à 35°C. La calibration a été réalisée au moyen de standards polystyrène (580 à 483.10³ g.mol⁻¹) et les masses molaires sont données en équivalent polystyrène (PS. Eq.).

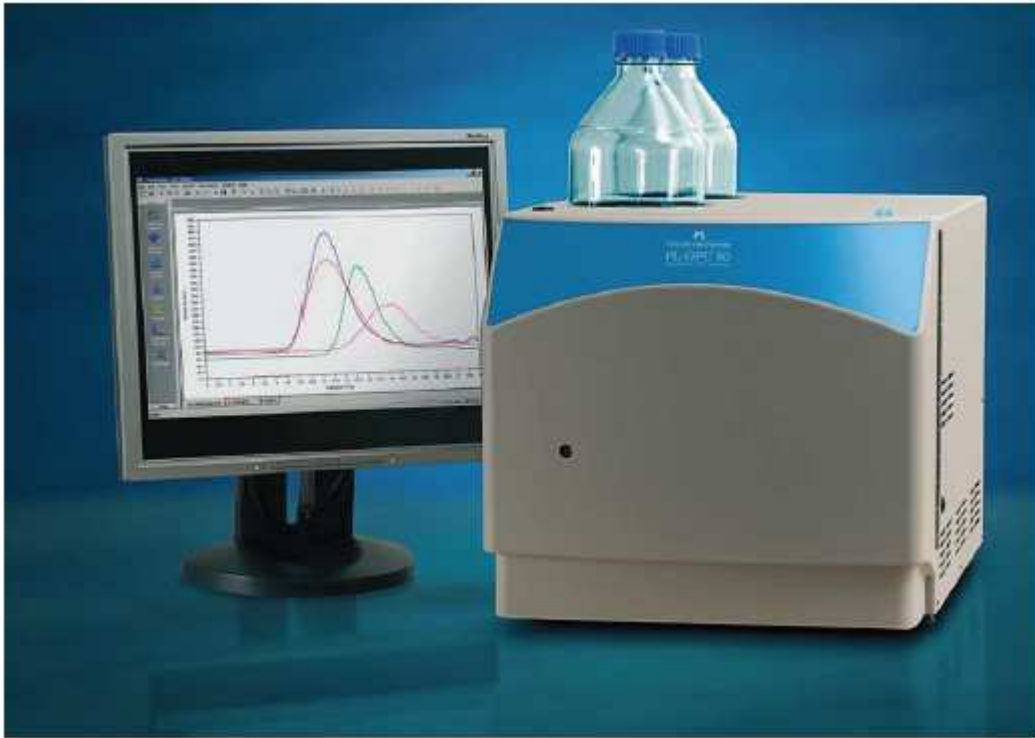


Figure 6. Schéma de l'appareil de chromatographie d'exclusion stérique.

I.10. Microscopie à force atomique (AFM)

L'imagerie par microscopie à force atomique a été réalisée au moyen d'un microscope de type Nanoscope III Multimode (Veeco instrument, Santa Barbara, Ca, USA) muni d'un scanner piezoélectrique de 100 μm . L'imagerie a été réalisée sous air à 25°C en mode tapping (Tip: Silicone ; Force Constante : 7,5 N/m). Les images sont représentées en mode topographique (en 2D et/ou 3D) avec une couleur sombre pour les zones profondes, et une couleur claire pour les zones hautes.

I.11. Spectroscopie photoélectrique à rayon X (XPS)



Spectromètre K-alpha de Thermofisher Scientific

Site internet : http://www.thermoscientific.com/ecomm/servlet/productsdetail_11152_L10531_80481_11962357_-1

L'analyse élémentaire des surfaces par XPS été réalisée au moyen d'un spectromètre Thermo Electron K-Alpha en utilisant une source monochromatique de rayons X (1486,6 eV). La procédure Thermo Electron K-alpha a été utilisée pour calibrer le spectromètre. Cette procédure a été vérifiée à l'aide d'échantillons de Cu (Cu 2p_{3/2} à 932,6 eV) et Au (Au 4f_{7/2} à 84,0 eV) suivant la procédure standard : ASTM-E-902-94.

Les paramètres d'acquisition imposés dans cette étude sont : taille de spot : 400 µm, énergie primaire : 12 kV, intensité d'émission : 6,0 mA. Pour les surveys mode CAE pass band 200 eV, pas de 1eV de -10 à 1350 eV. Pour les fenêtres spectrales CAE mode pass band 50 eV, pas de 0,1 eV pour les éléments principaux.

La procédure de déconvolution des spectres à haute résolution a été réalisée avec le système Thermo Fisher scientific Advantage©. La quantification est déterminée avec le logiciel Thermo Advantage. A l'aide de ce logiciel, l'aire du pic est corrigée en termes de temps total de séjour par canal, du nombre d'acquisitions et de l'épaisseur du canal d'énergie. L'aire normalisée est calculée comme suit : Aire du pic/(SF*TXFN*ECF) avec SF: Scofield factors; ECF: Energy Compensation Factor. Ce dernier facteur corrige le principal passage libre non élastique (Scofield library) en utilisant une approximation KE^{0.6}. TXFN: Transmission Function. Cette fonction est calculée à partir d'un lissage polynomial pour un tracer LOG {aire du pic /(PE*XSF)} vs LOG {KE/PE} avec PE = pass energy, KE = kinetic energy and XSF = relative sensitivity factor appliqué pour normaliser les deux courbes.

Analyse quantitative

Expression de l'intensité d'un signal XPS du niveau X d'un élément A I_{AX}

Paramètre regroupant tous les autres facteurs de proportionnalité*


Densité volumique à la profondeur z (nb atomes/unité de surface)

$$I_{AX} = A \sigma_{AX} T(E_{AX}) \int_0^{\infty} N_A(z) \exp\left(\frac{-z}{\lambda_{AX} \sin \theta}\right) dz$$

Section efficace de photoionisation

Fonction de transmission du système d'analyse (probabilité pour un e- collecté d'énergie E_{AX} de parvenir au système de comptage)

Profondeur d'échappement des photoélectrons émis à l'énergie cinétique E_{AX} par les atomes émetteurs de l'espèce A



* Terme considéré constant pour tous les pics d'un même spectre ou pour les pics de spectres acquis dans les mêmes conditions expérimentales

2/49

Analyse quantitative

Fractions atomiques relatives :

$$\frac{I_{AX}}{I_{BX}} = \frac{\sigma_{AX} T(E_{AX}) \lambda_{AX} X_A}{\sigma_{BX} T(E_{BX}) \lambda_{BX} X_B}$$

Simplification dans la détermination de composition :

Capacité de l'XPS en composition absolue

$$\% \text{ atomique} = \frac{A_A}{S_A} \times \frac{\sum_i A_i}{\sum_i S_i} \times 100\%$$

Aire sous pic de l'élément A

Facteur de sensibilité de l'élément A

Aires sou pics/facteurs de sensibilité de tous les autres éléments considérés



Logiciel Avantage

$$\text{Atomic Concentration [At \%]} = \text{Normalised Area} * 100 / \text{Sum of Normalised Areas}$$

where normalized area = Peak Area / (SF * λ_{XFN} * ECF)

II. Modes opératoires du chapitre 2 :

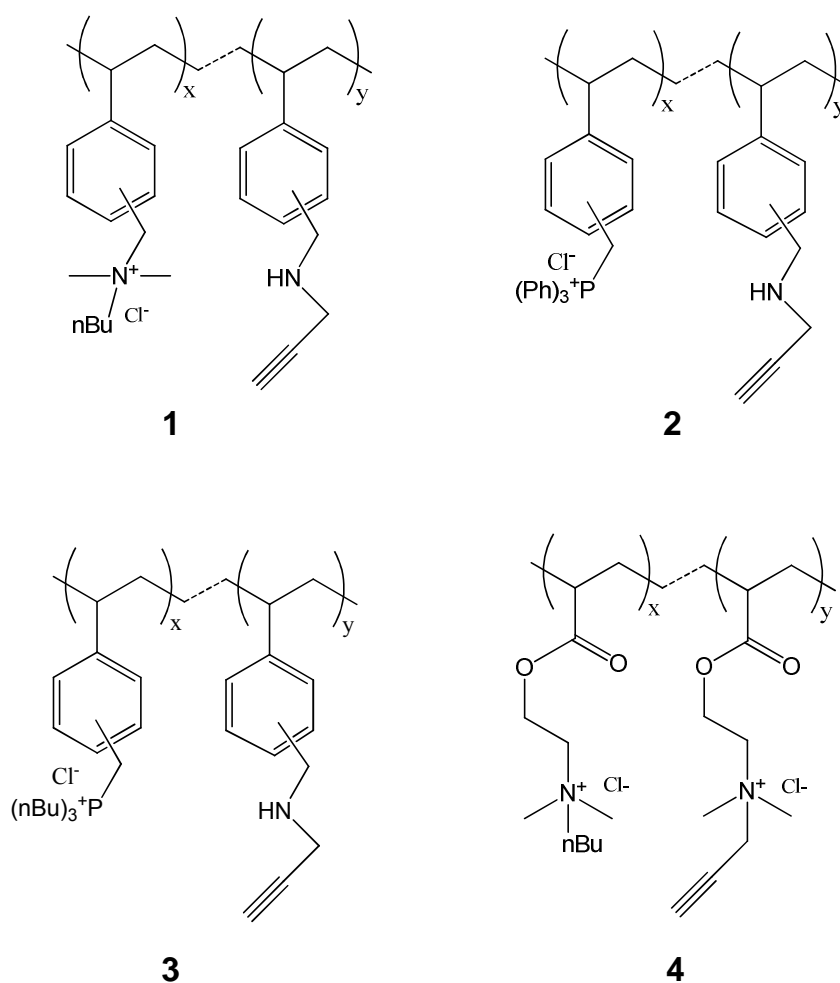


Figure 7. Bactericidal copolymers **1** to **4**.

II.1. Synthesis of cationic copolymers 1, 2 and 3:

120 μl (1.3 mmol) of propargylamine were added to a stirred solution of 2 g of poly(vinyl benzyl chloride) in 50 ml of anhydrous THF at room temperature. The reaction was allowed to stir for 24 h at 50 °C. Then, 8.2 ml (58 mmol) of *N,N*-dimethyl butylamine or 7.07 g, (27 mmol) of triphenylphosphine or 4.66 ml (17.7 mmol) of tributylphosphine were added to the previous solution. 30 ml of ethanol was added to the solution after 1 h of stirring because of the polymer precipitation. The reaction was allowed to stir for 24 h at 50 °C. The solution was after concentrated and the resulting product was dissolved in 50 ml of ethanol. Then, 8.2 ml (57.5 mmol) of *N,N*-dimethyl butylamine or 7.07 g (26.7 mmol) of triphenylphosphine or 4.66 ml (17.7 mmol) of tributyl phosphine were added to this ethanol solution in order to complete the conversion of the chloride groups. After stirring for 24 h at 50 °C, the obtained polymers

1, 2 or 3, respectively, were precipitated on diethyl ether, dried under vacuum, dissolved in water and lyophilised (yield~ 85%).

