



**HAL**  
open science

# Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques

François Aubert-Viard

► **To cite this version:**

François Aubert-Viard. Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S027 . tel-01090531

**HAL Id: tel-01090531**

**<https://theses.hal.science/tel-01090531>**

Submitted on 3 Dec 2014

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

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



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

**Université du Droit et de la Santé**

**École Doctorale Biologie-Santé**

**Thèse**

**pour obtenir le grade de**

**Docteur de l'Université du Droit et de la Santé de Lille**

**Sciences physico-chimiques et technologies pharmaceutiques**

**Présentée et soutenue publiquement par**

**François AUBERT-VIARD**

**Le 26 septembre 2014**

**Conception et évaluation d'un pansement multicouche  
antibactérien pour le traitement des plaies chroniques**

**Directeur de la thèse :**

**Dr. Nicolas BLANCHEMAIN, Université de Lille 2**

**Membres du jury :**

**Prof. Xavier GARRIC, Université de Montpellier 1**

**Rapporteur**

**Prof. Emmanuel PAUTHE, Université de Cergy-Pontoise**

**Rapporteur**

**Prof. Éric SENNEVILLE, CHU de Tourcoing**

**Examineur**

**Prof. Bernard MARTEL, Université de Lille 1**

**Examineur**

**Dr. Christel NEUT, Université de Lille 2**

**Examineur**

**Dr. Catherine DEMAILLY-MULLIÉ, Université de Picardie**

**Examineur**

**Dr. Maxime MOURER, Université de Lorraine**

**Examineur**

*Nulle pierre ne peut être polie sans friction.*

*Nul homme ne peut parfaire son expérience sans épreuves.*

Confucius

*Faut toujours être positif, mieux vaut dire lipophile que hydrophobe.*

Bernard MARTEL

## Remerciements

Je remercie :

Monsieur **Xavier GARRIC**, Professeur à l'Université de Montpellier 1 et monsieur **Emmanuel PAUTHE**, Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise d'avoir accepté de rapporter mon mémoire de thèse. Je les remercie pour leur présence et leur participation à mon jury de thèse.

Monsieur **Éric SENNEVILLE**, Professeur au Centre Hospitalier Universitaire de Tourcoing d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Madame **Catherine DEMAILLY-MULLIÉ**, Maître de conférences à l'Université de Picardie et monsieur **Maxime MOURER**, maître de conférences à l'Université de Lorraine pour leur participation à mon jury de thèse.

Je souhaite également remercier le docteur **Laurent RIFFAUD**, neurochirurgien à l'Hôpital Pontchaillou de Rennes, sans qui, je n'aurai pas pu envisager pouvoir continuer mes études jusqu'à ce niveau. C'est grâce à sa maîtrise parfaite en neurochirurgie que je peux, aujourd'hui, réaliser mon doctorat de sciences.

Je remercie **Nicolas BLANCHEMAIN**, maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Lille pour m'avoir encadré durant ce travail de thèse. Je te remercie particulièrement pour m'avoir fait confiance dans la gestion de ce projet avec une certaine autonomie. Je te remercie également pour tous tes conseils et ta grande disponibilité.

Je remercie également monsieur **Bernard MARTEL**, professeur à l'Université de Lille 1 pour son expertise et son soutien qu'il a pu m'apporter depuis mon stage de master 2 à Lille 1 jusqu'à la finalisation de ma thèse. Je le remercie pour sa simplicité et son franc-parler.

Je tiens également à remercier madame **Christel NEUT**, maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Lille pour son aide et sa disponibilité dans la réalisation des évaluations microbiologiques. Je la remercie également pour la confiance qu'elle m'a accordé et son accueil au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté de pharmacie.

Je remercie également chacune des personnes qui m'a aidé dans les différentes expérimentations microbiologiques. Merci **Isabelle**, **Séverine** et **Carole** pour votre aide et votre bonne humeur et bien sûr pour le milieu;-).

Je remercie **Adeline MARTIN**, avec qui j'ai travaillé durant près de deux ans sur cette thématique de recherche. Merci Adeline de m'avoir accompagné pendant nos réunions mensuelles à durée prolongée... Á plus tard pour réaliser notre projet de start-up!!

Je remercie particulièrement toute l'équipe du GRB (Groupe de Recherche sur la B...). Merci pour cette superbe ambiance d'équipe que j'ai eu la chance de partager avec vous.

Je remercie particulièrement un super collègue et ami, **Mickaël MATON**, assistant ingénieur et peut être futur ingénieur d'étude. Merci pour ta disponibilité, ton sérieux mais aussi ta déconnade.

Je remercie également **Claudia FLORES**, **Maria JOSÉ GARCÍA**, **Adrien HERTAULT**, **Feng CHAI** et **Monique BONNIER** pour leur bonne humeur et leur accompagnement durant ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier également **Nicolas TABARY** pour son soutien et son aide. Merci aussi pour ces franches rigolades. Ravi d'avoir pu partager une soupe allemande avec toi.

Je tiens également à remercier chacun des stagiaires qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail de thèse. Merci **Chloé**, **Sarah**, **Anne-Sophie**, **Alice**, **Asmaa**, **Raphaël** et **Romain**.

Je remercie particulièrement **Moussa DIOP**, assistant au laboratoire de pharmacie galénique à l'université de Cheikh Anta à Dakar pour l'investissement considérable qu'il a consacré à la formulation des gels.

Je remercie également **Oumaira RAHMOUNI** pour sa participation et son investissement important dans ce projet de recherche. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur et ton assiduité. Je te souhaite de pouvoir réaliser tes projets et t'encourage à persévérer quoiqu'il puisse arriver.

Je remercie monsieur **Ludovic JANUS**, maître de conférences et **Ahmed ADDAD**, ingénieur à l'Université de Lille 1, pour leur aide dans la réalisation des analyses par MEB.

Je remercie particulièrement ma femme, **Murielle RUÉS**, pour son soutien inconditionnel durant ces 3 années de thèse. Je te remercie pour ta patience et ta compréhension durant la finalisation de ma thèse. **Abigaël** et **Margot**, papa vous remercie de l'avoir accompagné et changé les idées entre deux couches et deux biberons.

## Résumé

Les plaies chroniques représentent un problème de santé publique dont la prévalence augmente avec l'âge, l'état de santé du patient (diabète) et la sédentarité. Le risque d'infection des plaies chroniques augmentant avec le temps de guérison de la plaie, il est donc nécessaire d'apporter des soins réguliers afin de prévenir ou lutter contre l'infection de ces plaies jusqu'à leur complète guérison. En cas d'infection, la colonisation critique ou infection localisée peut conduire, en cas d'absence de traitement adapté, à la nécessité d'une intervention chirurgicale afin de prévenir l'infection systémique voire la mort du patient. La prolifération des bactéries peut aboutir à la formation d'un biofilm protecteur diminuant l'efficacité des défenses de l'organisme et des agents antimicrobiens. L'objectif de ce travail de thèse est donc de concevoir un dispositif médical sous forme de pansement capable de libérer de façon prolongée un principe actif antibactérien à large spectre d'action.

Nous avons obtenu un textile fonctionnalisé par la réticulation du chitosane (CHT). Le revêtement de polymère a permis d'obtenir un support chargé positivement ou négativement en fonction de la nature et de la concentration de l'agent réticulant. Les textiles ont ensuite été activés par deux agents antibactérien, l'iode ( $I_3^-$ ) ou l'argent ( $Ag: Ag^+$ ). Les textiles activés par l'argent ont rapporté une activité antibactérienne plus importante que ceux activés par l'iode. Un système polyélectrolyte multicouche (PEM) *layer-by-layer* auto-assemblé a ensuite été construit sur les textiles activés par l'Ag. L'objectif est de créer une barrière afin de limiter la libération de l'Ag et ainsi prévenir sa toxicité. Les polyélectrolytes (PE) utilisés pour la construction de ce système PEM sont le CHT en tant que PE cationique et un polymère de cyclodextrine (CD) en tant que PE anionique. La capacité de formation de complexe d'inclusion des CD avec des principes actifs, apportée par le polymère de CD dans le système PEM, a ensuite été utilisée afin de charger un principe actif, la chlorhexidine (Chx).

Un dispositif avec une activité antibactérienne apporté par l'Ag a donc été obtenu et le système PEM a permis de libérer de façon prolongée la Chx.

### Mots-clés

Pansement, textile fonctionnalisé, antibactérien, multicouche, chitosane, cyclodextrine

## Abstract

The chronic wounds represent a public health problem which the prevalence increases with age, patient health (diabetes) and sedentary lifestyle. The infection of the chronic wounds increasing with wound healing delay, cares need to be repeated to prevent or fight wound infection until their complete healing. In the case of infected wound and without adapted treatment, the critical colonization or localized infection can lead to surgery operation in order to prevent systemic infection or death. The bacterial proliferation can lead to the biofilm formation which increases the bacterial protection against the body's natural defenses and antimicrobial agents. So, the aim of this thesis work is to elaborate a medical device as wound dressing for extended broad spectrum antibacterial drug release.

We obtained functionalized textile by the crosslinking of the chitosan (CHT). The polymer coating allows obtaining a device positively charged or negatively charged in function of the nature and the concentration of the crosslinking agent. Then, the textiles are activated by two antibacterial agents, the iodide ( $I_3^-$ ) or the silver ( $Ag^+$ ). The silver activated textiles report an antibacterial activity greater than those activated by iodide. Then, a polyelectrolyte multilayer (PEM) system layer-by-layer self-assembly is build-up on the silver activated textiles. The aim is to obtain a barrier to limit the silver release and prevent its toxicity. The polyelectrolytes (PE) used for the PEM system build-up are the CHT as cationic PE and a CD polymer as anionic PE. The ability of the CD to form inclusion complex with drug, bring by the CD polymer in the PEM system, is used for the drug loading by chlorhexidine (Chx).

A device with antibacterial activity brought by the silver is obtained and the PEM system allow an extended Chx release.

### Keywords

Dressing, functionalized textile, antibacterial, multilayer, chitosan, cyclodextrin

## Abréviations

ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	:	Microscopie à Force Atomique
Ag	:	Argent
ANSM	:	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
AO	:	Acide Orange
ARN	:	Acide RiboNucléique
ATB	:	Antibiotique
ATU	:	Autorisation Temporaire d'Utilisation
bFGF	:	basic Fibroblast Growth Factor
CD	:	Cyclodextrine
CHT	:	Chitosane
Chx	:	Chlorhexidine
CMB	:	Concentration Minimale Bactéricide
CMC	:	CarboxyMéthylCellulose
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
CNRS	:	Centre National de Recherche Scientifique
CTR	:	Acide Citrique
DD	:	Degré de Désacétylation
DM	:	Dispositif Médical
DMF	:	DiMéthylFormamide
FDA	:	<i>Food and Drug Administration</i>
Gpn	:	Génipine
HA	:	Hyaluronic Acid
HAS	:	Haute Autorité de Santé
HP	:	Hydroxy-Propyl
HPLC	:	High Phase Liquid Chromatography, Chromatographie en phase liquide haute performance
ICH	:	Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
IRTF	:	InfraRouge à Transformée de Fourier
ISA	:	Institut des Sciences Analytiques



ISP	:	Ingénierie des Systèmes Polymère
LPS	:	LipoPolySaccharide
MEB	:	Microscopie Électronique à Balayage
MEC	:	Matrice ExtraCellulaire
MeCD	:	Méthyl-β-Cyclodextrine
MEM	:	Milieu Essentiel Minimum
MHA	:	Mueller-Hinton Agar
MMP/TIMP	:	Matrix MetalloProtease/Tissue Inhibitory of Matrix
M <sub>w</sub>	:	Molecular weight, Masse moléculaire
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PAA	:	Poly (Acrylic Acid)
PAH	:	Poly (Allylamine Hydrochloride)
PBS	:	Phosphate Buffer Saline, Tampon phosphate salin
PCA	:	Acide Polycarboxylique
PDADMA	:	Poly (DiAllylDiMethylAmmonium)
PDGF	:	Platelet-Derived Growth Factor
PE	:	PolyÉlectrolyte
PE-	:	PolyÉlectrolyte anionique
PE+	:	PolyÉlectrolyte cationique
PEG	:	PolyÉthylène Glycol
PEM	:	PolyÉlectrolyte Multicouche
PET	:	Polyéthylène téréphtalate
PET-CHT-PEM <sub>n</sub> , PEM <sub>n</sub>	:	PET fonctionnalisé par le CHT à 2,5% m/V recouvert d'un système PEM à n paires de couches
PET-CTR"% "/CHT"% "	:	PET fonctionnalisé par le CHT (à % <sub>m/v</sub> ) réticulé par le CTR (à % <sub>m/v</sub> )
PET-Gpn"% "/CHT"% "	:	PET fonctionnalisé par le CHT (à % <sub>m/v</sub> ) réticulé par la Gpn (à % <sub>m/v</sub> )
PGA	:	Poly (Glutamic Acid)
PLL	:	Poly (L-Lysine)
polyCTR-CD	:	polymère de cyclodextrine réticulé par le CTR
polyCTR-MeβCD	:	Polymère de Méthyl-β-Cyclodextrine réticulé par le CTR
PP	:	PolyPropylène

PSS	:	Poly (sodium Styrène Sulfonate)
PVDF	:	Polyfluorure de VinyliDène
PVP	:	PolyVinylPyrrolidone
RC	:	Ringer Cystéiné
Rm	:	Rapport molaire
SN2	:	Substitution Nucléophile bimoléculaire
SARM	:	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
TBO	:	Toludin Blue O
TCPS	:	Tissue Culture PolyStyrène, Contrôle de culture cellulaire
TLC	:	Technologie Lipido-Colloïde
UFC	:	Unité Formant des Colonies
UMET	:	Unité Matériaux Et Transformation
UV	:	UltraViolet
Vis	:	Visible

## Table des matières

Introduction générale.....	6
Chapitre I: Revue bibliographique .....	9
Partie 1: La peau, ses problèmes et les traitements.....	10
1.    Structure, physiologie et renouvellement de la peau .....	10
a.    Structure et fonctions de la peau .....	10
b.    Physiologie et renouvellement de la peau.....	13
2.    Plaies et cicatrisation.....	14
a.    Les plaies .....	14
b.    Le processus de cicatrisation .....	16
c.    Problème de cicatrisation .....	17
3.    Le pansement, dispositif médical pour le traitement des plaies.....	18
a.    Intérêt du pansement .....	18
b.    Nature, composition et applications des pansements.....	19
4.    Flore cutanée commensale .....	21
5.    Prévention/traitement des plaies infectées .....	21
a.    Substances antibactériennes.....	22
b.    Méthode biologique antibactérienne.....	30
6.    Pansements avec principes actifs .....	31
Partie 2 : Le traitement de surface des dispositifs médicaux .....	32
1.    Le chitosane (CHT).....	32
a.    Ses propriétés antibactériennes .....	33
b.    Ses applications médicales.....	34
c.    Sa réticulation .....	34
2.    Les cyclodextrines (CD) .....	36
3.    Les systèmes polyélectrolyte multicouche (PEM).....	38
a.    Les substrats .....	39

b.	Les polyélectrolytes (PE).....	40
c.	Méthodes de construction des systèmes PEM .....	40
d.	Facteurs influençant la construction d'un système PEM .....	44
e.	Stabilisation du système PEM .....	47
Partie 3 :	Conclusion, stratégie employée et cahier des charges .....	49
1.	Stratégie employée et cahier des charges.....	50
2.	Schéma récapitulatif des voies utilisées pour les textiles .....	52
Chapitre II :	Produits, Matériels et Méthodes .....	53
Partie1 :	Matériels et produits.....	54
1.	Matériels .....	54
2.	Produits .....	54
Partie 2 :	Méthodes .....	56
1.	Fonctionnalisation des textiles.....	56
2.	Activation des textiles par l'argent ou l'iode .....	58
a.	Chargement par l'argent .....	58
b.	Chargement par l'iode .....	59
3.	Construction du système polyélectrolyte multicouche .....	59
a.	Méthode de construction.....	59
b.	Dégradation du système PEM.....	62
c.	Chargement du système PEM par la chlorhexidine .....	62
4.	Caractérisations physico-chimique .....	63
a.	Réaction entre le chitosane et la génipine.....	63
b.	Analyse infrarouge.....	63
c.	Microscopie électronique à balayage.....	63
d.	Quantification des groupements carboxyliques et amines.....	63
e.	Dosage des principes actifs .....	66
5.	Évaluation biologique <i>in vitro</i> .....	69

a.	Évaluation de la cytocompatibilité des polymères.....	69
b.	Évaluation de la cytocompatibilité des textiles fonctionnalisés .....	70
6.	Évaluation microbiologique <i>in vitro</i> .....	70
a.	Concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	71
b.	Cinétique de la réduction bactérienne: <i>Kill-time</i> .....	71
c.	Diamètre de la zone d'inhibition : Antibiogramme.....	72
Chapitre III: Résultats .....		73
Partie 1: Fonctionnalisation et activation antibactérienne du textile .....		74
1.	Fonctionnalisation du textile par le CHT .....	74
a.	Réticulation du CHT par le CTR .....	74
b.	Réticulation du CHT par la Gpn .....	81
c.	Conclusion sur la fonctionnalisation.....	85
2.	Caractérisations physico-chimique et biologique des textiles .....	86
a.	Analyse infrarouge des textiles .....	86
b.	Observation par microscopie électronique à balayage .....	88
c.	Évaluation biologique des supports PET-CHT.....	90
d.	Conclusion sur les caractérisations physico-chimiques et biologiques .....	91
3.	Activation des textiles par l'argent ou l'iode .....	91
a.	Quantification de l'argent et de l'iode adsorbé sur les textiles .....	92
b.	Évaluation microbiologique <i>in vitro</i> .....	93
4.	Conclusion de la première partie .....	96
Partie 2: Construction du système polyélectrolyte multicouche.....		97
1.	Optimisation de la construction du système PEM .....	97
a.	Choix du polymère de cyclodextrine .....	97
b.	Chargement de la chlorhexidine sur les textiles .....	99
2.	Construction du système polyélectrolyte multicouche .....	101
a.	Construction par gravimétrie .....	101

b.	Amélioration de la stabilité du système polyélectrolyte multicouche .....	102
c.	Caractérisation physico-chimique.....	104
3.	Évaluation biologique .....	107
4.	Activation du système PEM par la chlorhexidine.....	108
a.	Chargement de la chlorhexidine .....	108
b.	Cinétique de libération de la chlorhexidine .....	109
c.	Évaluation microbiologique.....	111
5.	Conclusion de la seconde partie.....	113
Partie 3 : Construction d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag .....		115
1.	Comparaison de la construction du système PEM avec le PET-CTR10 ..	115
2.	Construction d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag.....	116
3.	Évolution de la construction .....	117
4.	Évaluation de la stabilité du système PEM.....	117
5.	Quantification de l'Ag .....	118
6.	Évaluation microbiologique.....	119
Conclusion de la troisième partie .....		121
Discussion .....		122
Fonctionnalisation du PET par le chitosane .....		123
1.	Réticulation par l'acide citrique ou la génipine.....	123
2.	Toxicité de la génipine .....	124
3.	Intérêt de la fonctionnalisation par le chitosane.....	125
4.	Activité antibactérienne de l'argent et de l'iode .....	125
Intérêt et propriétés du système PEM .....		126
Chargement et interaction de la chlorhexidine avec le système PEM.....		126
Biodisponibilité des agents antibactériens .....		127
Cytocompatibilité du système PEM .....		128
Argent et système PEM .....		128

Amélioration du dispositif .....	131
Évaluation <i>in vivo</i> .....	131
Autres perspectives .....	132
Enduction d'un gel .....	132
Conclusion Générale .....	135
Références .....	138
Annexes .....	I
Calcul du rapport molaire .....	II
Analyse infrarouge du polypropylène fonctionnalisé .....	III
Dosage de l'argent .....	IV
Titres et Travaux .....	VII
Estimation du coût de la thèse .....	XV

# **Introduction générale**



### La problématique

Le traitement des plaies chroniques représente un intérêt majeur pour la santé publique tant sur le plan médical que le plan économique. Leur prise en charge implique un coût important englobant les consultations médicales, les soins infirmiers et les traitements. Dans les pays développés, elles touchent entre 2 et 3% de la population<sup>1</sup>. En France, en 2011, les plaies chroniques touchaient environ 2,5 millions de personnes<sup>2</sup>. La prévalence élevée des plaies chroniques est liée à la population vieillissante<sup>3</sup> (espérance de vie prolongée) et à la sédentarité grandissante qu'implique nos modes de vie.

Des complications telles que l'infection de la plaie chronique peuvent aggraver considérablement l'état de la plaie et de santé du patient qui peut conduire à une infection systémique. L'infection de ces plaies n'est pas rare et augmente la morbidité, voire, met en jeu le pronostic vital des patients. Le risque infectieux augmentant avec le temps de guérison, il est donc nécessaire de prévenir l'infection de ces plaies efficacement et le plus rapidement possible. En effet, l'infection seule d'une plaie aiguë, peut aboutir à la chronicité de cette plaie. On comprend, dès lors, la nécessité d'intervenir rapidement sur les plaies chroniques afin de prévenir leur infection et accélérer leur guérison.

De plus, les plaies chroniques, en plus de leur impact sur la santé, exercent une influence sur la vie des patients. En effet, les conséquences qu'elles provoquent peuvent conduire à leur isolement dû à la production plus ou moins importante d'exsudat et de l'odeur que dégage certaines plaies. Elles peuvent aussi conduire à une altération de leur condition physique par rapport à la sensation de douleur et la localisation de la plaie, à un sentiment d'insécurité au regard de l'évolution de l'état de la plaie mais aussi à l'investissement en temps et économique concernant les soins qui seront nécessaire pour le traitement de la plaie.

De nombreux dispositifs médicaux sont ainsi élaborés et développés pour le traitement spécifique de ces plaies. Cela concerne notamment les pansements dont la gamme ne cesse de s'élargir et s'adapter en fonction de l'étiologie de la plaie.