Characterizations of 1: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) $\delta/\text{ppm} = [7.4-6.1]$ ($\text{CH}=\text{CH}_{\text{aryl}}$, 4H); [4.7-4.2] ($\text{aryl-CH}_2\text{-N}^+$, 1.8H and $\text{aryl-CH}_2\text{-NH}$, 0.2H); [3.5-3.3] ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H and $\text{NH-CH}_2\text{-C}_{\text{alkyne}}$, 0.2H); 2.8 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$, 5.4H); 2.3 ($\text{C}_{\text{alkyne-CH}}$, 0.1H); [2-1.1] (CH-CH_2 , 3H); 1.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H); 1.3 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H); 0.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 2.7H). *FTIR-ATR* (diamond) $\nu_{\text{OH, NH, CH (alkyne)}} = [3600-3100] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C-H(aryl)}} = [3075-2990] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = [2990-2800] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C=C(aryl)}} = [1630-1585] \text{ cm}^{-1}$; $\delta_{\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}} = [1500-1380] \text{ cm}^{-1}$; complete disappearance of $\nu_{\text{aryl-Cl (PVBC)}} = 1265 \text{ cm}^{-1}$.

Characterizations of 2: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) $\delta/\text{ppm} = [8.5-7.3]$ ($\text{CH}=\text{CH}_{\text{aryl-P}}$, 13.5H); [7.4-6.1] ($\text{CH}=\text{CH}_{\text{aryl}}$, 4H); [4.55-4.2] ($\text{CH}_2\text{-P}^+$, 1.2H and $\text{aryl-CH}_2\text{-NH}$, 0.2H); 3.5 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{alkyne}}$, 0.2H); [2-0.8] (CH-CH_2 , 3H). *FTIR-ATR* (diamond) $\nu_{\text{OH, NH, CH (alkyne)}} = [3600-3100] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C-H(aryl)}} = [3075-2990] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}} = [2990-2820] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C=C(aryl)}} = [1630-1585] \text{ cm}^{-1}$; $\delta_{\text{CH}_2, \text{CH}} = [1500-1380] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{P-C}} = 740$ and 690 cm^{-1} ; complete disappearance of $\nu_{\text{C-Cl (PVBC)}} = 675 \text{ cm}^{-1}$.

Characterizations of 3: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) $\delta/\text{ppm} = [7.4-6.1]$ ($\text{CH}=\text{CH}_{\text{aryl}}$, 4H); [4.6-4.3] ($\text{Aryl-CH}_2\text{-NH}$, 0.2H); [4-3.5] ($\text{CH}_2\text{-P}^+$, 1.5H); 3.5 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{alkyne}}$, 0.2H); [2.4-1.9] ($\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 5.4H); [1.7-1.1] ($\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 10.8H and CH-CH_2 , 2H); [1.0-0.6] ($\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 8.1H and CH-CH_2 , 1H). *FTIR-ATR* (diamond) $\nu_{\text{OH, NH, CH (alkyne)}} = [3680-3080] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C-H(aryl)}} = [3075-2990] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}} = [2990-2800] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{C=C(aryl)}} = [1630-1585] \text{ cm}^{-1}$; $\delta_{\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}} = [1500-1380] \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{P-C}} = 787$ and 723 cm^{-1} ; complete disappearance of $\nu_{\text{C-Cl (PVBC)}} = 675 \text{ cm}^{-1}$.

II.2. Synthesis of cationic copolymer 4

Free radical polymerization of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA, 4.08 g, 25.5 mmol) was achieved in THF (30 ml) using AIBN as initiator ([DMAEMA]/[AIBN]=1050). Solution containing DMAEMA was stirred at 60 °C for 18 h into a three-neck flask, generously deoxygenated, sealed under vacuum. The polymer (PDMAEMA) was obtained by precipitation into excess of hexane, isolated by filtration and dried under vacuum (SEC analysis in THF: $\overline{M}_w = 975600 \text{ g mol}^{-1}$, PDI=3.9). The modification of PDMAEMA was carried out in 2 steps. First, PDMAEMA (1.87 g, 11.9 mmol) was reacted with propargyl chloride (0.10 g, 1.32 mmol, 11% molar ratio) in 30 ml of

dry THF at 45 °C for 24h. The mixture was stirred for 24h. Then, an excess of iodobutane (4.8 ml, 42.3 mmol) was next introduced in the previous solution. After stirring 48h, the final polymer was concentrated, dried under vacuum, dissolved into water, dialysed and lyophilised. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ/ppm = [4.8-4.3] (O-CH_2 , 2H and $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{alkyne}}$, 0.2H); [4.2-3.9] ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, 2H); 3.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H); 3.4 ($\text{CH}_3\text{-N}^+$, 6H); 3.1 ($\text{C}_{\text{alkyne}}\text{-CH}$, 0.1H); [2.3-1.7] ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H and $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)$, 2H); 1.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 1.8H); [1.3-0.7] ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$, 2.7H and $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2$, 3H). *FTIR-ATR* (diamond) $\nu_{\text{OH, NH, CH (alkyne)}}$ = [3600-3100] cm^{-1} ; $\nu_{\text{CH}_3, \text{CH}_2}$ = [3050-2765] cm^{-1} ; $\nu_{\text{C=O ester}}$ = 1723 cm^{-1} ; $\nu_{\text{C-O ester}}$ = 1259 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CH}_2, \text{CH}_3=}$ [1480-1420] cm^{-1} .

II.3. Preparation of PVC-N₃ surfaces

PVC films were prepared by casting from dichloromethane solutions in Teflon moulds. The films were washed during 24 h using diethyl ether solutions and then dried under vacuum for a further 3 h at 60 °C. Then, PVC films with dimensions 10×10 mm² were immersed in a solvent/non solvent mixture (DMF/distilled water (6:1)) containing 0.5 M of sodium azide. Temperature was maintained at 60 °C for 48 h. The modified films were intensively washed with water followed by diethyl ether bath during 24 h and then dried 3 h at 60 °C. Analysis of the modified films was performed by FTIR: (PVC-N₃): ν (N₃)-azide stretching vibration at 2100 cm^{-1} .

II.4. Chemical grafting of the cationic polymers onto PVC-N₃ surfaces

The PVC-N₃ surfaces (10×10 mm²) were immersed in a water/ethanol (20ml/10ml) solution containing 40 mg of antibacterial copolymers (11.2 to 18.9 μmol of alkyne groups), 2 mol % of copper (II) sulphate and 10 mol % of sodium ascorbate with regards to alkyne content. The system was shaken during 48 h at room temperature. The final films were intensively washed with water to remove any ungrafted cationic polymer, then with diethyl ether bath during 24h and dried 3 h at 60 °C.

II.5. Determination of surface accessible quaternary ammonium densities

The Tiller *et al.* method was used as follow: Samples of 7×7 mm² were immersed in a solution of fluorescein sodium salt (1% in distilled water) for 10 min. Due to their negative charges, the fluorescent markers bind strongly to the cationic sites and the unreacted

molecules can then be removed by exhaustive washing with distilled water. The bound fluorescein molecules were then exchanged by immersing the modified samples in a small volume (2 ml) of a solution of hexadecyltrimethyl ammonium (0.5% in distilled water), and sonicated for 45 min. After adding 0.3 ml of saturated NaHCO₃ solution (pH= 8.3), the fluorescence intensity was measured in the following conditions: Excitation at 450 nm, emission spectra range: 400-600 nm, increment: 1 nm, integration time: 0.1 sec, Slits: excitation: 10 and emission: 1, voltage: 1100 V. Calibration curve was established from fluorescein sodium salt at different concentrations in the titration solution.

The density of cationic groups was then derived from the titration solution concentration: the charges measured are those corresponding to quaternary ammonium groups capable of forming an ionic complex with fluorescein.

II.6. Analysis of cationic charges distribution onto surfaces

In order to assess cationic charges distribution (and polymer distribution) onto surfaces and to check the efficiency of the Tiller *et al* titration method [5] for our system, cationic surfaces treated with fluorescein sodium salt were analysed by fluorescence microscopy before and after contact with the hexadecyltrimethyl ammonium chloride. Microscope observation was achieved after spreading a 40 µl droplet of saturated solution of NaHCO₃ (pH= 8.3) onto the surface. Then, the surfaces were analysed by the fluorescence microscope. To acquire the different images of these surfaces, we used a 63x oil immersion objective (with a numerical aperture at 1.40) and an Argon laser at 488 nm to excite fluorescein with the same parameters between the different surfaces.

II.7. Assessment of bactericidal efficiency (Live and Dead test)

A 40 µl sessile droplet of *E. coli* or *S. epidermidis* suspensions in distilled water (3.7×10^8 cell/ml) was spread on the studied surfaces (1 cm²). The bacteria were allowed to sediment on the substrate surface for 10 min. After that, the non attached bacteria were washed away by flushing the substrate with distilled water and then a 40 µl droplet of water was deposited and spread on the surfaces for 35 min. After, water is removed from surfaces and a 40 µL droplet of mixture of aqueous solutions of two fluorescent markers: the SYTO[®]9 (L7012, 20 µmol/l) and the propidium iodide (L7012, 120 µmol/l), was then deposited and spread on these surfaces

for 15 min. Then, the surfaces were analysed by the fluorescence microscope. To acquire the different images of these surfaces, we used a 63x oil immersion objective (with a numerical aperture at 1.40) and an Argon laser at 488 nm to excite the SYTO[®]9 and a HeNe laser at 543 nm to excite the propidium iodide. To increase the quality of these images, we used a sequential acquisition to avoid the overlapping emission spectrums of the fluorescent markers. The adsorbed bacteria appear as green dots if still viable and as red/orange dots if their membrane has been damaged following contact with quaternary ammonium groups. To count all bacteria and to measure the area of each bacteria in the following cases, bacterial adhesion and bactericidal efficiency, we used ImageJ, a public domain program developed at the National Institutes of Health (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

II.8. Assessment of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the cationic polymers

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the cationic polymers were determined by a standard serial dilution technique with an inoculum of 7×10^5 cell/ml in LB (Luri Broth) bacteria growth medium. Two bacteria strains were used: *E. coli* and *S. epidermidis*. The MIC of the polymers was determined after 12 h of incubation at 37°C by optical density (OD) measurements. The concentration for the polymers ranged from 1 to 200 $\mu\text{g/ml}$. The MIC was defined as the lowest concentration at which bacterial growth was inhibited.

II.9. Analysis of polymer distribution onto surfaces by confocal fluorescent microscopy

Polysaccharide surfaces were stained by immersion in solution of fluorescein isothiocyanate (FITC) in acetonitrile ($2.5 \cdot 10^{-3}$ M) in presence of DBTL as catalyst ($3.38 \cdot 10^{-5}$ M).

Microscope observation was achieved after spreading a 40 μl droplet of saturated solution of NaHCO_3 (pH= 8.3) onto the surface. Then, the surfaces were analysed by the fluorescence microscope. To acquire the different images of these surfaces, we used a 63x oil immersion objective (with a numerical aperture at 1.40) and an Argon laser at 488 nm to excite fluorescein with the same parameters between the different surfaces.

II.10. Assessment of bacteria attachment onto the PVC surfaces

Samples of $1 \times 1 \text{ cm}^2$ were incubated with *E. coli* or *S. epidermidis* suspensions in LB medium (3.7×10^8 cell/ml) at 37°C . The bacteria were allowed to sediment on the substrate surface for 4 days. After that, the non attached bacteria were washed away by flushing the substrate with distilled water. After, a $40 \mu\text{L}$ droplet of aqueous solution of SYTO[®]9 (L7012, $20 \mu\text{mol/l}$) was then deposited and spread on these surfaces for 15 min. Then, the surfaces were analysed by the fluorescence microscope. To acquire the different images of these surfaces, we used a 63x oil immersion objective (with a numerical aperture at 1.40) and an Argon laser at 488 nm to excite the SYTO[®]9. To increase the quality of these images, we used a sequential acquisition to avoid the overlapping emission spectrums of the fluorescent markers. The adsorbed bacteria appear as green dots. To count all the bacteria and to measure the area of each bacteria we used ImageJ, a public domain program developed at the National Institutes of Health (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

III. Partie expérimentale du chapitre 3 :

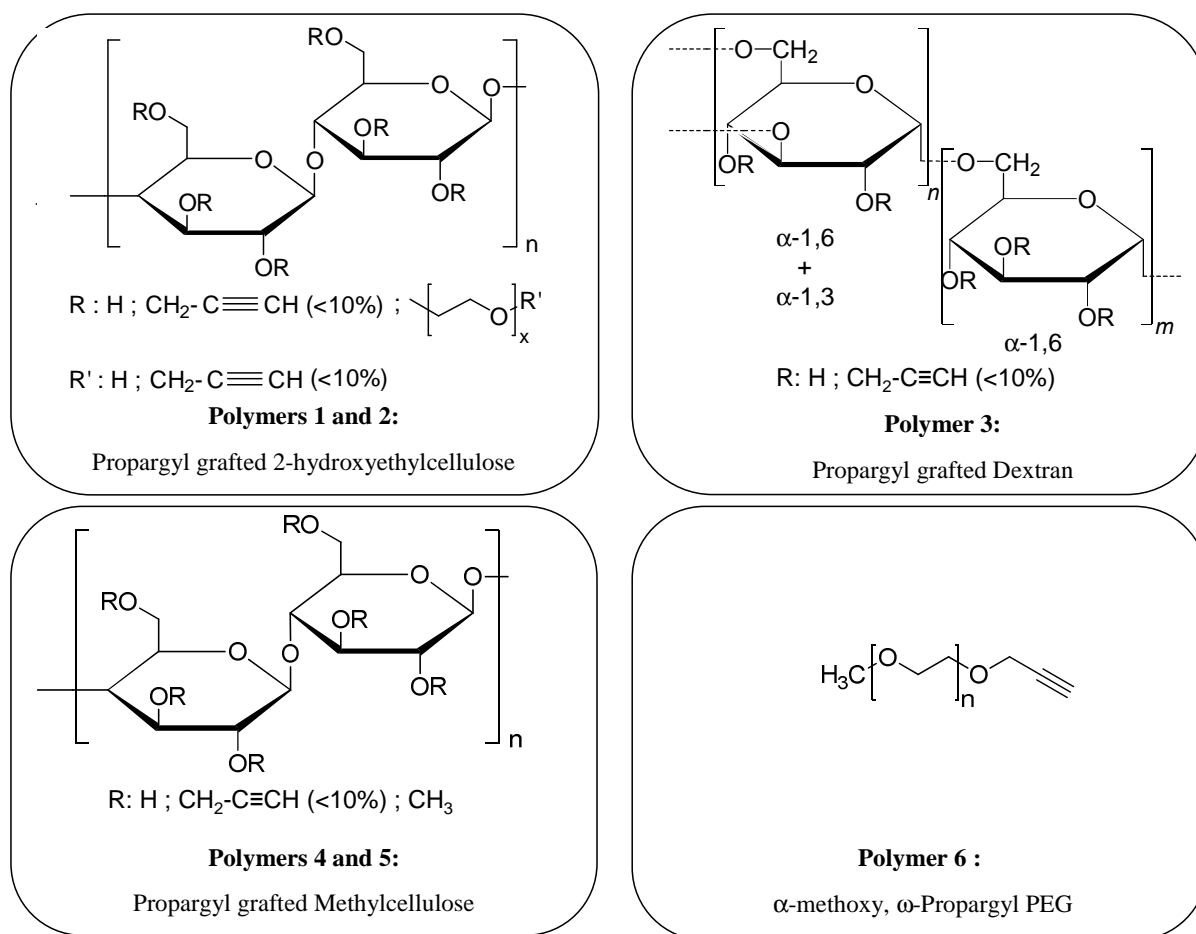


Figure 8. Antiadhesive copolymers **1** to **6**.

2.2. Synthesis of polymers 1 and 2:

333 mg (8.10^{-3} mol) of sodium hydroxyde (NaOH, Aldrich) were added to a stirred solution of hydroxyethyl cellulose (1.1 g, 4.10^{-3} mol, $M_w = 250000$ g/mol, Aldrich) in 150 mL of water. After 2h of stirring, 3.9 mL (5.10^{-2} mol) of propargyl chloride (98%, Aldrich) and 50 mg (3.10^{-4} M) of sodium iodide (NaI, Aldrich) in 2.5 mL of 1,4-dioxane were added to the solution. After stirring 15h at room temperature, the solution was dialysed and lyophilisated to give the polymers **1** or **2**.

FTIR-ATR : $\nu_{\text{O-H}} = 3393 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$; $\delta_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 1424 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (D_2O) δ/ppm : 4.49 (m; $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-$) ; 4.21 (s, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); [4.00-3.00] ppm (m; $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$ and $-\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{cycle}}-$ and $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\text{H}_{\text{cycle}}-$) ; 1.80 ppm (s; $-\text{O}-\underline{\text{H}}$).

2.3. Synthesis of polymer 3

333 mg (8.10^{-3} mol) of sodium hydroxide were added to a stirred solution of Dextran (600 mg, 3.7 mmol, $M_w = 2.5 \times 10^6$ g/mol, DEXTRAN from *Leuconostoc mesenteroides*, Sigma-Aldrich) in 20 mL of water. Then, 152.5 μ L (1.85 mmol) of propargyl chloride and 33 mg of sodium iodide (2.10^{-4} mol) in 1.85 mL of 1,4-dioxane were added to the solution. After stirring 24h at room temperature, the final Dextran solution was dialysed and lyophilised to give the copolymer 3.

FTIR-ATR: $\nu_{O-H} = 3320 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{CH-CH_2} = 2900 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{C-O-C} = 1000 \text{ cm}^{-1}$; $\delta_{CH, CH_2} = 1200-1450 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O}) \delta/\text{ppm}$: 4,98 (m; -O-CH-O-); 4.40 (s, -CH₂-C \equiv CH); [4.10-3.40] (m, O-CH- and O-CH₂).

2.4. Synthesis of polymers 4 and 5

For a typical procedure, 830 mg of Methylcellulose (viscosity = 8000 cPs, $M_n \sim 100000$ g/mol, degree of substitution : 1.5-1.9) were dissolved in water (150 mL) at 0°C during 1 h. Then, sodium hydroxide (190 mg, 4.75 mmol) were added to the viscous solution. After complete dissolution of NaOH, propargyl chloride (2.51 mL, 34.1 mmol, 5 eq.) in 2.5 mL of 1,4-dioxane containing NaI (50 mg, 0.33 mmol, 5%) were added to the solution. After stirring vigorously 48 h at room temperature, the final Methylcellulose solution was heated in order to make the polymer precipitate. The off-white gel is isolated by filtration. The residual product was then dialysed in water during 2 days and lyophilised to give the polymer as a transparent solid (yield: 66%).

FTIR-ATR: $\nu_{O-H} = 3450 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{CH-CH_2} = 2830-3000 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O-C} = 1054 \text{ cm}^{-1}$, $\delta_{CH, CH_2} = 1300-1500 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O) : 4.49 (m; -O-CH-O-) ; [4.05-2.09] (m, -O-CH- and -O-CH₂ and -O-CH₃).

2.5. Synthesis of polymer 6

To a solution of poly(ethylene glycol) methyl ether ($M_n \sim 750$ g/mol, 2.1 g, 2.8 mmol) in THF (20 ml) at 0 °C under a N_2 atmosphere, NaH (206 mg, 8.6 mmol, 3eq.) was slowly added over 30 min. [Sodium hydride (60% in mineral oil, Aldrich Chemical Co.) was washed with diethyl ether before use.]. The mixture was allowed to warm to room temperature and then stirred for 2 h. After cooling to 0 °C, propargyl chloride (0.98 mL, 13.3 mmol, 5 eq) was added. The mixture was allowed to warm to 45°C and stirred for a further 24 h. The white precipitate was filtered off and washed three times with THF. The combined filtrate and washing solutions were evaporated to give the polymer 6, alkyne-MPEO-750, as a colorless oil (~90% yield).

IRTF-ATR: $\nu_{O-H} = 3550$ cm^{-1} ; $\nu_{CH_2} = 2865$ cm^{-1} ; $\nu_{C-O-C} = 1095$ cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm : 4.19 (s, $-CH_2-C\equiv CH$, 2H) ; [3.90-3.50] (m, $-CH_2-CH_2-O$, 62H); 3.35 (s, CH_3-O- , 3H); 2.40 (s, $-CH_2-C\equiv CH$, 1H).

ANNEXE 2 : Chapitre 2

L'ensemble de cette section concerne les figures liées au chapitre 2. Elles sont répertoriées par ordre chronologique de lecture.