### Les objectifs

Les objectifs de ce projet de thèse reposent sur l'élaboration d'un pansement recouvert d'un système polyélectrolyte multicouche (PEM) pour la libération d'un ou plusieurs principes actifs de façon prolongée. Le premier agent antibactérien, l'argent (Ag), sera chargé sur le textile en polyéthylène téréphtalate (PET) grâce à sa fonctionnalisation par le CHT réticulé par l'acide citrique (CTR). Le système PEM aura un rôle de barrière pour limiter la libération de l'Ag hors du dispositif afin de limiter l'effet toxique de l'Ag sur les cellules saines de la

## Introduction générale

plaie. Il exercera également un rôle dans la libération d'un principe actif et sa capacité de formation de gel sera également étudiée pour les propriétés d'absorption des exsudats de plaie. Pour cela, un polymère de cyclodextrine (polyCD) réticulé par l'acide citrique (CTR), en tant que polyélectrolyte anionique (PE<sup>-</sup>), sera utilisé dans la construction du système PEM pour son caractère polyanionique et ses propriétés de complexation avec de nombreux principes actifs. La chlorhexidine (Chx) sera utilisée comme principe actif et chargée sur le système PEM afin d'évaluer les propriétés du système PEM dans le chargement d'un principe actif lipophile, dans la libération de ce principe actif et enfin dans l'activité du principe actif. Le but est d'obtenir un dispositif médical antibactérien, actif sur plusieurs jours, pour palier au besoin des soins quotidiens des plaies chroniques. Ce dispositif n'aura ainsi pas besoin d'être changé tous les jours. Une évaluation microbiologique sera également réalisée afin d'évaluer l'efficacité du système à réduire la population bactérienne.

### Présentation du manuscrit

Ce manuscrit s'articule en 4 chapitres. Le premier chapitre est une revue bibliographique définissant les problématiques posées par l'infection des plaies chroniques et un état de l'art des dispositifs médicaux qui sont développés pour le traitement des plaies chroniques infectées. Le second chapitre présente le matériel, les produits et les méthodes utilisées pour ce projet. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus concernant la préparation du textile, sa caractérisation physico-chimique et son évaluation biologique et microbiologique.

### Références

1. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol* 2008 Feb;58(2):185-206 doi: 101016/jjaad200708048 2008.
2. Vallois B. Premiers résultats de l'enquête VULNUS - Une photographie des plaies en France. *Le Quotidien du Médecin* 3 Juin 2009;N°8581.
3. Margolis DJ, Bilker W, Santanna J, Baumgarten M. Venous leg ulcer: incidence and prevalence in the elderly. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(3):381-386.

# Chapitre I: Revue bibliographique

La première partie traitera des différents types de plaies et le traitement utilisé pour permettre une guérison rapide. Le cas des plaies infectées sera également traité afin de préciser la difficulté de guérison de ces plaies. Une revue bibliographique des différents traitements utilisés pour lutter contre ces infections sera dressée.

Dans la seconde partie, la revue bibliographique sera portée sur les traitements et modification de surface des matériaux notamment les DM destinés au traitement des plaies.

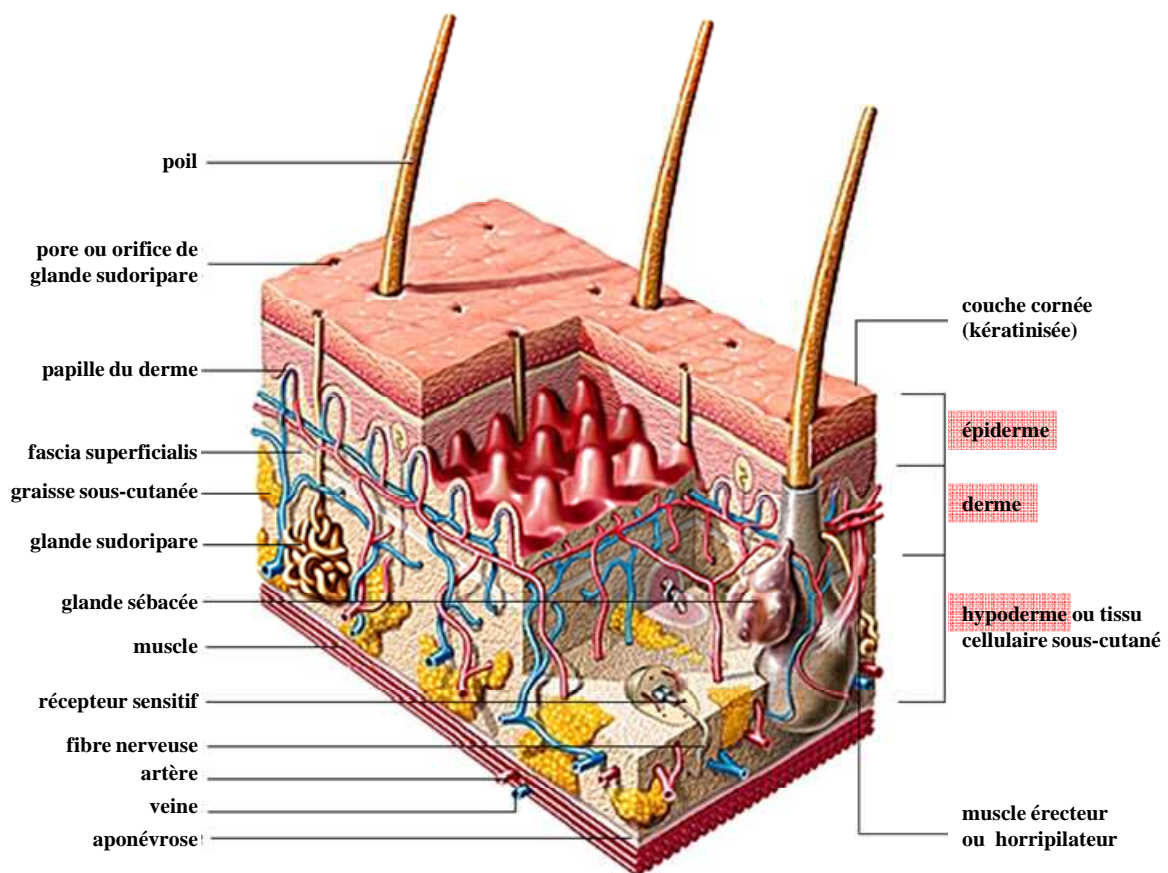
La troisième partie exposera la stratégie employée et le cahier des charges pour ce travail de thèse.

### **Partie 1: La peau, ses problèmes et les traitements**

#### **1. Structure, physiologie et renouvellement de la peau**

##### **a. Structure et fonctions de la peau**

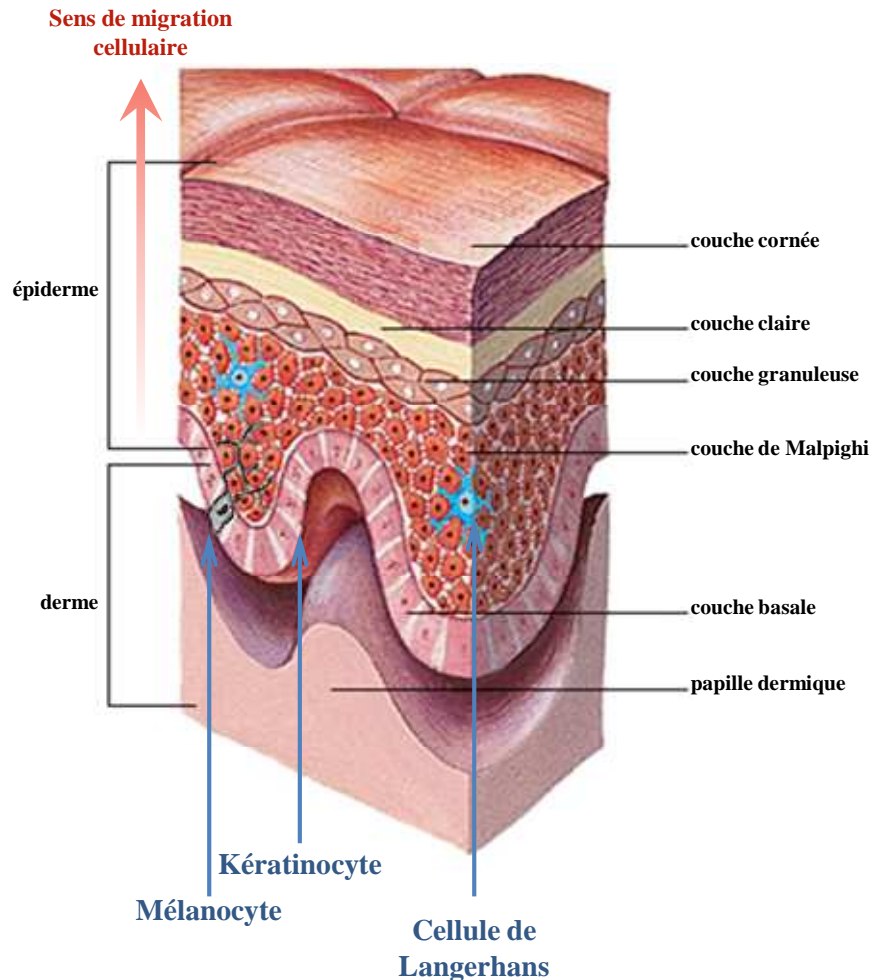
La peau est l'organe le plus grand et le plus lourd de notre organisme. Chez une personne adulte, elle représente environ 1,2 à 2,3m<sup>2</sup> et 10 à 16% de la masse totale du corps. Cette enveloppe vivante est organisée en trois couches: l'épiderme, le derme et l'hypoderme de la plus superficielle à la plus profonde (Figure 1).



*Figure 1. Organisation schématique de la peau<sup>4</sup>.*

## Chapitre I: Revue bibliographique

L'épiderme, couche superficielle, est la plus mince avec 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Il s'agit d'un épithélium Malpighien kératinisé (c'est-à-dire un épithélium pavimenteux pluristratifié). Celui-ci est lui-même organisé en sous-couches, la couche cornée (ou stratum corneum), la couche claire (stratum lucidum), la couche granuleuse (stratum granulosum), la couche épineuse ou couche de Malpighi (stratum spinosum) et enfin la couche basale ou lame basale (stratum germinativum) (Figure 2). Son rôle est d'assurer l'imperméabilité et la résistance de la peau.



**Figure 2. Organisation schématique de l'épiderme<sup>4</sup>.**

Le derme, tissu conjonctif de 1 à 2 mm d'épaisseur, est constitué par la présence de fibroblastes et de quelques globules blancs entourés par la matrice extracellulaire, elle-même composée essentiellement d'eau et de nombreuses protéines telles que les fibres. Le derme s'organise en deux couches : le derme papillaire superficiel et le derme réticulaire profond. Le derme papillaire forme des papilles dermiques interpénétrées avec l'épiderme sus-jacent contenant les plexus vasculaires assurant la nutrition de l'épiderme. C'est un tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène de type I et III et de fibres élastiques oxytalane

## Chapitre I: Revue bibliographique

exclusivement constituées par des microfibrilles de fibrilline-1. Le derme réticulaire est un tissu conjonctif plus dense. Alors que les fibres de collagène au niveau du derme papillaire s'organisent perpendiculairement à la surface de la peau, au niveau du derme réticulaire les fibres de collagène et d'élastine s'organisent parallèlement à la surface de la peau. Le derme accueille de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les terminaisons nerveuses sensibles telles que les corpuscules de Vater-Pacini, de Golgi-Mazzoni, de Krause et de Meissner. Chacun de ces corpuscules est sensible à différents stimuli permettant la perception de notre environnement: pressions, vibrations, variations de température et effleurement respectivement. En plus de la fonction sensitive, le derme assure la fonction de nutrition grâce à sa vascularisation importante, la fonction de thermorégulation et également un rôle dans la cicatrisation par la présence des glandes sudoripares qui produisent de l'urée contenue dans la sueur (détersion de la plaie)<sup>5</sup>.

L'hypoderme est un tissu adipeux vascularisé composé de lobules adipeux contenant les adipocytes. L'hypoderme assure un rôle de protection thermique (isolation) et mécanique (amortissement des chocs).

Grâce à ses différentes structures, la peau assure plusieurs fonctions; une fonction sensorielle, une fonction de régulation thermique et une fonction de protection. En effet c'est un des organes des sens dans la perception du toucher (muqueuse buccale, vaginale,...). Cette fonction est assurée par la présence de nombreux récepteurs nerveux sensoriels. Le rôle de régulation thermique de la peau est principalement assuré par une vasomotricité permanente active des veinules et des artérioles sous le contrôle nerveux du système orthosympathique adrénergique dont l'hypothalamus représente le centre thermorégulateur. Ainsi la sensation de froid va entraîner une vasoconstriction des vaisseaux dans le but de limiter les pertes de chaleur. Au contraire la sensation de chaleur provoque une vasodilatation des vaisseaux afin d'augmenter la perte de chaleur qui, peut être également augmentée par la production de sueur par les glandes sudoripares situées au niveau de l'hypoderme.

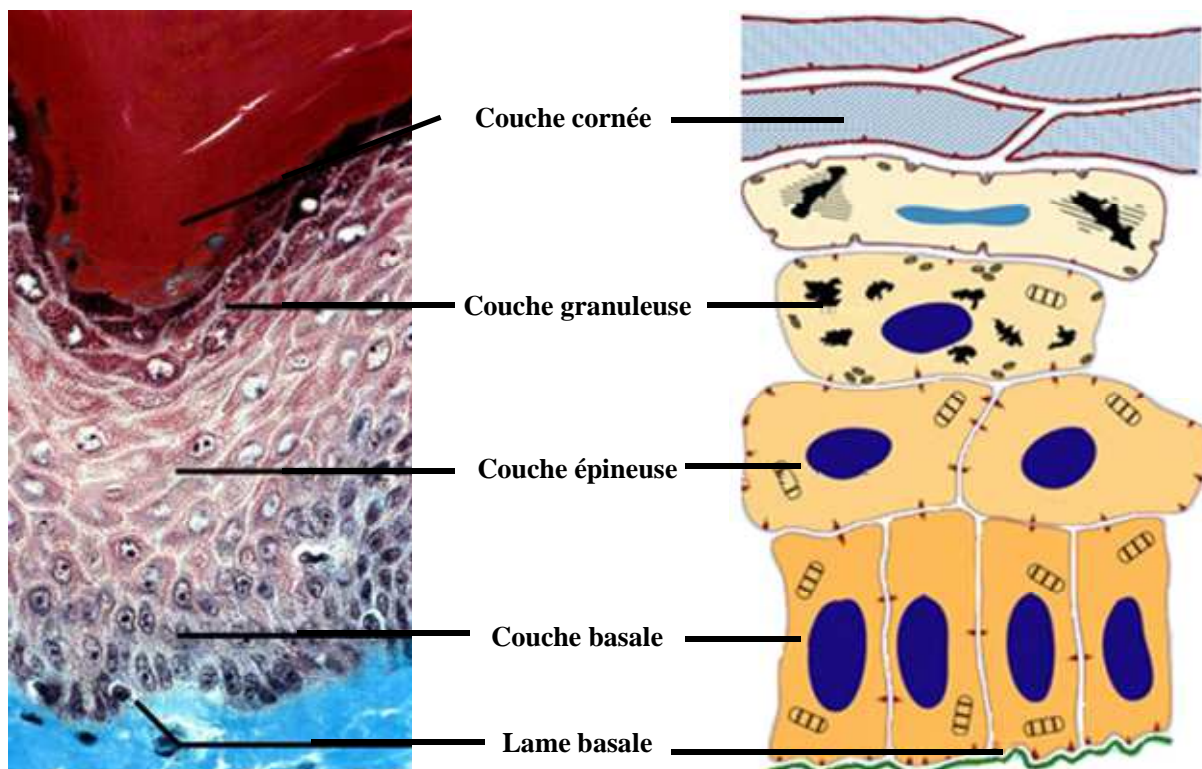
La peau joue également un rôle de barrière dont le rôle est de protéger l'organisme des agressions extérieures. Ces agressions de diverses natures comprennent les agressions physiques (étirements, pressions, frottements...), chimiques ou biologiques (micro-organismes). L'épiderme étant la couche la plus superficielle, il joue un rôle primordial dans cette protection. Son action est renforcée par la présence des cellules de Langerhans, cellules dendritiques, qui interviennent dans la défense immunitaire et les mélanocytes qui synthétisent un pigment de protection contre les radiations ultraviolet. La kératine, protéine

synthétisée par les kératinocytes, permet d'imperméabiliser l'épiderme et le rendre plus résistant contre les agressions extérieures.

b. Physiologie et renouvellement de la peau

Comme la plupart des tissus vivants, la peau a besoin d'être vascularisée et renouvelée constamment. Le rôle de vascularisation est assuré en particulier au niveau du derme par les vaisseaux sanguins extrêmement abondants et les vaisseaux lymphatiques. Cependant aucune vascularisation ne pénètre au sein de l'épiderme. Ainsi l'oxygène et les éléments nutritifs sont apportés via la circulation sanguine par diffusion à travers la lame basale.

Le renouvellement de la peau concerne principalement l'épiderme qui est constamment renouvelé grâce à la migration des cellules provenant de la lame basale vers la couche cornée. Le renouvellement de la totalité de la couche cornée nécessite 45 jours, temps nécessaire aux cellules pour atteindre la couche cornée. Lors de cette migration, les kératinocytes s'aplatissent, s'enrichissent en kératine (processus de kératinisation) et perdent leur noyau. Une fois la surface atteinte les kératinocytes morts se détachent et tombent en emportant les éventuels microbes et corps étrangers; il s'agit du processus de desquamation (Figure 3).



**Figure 3. Organisation schématique de l'épiderme et son renouvellement<sup>6</sup>.**

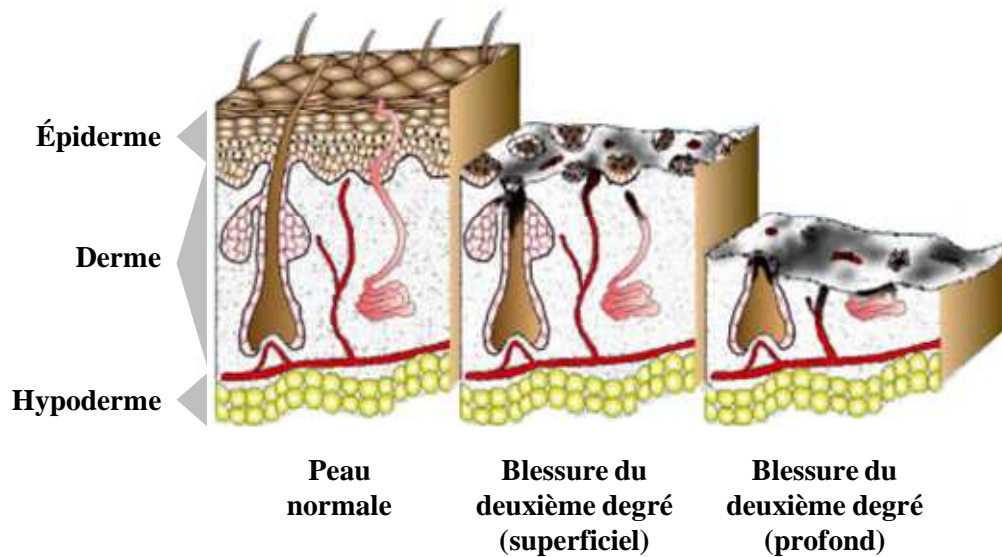
L'intégrité de la peau joue un rôle clé dans la protection du milieu interne de l'organisme. Cependant, cette protection peut être endommagée de façon plus ou moins

importante; on parle alors de plaie. Dans ce cas, le rôle de barrière que constitue la peau ne peut plus être pleinement assuré et représente une voie d'entrée aux agents pathogènes.

## 2. Plaies et cicatrisation

### a. Les plaies

Les causes d'apparition des plaies sont de diverses natures telles que les agressions extérieures (éraflures, plaies,...), l'apparition spontanée (escarres) ou postopératoire (incisions réalisées au scalpel). En fonction de ces causes, les plaies sont réparties en 4 groupes: les plaies traumatiques, les plaies post-opératoires, les brûlures et les dermabrasions. Selon l'importance de la blessure, les plaies de la peau sont hiérarchisées en fonction de la profondeur des couches atteintes. Les blessures du 1<sup>er</sup> degré concernent uniquement l'épiderme. Les blessures du 2<sup>nd</sup> degré concernent les plaies dont l'épiderme est détruit (superficiel) ainsi qu'une partie du derme sous-jacent (profond). Une dégradation totale de l'épiderme et du derme définit une blessure du 3<sup>ème</sup> degré (Figure 4).


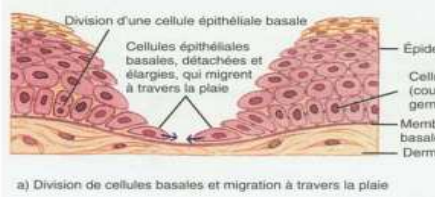
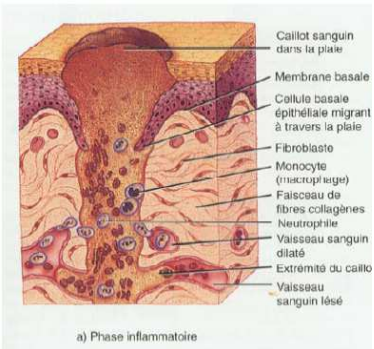


*Figure 4. Schéma comparant une peau normale, une peau blessée au deuxième degré superficiellement et une peau blessée au deuxième degré profondément<sup>6</sup>.*

En pratique clinique, différentes catégories de plaies dites aiguës sont définies, en fonction de l'importance de la plaie et du traitement nécessaire (Tableau 1).