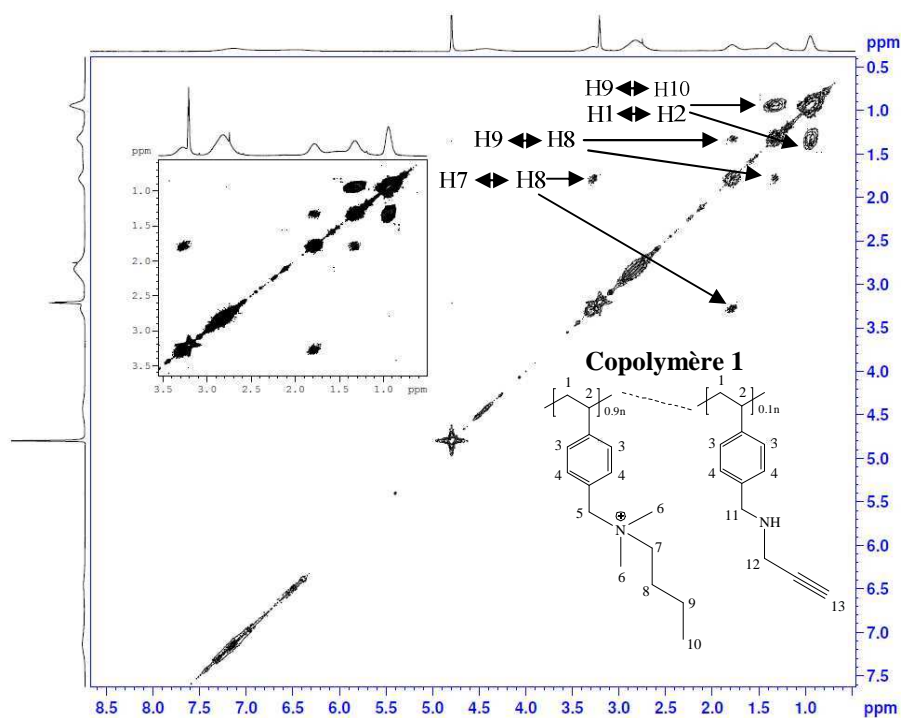


Figure A2-1. Analyse RMN ¹H (COSY) 2D du copolymère 1

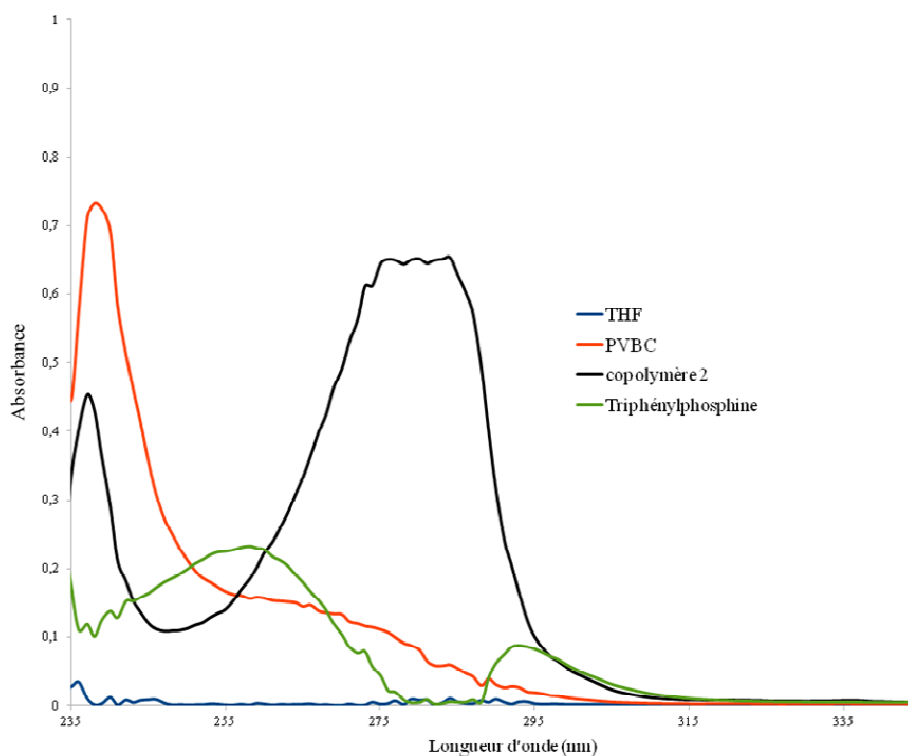


Figure A2-2. Spectres UV-visible du PVBC, de la triphénylphosphine et du copolymère **2** en solution dans le THF

La spectroscopie UV-visible n'a pu être utile que dans le cas où les réactifs de départ et le copolymère final absorbaient en UV-visible et étaient solubles dans un même solvant transparent dans l'UV-visible. Le seul cas répondant à ces exigences est celui du copolymère **2**.

Ainsi, les spectres UV-visible du PVBC de la triphénylphosphine (TPP) et du copolymère **2** en solution dans le THF confirme la formation d'une nouvelle structure chimique à partir du PVBC et de la TPP (**Figure A2-2**). En effet, le spectre du copolymère **2** présente deux bandes d'absorption, l'une à 237 nm et l'autre à 280 nm. La bande d'absorption à 237 nm correspond aux transitions électroniques des électrons π du groupement phényle directement lié à la chaîne principale du copolymère **2**. En effet, cette bande d'absorption est présente sur le spectre UV du PVBC. La large bande d'absorption à 280 nm correspond aux transitions électroniques des électrons π des trois groupements phényle directement liés au phosphonium, alors que l'absorption des trois groupements phényle de la TTP se trouve à 260 nm. Ce décalage vers les longueurs d'onde plus élevées (effet bathochrome) est provoqué par la charge positive sur l'atome de phosphore.