**Tableau 1: Les différentes catégories de plaies et leur physiopathologie<sup>7</sup>.**

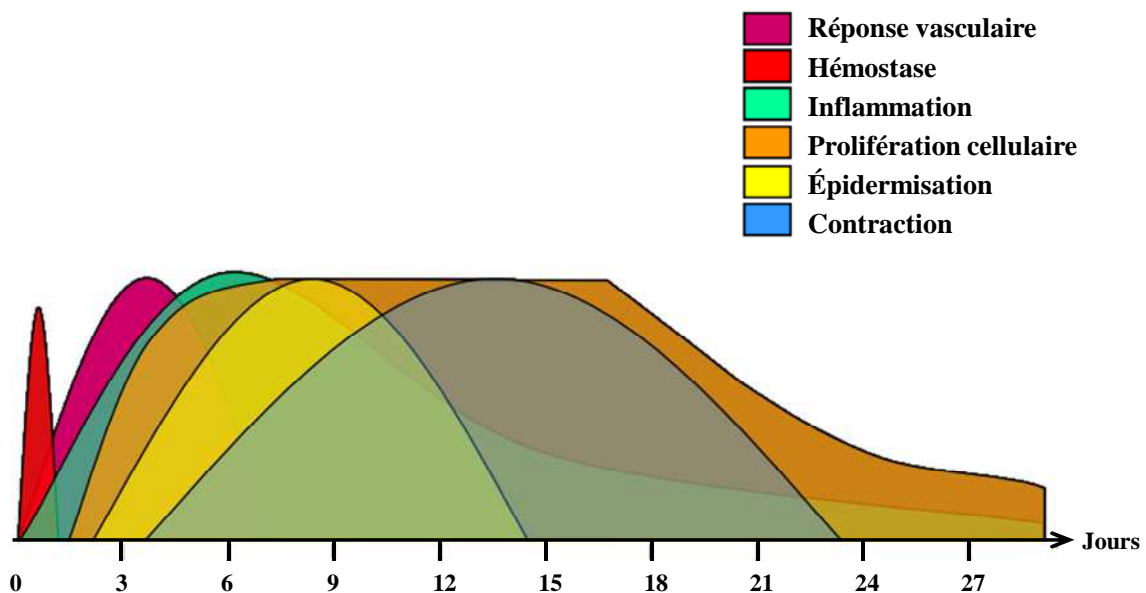
Catégorie de plaie	Physiopathologie de la plaie	Exemple de plaie
<p>Plaies fraîches sans perte de substance</p>	<p>La cicatrisation se fera par un rapprochement des berges de la plaie.                      →Cicatrisation de 5 à 15 jours.</p>	 <p><i>Figure 5. Photographie d'une plaie franche<sup>8</sup>.</i></p>
<p>Plaies étendues superficielles ou dermabrasions</p>	<p>Discontinuité partielle de la jonction dermo-épidermique. Disparition du sommet des papilles avec la présence de quelques îlots épidermiques de cellules basales et germinatives.                      →Cicatrisation de 10 à 12 jours.</p>	 <p><i>Figure 6. Schéma d'une plaie superficielle<sup>9</sup>.</i></p>
<p>Plaies profondes avec perte de substance</p>	<p>Traumatisme grave avec une perte de substance sur tout l'épaisseur de la peau et une rupture totale de la continuité de la jonction dermo-épidermique.</p>	 <p><i>Figure 7. Schéma d'une plaie profonde<sup>9</sup>.</i></p>

La dégradation plus ou moins sévère de la peau déclenche le processus de cicatrisation spontanée dont le but est de rétablir l'intégrité de cet organe. La cicatrisation cutanée est un mécanisme complexe qui implique différentes étapes et plusieurs acteurs cellulaires.

b. Le processus de cicatrisation

Le processus de cicatrisation se déroule en 6 phases qui se chevauchent dans le temps (Figure 8). Un mécanisme simplifié, plus couramment utilisé, regroupe les 6 phases décrites sur la Figure 8 en 3 phases. Les 3 phases simplifiées sont :

- la phase vasculaire et inflammatoire (réponse vasculaire, hémostase, inflammation)
- la phase de bourgeonnement ou de granulation (inflammation, prolifération cellulaire)
- et la phase d'épidermisation (épidermisation, contraction).



**Figure 8. Les étapes du processus de cicatrisation cutanée<sup>10</sup>.**

La phase vasculaire et inflammatoire, très rapide et précoce, correspond à la formation d'un caillot qui va permettre l'arrêt du saignement et la migration des cellules participant à la réaction inflammatoire. Ce caillot composé de fibrine est obtenu par l'agrégation, l'adhésion et l'activation des plaquettes par plusieurs protéines (fibronectine, protéases, thrombine, facteur Willebrand) intervenant dans la cascade de coagulation. L'activation des plaquettes active la libération de facteurs de croissance, médiateurs de la cicatrisation comme le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et le TGF (Transforming Growth Factor). Ces facteurs permettent de moduler les différentes phases de la cicatrisation.

Ce caillot assure ainsi l'hémostase et sert de matrice provisoire pour la migration des cellules pro-inflammatoires, dermiques et épidermiques sur le site de la plaie. La réponse inflammatoire qui commence lors de cette étape, débute par une phase de vasodilatation et par la libération des médiateurs tels que l'histamine, les prostaglandines et les compléments C3a et C5a qui favorisent l'affluence des cellules circulantes au niveau de la plaie. Ainsi les polynucléaires neutrophiles et les monocytes sont attirés progressivement au niveau de la plaie. Les neutrophiles libèrent des enzymes protéolytiques qui favorisent la pénétration des cellules dans la plaie et la détersion des lésions. Les monocytes se différencient en macrophages, participent à la fonction anti-infectieuse, à la fonction de détersion et au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) par phagocytose. La prolifération des fibroblastes est augmentée ainsi que leur production de collagène. Un tissu de granulation se forme alors.

La phase de bourgeonnement ou de granulation concerne 2 niveaux tissulaires: le derme et l'épiderme. La formation du tissu de granulation est associée à la prolifération fibroblastique, la synthèse de MEC (collagène, fibronectine et protéoglycanes) par les fibroblastes (système MMP/TIMP : matrix metalloprotease/tissue inhibitors of matrix metalloprotease, permettant la régulation fine de la synthèse/dégradation de la MEC<sup>11, 12</sup>), une angiogénèse et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes. L'angiogénèse est favorisée par l'hypoxie tissulaire de la plaie et la dégradation de la MEC par les protéases synthétisées par les fibroblastes.

Lors de la phase d'épidermisation et de contraction, les kératinocytes basaux migrent sur les composants matriciels (bourgeons) puis se multiplient et se différencient. La migration et la prolifération à la surface des bourgeons permettent la formation d'un néo-épiderme qui sera progressivement renforcé au niveau de son épaisseur. Cette épidermisation est facilitée par l'action des myofibroblastes formés lors de la phase de granulation. Ceux-ci se contractent et vont permettre le rapprochement des berges de la plaie. Le remodelage de la MEC s'étend sur plusieurs mois après la fermeture de la plaie.

### c. Problème de cicatrisation

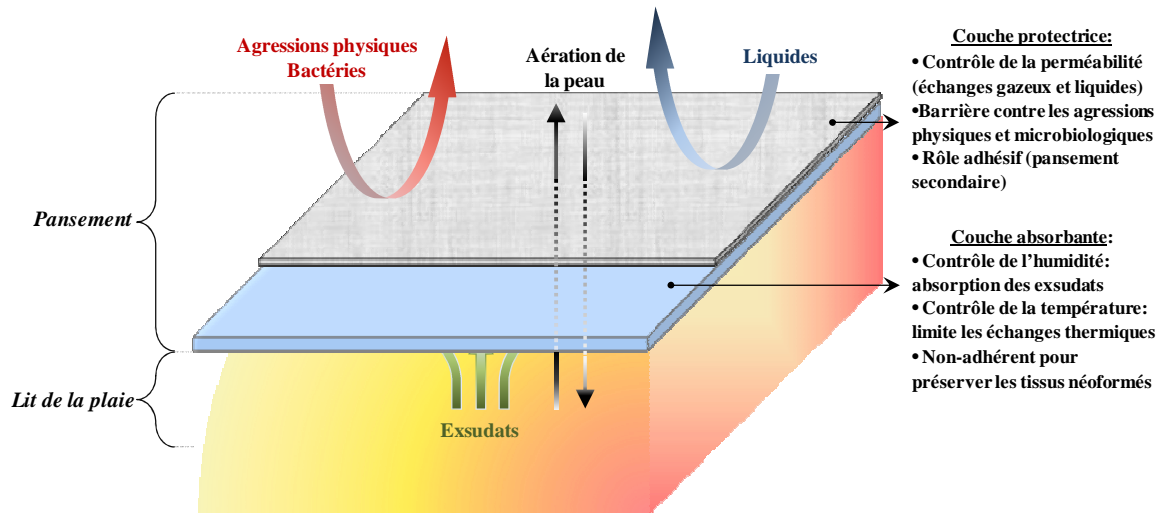
La cicatrisation peut être parfois retardée pour diverses raisons. Ce retard peut dépendre de l'état de santé de la personne et de l'état de la plaie. Dans le premier cas, ce retard peut être dû à une pathologie associée, de l'état général du patient (diabétique, immunodéprimé, dénutrition,...), de son âge ou de son sexe. Le retard dans la cicatrisation peut également intervenir en fonction de la profondeur, de la surface et de la localisation de la

plaie. La cicatrisation spontanée dans ce cas, peut ne plus suffire pour permettre une guérison convenable (durée et aspect de la cicatrice) de la plaie. Un traitement adapté en fonction de la catégorie et du degré de la plaie sera donc nécessaire pour accompagner et diriger la cicatrisation dans le but d'accélérer ou améliorer la guérison. Ce traitement peut être effectué par le praticien par la réalisation d'une suture après déterision manuelle sur les plaies importantes puis de l'utilisation d'un pansement.

### **3. Le pansement, dispositif médical pour le traitement des plaies**

#### **a. Intérêt du pansement**

Pour que le processus de cicatrisation s'effectue suffisamment rapidement et correctement (en fonction de l'âge de la personne), certaines conditions physico-chimiques indispensables doivent être rassemblées. Ainsi la température, le pH et le taux d'hydratation de la plaie sont autant de facteurs qui influencent la vitesse et la qualité de guérison d'une plaie. En 1962, Winter démontre que la cicatrisation d'une plaie recouverte par un pansement synthétique semi-occlusif est 30% plus rapide par rapport à une plaie conservée à l'air libre<sup>13</sup>. Le pansement appliqué sur la plaie permet de maintenir l'hydratation des tissus lésés en limitant l'évaporation de l'eau. De plus, cette évaporation, lorsqu'elle n'est pas limitée par l'application d'un pansement par exemple, induit une baisse de la température des tissus au niveau de la plaie. Or l'état de guérison d'une plaie est également influencé par la température. Une étude a été réalisée sur des serpents à collier (animal à sang froid). Ils ont été placés à différentes températures de 13,5°C, 21°C et 30°C après avoir subit des incisions linéaires ou des excisions circulaires. Les résultats rapportent une complète ré-épithélialisation de la plaie après 10 jours pour les serpents placés à 30°C alors que la cicatrisation est partielle à des températures inférieures<sup>14</sup>. Chez l'homme, l'activité des cellules intervenant dans la cicatrisation, tels que les fibroblastes, est plus importante à température proche de la température corporelle de 37°C<sup>15, 16</sup>. Cela s'explique par le réchauffement des plaies qui améliore la fluidité du sang, la pression en oxygène, le dépôt de collagène et la fonction des cellules responsables de la réponse inflammatoire<sup>17</sup>. Ainsi, des pansements chauffants appliqués sur des ulcères de pression permettent de réduire significativement la surface de la plaie après 4 semaines par rapport à des plaies recouvertes par un pansement standard<sup>18</sup>. Des designs de pansements sont ainsi conçus dans le but de conserver l'humidité et la température de la plaie dans les conditions optimales de guérison schématisées sur la Figure 9.



**Figure 9. Organisation de la structure d'un pansement et ses fonctions.**

L'utilisation des pansements est réglementée par la classification des dispositifs médicaux en fonction de la durée de leur utilisation, de la destination du produit définie par le fabricant, du caractère invasif ou implantable, du but thérapeutique ou diagnostique, du type d'organe concerné et du niveau de risque du dispositif. La Haute Autorité de Santé (HAS) a ainsi réalisé une classification des dispositifs médicaux (DM) en fonction du niveau de risque<sup>19</sup> (Tableau 2.).

**Tableau 2. Classification des DM pansements selon l'HAS<sup>19</sup>, 2013.**

Classe du dispositif	Niveau de risque	Nature du pansement (exemple)
Classe I	Faible degré de risque	Pansements gras
Classe IIA	Degré moyen de risque	Films de polyuréthane
Classe IIB	Potentiel élevé de risque	Hydrocolloïdes, hydrocellulaires, hydrogels, pansements au charbon et les alginates (sauf Algostéril®)
Classe III	Potentiel très sérieux de risque (comprend les DM implantables actifs)	Duoderm®, Acticoat® et Algostéril® pour son caractère invasif de type per ou post opératoire et plaies hémorragiques

**b. Nature, composition et application des pansements**

On distingue deux types de pansements en fonction de la nature de la plaie à traiter. Les pansements primaires concernent les pansements ayant pour but de traiter les plaies peu ou modérément exsudatives aiguës ou chroniques telles que les escarres, les ulcères, les brûlures superficielles (1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> degré) et les dermabrasions. Les pansements secondaires

## Chapitre I: Revue bibliographique

concernent les pansements recouvrant un pansement primaire (dans le cas d'une plaie non infectée), par exemple, une compresse, une bande, un filet, un adhésif ou un film. Ils présentent un intérêt au niveau d'une zone de frottement pour maintenir le pansement primaire intact ou en soutien pour améliorer les capacités d'absorption des exsudats dans le cas de plaies très exsudatives. Dans le cas de pansements primaires non-adhésifs, le pansement secondaire aura pour fonction de maintenir le pansement primaire au contact de la plaie (film adhésif, membrane, bande).

Il n'existe pas de pansements universels capables de répondre à ces différentes fonctions en même temps. Ainsi, le pansement doit être adapté en fonction du type de plaie (Tableau 3): par rapport au stade de cicatrisation, au caractère superficiel ou profond de la plaie et de la nature de la plaie (sèche, exsudative, hémorragique).

**Tableau 3. Les différents types de pansements et leurs applications. Modifié de HAS, 2007. Évaluation des pansements<sup>20</sup>.**

Type de pansement	Nature et composition	Action	Application	Commentaires
<b>Hydrogel</b>	gel polymérique	hydratation déterSION auto-lytique Absorption des exsudats	Plaie non-infectée et peu exsudative	Pansement secondaire
<b>Irrigo-absorbants</b>	coussin en polyacrylate	absorption et irrigation de la plaie par activation avec une solution de Ringer	en phase de détersion	
<b>Alginates</b>	polymère naturel d'acide alginique (algue brune) associé ou non à la CMC et l'acide hyaluronique	absorption (++), hémostatique antibactérien (piège les bactéries) formation d'un gel non-adhérent	de la phase de détersion à la phase de bourgeonnement, plaies hémorragiques et plaies avec colonisation critique	pansement secondaire de type hydrocellulaire pour imperméabiliser
<b>Hydrofibres</b>	100% fibres non tissés de CMC sodique	grande capacité d'absorption (+++) gélification au contact de l'exsudat	plaie très exsudative de la phase de détersion à la phase de bourgeonnement	pansement secondaire de type hydrocellulaire ou hydrocolloïde pour maintenir l'humidité
<b>Hydrocellulaires</b>	mousse de polyuréthane	Absorbant (+)	phase de bourgeonnement ou d'épidermisation complète	
<b>Hydrocolloïdes</b>	100% CMC sodique	absorption, formation d'un gel imperméable à l'eau et bactéries	plaie peu exsudative non-infectée en phase d'épidermisation	
<b>TulleS</b>	compresse de mailles larges enduites de corps gras (vaseline, paraffine)	non-adhérent et aéré	dermabrasions et brûlures de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation	
<b>Interfaces</b>	voile à mailles étroites enduite de silicone, de CMC ou de TLC <sup>(1)</sup>	non-adhérent et évite le dessèchement	dermabrasions et brûlures de la phase de bourgeonnement à la phase d'épidermisation	
<b>Films</b>	film polymérique transparent	résistant, adhérent et semi-perméable	escarres ou en pansement secondaire	
<b>Acide hyaluronique</b>	compresse ou crèmes imprégnées	relance la cicatrisation des plaies atones (tissu de granulation inflammatoire déficient)	plaies chroniques atones	

<sup>1</sup>Technologie Lipido-Colloïdes

En règle générale, un pansement doit être changé tous les 3 jours dans le cas d'une plaie peu ou modérément exsudative, dans le cas d'une plaie exsudative, il devra être changé tous les jours. La répétition des soins peut varier en fonction de la nature du pansement

secondaire notamment dans les cas des plaies exsudatives dont l'application d'un pansement secondaire de type compresse permet de repousser la nécessité de soins à 3 jours.

L'application d'un pansement doit donc permettre de rétablir la continuité de la barrière que constitue la peau au niveau du site lésé afin de protéger et maintenir des conditions optimales pour que la plaie puisse guérir. Cependant, dans certains cas, l'application d'un simple pansement ne suffit pas notamment dans le cas de plaies infectées qui peuvent résulter de la chronicité de la plaie (temps de guérison prolongé) ou de l'absence de traitement adapté des plaies (colonisation bactérienne).

#### **4. Flore cutanée commensale**

De façon normale, l'ensemble de la peau est colonisée par des microorganismes tels que les bactéries<sup>21</sup> appelés flore cutanée commensale. Le pouvoir pathogène de ces microorganismes est très faible. La densité et la nature des bactéries présentes à la surface de la peau varient en fonction de la localisation anatomique. En effet selon le pH et le taux d'humidité, la densité est plus importante avec des taux d'humidité élevés et l'adhésion plus forte au niveau des sites anatomiques faiblement humides et légèrement acides<sup>22</sup>. Cette flore commensale contribue à l'équilibre et l'intégrité de la peau dans la mesure où elle protège l'organisme contre les bactéries pathogènes en empêchant leur prolifération. Cet équilibre dépend également de la production de protéines antibactériennes telles que la lactoferrine, les cathélicidines de type  $\beta$ -défensines ou les lysozymes<sup>22</sup>. Dans le cas d'une plaie, cet équilibre est altéré par une modification du pH, des substrats disponibles et des taux d'humidité par exemple permettant la colonisation par les bactéries pathogènes aboutissant à l'infection de la plaie. Les principales espèces bactériennes rencontrées dans l'infection des plaies sont le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (34%) et *Pseudomonas aeruginosa* (9,4%).

#### **5. Prévention/traitement des plaies infectées**

On comprend alors la nécessité de prévenir ou traiter l'infection des plaies qui représente un intérêt pour la santé publique tant sur le plan de l'hygiène que sur le plan économique. Afin de prévenir/lutter contre les infections, il existe de nombreuses molécules naturelles ou synthétiques à notre disposition. Chaque antimicrobien possède des avantages mais également des inconvénients qui doivent être pris en compte afin d'utiliser de façon adaptée ces différentes molécules en fonction de la nature, de l'avancement de l'infection et bien sûr en fonction des germes impliqués.

## Chapitre I: Revue bibliographique

### a. Substances antibactériennes

#### ▪ Les antibiotiques

Afin de traiter l'infection, il existe plusieurs composés capables de réduire significativement la charge bactérienne au niveau d'une plaie infectée ou de prévenir l'infection systémique.

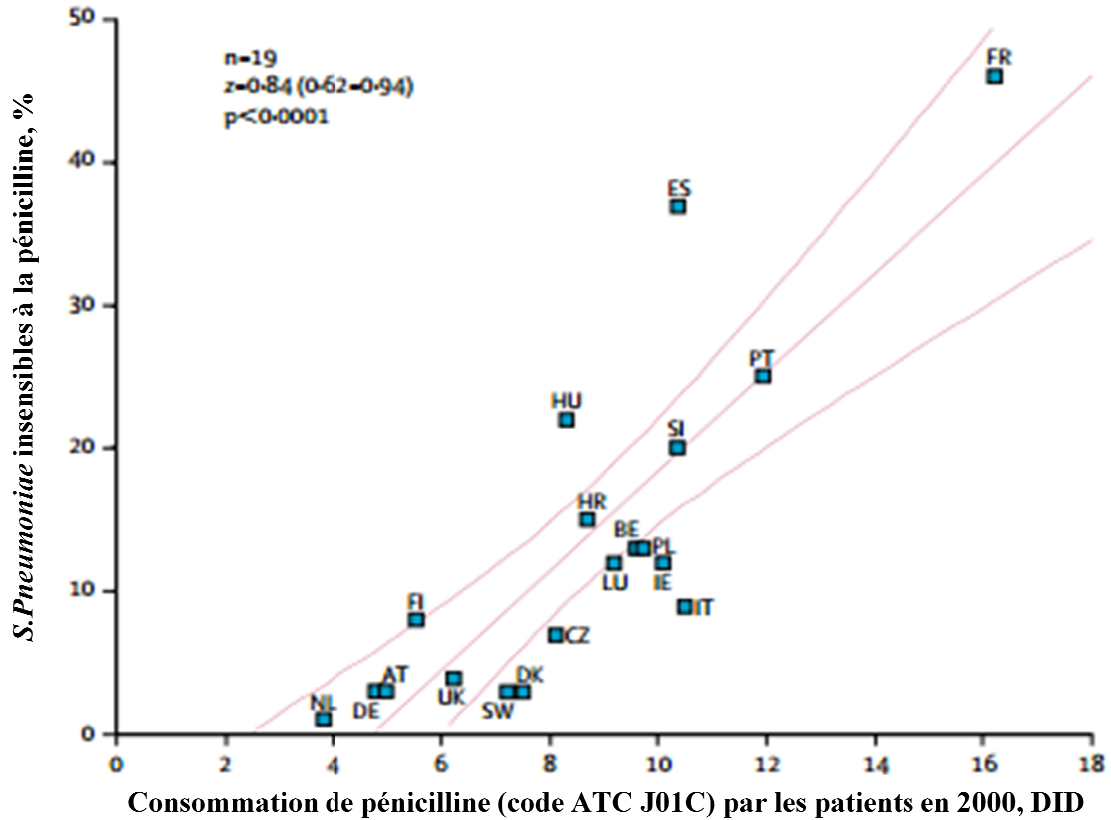
Les antibiotiques (ATB) sont des molécules naturelles ou synthétiques possédant la capacité d'éliminer (bactéricide) ou ralentir la prolifération (bactériostatique) des bactéries à faible dose. A l'origine, les ATB sont synthétisés par les bactéries elles-mêmes dans le but de lutter contre leurs congénères. La production de ces ATB est réalisée de façon naturelle, synthétique ou semi-synthétique dans le cas d'ATB modifiés chimiquement. Il en existe différentes catégories classées en fonction de leur origine, de leur spectre d'activité, de leur nature chimique ou de leur mode d'action (Tableau 4). L'utilisation d'ATB dans le cas des plaies peut être systémique (administration par voie orale ou par injection) avec un suivi de l'état de guérison de la plaie ou topique (application locale) mais peu recommandée<sup>23</sup>.