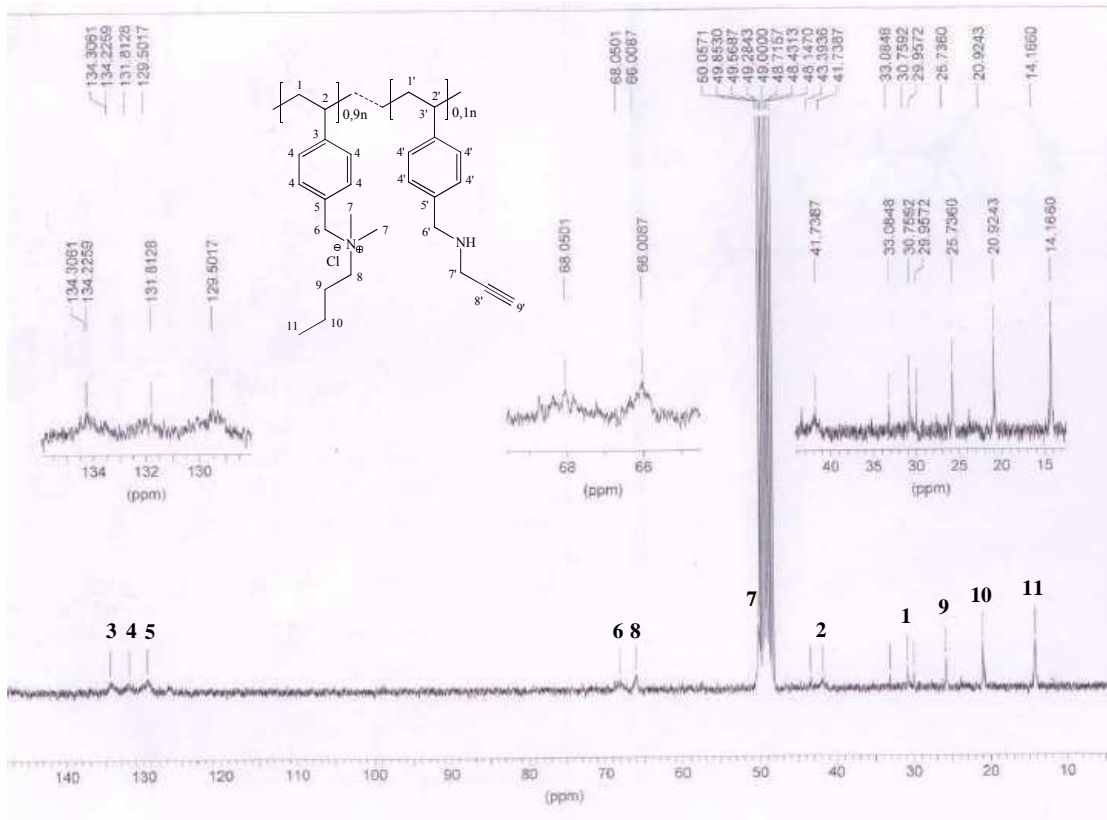


Figure A2-3. Analyse RMN ^{13}C du copolymère 1

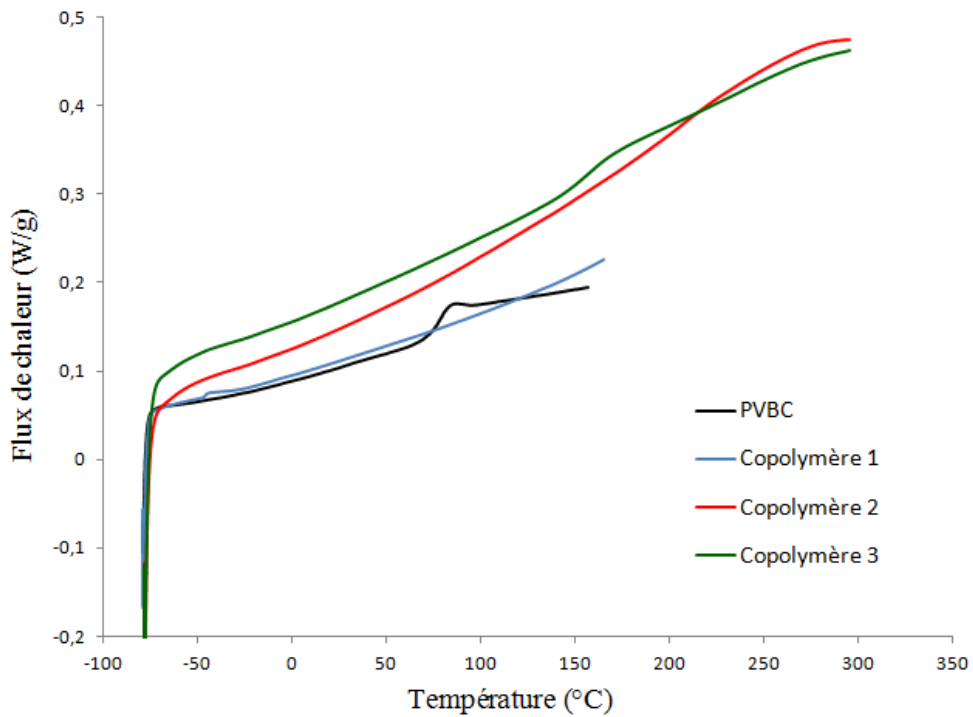


Figure A2-4. Analyses DSC du PVBC et des copolymères 1 à 3

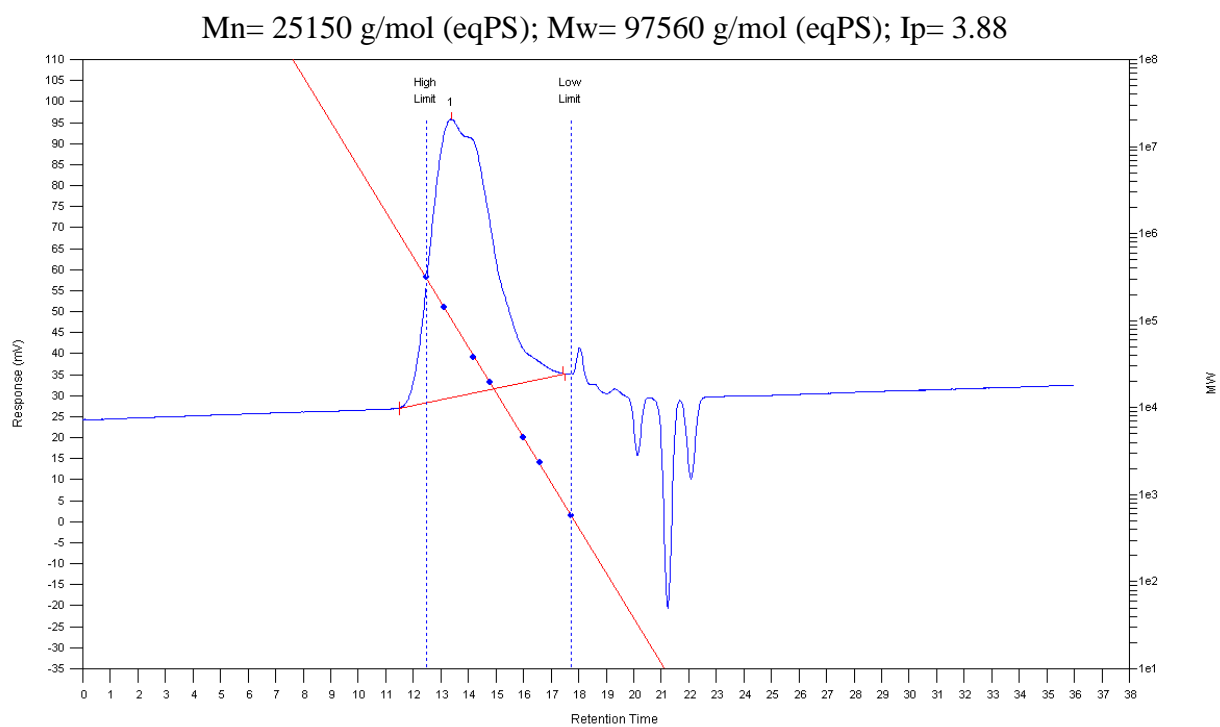


Figure A2-5. Analyse CES du pDMAEMA

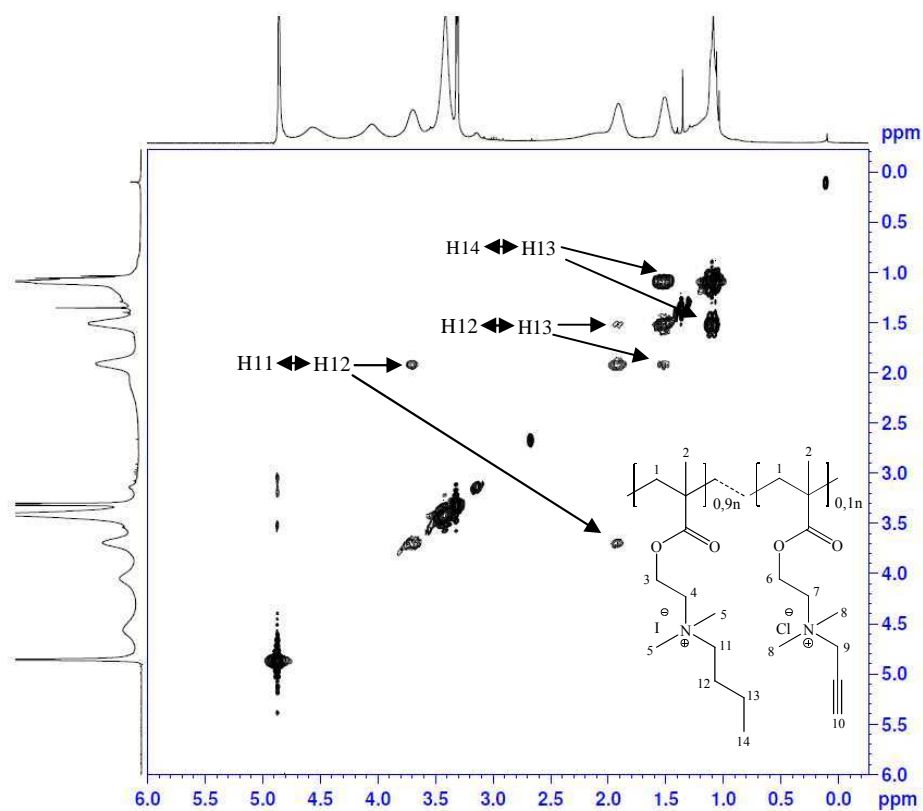


Figure A2-6. Analyse RMN ^1H (COSY) 2D du copolymère 4

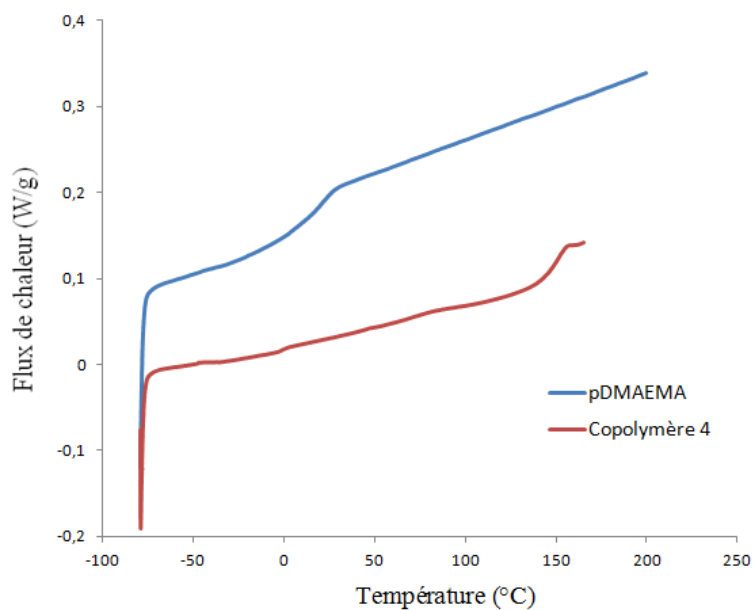


Figure A2-7. Analyses DSC du pDMAEMA et du copolymère 4

Rapport DMF/eau	Aire ν (CH,CH ₂) [3000-2790] cm ⁻¹	Aire ν (NN) [2190-1900] cm ⁻¹	rapport Aire ν (NN) / Aire ν (CH,CH ₂)
6 / 1	1,1	5,9	5,4
5 / 1	0,7	2,8	4,0
3 / 1	0,9	1,3	1,4

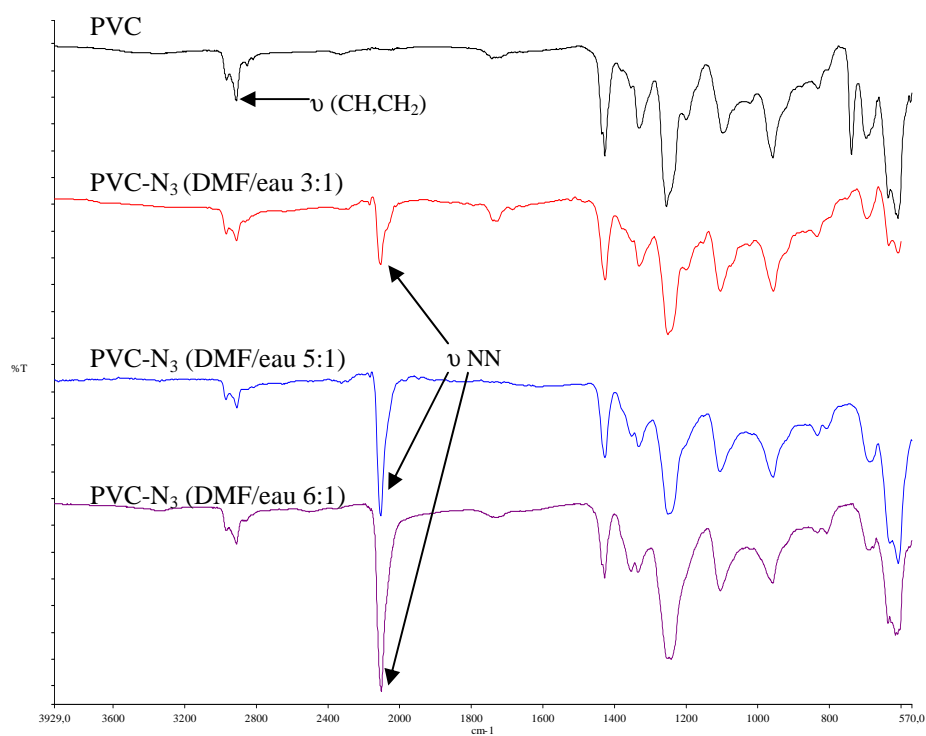


Figure A2-8. Suivi de l'intensité de la liaison N≡N en fonction du rapport DMF/eau par IRTF