**Tableau 4. Les différentes catégories d'antibiotiques utilisés en traitement local ou systémique contre l'infection de la plaie (fond bleu). Adaptée de Decoster et al<sup>24</sup> et St-Cyr et al<sup>25</sup>.**

Cible	La Paroi	La Membrane	Le Ribosome et synthèse des protéines	L'ARN polymérase	L'ADN	Synthèse Acide Folique	
Famille d'ATB <u>sous famille</u> <u>exemple d'ATB</u>	Bétalactamines	Polymyxines	Aminosides	Rifamycines	Quinolones	Sulfamides	
	<u>Pénams</u> <u>penicilline</u> <u>amoxicilline</u>	<i>polymyxine B</i>	<i>streptomycine</i>	<i>rifampicine</i>		<i>sulfadiazine</i> <i>argentique</i>	
	<u>Pénéms</u>		<i>gentamicine</i>				
	<u>Céphens</u> (céphalosporines) céfazoline		<i>tobramycine</i>				
	<u>Monobactams</u>						
	Fosfomycines	Gramicidines et Tyrocidines	Groupe des "MLS"			Fluoroquinolones	Triméthoprim
	<i>fosfocine</i>	<i>bacitracine</i>	<u>Macrolides</u> <i>azithromycine</i>			<i>ciprofloxacine</i>	
			<u>Lincosamides</u> clindamycine				
			<u>Synergistines</u> pristinamycine				
	Glycopeptides		Phénicolés			Produits nitrés	
<i>vancomycine</i>		<i>chloramphénicol</i>			<u>Oxyquinoléines</u>		
		Cyclines		<u>Nitrofuranes</u>			
		<i>doxycycline</i>		<u>Nitro-imidazolés</u> <i>metronidazole</i>			
		Autres					
		<i>mupirocine</i>					

Les ATB sont généralement utilisés pour le traitement des infections aiguës sur une période de traitement relativement courte afin d'éviter l'apparition, la prolifération et la dissémination de souches résistantes. La sensibilisation réalisée notamment par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à propos de l'utilisation des ATB a entraîné un désintérêt des industries pharmaceutiques vis-à-vis de la production d'ATB<sup>26</sup>. En effet malgré leur grande efficacité, les ATB sont de plus en plus utilisés avec parcimonie et de façon adaptée. La consommation abusive des ATB, ces dernières décennies, a conduit à l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes. Cela concerne des bactéries jusqu'alors sensibles à ces mêmes ATB<sup>27</sup> comme illustré par l'exemple du pneumocoque et la relation du taux de bactéries résistantes à la consommation d'ATB (Figure 10). Malgré quelques industries de biotechnologies qui tentent de découvrir d'autres ATB, l'évolution de la génomique oriente, désormais, les recherches principalement sur la découverte de nouvelles cibles bactériennes et l'étude des mécanismes de résistance développés par les bactéries.

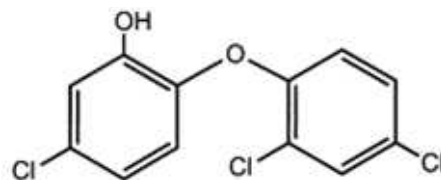


**Figure 10. Corrélation entre la consommation de pénicilline (DID, dose quotidienne définie pour 1000 habitants) et la prévalence de *S. pneumoniae* insensibles à la pénicilline.** AT, Australie; BE Belgique; HR, Croatie; CZ, République Tchèque; DK, Danemark; FI, Finlande; FR, France; DE, Allemagne; HU, Hongrie; IE, Irlande; IT, Italie; LU, Luxembourg; NL, Pays-Bas; PL, Pologne; PT, Portugal; SI, Slovénie; ES, Espagne; UK, Angleterre seulement. *Modifiée de Goossens*<sup>27</sup>

- Les antiseptiques

- Le triclosan

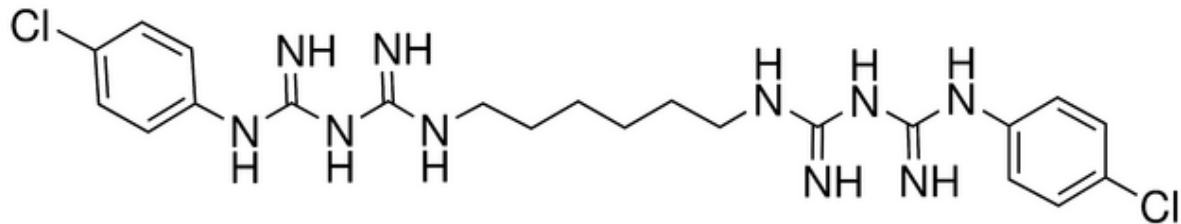
Le triclosan<sup>28</sup> est largement utilisé dans la composition de produits de soins et d'hygiène comme les déodorants, les gels-douches ou bien les produits de soin des mains. C'est un ester de phénol halogéné non ionique. Il traverse la membrane cytoplasmique et altèrent la synthèse de l'ARN des protéines. Il présente une activité diminuée par la présence d'agents tensio-actifs.



**Figure 11. Formule chimique du triclosan**<sup>29</sup>

- La Chlorhexidine (Chx)

La Chx est un biguanide chloré largement utilisé dans l'antiseptie locale bucco-pharyngée et cutanée ainsi que quelques DM. Il existe plusieurs formes de Chx commercialisées: le dihydrochlorure de Chx, le digluconate et le gluconate de Chx. Ces différentes formes de Chx présentent la particularité de présenter une forme soluble de la Chx qui, sous sa forme non ionisée, possède une faible solubilité dans l'eau de l'ordre de 800 mg/L à 20°C<sup>30</sup>.



**Figure 12. Formule chimique de la chlorhexidine.**

La Chx est un antiseptique qui possède un large spectre d'action<sup>31</sup> et qui est utilisée dans diverses applications en fonction de son association avec d'autres composés. Par exemple, la Chx est utilisée sur les caries dentaires, les gingivites et les parodontites en association avec du carbonate de calcium. En association avec du chlorure de benzalkonium, son application est essentiellement cutanée. C'est notamment le cas de la Biseptine®, solution antiseptique utilisée dans l'antiseptie de la peau avec des concentrations en digluconate de Chx de 0,25; 0,025; et 4%. Le digluconate de Chx est associé au chlorure de benzalkonium et à l'alcool benzylique. Son large spectre d'action comprend des levures comme *Candida albicans*. L'action de la Chx peut être potentialisée par l'utilisation de certains solvants comme l'alcool éthylique de 60 à 70°<sup>32</sup>. Certains travaux de recherche portent notamment sur le chargement de Chx sur des DM; c'est par exemple le cas de ciments-verre ionomérique en tant que matériau de restauration dentaire<sup>33</sup> ou bien, en association avec des agents moussants comme HIBISCRUB®.

L'action antibactérienne de la Chx s'explique par son caractère polycationique (protonation des guanidines à pH physiologique) lui permettant d'interagir avec les constituants de la membrane chargée négativement par une interaction aspécifique avec la membrane bactérienne (acides phospholipidiques) et la précipitation du contenu cellulaire. De plus, la Chx est capable d'inhiber l'adhésion des bactéries, empêchant ainsi la prolifération et la formation d'un biofilm<sup>34</sup>. Au niveau de la peau, il a été démontré que la Chx garde son activité antibactérienne au moins 48 heures<sup>35, 36</sup> et que son efficacité n'est pas affectée en présence des liquides biologiques tel que le sang<sup>37</sup>.

- Autres substances

- Le miel

Les propriétés antibactériennes du miel sont expliquées notamment par son hyperosmolarité et par la présence d'une enzyme, la glucose oxydase, introduite par les abeilles dans le miel lors de sa synthèse. Cette enzyme transforme le sucre en peroxyde d'hydrogène. Le produit de cette enzyme agirait en synergie avec le pH et l'osmolarité du miel<sup>38</sup>. De plus, selon une analyse récente de plusieurs études, le miel pourrait réduire le temps de cicatrisation de brûlures superficielles de 4 jours<sup>39</sup> ou de plaies réalisées sur des souris<sup>40</sup>. Les propriétés pro-cicatrisantes du miel s'expliqueraient par la formation d'une couche isolante qui permettrait de maintenir l'humidité et l'absorption des exsudats de la plaie grâce à son hyperosmolarité<sup>41, 42</sup>. Cependant, la qualité très variable du miel en fonction de son origine (faune et flore) et de son affinage ne permet pas d'envisager, pour le moment, son utilisation à grande échelle. En effet, il arrive que le miel soit contaminé par des bactéries le rendant inutilisable pour une application médicale. De plus, sa pasteurisation nécessaire rendrait la glucose oxydase inactive.

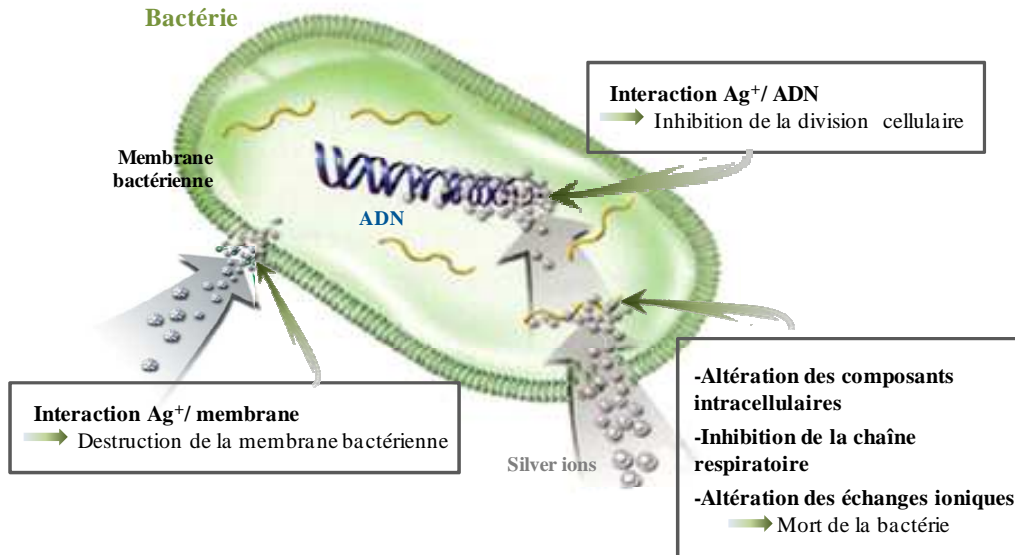
- L'argent

Les ions métalliques ont démontré des effets antibactériens différents selon la nature de l'ion considéré<sup>43</sup>.

Les premières utilisations de l'argent (Ag) pour ses propriétés antibactériennes remontent à l'Antiquité. Ainsi les phéniciens conservaient l'eau, le vin et le vinaigre dans des contenants en argent pour les préserver des contaminations. En revanche, ce n'est qu'avec les premières expérimentations de Crédé en 1884 que l'argent a été utilisé pour une action thérapeutique. Crédé a ainsi formulé un collyre à base de nitrate d'argent pour traiter l'endophtalmie gonococcique néo-natale permettant de réduire le nombre de cas de 10 à 0,3% en France. Depuis quelques années, l'utilisation de l'argent dans la conception de dispositifs médicaux est en constante évolution.

Les mécanismes impliqués dans l'effet antibactérien de l'Ag sont multiples et impliquent la forme ionique  $Ag^+$ . L'Ag interagit avec certains constituants de la membrane bactérienne chargée négativement (phospholipides, lipopolysaccharide). Cette interaction provoque une altération de la stabilité de la paroi bactérienne et une augmentation de la perméabilité membranaire aboutissant à la fuite du contenu cellulaire puis à la mort de la bactérie. De plus, l'Ag est capable de se lier aux protéines par l'intermédiaire des groupements thiols notamment, altérant ainsi la structure conformationnelle des protéines et leurs

fonctions<sup>44, 45</sup>. Dans la bactérie, l'Ag interagit avec l'ADN dont la charge globale est négative<sup>46</sup> et provoque l'inhibition de la réplication de l'ADN. L'Ag inhibe également la chaîne respiratoire<sup>47</sup>.



*Figure 13. Les multiples modes d'action de l'argent sur la bactérie. Modifiée de Smith&Nephew<sup>48</sup>.*

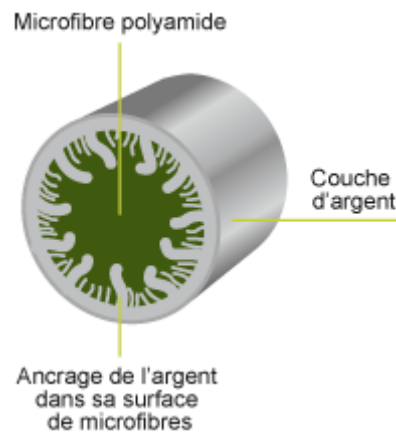
Cependant l'utilisation de nitrate d'argent peut induire une coloration noire de la peau et un possible argyrisme qui sont irréversibles (Figure 14). De plus, l'argent peut être emmagasiné au niveau rénal et hépatique augmentant la concentration sérique de l'argent et représente donc un risque de toxicité pour ces organes.



*Figure 14. Photographie d'un patient atteint d'argyrisme généralisé<sup>49</sup>. Herbert, 2008.*

La résistance à l'argent de certaines bactéries a été démontrée dans certaines études. Cependant l'association avec d'autres composés comme la sulfadiazine argentique ou la chlorhexidine permet de diminuer la propension d'une résistance à l'argent.

Plus récemment, l'argent a été utilisé dans la fabrication de pyjamas en complément aux thérapies de l'eczéma atopique et du psoriasis. Dans cette application, outre l'action bactéricide et fongicide, les particules d'argent ont démontré un effet anti-inflammatoire qui a été utilisé pour améliorer la qualité de vie des patients<sup>50</sup> afin de soulager notamment les démangeaisons. Les mécanismes impliqués dans cet effet anti-inflammatoire de l'argent ne sont pas totalement élucidés. Dans cette application directe, l'argent est chargé directement par imprégnation à la surface des fibres textiles à base de polyamide (Figure 15) associées à des fibres en coton.



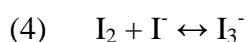
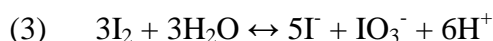
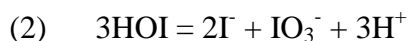
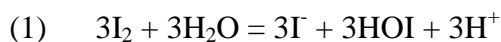
*Figure 15. Schéma du concept d'ancrage de l'argent sur les fibres textiles des pyjamas conçus par l'entreprise Dooderm<sup>50, 51</sup>.*

- L'iode

Outre son rôle biologique, l'iode possède également des propriétés antibactériennes dont les premières utilisations en tant que telle remonte au XIX<sup>ème</sup> siècle dans le traitement du goitre. Plus récemment, Alexander Fleming rapporta l'efficacité d'un traitement avec de l'iode à 2% sur les plaies des soldats lors de la première guerre mondiale contre la gangrène<sup>52</sup>.

La préparation d'iode ( $I_2$ ) en solution aqueuse aboutit à la formation de nombreuses espèces d'iodes. Premièrement la réaction de l'iode avec l'eau conduit à la formation d'ions iodate (HOI) comme le montre l'équation (1). Les ions iodates se dissocient ensuite et libèrent des ions iodures ( $I^-$ ), des protons ( $H^+$ ) et une autre forme d'ions iodates ( $IO_3^-$ ) décrit dans l'équation (2). La réaction bilan est représentée par l'équation (3). L'équilibre de la réaction peut varier en fonction du pH vers la gauche en condition acide ou vers la droite en conditions neutre et basique. L'iode réagit également rapidement avec les ions iodures ( $I^-$ ) et forme

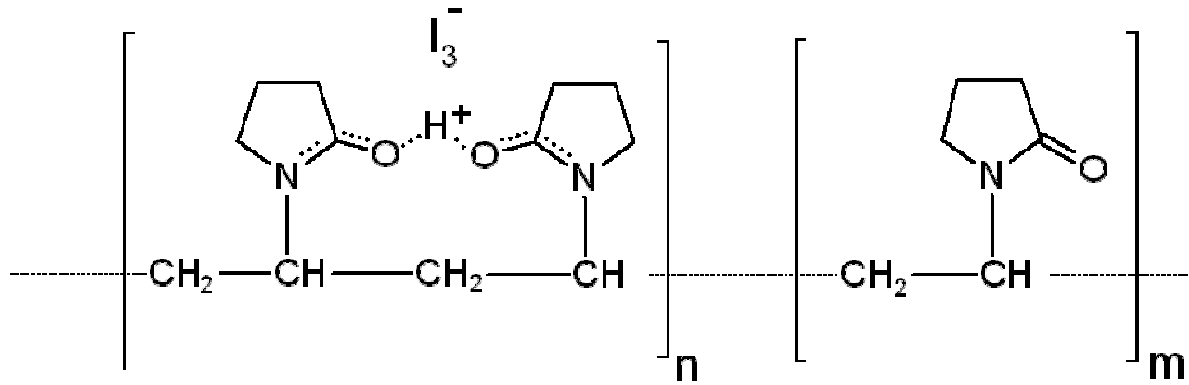
rapidement un équilibre avec la formation de complexe triiodure ( $I_3^-$ )<sup>53</sup> décrite par l'équation (4)<sup>54</sup>. La préparation de cette solution dite solution de Lugol a été décrite précédemment par le physicien Lugol J.G.A. en 1829. La constante d'équilibre associée à l'équation (4) dépend de la température et de la concentration des 3 espèces d'iode. Au-dessus de 25°C, l'équilibre de la réaction est ainsi favorisé vers la gauche<sup>53</sup>. Au contraire, une augmentation de la concentration en iodure ( $I^-$ ) favorise l'équilibre vers la droite.



En conditions physiologiques, seules les espèces chimiques de l'iode décrites par l'équation (4) sont retrouvées dans la solution de Lugol<sup>55</sup>.

Parmi les 3 espèces présentes dans la solution de Lugol, seule l'iode ( $I_2$ ) présente une activité antibactérienne<sup>56</sup>. L'effet bactéricide s'explique par la pénétration rapide de l'iode dans la bactérie à travers la paroi bactérienne<sup>53</sup>. L'activité antibactérienne est due au pouvoir oxydant de l'iode qui provoque l'altération des protéines en créant un défaut de repliement<sup>57</sup>. Ces altérations conduisent à la modification de la structure 3D des protéines qui aboutit à leur inactivation<sup>58, 57</sup>.

Depuis, l'utilisation de l'iode en tant qu'agent antiseptique s'est développée notamment avec la découverte des iodophores permettant de complexer l'iode avec une molécule organique. Cette complexation permet de supprimer les effets indésirables de l'iode comme la coloration des tissus en jaune-brun et l'odeur désagréable des solutions d'iode et surtout potentialise l'action de l'iode. C'est le cas de la Bétadine®, dont l'iodophore est le polyvinylpyrrolidone (PVP) qui forme avec l'iode un complexe po(ly)vidone iodé soluble dans l'eau.



**Figure 16. Formule chimique du complexe povidone iodée.**

**b. Méthode biologique antibactérienne**

La larvothérapie ou asticothérapie est une méthode de soin des plaies qui permet d'éliminer les tissus nécrosés et désinfecter la plaie. Elle fait intervenir l'utilisation de larves de diptères, notamment celles de la mouche verte (Figure 17), dite *Lucilia sericata* ou *Phaenicia sericata*<sup>59</sup>.



**Figure 17. Photographie de *Lucilia sericata* ou *Phaenicia sericata* au stade adulte et larvaire.**

C'est en 1799, lors de la campagne en Syrie par Napoléon Bonaparte, que le chirurgien Dominique Larrey découvre que les soldats blessés, dont les plaies étaient colonisées par des asticots, guérissaient mieux et plus rapidement. La colonisation de la plaie par les asticots permet de désinfecter la blessure, de stimuler la production des tissus cicatriciels et surtout de nettoyer la plaie par la consommation des tissus uniquement nécrosés par les asticots.

La détersion des plaies par ces larves est réalisée par la production d'enzymes digestives, telle que les carboxypeptidases A et B, la collagénase et des sérines protéases<sup>60</sup>, et par une action mécanique due au grouillement des larves et à la dilacérations de la fibrine par les mandibules<sup>61</sup>. Le rôle désinfectant des larves est illustré par de nombreux articles<sup>62, 63</sup>. Il s'explique par la production d'ammoniaque provoquant une élévation du pH<sup>64, 63</sup> et de la sécrétion larvaire de substance ayant une activité antibactérienne: l'allantoïne, l'acide phénylacétique et le phénylacétaldéhyde<sup>65, 66</sup>.



Cependant cette méthode est peu acceptée par les patients et les soignants. Et il semblerait que l'augmentation du pH stimulerait les récepteurs locaux à la douleur. Une dermite d'irritation péri-lésionnelle peut également survenir due à l'action irritante des enzymes larvaires. En France, l'utilisation de la larvothérapie est autorisée sous forme de "BioBag" et uniquement dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) adressée à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM).

### **6. Pansements avec principes actifs**

L'association des pansements avec un principe actif permet d'obtenir des dispositifs médicaux qui permettent à la fois de maintenir un environnement adéquat à la cicatrisation des plaies et d'apporter une valeur ajoutée dont le but est d'apporter une action antibactérienne, pro-cicatrisante ou antalgique. Une nouvelle gamme de pansements dit modernes permet ainsi d'améliorer la cicatrisation et prévenir ou traiter l'infection. Ce type de dispositif est utilisé pour le traitement des plaies particulières telles que les plaies atones (absence de tissu de granulation inflammatoire), les plaies infectées ou à risque infectieux élevé, les plaies douloureuses et les plaies cancéreuses ou malodorantes.

Des pansements antibactériens sont ainsi élaborés par imprégnation dans une solution de povidone iodée additionnée de polyéthylène glycol (PEG) tel que le pansement Inadine®. Le rôle du PEG est d'apporter une matrice hydrosoluble permettant à l'iode d'atteindre les bactéries. D'autres méthodes permettant de charger de l'iode sont utilisées tel que le cadexomer en tant que iodophore dans les pansements Iodosorb®. Le cadexomer est formulé à partir d'amidon réticulé sous la forme de billes<sup>67</sup>, ce qui permet de charger l'iode dans ce cadexomer dont les liaisons réticulées seront cassées en présence des exsudats de plaie, permettant ainsi la libération de l'iode.

Il existe également de nombreux pansements à l'argent qui diffèrent par leurs supports (crèmes, compresses, plaques, ...). C'est par exemple le cas des pansements Cellosorb Ag®, Urgotul Ag®, Biatain® et Silverlon®. La principale différence entre ces différents pansements repose sur la méthode de chargement de l'Ag et sur les interactions physico-chimiques impliquées dans le chargement de l'Ag. Certains pansements utilisent ainsi la technique lipido-colloïde basée sur l'induction d'un gel à base de carboxyméthylcellulose (CMC) chargé par l'Ag. La formulation de ce gel permet au dispositif d'être non adhésif, non occlusif et d'absorber les exsudats de plaie modérément exsudatives. L'absorption des exsudats de plaies provoque le gonflement de ce gel et la libération de l'Ag. De nouveaux dispositifs sont développés impliquant l'étirement des fibres textiles fonctionnalisées, ce qui

permet la formation de fissures au niveau du revêtement permettant ainsi de libérer l'Ag contenu dans le revêtement<sup>68</sup>. D'autres dispositifs, tel que le Silverlon®, incluent directement l'Ag dans la fibre textile avec des quantités d'Ag chargées (de l'ordre de 550 mg/100 cm<sup>2</sup>). D'autres dispositifs incluent l'Ag sous forme de complexe argentique. Cependant, une controverse existe par rapport à l'efficacité de ces dispositifs<sup>69</sup> et leur toxicité due à la présence de l'Ag<sup>70</sup>. L'utilisation de ces dispositifs repose sur la balance entre l'activité antibactérienne et la cytotoxicité<sup>71</sup>. Autrement dit, l'utilisation de ces pansements doit être adaptée en fonction du risque infectieux par rapport au processus de guérison.

La problématique qui se pose aux pansements est la nécessité d'apporter des soins quotidiens. Les pansements doivent, en effet, être changés régulièrement, notamment dans le cas de plaies très exsudatives, afin d'éviter la macération de la plaie. De plus, l'application, seule, d'un pansement ne suffit pas pour prévenir l'infection de la plaie et encore moins pour traiter l'infection. C'est la raison pour laquelle des principes actifs sont chargés sur des pansements de nouvelle génération. Cependant, l'efficacité plus ou moins spécifique de ces agents antibactériens peut induire une toxicité cellulaire locale, ralentissant la guérison des plaies. C'est pourquoi, les supports sont améliorés afin d'optimiser l'activité de ces agents antibactériens par rapport à leur biodisponibilité et les quantités utilisées.

### **Partie 2 : Le traitement de surface des dispositifs médicaux**

La modification de surface des matériaux textiles à visée médicale concerne une large gamme de produits et dispositifs dans le but d'améliorer et/ou apporter des propriétés aux matériaux comme le chargement d'un principe actif. Ces modifications sont apportées dans le but de répondre à une problématique d'ordre médical. C'est par exemple le cas de certaines prothèses vasculaires dont les modifications apportées après leur fabrication permettent de limiter les risques d'infections, les re-sténoses ou les thromboses<sup>72</sup>. Pour cela, il existe plusieurs méthodes et techniques permettant de modifier la surface de DM textiles. L'une des principales méthodes utilisée sur les textiles est la fonctionnalisation de surface qui permet de greffer un polymère à la surface du matériau. Ce greffage peut être réalisé par la formation de liaison covalente ou par un enrobage des fibres textiles avec le polymère.

#### **1. Le chitosane (CHT)**

Le CHT est un polysaccharide naturel composé d'unités D-2-déoxy-2-acétyl-glucosamine et D-2-déoxy-glucosamine liées par une liaison  $\beta$  (1-4) (Figure 18) et obtenu par la désacétylation partielle de la chitine en milieu alcalin. La chitine, qui permet d'obtenir le

CHT, est un composé extrait de la carapace des crustacés (crevettes grises, crabes,...) et représente le polysaccharide le plus abondant après la cellulose. Il représente donc un intérêt économique pour l'industrie de par son abondance. Le CHT peut être aussi extrait directement de certains champignons tel que *Agaricus bisporus* et *Aspergillus niger*<sup>73</sup>. Le CHT est caractérisé par un degré de désacétylation (DD) supérieur à 50%. Le DD et la masse moléculaire moyenne définissent le type de CHT.

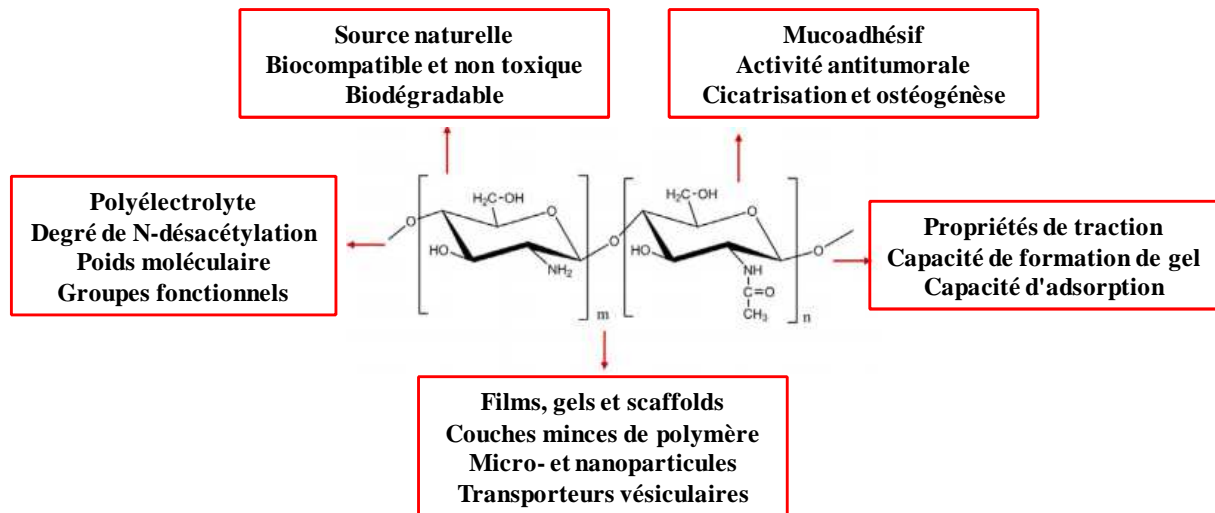


Figure 18. Formule chimique du CHT. Modifiée de Balan et al, 2014<sup>74</sup>.

a. Ses propriétés antibactériennes

Son utilisation représente une voie de développement intéressante pour la santé publique dans la mesure où celui-ci présente des propriétés biologiques et chimiques intéressantes. En effet, il possède des propriétés antibactériennes en solution qui ont été démontrées par plusieurs équipes<sup>75-77</sup>. Son action antibactérienne s'explique par la présence de nombreuses fonctions amines protonées (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Il interagit avec les composants externes de la membrane des bactéries chargées négativement (Gram<sup>+</sup> : acide téichoïque, Gram<sup>-</sup> : lipopolysaccharide: LPS)<sup>78, 76, 79</sup>. Le traitement d'*Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>) par une solution d'acétate de CHT à 0,5%<sub>m/v</sub> pendant 20 minutes cause une altération de la membrane externe qui se recouvre de vésicule de CHT puis se rompt. L'interaction du CHT avec la membrane bactérienne provoque une augmentation de la perméabilité membranaire. Le même traitement réalisé sur *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>) provoque une rupture de la membrane au niveau de la région resserrée des cellules en division. Cela provoque la perte du contenu cellulaire puis l'éclatement des bactéries<sup>76</sup>. La différence de l'effet antibactérien du CHT observée sur les bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup> s'explique par les différences structurales de la membrane des bactéries. En effet, les bactéries Gram<sup>+</sup> possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse

que les bactéries Gram- et les bactéries Gram- possède une double membrane constituée chacune par une double couche de phospholipides.

Les propriétés antibactériennes du CHT dépendent cependant du type de CHT. En effet, l'action bactéricide du CHT augmente avec son poids moléculaire (Mw) et son DD.

### b. Ses applications médicales

Le CHT est biocompatible ce qui lui permet d'être toléré par l'organisme<sup>80, 81</sup>. De ce fait, de nombreuses applications médicales utilisent le CHT, par exemple dans l'élaboration d'hydrogels injectables. Ces gels, constitués de polyélectrolytes (PE) tel que le CHT (PE<sup>+</sup>), les alginates (PE<sup>-</sup>) et les acides polyacryliques (PE<sup>-</sup>) interagissent de façon ionique et permettent d'obtenir un gel<sup>80</sup>. L'incorporation de drogues au sein de cet hydrogel permet ainsi d'obtenir des systèmes à libération de drogues<sup>82</sup>.

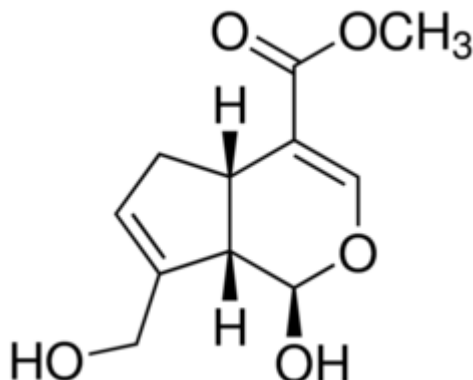
Des systèmes de libération ont également été réalisés à partir du CHT pour la libération de principes actifs au niveau de la muqueuse de l'épithélium nasal. Le caractère polycationique du CHT lui permet d'interagir avec la muqueuse nasale par l'intermédiaire des résidus d'acides sialiques chargés négativement<sup>83</sup>. Des microcapsules ont ainsi été réalisées à base de CHT pour permettre la libération de principes actifs au niveau de la muqueuse nasale.

Le CHT est également utilisé pour la fonctionnalisation des textiles afin d'obtenir des pansements bioactifs. Les propriétés pro-cicatrisantes du CHT permettent d'obtenir des dispositifs bioactifs. Pour cela, le CHT peut être fixé de façon covalente sur certains textiles en cellulose par l'intermédiaire de molécules d'ancrage comme l'acide butanetetracarboxylique<sup>84</sup>. Cette fonctionnalisation aboutit au greffage covalent du CHT à la surface des fibres textile par la formation de liaison amide avec la molécule d'ancrage. La fonctionnalisation de CHT peut également être effectuée par un enrobage des fibres. Dans ce cas, le CHT n'est pas greffé sur le textile mais sa réticulation par un agent réticulant lui permet de créer un enrobage de polymère autour des fibres<sup>85</sup>. Il est également possible de créer une membrane de CHT réticulé<sup>81</sup>. Cette réticulation repose sur la réactivité importante du CHT s'expliquant par la présence de nombreuses fonctions alcools (-OH) et amines (-NH<sub>2</sub>).

### c. Sa réticulation

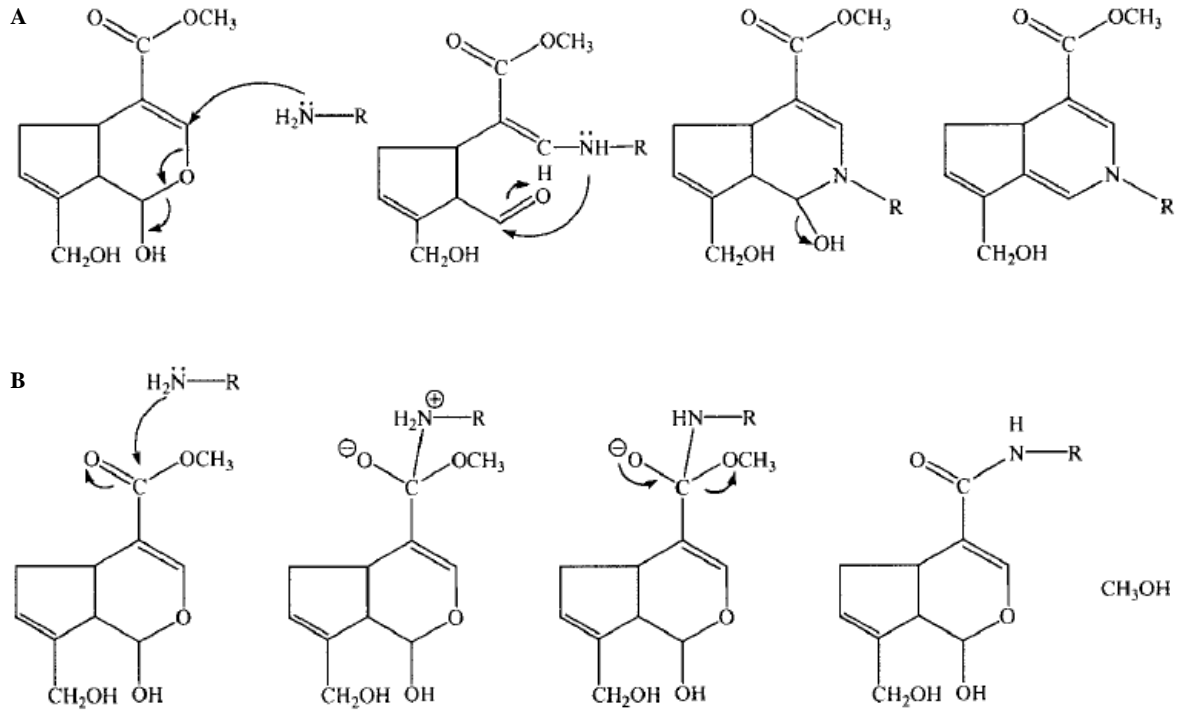
La réticulation du CHT peut être réalisée par différents agents réticulants tels que le glutaraldéhyde, le diglycidyl ether ou les époxydes. Ces réactifs présentent néanmoins l'inconvénient d'être toxiques<sup>86</sup> et leurs produits de dégradation sont des composés toxiques tels que les esters et les dialdéhydes<sup>81</sup>. D'autres agents réticulants peuvent être utilisés tel que

la génipine (Gpn) (Figure 19). La Gpn correspond à la partie aglycone du géniposide extrait des fruits de *Gardiena jasminoïde Ellis*.



**Figure 19. Formule chimique de la génipine.**

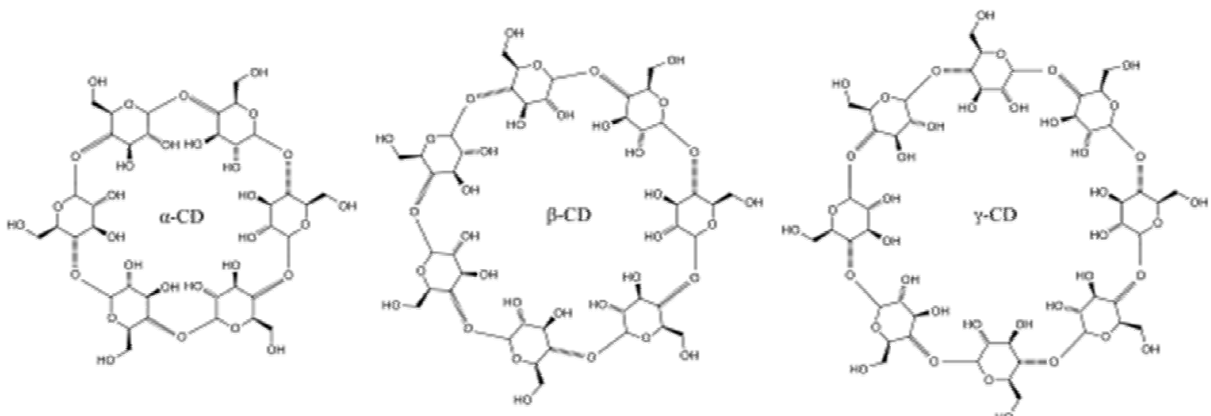
La réaction de réticulation du CHT par la Gpn fait intervenir une réaction qui implique deux mécanismes réactionnels<sup>86, 87</sup>. La première réaction (Figure 20 A), plus rapide, est portée sur l'atome de carbone C3 de la Gpn. Il subit une attaque nucléophile par l'amine primaire (R-NH<sub>2</sub>) du chitosane conduisant à l'ouverture du cycle dihydropyrane puis à la formation d'un aldéhyde intermédiaire, lui-même réattaqué par l'amine secondaire et aboutissant à la formation d'un composé hétérocyclique de Gpn lié de façon covalent au CHT. La deuxième réaction (Figure 20 B), plus lente, se produit sur l'atome de carbone C11 de la Gpn. Ce dernier subit une substitution nucléophile bimoléculaire (SN2) de la fonction ester de la Gpn par le groupement amine primaire du CHT pour former un amide secondaire et libérer une molécule de méthanol. Ces réactions aboutissent à l'apparition d'une coloration bleue qui dépend de la présence d'oxygène<sup>86</sup>. Actuellement ces deux mécanismes ont été parfaitement décrits et démontrés. Cependant, certaines études rapportent l'implication d'une mole de Gpn pour deux moles d'amines tandis que d'autres rapportent l'implication de plusieurs moles de Gpn intervenant dans la constitution d'un pont entre les chaînes de CHT<sup>86, 87</sup>.



**Figure 20.** Réaction de réticulation de composés aminés par la Gpn. Butler et al, 2003<sup>86</sup>

## 2. Les cyclodextrines (CD)

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constituées par des unités glucopyranoses liées entre-elles par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4. Elles ont été découvertes en 1891 par A. Villiers<sup>88</sup> et sont obtenues par la dégradation bactérienne de l'amidon par *Bacillus macerans*<sup>89</sup>. En fonction du nombre d'unités glucose qui les constitue, elles sont dénommés  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  pour 6, 7 et 8 unités glucose respectivement (Figure 21).

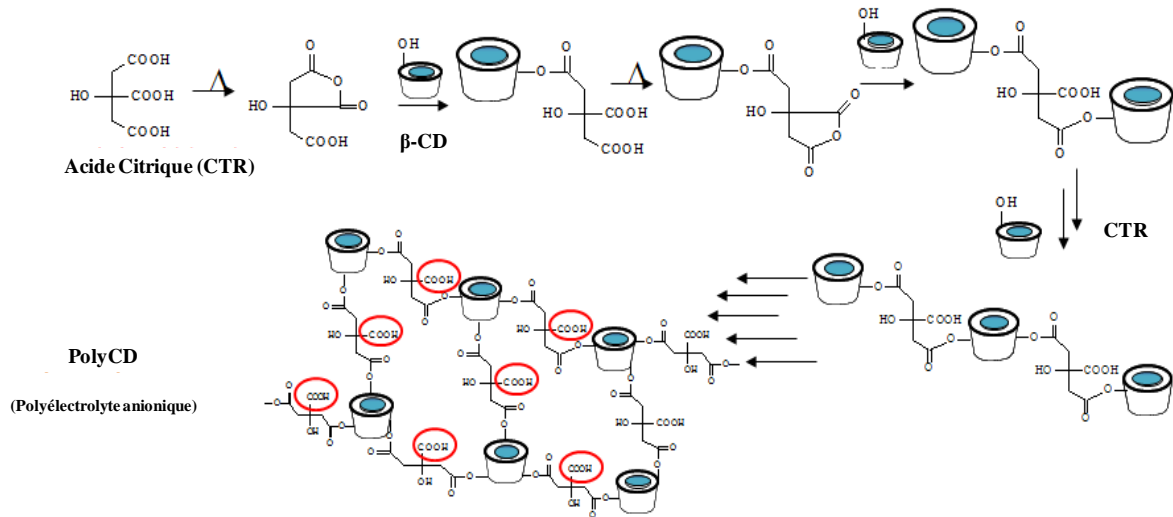


**Figure 21.** Formule chimique de l' $\alpha$ , de la  $\beta$  et de la  $\gamma$ -CD.

Ces molécules présentent une structure 3D en forme de cône tronqué. Les groupements hydroxyyles orientés vers l'extérieur confèrent un caractère hydrophile au niveau

de la face externe et les hydrogènes, orientés vers l'intérieur de la molécule, confèrent un caractère hydrophobe au niveau de la cavité. La principale propriété de ces molécules cage est la formation de complexe d'inclusion avec un grand nombre de principe actif. La formation de complexe d'inclusion permet la solubilisation de la plupart des principes actifs lipophiles comme la Chx<sup>90, 91</sup>. Les CD sont utilisés, comme excipients, pour la solubilisation des principes actifs. Le caractère lipophile de la majorité des principes actifs, rend l'utilisation des CD intéressante en tant qu'excipient dans la préparation des médicaments<sup>92, 93</sup>. La formation de complexes d'inclusion est un phénomène réversible<sup>94</sup>, permettant de libérer la molécule active pour lui permettre d'exercer son action. Ces CD peuvent subir des modifications chimiques qui sont le plus souvent réalisées pour améliorer les capacités de solubilisation des principes actifs. Des groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>), hydroxypropyls (-CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>), amines (-NH<sub>2</sub>), esters (-C(O)O-) ou éthers sont ainsi liés de façon covalente aux groupements hydroxyles de la CD.

La synthèse de polymère de CD (polyCD) permet de disposer de molécules présentant à la fois la capacité de former des complexes d'inclusion d'une part et d'autre part de disposer de fonctions réactives ou de charges (PE) qui peuvent être utilisées pour interagir avec d'autres molécules ou pour la fonctionnalisation de surface de textiles. La réaction à chaud d'acide polycarboxylique (PCA) sur les CD a permis d'obtenir un polymère de CD. La réaction de polymérisation des CD est réalisée par une réaction de polyestérification entre les groupements carboxyliques du PCA et les groupements hydroxyles de la cyclodextrine. Ainsi, la réaction de polymérisation entre l'acide citrique (CTR) et les CD a été étudiée lors de travaux précédents. Cette étude a démontré que seules deux des trois fonctions carboxyliques du CTR intervenait dans la formation de liaison<sup>95</sup> (Figure 22).



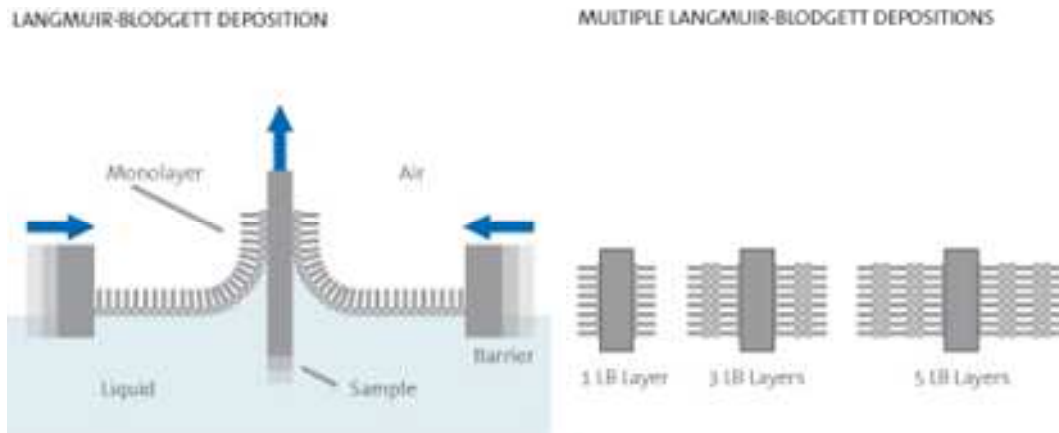
**Figure 22. Réaction de polymérisation de la  $\beta$ -CD avec l'acide citrique (CTR) par polyestérification.**

Le greffage de polyCD sur un textile en polyéthylène téréphtalate (PET) a permis d'obtenir un dispositif à libération de principes actifs pour l'élaboration de prothèses vasculaires<sup>96, 97</sup>. Dans cette application, une légère réponse inflammatoire locale, due à l'acidité du polyCD, a été observée après un mois d'implantation au niveau de la carotide chez le chien. Cependant après 6 mois d'implantation, les tissus environnants ne présentent plus de signes d'inflammation ni de signes d'altération<sup>97</sup>. Le débit et le renouvellement du volume sanguin qui traverse la prothèse permet de dissiper progressivement l'acidité du polyCD, ce qui permet son utilisation prolongée dans une telle application. Plus récemment, le polyCD a été utilisé pour son caractère PE négatif dans la construction d'un système PEM<sup>98, 99</sup> sur le PET fonctionnalisé par le polyCD<sup>100, 101</sup>.