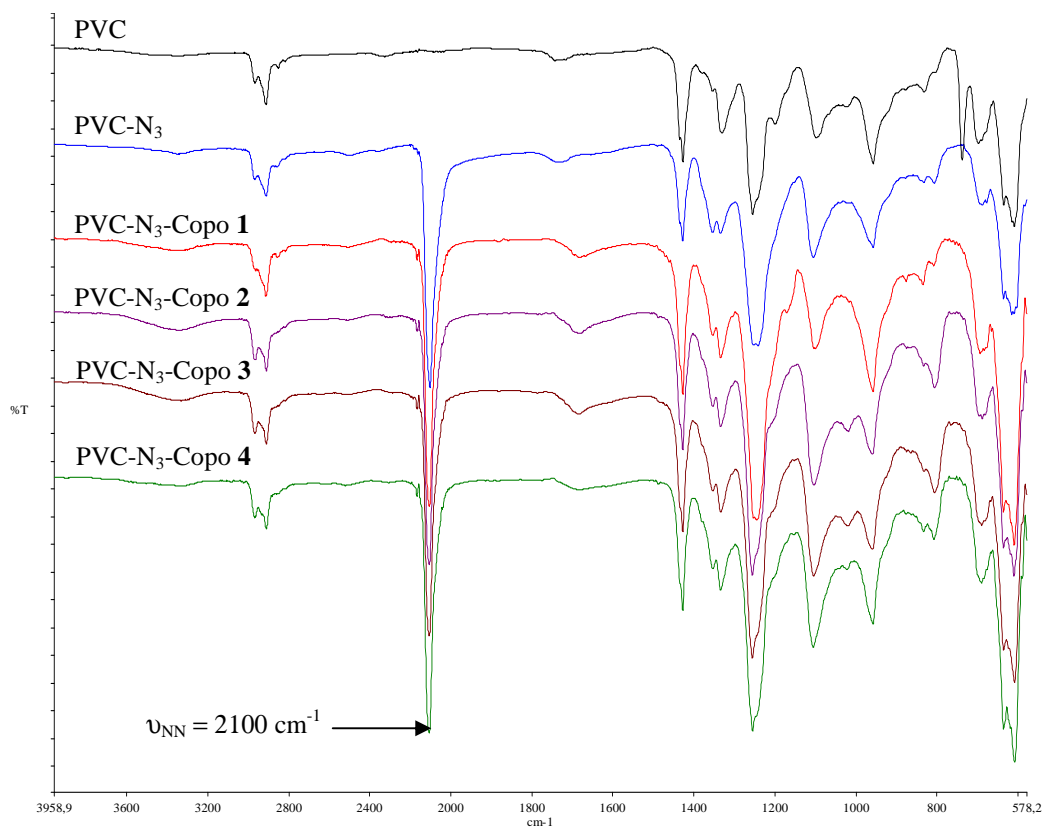


Figure A2-9. Analyses IRTF des surfaces PVC, PVC-N₃ et des surfaces cationiques

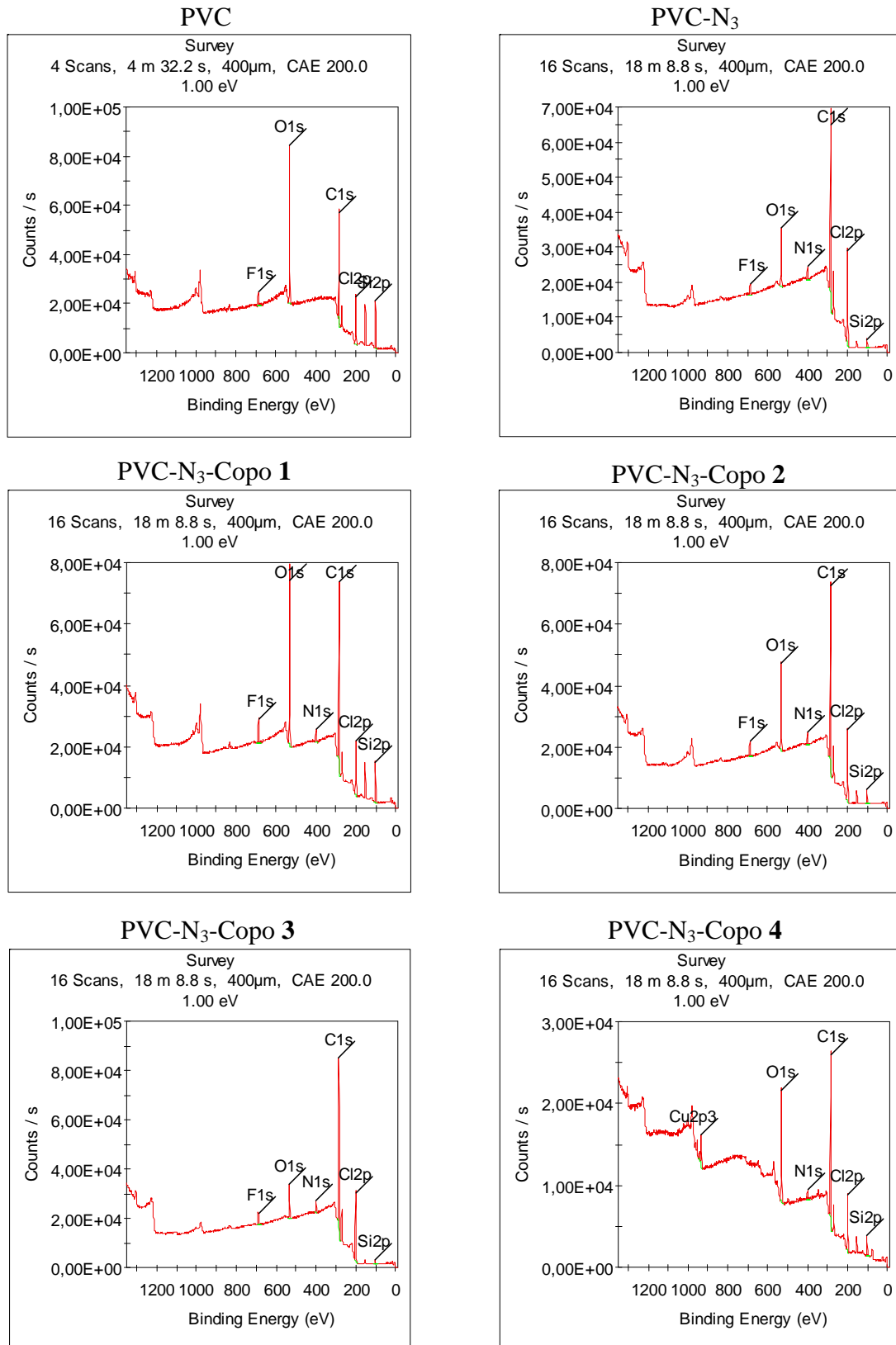


Figure A2-10. Spectres XPS complets des surfaces PVC, PVC-N₃ et des surfaces cationiques

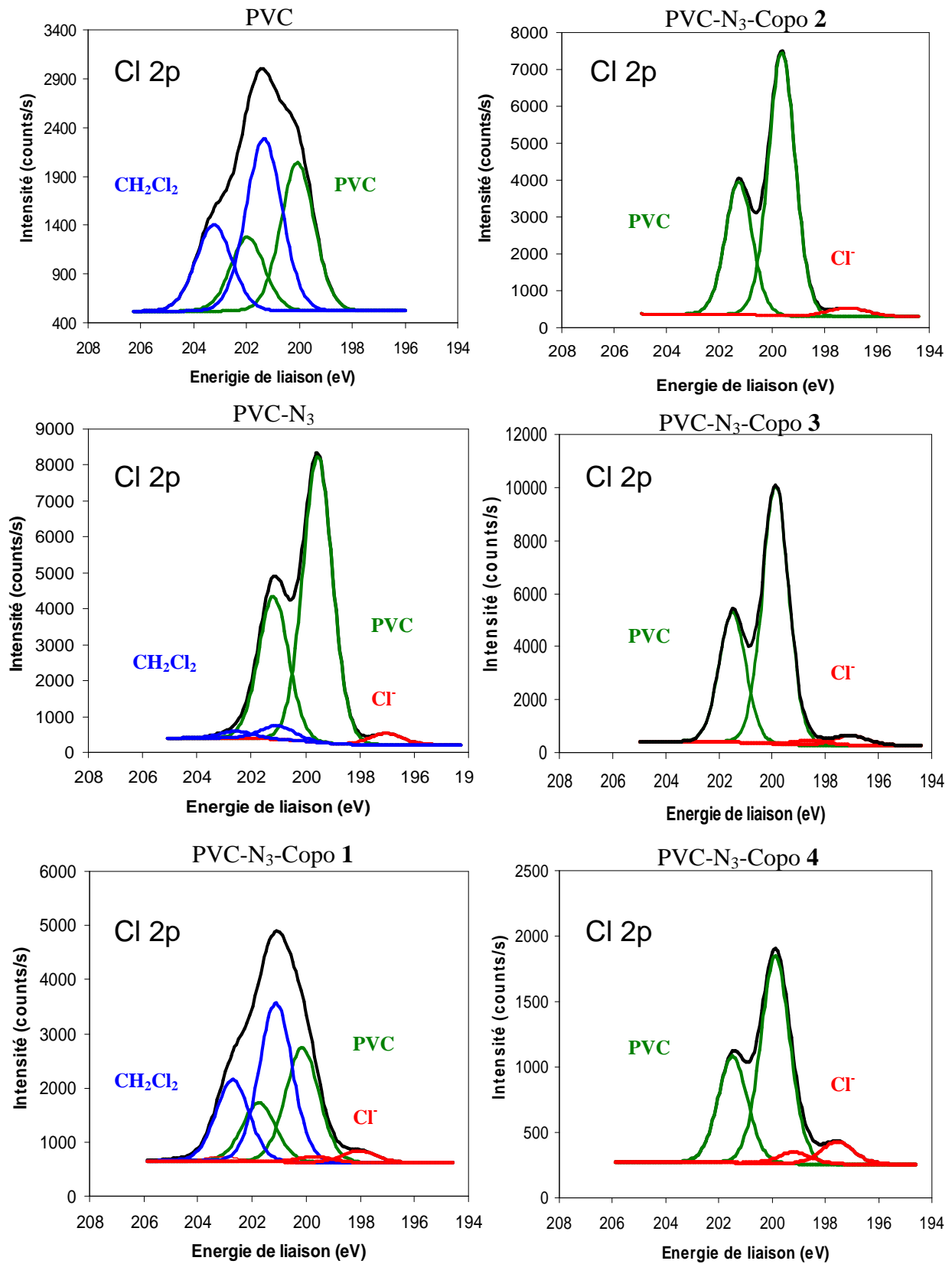


Figure A2-11. Pics Cl 2p des spectres XPS à haute résolution des surfaces cationiques et des surfaces témoins PVC et PVC-N₃.

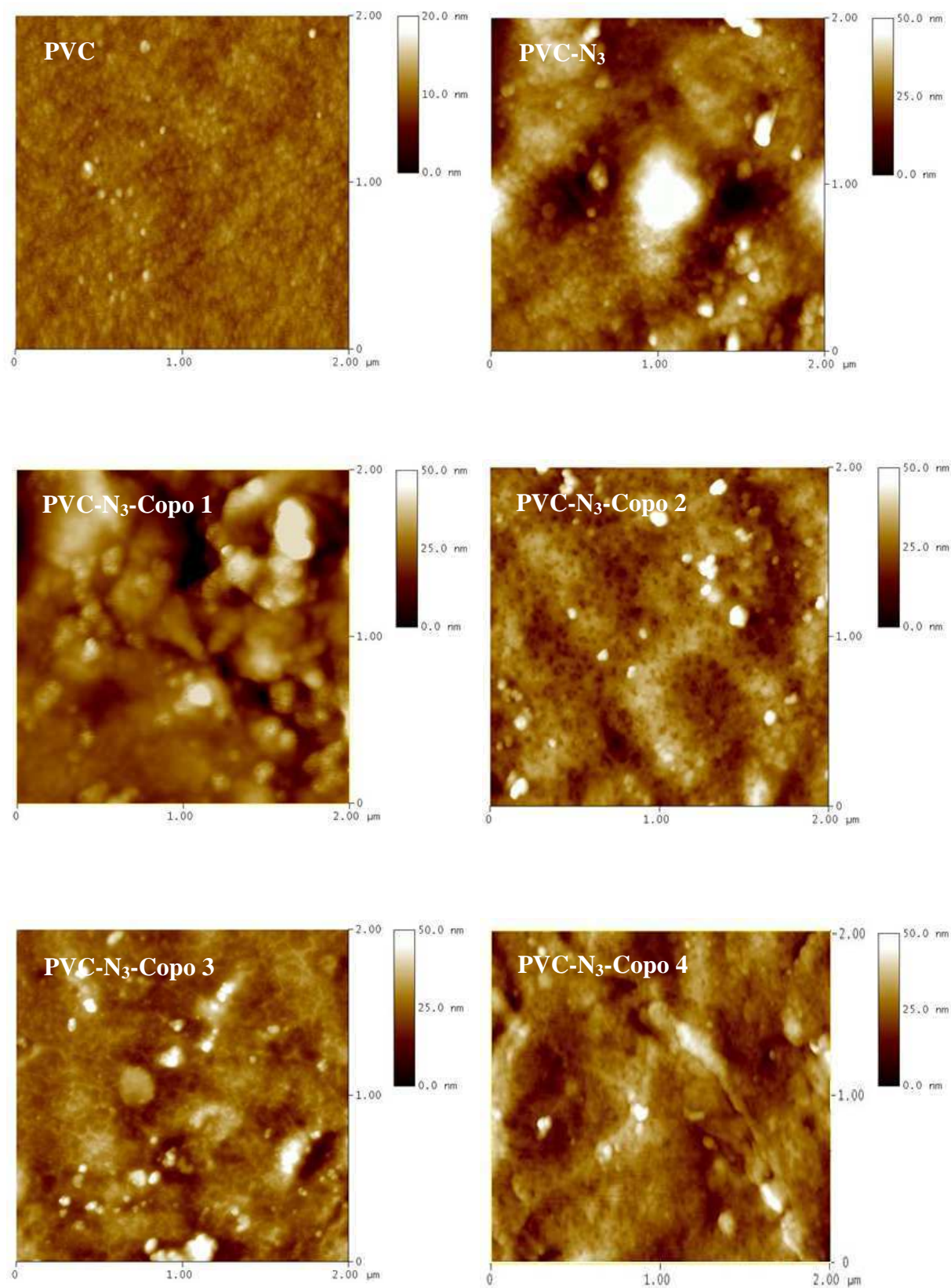


Figure A2-12. Images AFM 2D des surfaces cationiques et des surfaces PVC et PVC-N₃

ANNEXE 3 : Chapitre 3

L'ensemble de cette section concerne les figures liées au chapitre 3. Elles sont répertoriées par ordre chronologique de lecture.

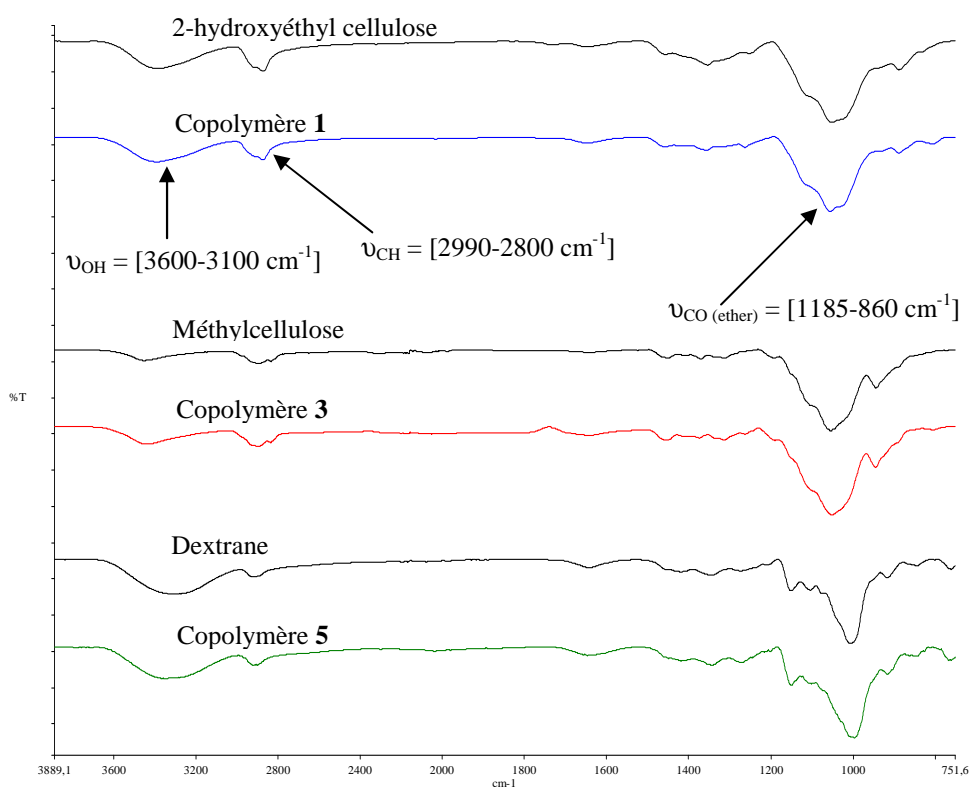


Figure A3-1. Spectres IRTF des copolymères **1**, **3**, **5** et des polysaccharides précurseurs (2-hydroxyéthyl cellulose, méthylcellulose et dextrane)

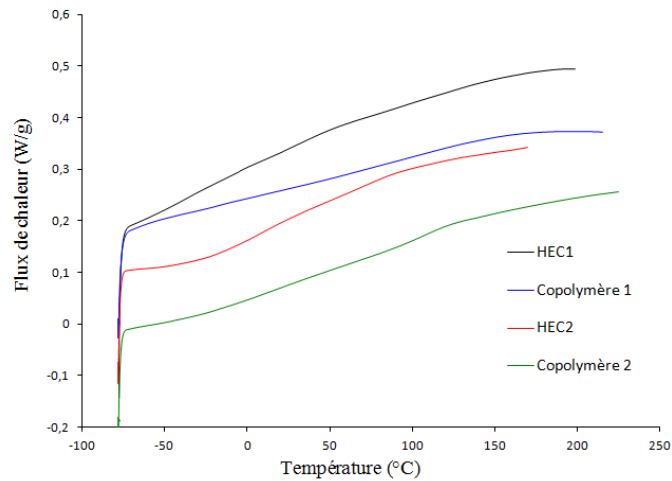


Figure A3-2. Analyses DSC des copolymères 1 et 2 et des polysaccharides précurseurs HEC1 et HEC2

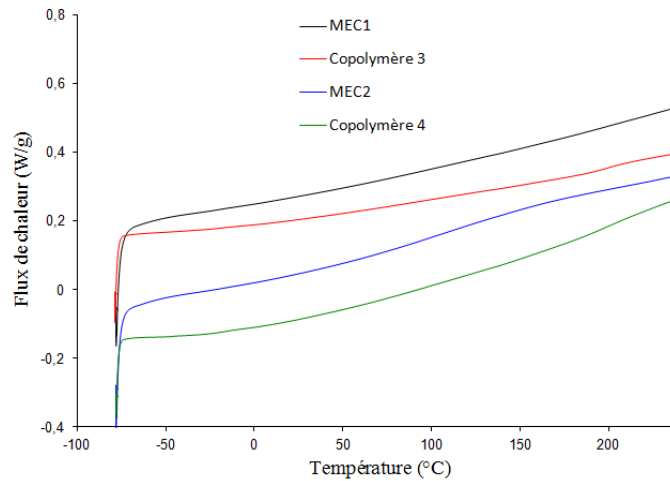


Figure A3-3. Analyses DSC des copolymères 3 et 4 et des polysaccharides précurseurs MEC1 et MEC2

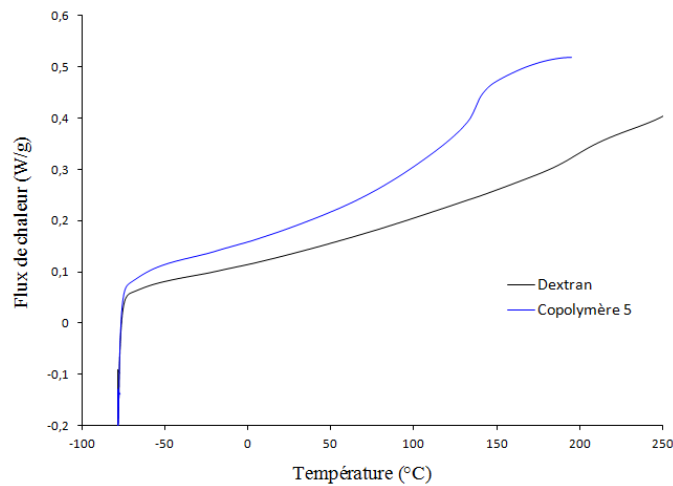


Figure A3-4. Analyses DSC du copolymère 5 et du dextrane

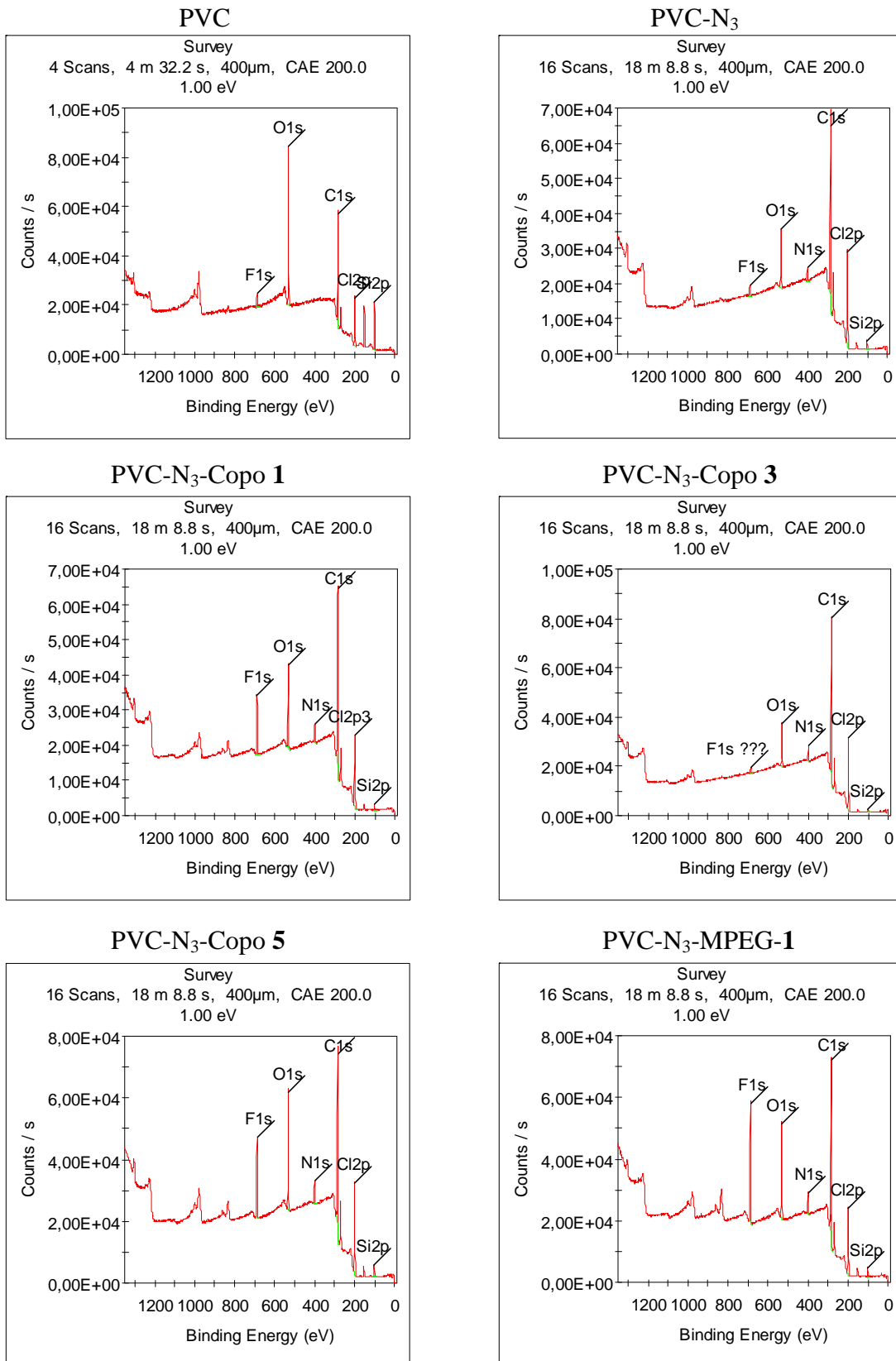


Figure A3-5. Spectres XPS complets des surfaces PVC, PVC-N₃, PVC-N₃-Copo 1, PVC-N₃-Copo 3, PVC-N₃-Copo 5 et PVC-N₃-MPEG-1