### 3. Les systèmes polyélectrolyte multicouche (PEM)

L'intérêt d'utiliser un système multicouche est d'associer les propriétés des polymères sur un même dispositif. Les premiers travaux basés sur la construction d'un système multicouche ont été réalisés par Langmuir et Blodgett dans les années 30. L'objectif était de pouvoir étudier le comportement d'un système composé de paires de couches lipidiques sur la perméabilité de la paroi cellulaire<sup>102</sup> (Figure 23).





**Figure 23. Méthode de construction de systèmes multicouche par l'utilisation de molécules amphiphiles<sup>103</sup>.**

La plupart des systèmes multicouche est obtenue par l'utilisation de polymères chargés ou PE. Des systèmes PEM sont ainsi réalisés par l'interaction entre polymère/polymère ou polymère/protéine. La construction du système PEM est réalisée par un auto-assemblage des couches, c'est-à-dire un agencement des couches entre elles sans le contrôle d'une source extérieure. L'empilement des couches se fait successivement les unes sur les autres. Cet auto-assemblage se réalise par des interactions physico-chimiques telles que les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes ou les interactions hydrophobe/hydrophile. La membrane cellulaire constitue par exemple un système multicouche constitué d'une paire de couches lipidique dont la stabilité dépend d'interaction hydrophobe/hydrophile.

#### a. Les substrats

La construction d'un système PEM est possible sur un grand nombre de substrats présentant une surface plane ou sphérique tel que des substrats de nature minérale comme le verre<sup>104</sup> et le quartz<sup>105</sup> ou de nature métallique comme le silicium<sup>106</sup>, le titane fritté<sup>107</sup> et l'or<sup>108</sup> ou encore de nature organique comme le PET<sup>98, 99, 109</sup> et le Téflon®<sup>110</sup>. L'une des principales contraintes dans la construction d'un système PEM est la nécessité de disposer de charges soit présentes de façon intrinsèque au substrat ou bien apportées par la modification de surface. Cette dernière peut être réalisée par l'activation de la surface par un traitement plasma froid qui permet de créer des groupements fonctionnels à la surface des matériaux. La modification de surface peut également être réalisée par un procédé de fonctionnalisation tel que le "coating" qui consiste à créer une enveloppe au niveau de la surface du substrat.

b. Les polyélectrolytes (PE)

Dans le cas des systèmes PEM, la construction est réalisée par des interactions électrostatiques entre des PE de charges opposées. Plusieurs PE peuvent être utilisés et sont regroupés en fonction de leur origine naturelle ou synthétique et de leur charge (Tableau 5). Parmi les PE d'origine naturelle on distingue les PE d'origine naturelle ayant subi des modifications chimiques comme la pectine ou la carboxyméthylcellulose (CMC) et les dérivés d'origine animale comme l'acide hyaluronique, le CHT, la mucine ou encore l'héparine.

**Tableau 5. Exemple de polyélectrolytes (PE) utilisés pour la construction de systèmes PEM classés en fonction de leur charge positive (cationique) ou négative (anionique) et de leur origine synthétique ou naturelle.**

	Cationique	Anionique
PE d'origine synthétique	poly(allylamine hydrochloride) PAH	poly(sodium styren sulfonate) PSS
	poly(diallyldimethylammonium chloride) PDADMA	poly(acrylic acid) PAA
PE d'origine naturelle	poly(L-lysine) PLL	poly(glutamic acid) PGA
	chitosan CHT	hyaluronic acid HA

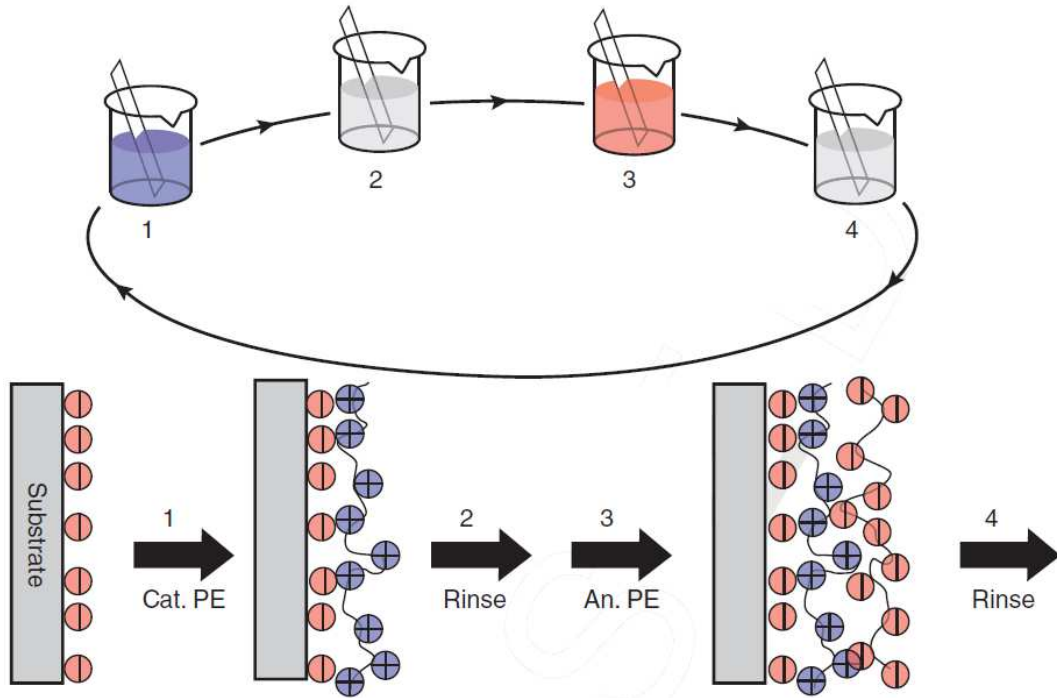
Les PE d'origine synthétique présentent l'avantage d'offrir un large choix de composés chimiques, de structure et de densité de charges. Ils sont également adaptables puisqu'ils peuvent être modifiés chimiquement et sont en général abondants et bon marché. Cependant, ils sont souvent non-biodégradables et dans le cas contraire les produits de leur dégradation peuvent être nocifs. En général, ils ne présentent pas d'activité biologique particulière. En revanche, les PE d'origine naturelle peuvent parfois apporter une fonction biomimétique au substrat et ils apportent souvent des propriétés fonctionnelles comme le cas de la poly(L-lysine) dans la signalisation cellulaire par des récepteurs cellulaires spécifiques ou encore leur interaction avec des molécules bioactives telles que les principes actifs, les facteurs de croissance... Les inconvénients de ces PE sont notamment leur taux de pureté (extraction/purification) et leur exigence en terme de pH et de forces ioniques qui influencent leur solubilité par exemple.

c. Méthodes de construction des systèmes PEM

Afin de construire un système PEM, il existe plusieurs méthodes adaptées en fonction du substrat et surtout des moyens techniques dont disposent les laboratoires.

▪ La méthode de "dip-coating"

La méthode de "dip-coating", utilisée par Decher<sup>104, 111</sup>, consiste à imprégner le substrat dans des bains alternés de solutions de  $PE^+$  et  $PE^-$  suivis par des étapes de rinçage (Figure 24).



**Figure 24. Construction d'un système PEM par la méthode de "dip-coating"<sup>112</sup>.**

Cette méthode est la plus largement utilisée de par sa simplicité de réalisation. La méthode de "dip-coating" peut être appliquée à plusieurs natures de substrat tel que le verre, la silicone ou tout autre substrat présentant une densité de charges nettes. Elle est cependant relativement longue (de l'ordre d'une dizaine de minutes par bain) et le dépôt des PE présente une interface irrégulière entre deux couches. La réussite de la construction d'un système PEM par cette méthode repose sur le phénomène de surcompensation des densités de charges qui peut être suivi par zétamétrie (Figure 25.A). La surcompensation de charges est indispensable pour permettre au PE suivant de pouvoir interagir avec les charges disponibles en excès de la couche précédente. En effet, comme le montre la Figure 25.B, l'absence de surcompensation des charges aboutit à la stabilisation de la construction du système PEM après un certain nombre de paires de couches.

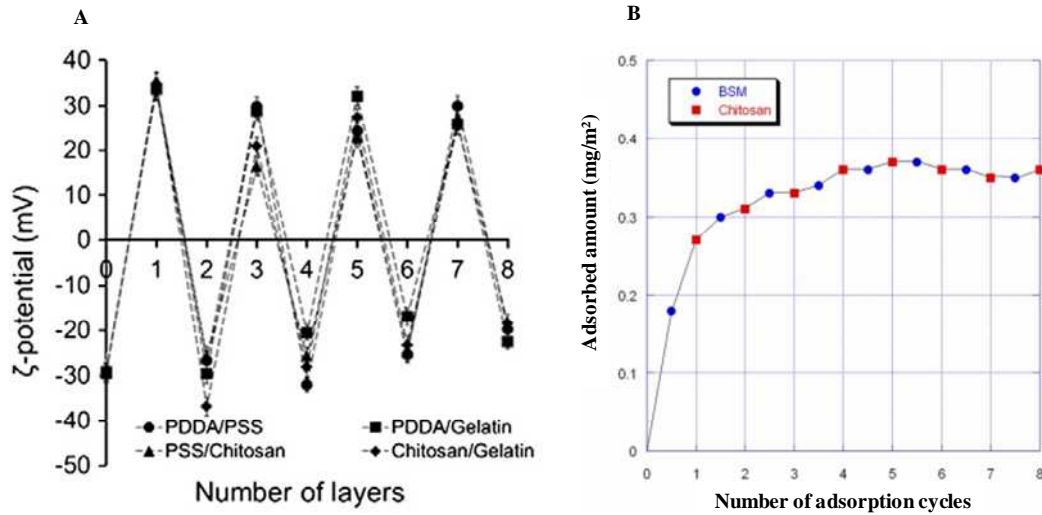


Figure 25.A. Mesure du potentiel zeta ( $\zeta$ ) en fonction du PE déposé sur le substrat<sup>113</sup>. B. Gain de masse de la construction d'un système PEM avec le CHT et une mucine en fonction du nombre de paires de couches<sup>114</sup>.

▪ La méthode de "spray-coating"

Cette méthode a été reportée pour la première fois par Schlenoff<sup>115</sup> puis développée par Schaaf<sup>116</sup>. Cette méthode offre l'avantage d'être très rapide (de l'ordre de quelques secondes). L'excès de solution de PE est éliminé par la gravité, ce qui permet d'obtenir des films fins. L'analyse par microscopie de force atomique (AFM) montre une topographie de surface identique à celle obtenu par "dip-coating".

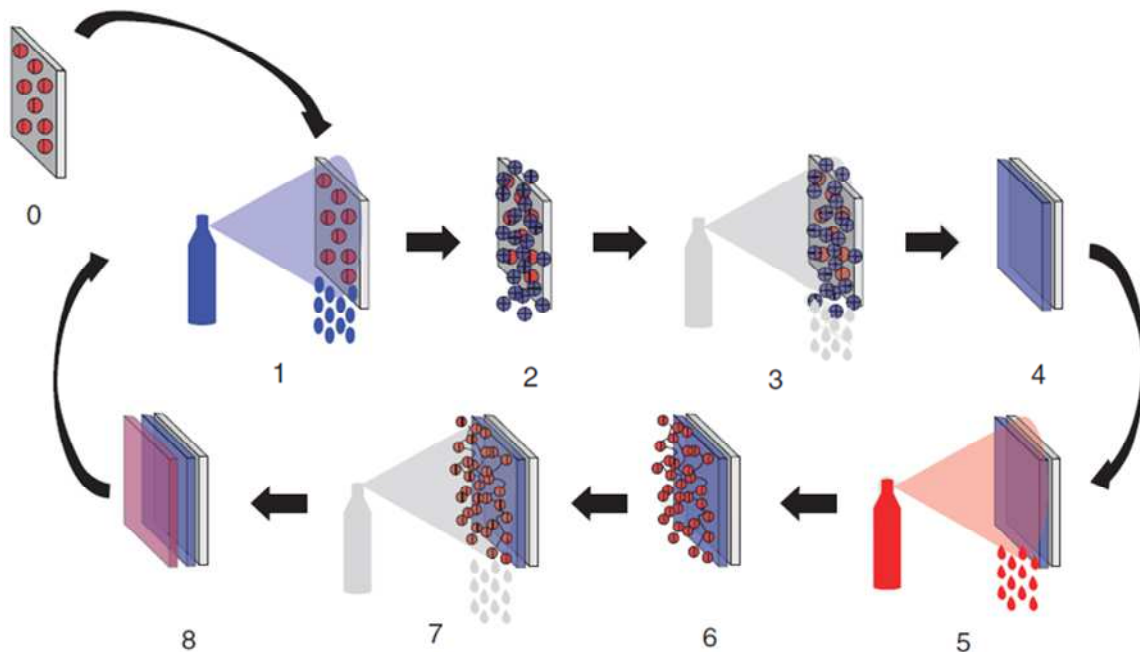
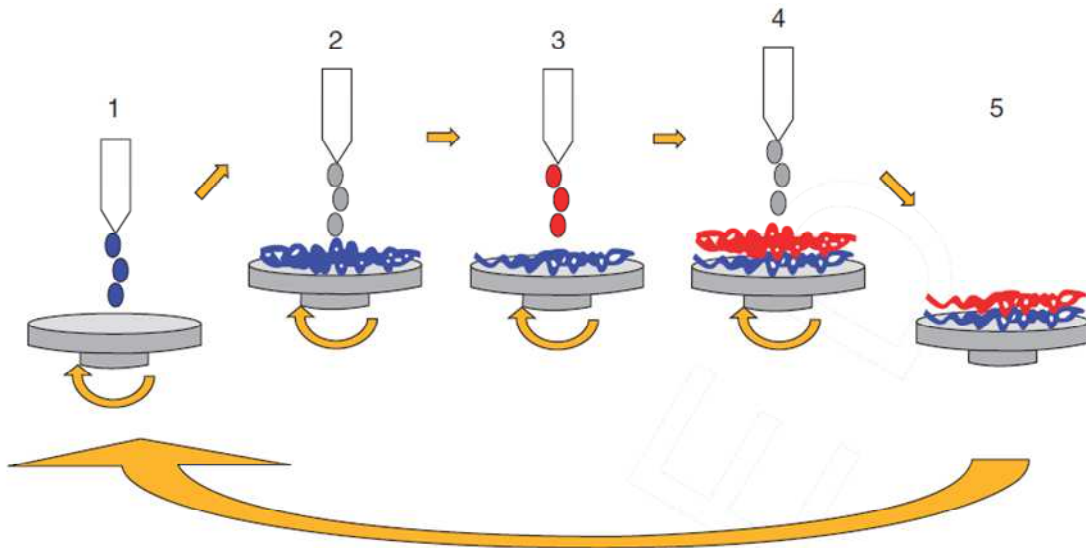


Figure 26. Construction d'un système PEM par la méthode de "spray-coating"<sup>112</sup>.

- La méthode de "spin-coating"

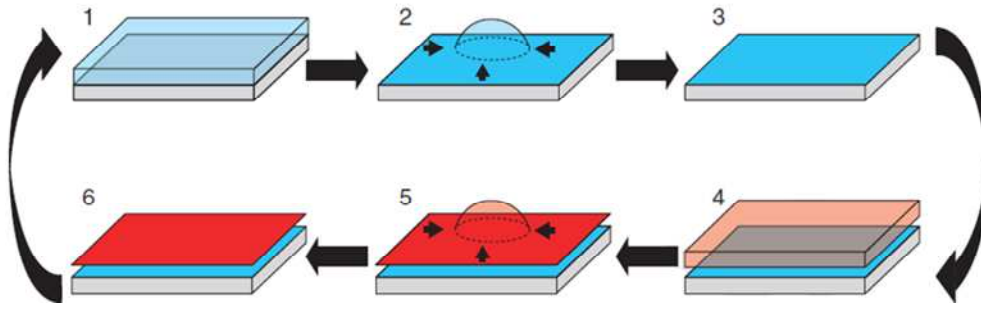
Cette technique repose sur la capacité des solutions de PE déposées en goutte sur la surface à s'étaler et s'aplatir<sup>117</sup>. L'association de la force centrifuge et de la gravité permet de réaliser des films ultrafins et d'obtenir une stratification homogène des différentes couches par rapport à la méthode de "dip-coating"<sup>118</sup>. L'épaisseur totale du système PEM, par cette technique, dépend de la vitesse de rotation et de la concentration en PE<sup>119</sup>. C'est également une méthode rapide qui ne nécessite pas d'étape de rinçage. Cependant, il est nécessaire d'utiliser des solvants volatiles.



**Figure 27. Construction d'un système PEM par la méthode de "spin-coating"<sup>112</sup>.**

- La méthode de "dewetting-coating"

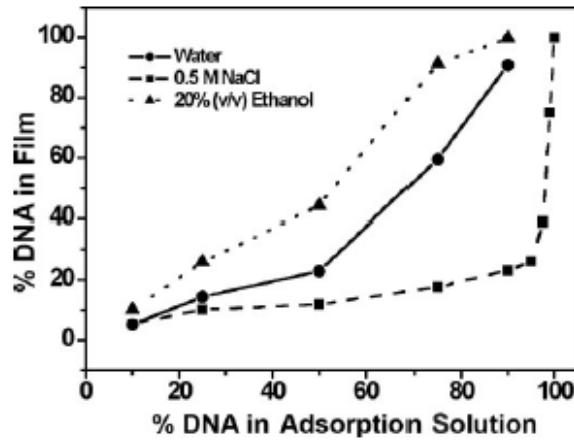
Cette méthode est plus récente. Cette technique fait intervenir l'utilisation d'un mélange contenant du diméthylformamide (DMF) avec de l'eau et le PE. Seule une étape d'évaporation du solvant est nécessaire pour permettre le dépôt de la couche suivante. L'étape d'évaporation du solvant permet d'éviter une étape de rinçage laissant le PE seul à la surface du substrat. La taille de l'échantillon est cependant limitée et l'utilisation d'un tel solvant n'est pas compatible avec la construction d'un système PEM sur un dispositif médical.



**Figure 28. Construction d'un système PEM par la méthode "dewetting-coating"<sup>112</sup>.**

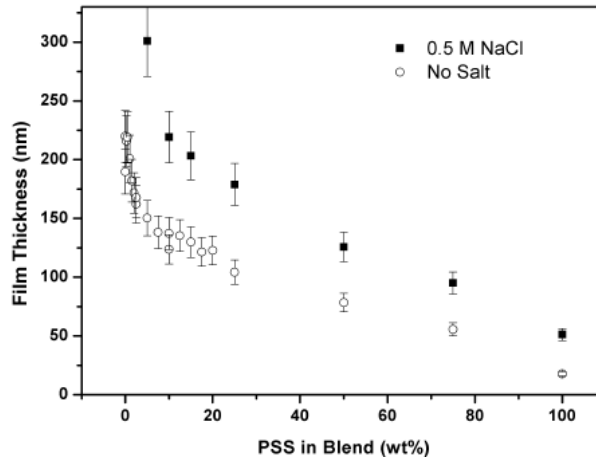
**d. Facteurs influençant la construction d'un système PEM**

Plusieurs facteurs influencent la construction d'un système PEM. Tout d'abord, la quantité de PE déposée par couche dépend de la nature du solvant et de la concentration en PE. Par exemple, l'ADN, en tant que PE anionique, a été utilisé pour la construction de système PEM en fonction de différente composition du solvant. Comme le montre la Figure 29, la présence de sels (NaCl) dans la solution diminue la quantité d'ADN retrouvé dans le système PEM pour une concentration donnée en ADN<sup>120</sup>. Au contraire, l'ajout d'éthanol permet d'augmenter la quantité d'ADN déposée.



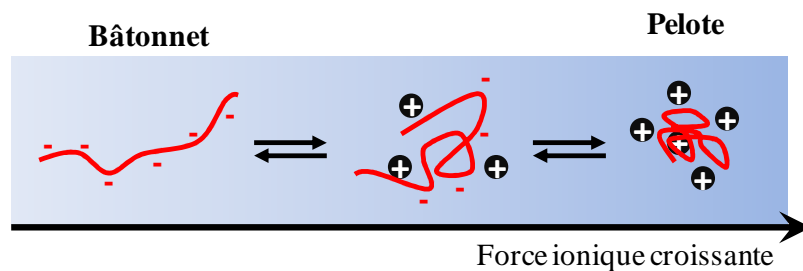
**Figure 29. Pourcentage d'ADN retrouvé dans un système multicouche associant le PAH et l'ADN en fonction de la composition du mélange contenant l'ADN<sup>120</sup>.**

En effet, il a été démontré que la concentration saline des solutions influence l'épaisseur du système PEM et donc la quantité de PE déposé par couche. Par exemple, un système PEM construit avec l'auto-assemblage de PAH-PAA/PSS montre une augmentation de l'épaisseur totale du système PEM après construction en présence de sels (0,5 M de NaCl) comme le montre la Figure 30.