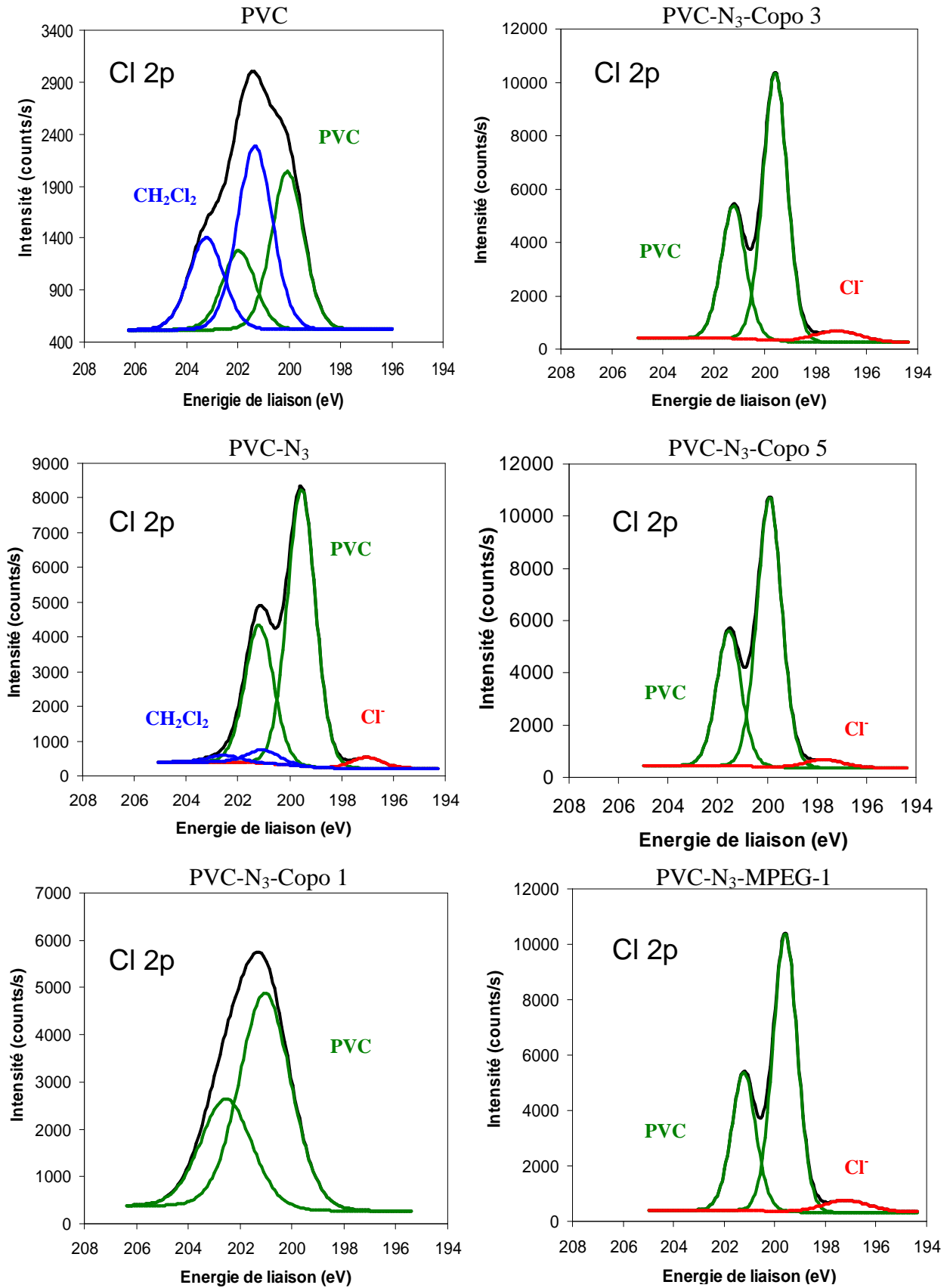


Figure A3-6. Pics Cl 2p des spectres XPS à haute résolution des surfaces PVC, PVC-N₃, PVC-N₃-Copo 1, PVC-N₃-Copo 3, PVC-N₃-Copo 5, PVC-N₃-MPEG-1

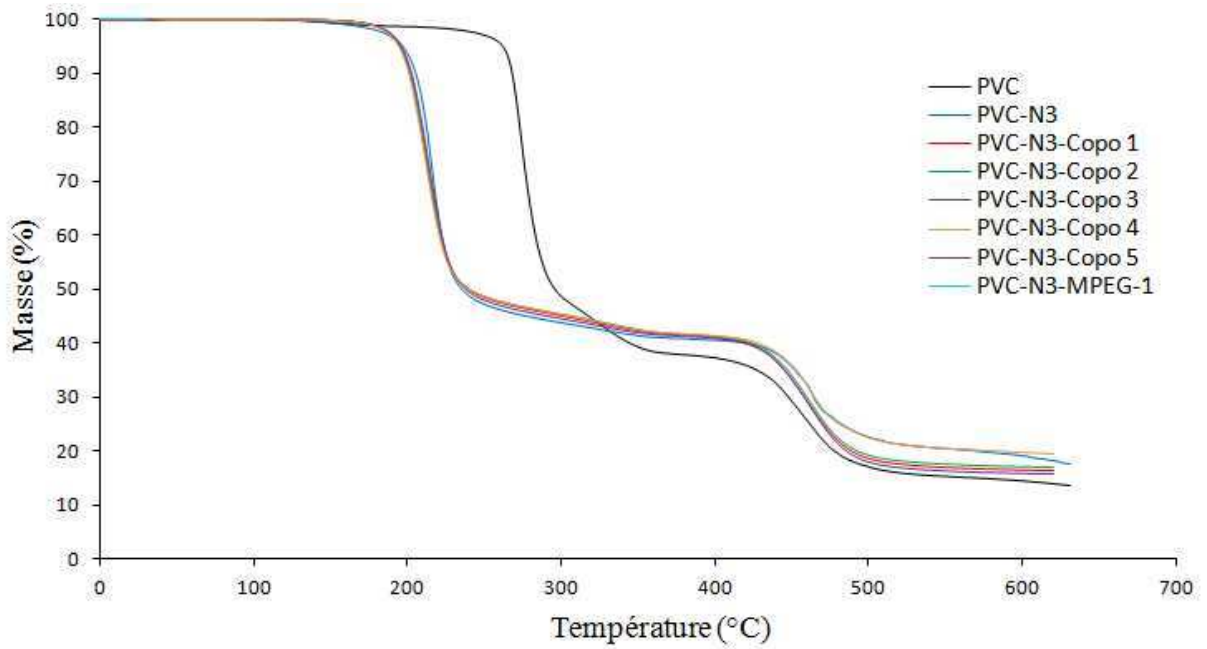


Figure A3-7. Analyses TGA des surfaces PVC, PVC-N₃ et des surfaces antiadhésives

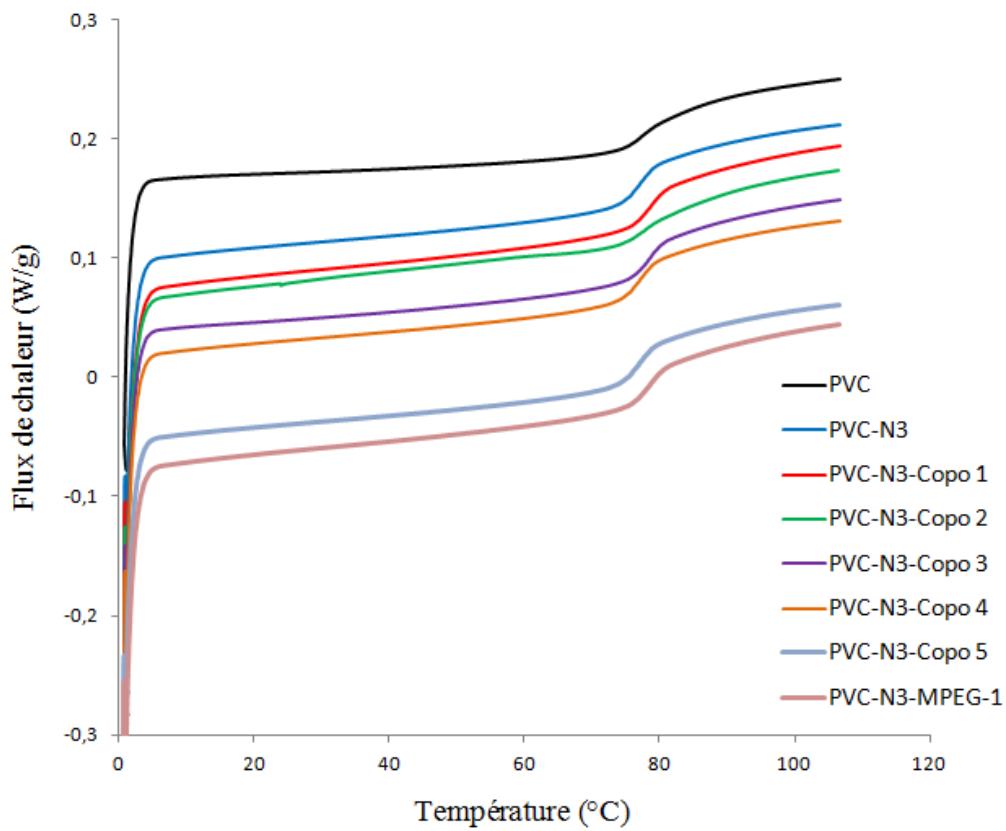


Figure A3-8. Analyses DSC des surfaces PVC, PVC-N₃ et des surfaces antiadhésives