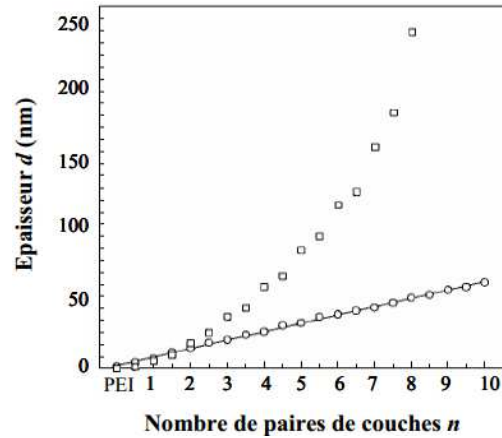
**Figure 30.** Épaisseur d'un système PEM construit par l'auto-assemblage de PAH avec un mélange PAA/PSS en fonction de la concentration en sel<sup>121</sup>.

L'augmentation de l'épaisseur d'un système PEM en présence de sel s'explique par le phénomène d'écrantage des charges. Il s'agit d'une interaction ionique entre les sels présents dans la solution et les charges du PE. Cette interaction ionique diminue les forces de répulsions entre les charges identiques du PE et conduit au repliement du PE sur lui-même. Ce phénomène d'écrantage est proportionnel à la concentration en sel dans la solution (ou force ionique). Ainsi une force ionique croissante provoque le passage d'un PE étiré sous la forme de bâtonnet à un PE replié sur lui-même sous la forme de pelote (Figure 31). L'épaisseur du système PEM est donc plus importante avec un PE replié par rapport à un PE étiré.



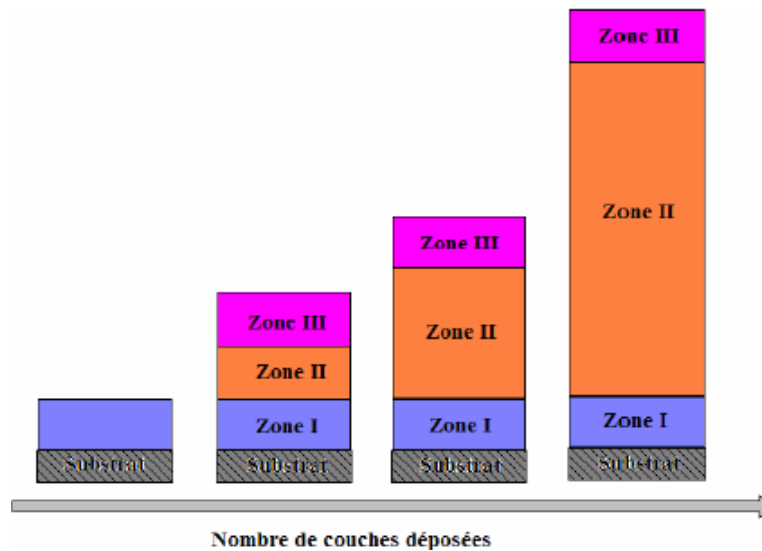
**Figure 31.** Influence de la force ionique sur la conformation spatiale d'un PE anionique par écrantage des charges.

Le choix des PE influence le profil de la construction du système PEM. En effet, en fonction de la nature des PE, deux profils de construction sont décrits en fonction de l'évolution de la construction (en épaisseur ou en masse) du système PEM. On distingue ainsi des systèmes PEM se construisant de façon exponentielle tandis que d'autres se construisent de façon linéaire en fonction du nombre de paires de couches (Figure 32).



**Figure 32. Évolution de l'épaisseur du système PEM en fonction du nombre de paires de couches<sup>122</sup>.**

Une évolution de la construction du système PEM avec un profil linéaire s'explique par le dépôt successif des couches de PE à la surface du système PEM en construction, comme le montre la Figure 33. Dans ce modèle de construction, trois zones sont ainsi définies en fonction des interfaces de la zone: une première zone (Zone I) correspondant à l'interface substrat/système PEM, une seconde zone (Zone III) avec une interface air/ système PEM et la seconde zone (Zone II) correspondant à l'interface intermédiaire en extension entre la zone I et la zone III. Dans ce modèle, l'épaisseur de la couche de la zone III ne varie pas en fonction du nombre de paires de couches.

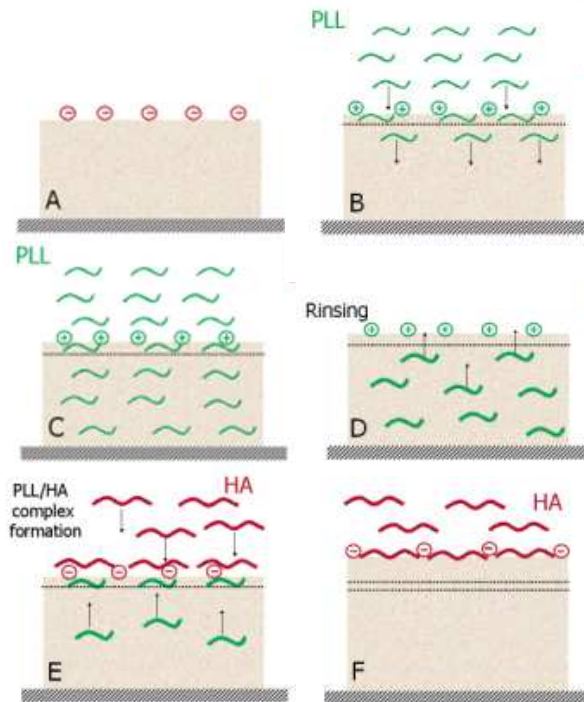


**Figure 33. Schématisation d'une construction linéaire d'un système PEM<sup>123</sup>.**

La construction d'un système PEM avec une évolution qui suit un profil exponentiel a été évaluée par Richert *et al*<sup>124</sup>. L'évolution exponentielle de la construction du système PEM s'explique par la diffusion de l'un des PE utilisé à travers l'ensemble du système PEM. La diffusion de ce PE au sein du système PEM aboutit à une augmentation de plus en plus



importante, avec le nombre de paires de couches, de la quantité de ce PE incorporée dans le système PEM.

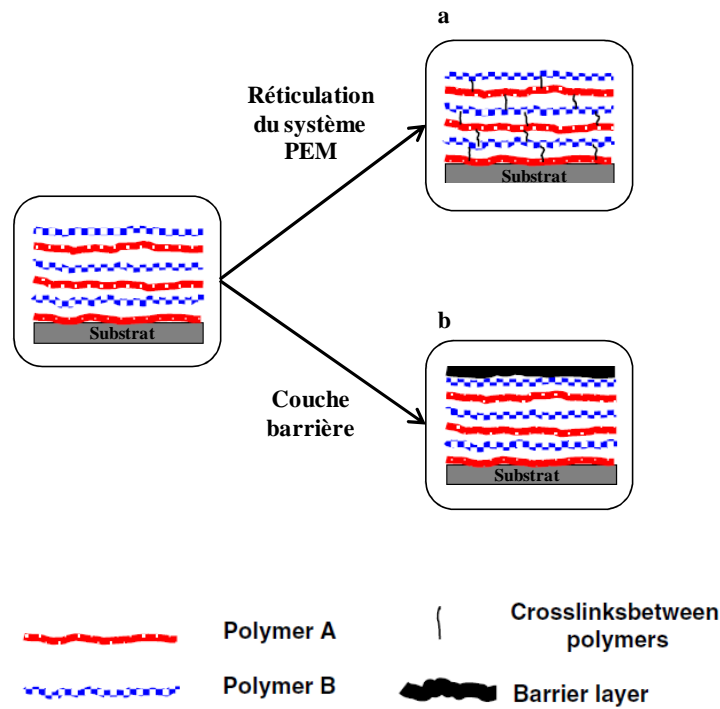


**Figure 34.** Schématisation d'une construction exponentielle d'un système PEM construit avec la poly L-lysine (PLL) et l'acide hyaluronique (HA)<sup>124</sup>.

e. Stabilisation du système PEM

La stabilité des systèmes PEM dépend de nombreux facteurs tels que la nature des polymères utilisés, de leur densité de charges, de leur poids moléculaire,... Certains systèmes PEM sont ainsi relativement peu stables dans certains milieux comme les liquides physiologiques ou encore les milieux salins tels que le tampon phosphate (PBS) dont les paramètres physico-chimiques tels que le pH ou la force ionique déstabilisent le système PEM. La stabilité du système PEM peut être améliorée, notamment, pour répondre à une problématique dont l'impact peut être prolongé dans le temps, comme cela est le cas des plaies chroniques dont la guérison est retardée.

Il existe des méthodes permettant, ainsi, d'améliorer la stabilité des systèmes PEM, comme le montre la Figure 35.



**Figure 35. Stabilisation d'un système PEM (hétéropolymère) par la réticulation des couches entre elles (a) ou bien par le dépôt d'une couche barrière protectrice (b)<sup>125</sup>.**

La réticulation de l'ensemble du système PEM permet d'améliorer la stabilité du système par la formation de liaison covalente entre les couches grâce à l'utilisation d'agents réticulants. Cette réticulation peut être réalisée par la formation de liaisons carbodiimide par l'intermédiaire de l'éthylenediamine<sup>126</sup>, par la formation de liaisons amides entre des polyamines et des polyacides avec le glutaraldéhyde<sup>127</sup> ou encore par l'utilisation de la Gpn après la construction du système PEM<sup>98</sup>. Leur utilisation, pour des dispositifs médicaux, doit tenir compte de leur toxicité comme cela est le cas du glutaraldéhyde<sup>128</sup>.

D'autres méthodes permettent d'améliorer la stabilité du système PEM, comme le dépôt d'une couche barrière dont l'efficacité a été évaluée sur certains systèmes<sup>129, 130</sup>. La couche barrière permet ainsi de ralentir voire retarder la libération des principes actifs chargés au sein du système PEM en limitant la diffusion du principe actif et la dégradation du système<sup>130</sup>.

### **Partie 3 : Conclusion, stratégie employée et cahier des charges**

Dans cette revue bibliographique, l'organisation de la peau a été décrite comprenant sa complexité structurelle et fonctionnelle. L'intégrité de cet organe est assurée par différents mécanismes physiologiques et cellulaires dont le renouvellement de la peau et le processus de cicatrisation. La complexité des mécanismes impliqués dans le processus de cicatrisation a été également décrite avec ses différents stades: la phase vasculaire, la phase de bourgeonnement et la phase d'épidermisation. Les causes des altérations de la peau que sont les plaies ont également été décrites ainsi que les différentes catégories de plaie en fonction de leur gravité.

En fonction de l'état de santé du patient et de son âge, la guérison de la plaie peut être prolongée. Au-delà d'un temps de guérison supérieur à 4 ou 6 semaines selon l'étiologie de la plaie, la plaie est considérée comme chronique.

Les conditions nécessaires pour obtenir une guérison optimale ont été exposées ainsi que l'intérêt de l'utilisation de dispositifs médicaux, tels que les pansements, pour permettre de réunir les conditions optimales de guérison. En fonction de la catégorie de plaie, du stade de cicatrisation ou de la production d'exsudat, la nature du pansement sera adaptée par rapport à la plaie à traiter.

Cependant dans le cas de plaies chroniques, le facteur de risques infectieux augmente avec le temps de guérison. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'apporter des soins rapidement pour prévenir cette infection et favoriser la guérison de ces plaies. Dans le cas d'une plaie chronique non infectée, l'utilisation de dispositifs médicaux tels que les pansements en association avec l'antisepsie de la plaie permet de la protéger et ainsi prévenir l'infection. Dans le cas des plaies infectées, la nécessité de traiter l'infection est primordiale pour permettre la guérison de la plaie. Afin de traiter cette infection, il existe de nombreux agents antibactériens utilisés en association avec les pansements.

Face à la chronicité des plaies, l'utilisation de ces agents nécessite d'apporter des soins quotidiens jusqu'à la guérison de la plaie. C'est pour cette raison que ces pansements sont développés afin de leur apporter une activité thérapeutique. Dans cette revue bibliographique, l'intérêt de la modification de surface par des polymères pour obtenir un système de libération de principes actifs a été exposé. En effet, cela permet d'obtenir des dispositifs ayant une activité thérapeutique contre l'infection des plaies avec une efficacité antibactérienne démontrée et des durées d'activités plus ou moins prolongées. L'efficacité de tels dispositifs

dépend notamment du niveau de biodisponibilité des agents antibactériens qui seront chargés sur ces dispositifs.

### 1. Stratégie employée et cahier des charges

Dans ce projet de recherche nous avons choisi le CHT pour ses différentes propriétés évoquées précédemment (biocompatibilité, caractère polycationique, biodégradable). Dans un premier temps, la fonctionnalisation des fibres textiles (polyester non-tissé) a été réalisée par un enrobage de CHT réticulé. Afin de réaliser cet enrobage, deux agents réticulants ont été étudiés: un premier, le CTR largement utilisé par l'UMET dans la synthèse du polymère de cyclodextrine et dans la fonctionnalisation de différents substrats et le second, la Gpn, pour ses propriétés auto-réticulantes sur le CHT.

Une fois les textiles fonctionnalisés, ceux-ci ont été activés par une l'adsorption d'Ag ou d'iode afin de conférer une activité antibactérienne au dispositif. Nous avons ensuite évalué l'efficacité antibactérienne des textiles activés par une évaluation microbiologique.

Un système PEM a ensuite été construit sur les textiles activés par l'Ag afin de limiter sa libération hors du système. Le but est ainsi d'améliorer la cytocompatibilité des supports en empêchant l'Ag de diffuser hors du dispositif afin de prévenir les effets toxique de l'Ag sur les cellules saines de la plaie. Le système PEM constituera ainsi une interface au sein de laquelle les bactéries pénétreront, entraînées par les exsudats de plaie et dans laquelle l'Ag pourra exercer son action bactéricide par diffusion au sein de ce système (Figure 36). Le système PEM sera également activé par le chargement d'un principe actif pour apporter une fonction supplémentaire au dispositif.

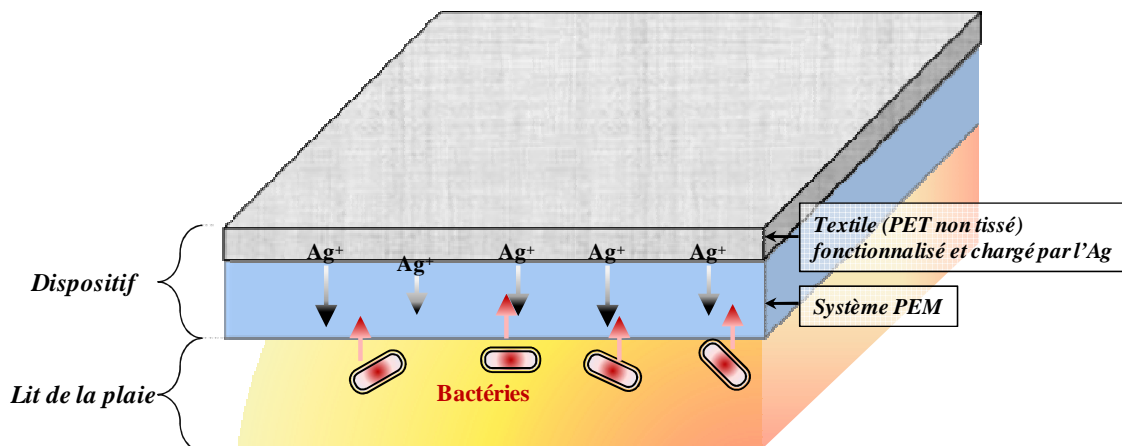


Figure 36. Schéma du principe de l'action antibactérienne du dispositif élaboré.

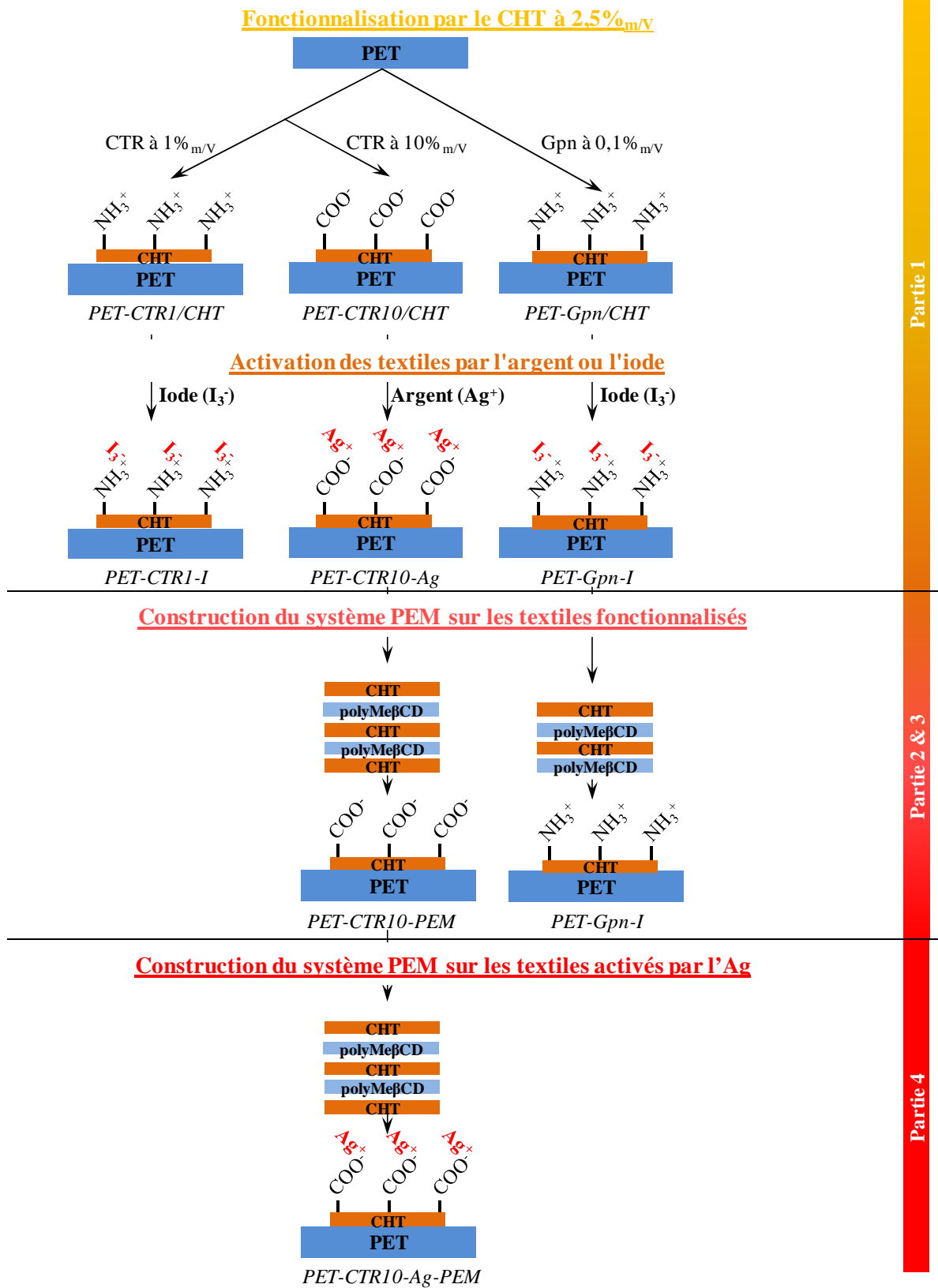
## Chapitre I: Revue bibliographique

Le système PEM utilisant le polyCD, sa capacité d'encapsulation de principes actifs par les CD sera utilisée pour charger un principe actif. Le but est de pouvoir apporter une activité supplémentaire au dispositif, par exemple un effet antalgique avec le chargement d'un anesthésiant local. L'évaluation sera, tout d'abord, réalisée à partir du chargement d'un second agent antibactérien, la Chx, dont l'activité peut être évaluée par des tests microbiologiques *in vitro*.

Le cahier des charges repose sur l'élaboration d'un dispositif antibactérien permettant la biodisponibilité de l'Ag pour obtenir un effet bactéricide rapide significatif. Un témoin sera utilisé à titre de comparaison pour certaines évaluations et sera constitué par le PET fonctionnalisé par le polymère de  $\beta$ -CD réticulé par le CTR, le PET-CTR/CD.

L'activité antibactérienne devra être conservée après construction du système PEM dont le rôle est d'améliorer, tout d'abord, les propriétés biocompatibles du support en limitant la libération de l'Ag hors du système et ensuite de libérer un principe actif. Pour cela, la stabilité du système PEM sera améliorée.

## 2. Schéma récapitulatif des voies utilisées pour les textiles

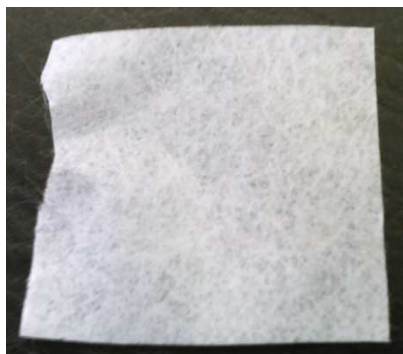


## **Chapitre II : Produits, Matériels et Méthodes**

## **Partie 1 : Matériels et produits**

### **1. Matériels**

Le textile utilisé est un polyester non-tissé à base de polyéthylène téréphtalate (PET, NSN 365) fourni par PGI Nordlys (Bailleul, France). La densité du textile PET est de 76 g/m<sup>2</sup> avec une épaisseur moyenne de 0,24 mm. Le textile se présente sous la forme d'un réseau en 3 dimensions (Figure 37) obtenu par calandrage des fibres textiles à chaud.



**Figure 37. Photographie du textile en polyéthylène téréphtalate (PET).**

Un PET fonctionnalisé par le polymère de  $\beta$ -CD réticulé par le CTR sera utilisé comme témoin dans l'évaluation biologique et microbiologique *in vitro*. Le but est de comparer la fonctionnalisation apportée par le polyCD d'une part, et d'autre part la fonctionnalisation par le CHT. Par rapport aux études antérieures réalisées au laboratoire, l'intérêt d'utiliser le CHT pour la fonctionnalisation du PET pour une application pansement devra être démontré en le comparant au PET-CTR/CD déjà utilisé dans les travaux précédents<sup>131</sup> et les travaux de thèse d'A. Martin<sup>98,99</sup>.

### **2. Produits**

Le **CTR**, la **Gpn** et le **CHT** sont fournis par Sigma Aldrich. Le CHT utilisé est de bas poids moléculaire (Lot N° SLBG1673V, 190 kDa, viscosité: 20-300 cps, soluble dans 1%<sub>v/v</sub> d'acide acétique) avec un degré de désacétylation de 75 à 85%.

Le **iodure de potassium** (KI,  $\geq 99,5\%$ ,  $M_w=166$  g/mol) et le **diiodure** (I<sub>2</sub>,  $\geq 99,8\%$ ,  $M_w=253,81$  g/mol) sont fournis par Sigma Aldrich. Un mélange d'iodure de potassium et de diiodure avec un ratio KI/I<sub>2</sub> de 2/1 est réalisé pour obtenir une solution qui sera utilisée pour le chargement d'iode sur le PET fonctionnalisé.

Le **sulfate d'argent** (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  $\geq 99,5\%$ ,  $M_w=311,80$  g/mol) est fourni par Sigma Aldrich. Une solution de sulfate d'argent à 10 g/L sera utilisée pour le chargement d'Ag sur le PET fonctionnalisé.



La **Chx base** (réf 55561-25,  $M_w=505,44$  g/mol) est fournie par INRESA. La Chx sera utilisée pour le chargement du système PEM.

Les **polymères de CHT** réticulés sont préparés afin d'évaluer leur cytocompatibilité. Une solution de CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> dans l'acide acétique à 1%<sub>V/V</sub> avec le CTR à 5%<sub>m/V</sub> est préparée dans un ballon puis concentrée à l'évaporateur rotatif (Rotavapor RII®). La solution est ensuite plongée dans un bain d'huile à 140°C sous vide pendant 15 minutes afin de permettre la réaction de réticulation. Le polymère insoluble obtenu est ensuite récupéré puis filtré par un verre fritté dont le diamètre des pores varie de 41 à 100  $\mu\text{m}$ . Le polymère est lavé à plusieurs reprises afin d'éliminer le CHT et le CTR qui n'ont pas réagi. Il est ensuite séché à 60°C pendant une journée puis réduit en poudre avec un broyeur à couteaux (Pulverisette 14®). La poudre est conservée dans un dessiccateur dans un pot opaque.

Une solution de CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> et Gpn à 0,1%<sub>m/V</sub> est préparée puis recouverte par du Parafilm® afin d'empêcher sa déshydratation puis placée à l'abri de la lumière à 25°C pendant 24 heures. Le polymère obtenu est ensuite congelé afin d'être lyophilisé à une pression de 0,080 mbar et une température de -60°C pendant 2 jours. Le polymère obtenu est grossièrement découpé puis réduit en poudre avec un broyeur à couteaux (Pulverisette 14®). La poudre est conservée dans un dessiccateur dans un pot opaque.

Les **CD** sont utilisées pour étudier la solubilité de la Chx et pour la synthèse des polymères de CD réticulés par le CTR selon la méthode décrite par B. Martel<sup>132</sup>. Les CD utilisées sont la  **$\beta$ -CD** (Roquette™,  $M_w = 1135$  g/mol, solubilité = 16 g/L), la **HP- $\beta$ -CD** (Roquette™,  $M_w = 1382,38$  g/mol, solubilité = 450 g/L, degré de substitution (DS) = 0,62), la **méthyle- $\beta$ -CD** (Roquette™,  $M_w = 1191$  g/mol, solubilité = 200 g/L, DS = 0,5), la  **$\gamma$ -CD** (Wacker™,  $M_w = 1297$  g/mol, solubilité = 232 g/L) et la **HP- $\gamma$ -CD** (Wacker™,  $M_w = 1574$  g/mol, solubilité = 800 g/L).

Les **polyCD** sont préparés afin d'étudier la solubilité de la Chx et le **polyCTR-Me $\beta$ CD** sera utilisé pour la construction du système PEM. La synthèse des polymères de CD est réalisée selon la méthode mise au point par l'équipe ISP de l'UMET<sup>132</sup>. Elle repose sur la polyestérification des CD par l'acide citrique. Un mélange de CTR, d'hypophosphite de sodium et de CD est réalisé dans les proportions 10/3/10 g dans 100 mL d'eau distillée dans un ballon. La solution est ensuite passée dans un évaporateur rotatif (Rotavapor RII®) sous-vide à 80°C afin d'évaporer la totalité de l'eau. Après refroidissement sous-vide, le ballon est placé dans un bain d'huile à 140°C sous vide pendant 30 minutes. Le polymère est ensuite resolubilisé dans 200 mL d'eau distillée sous agitation magnétique pendant 30 minutes. La solution est ensuite filtrée au verre fritté (porosité de 100  $\mu\text{m}$ ) afin d'éliminer la fraction de

polymère insoluble puis rincée avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un filtrat limpide. Le filtrat récupéré est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif puis purifié par dialyse (membrane de dialyse MWCO 6-8000, 50 mm de Ø de cellulose) avec de l'eau distillée pendant 3 jours avec un changement de l'eau tous les jours. La solution dialysée est ensuite récupérée dans un ballon puis concentrée à l'évaporateur rotatif. La solution de polymère est ensuite congelée à -20°C pendant une nuit puis lyophilisée de la même façon que le polymère de Gpn/CHT. Le polymère obtenu est ensuite réduit en poudre manuellement avec une spatule.

## **Partie 2 : Méthodes**

### **1. Fonctionnalisation des textiles**

Le procédé général de fonctionnalisation des textiles par le CHT repose sur la méthode de foulardage/exprimage, séchage puis thermofixation déjà utilisée par l'équipe Ingénierie des Systèmes Polymères (ISP) de l'Unité Matériaux Et Transformation (UMET) à Lille 1 lors de travaux précédents<sup>72, 133, 134</sup>.

Dans un premier temps, les échantillons textiles (25 x 5 cm) sont lavés au soxhlet par trois cycles avec de l'isopropanol puis rincés par trois cycles à l'eau distillée afin d'éliminer les impuretés. Après séchage à 90°C pendant 15 minutes, les échantillons sont pesés ( $m_i$ : masse initiale) avant d'être fonctionnalisés par le CHT. Deux agents réticulants ont été utilisés pour réticuler le CHT : l'acide citrique et la génipine:

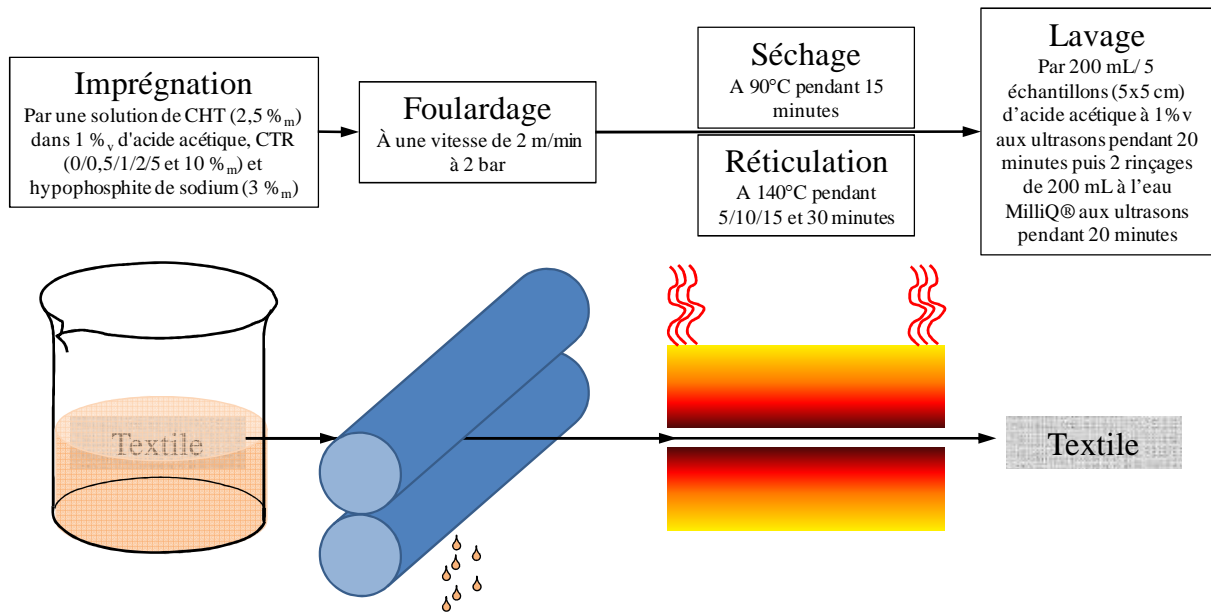
Acide citrique (CTR) : La solution d'imprégnation est préparée à une concentration de 1 ou 2,5%<sub>m/v</sub> en CHT; 0 / 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 2 / 5 et 10%<sub>m/v</sub> de CTR et 3%<sub>m/v</sub> d'hypophosphite de sodium dans l'eau ultrapure (eau MilliQ®). Les échantillons de textile sont ensuite imprégnés dans la solution à raison de 0,4 mL/cm<sup>2</sup> puis sont exprimés au foulard (Roaches™, 2 bars, 2 m/min) afin d'imprégner la totalité de l'échantillon et d'éliminer l'excès de solution. Les échantillons sont immédiatement pesés ( $m_h$ : masse humide) afin de calculer le taux d'emport selon la formule suivante:

$$\text{Taux d'emport, \%} = \frac{(m_h - m_i)}{m_i} \times 100$$

Ensuite, les échantillons sont séchés à 90°C pendant 15 minutes dans une rame de finition (Minithermo®) puis à 140°C pendant 0 ; 5 ; 10 ; 15 et 30 minutes dans une seconde rame de finition afin que la réaction de réticulation se réalise entre le CHT et le CTR. Finalement, les échantillons sont redécoupés (5 x 5 cm) puis lavés par 200 mL/5 échantillons d'acide acétique à 1% pendant 20 minutes aux ultrasons puis par deux volumes de 200 mL d'eau ultrapure pendant 20 minutes aux ultrasons. Cette étape de lavage permet d'éliminer les

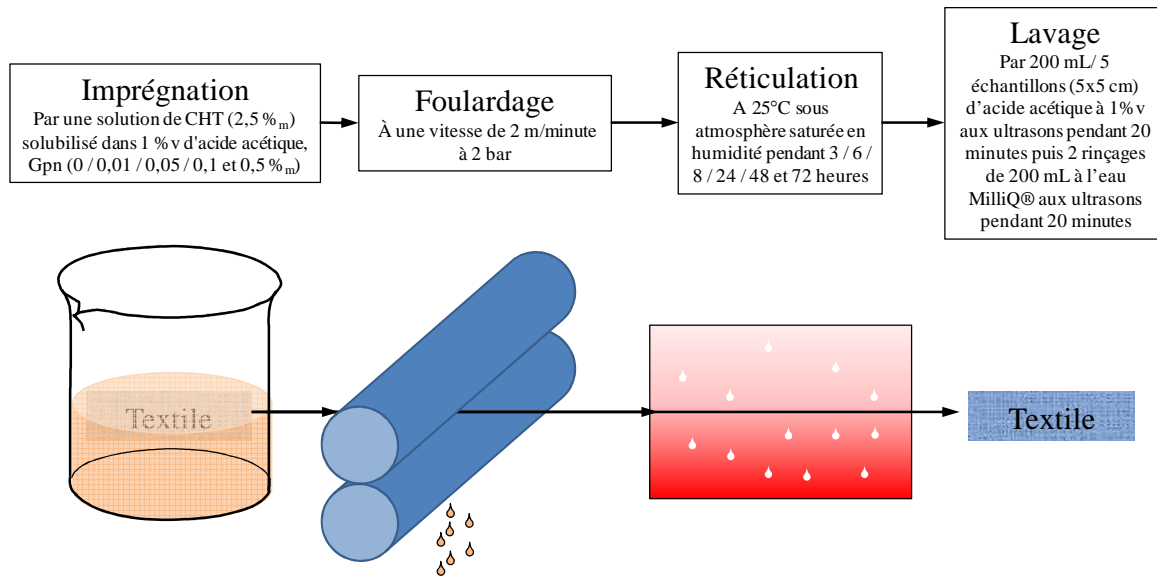
réactifs n'ayant pas réagi. Et les échantillons sont ensuite séchés à 90°C pendant 15 minutes puis pesés ( $m_f$ : masse finale) afin de calculer le gain de masse final:

$$\text{Gain de masse, \%} = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \times 100$$



**Figure 38. Procédé de fonctionnalisation du CHT avec le CTR par la méthode "Pad-Dry-Cure".**

**Génipine (Gpn) :** Une solution de CHT de 2 et 5%<sub>m/V</sub> dans l'acide acétique 1%<sub>V/V</sub> est préparée et une solution de Gpn à 0 / 0,02 / 0,01 / 0,2 et 1%<sub>m/V</sub> dans l'eau ultrapure sous agitation au vortex pendant 1 minute afin de solubiliser la totalité de la Gpn. Une fois ces solutions préparées, la solution d'imprégnation est obtenue en mélangeant un volume identique de chaque solution afin d'obtenir un volume total d'imprégnation de 0,4 mL/cm<sup>2</sup> de textile à fonctionnaliser. Le procédé de fonctionnalisation est ensuite réalisé selon la méthode décrite précédemment.



**Figure 39. Procédé de fonctionnalisation du CHT avec la Gpn par la méthode "Pad-Dry-Cure".**

En fonction de la nature, de la concentration en agent réticulant et de la concentration en CHT, les échantillons seront dénommés PET-CTR1/CHT2,5 ou PET-Gpn0,1/CHT2,5 pour ceux obtenus par la réticulation du CHT (à 2,5%<sub>m/v</sub> dans la solution d'imprégnation) avec le CTR (à 1%<sub>m/v</sub>) ou la Gpn (à 0,1%<sub>m/v</sub>) respectivement.

## 2. Activation des textiles par l'argent ou l'iode

### a. Chargement par l'argent

Les échantillons PET-CHT réticulés par le CTR à 10%<sub>m/v</sub> (Ø 11 mm) sont traités par du carbonate de sodium à 4 g/L à raison de 2,5 mL/cm<sup>2</sup> pendant 15 minutes à 200 rpm pour permettre le passage des fonctions carboxyliques (-COOH) sous leur forme carboxylate anionique (-COO<sup>-</sup>). Les échantillons sont ensuite stérilisés par un bref passage dans l'alcool absolu puis séchés à 37 °C pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite imprégnés par une solution de sulfate d'argent (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sigma Aldrich) préparée préalablement à 10 g/L en chauffant à 70°C pour solubiliser le sulfate d'argent qui est finalement filtrée avec un filtre en polyethersulfone (0,22 µm, Millex®GP) afin d'obtenir une solution stérile. L'imprégnation dans la solution d'argent est effectuée avec un rapport de bain de 2,5 mL/cm<sup>2</sup> à 37°C sous agitation à 80 rpm pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite rincés par 50 mL d'eau ultrapure aux ultrasons pendant 1 minute et à 37°C sous agitation à 80 rpm pendant 4 minutes à deux reprises.

### b. Chargement par l'iode

Les échantillons PET-CHT réticulés par le CTR 1%<sub>m/v</sub> (Ø 11 mm) sont traités par l'acide acétique à 1%<sub>m/v</sub> à raison de 2,5 mL/cm<sup>2</sup> pendant 15 minutes à 200 rpm pour permettre le passage des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) sous leur forme ionique -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Les échantillons fonctionnalisés par le CHT sont stérilisés par un bref passage dans l'alcool absolu puis séchés à 37 °C pendant une nuit. Le chargement des textiles fonctionnalisés est réalisé par un soluté iodo-ioduré. Ce soluté est préparé par co-broyage dans un mortier de 0,3 g d'iodure de potassium (KI, Sigma Aldrich) et de 0,15 g de diiode (I<sub>2</sub>, Sigma Aldrich). Un volume de 100 mL d'eau ultrapure est ajouté afin de solubiliser le mélange. Ce soluté est conservé à l'abri de la lumière dans une bouteille teintée. Afin de la stériliser, la solution d'iode est filtrée avec un filtre en polyethersulfone (0,22 µm, MillexGP®). L'imprégnation des échantillons est réalisée avec le même rapport de bain utilisé pour le chargement par l'Ag et le rinçage est réalisé de la même façon.

### 3. Construction du système polyélectrolyte multicouche

#### a. Méthode de construction

La construction du PEM a été réalisée selon les mêmes paramètres que ceux définis précédemment par A. Martin<sup>135</sup> sur le PET fonctionnalisé par le polyCTR-βCD avec des bains alternés dans une solution de polyMeCD puis dans une solution de CHT. Dans ce travail, nous avons élaboré le système PEM sur le PET-CHT qui sera dénommé PEM<sub>n</sub> où n représente le nombre de paires de couches.

Le dépôt du PEM est réalisé par l'alternance de bains successifs selon la méthode "*layer-by-layer deposition*". Cette méthode repose sur le dépôt alternatif de PE<sup>-</sup> (polyCTR-MeβCD) et de PE<sup>+</sup> (CHT) (Figure 40). Les solutions de polymère sont réutilisées avec un renouvellement de 2 mL des solutions de polymère pour un volume total de 40 mL à chaque imprégnation. L'ensemble des solutions de polymère est totalement renouvelé après le dépôt de 8 paires de couches. Les échantillons fonctionnalisés (5 x 5 cm) par le CHT sont imprégnés dans une solution (à raison de 1,6 mL/cm<sup>2</sup>) de polyCTR-MeβCD soluble (à 0,3%<sub>m/v</sub>) sous agitation à 180 rpm pendant 15 minutes à température ambiante. Après chaque étape d'imprégnation ou de rinçage, les échantillons sont séchés à 90°C pendant 15 minutes dans un four ventilé (MEMMERT®). Les échantillons sont ensuite rincés dans l'eau distillée en conservant toujours le même rapport de bain. Après séchage les échantillons sont imprégnés dans une solution de CHT (à 0,5%<sub>m/v</sub>) sous agitation à 180 rpm pendant 15 minutes à température ambiante. Une nouvelle fois, après séchage, les échantillons sont rincés dans une

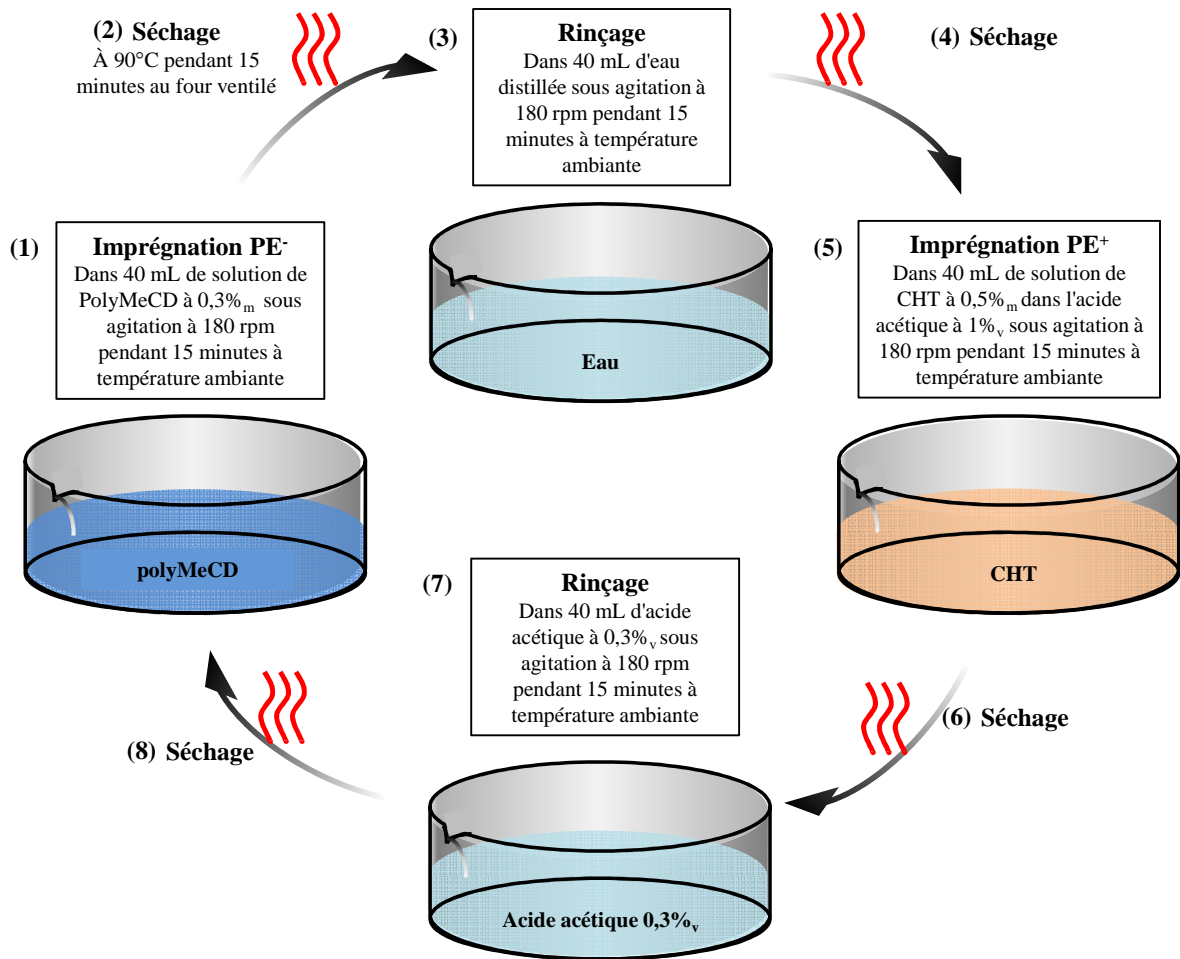
## Chapitre II : Produits, Matériels et Méthodes

solution d'acide acétique à 0,3%<sub>v</sub> sous agitation à 180 rpm pendant 15 minutes à température ambiante. Pour finir les échantillons sont séchés et ce cycle est répété autant de fois que nécessaire. À chaque fin de cycle, une paire de couches est ainsi déposée sur le textile en finissant par une couche de CHT. Trois systèmes de PEM comprenant 5,5; 7,5 et 10,5 paires de couches sont construits.

La construction du système PEM a été suivie par pesée grâce au calcul du gain de masse après le dépôt d'une paire de couches. Les résultats sont donnés en gain de masse en fonction du nombre de paires de couches par la formule suivante:

$$\text{Gain de masse (n) , \%} = \frac{(m_n - m_i)}{m_i} \times 100$$

n=le nombre de paires de couches



**Figure 40.** Étapes de la construction du PEM de (1) à (8) sur le PET fonctionnalisé par le CHT.

Les textiles enrobés par le système PEM subissent un traitement thermique, que nous dénommerons recuit, est réalisé afin d'améliorer la stabilité du système PEM. Le but de ce recuit (R) est de créer des liaisons covalentes intercouches de type amide entre les fonctions amines du CHT et les fonctions carboxyliques résiduelles réactives apportées par le CTR du polyCTR-Me $\beta$ CD. Ces liaisons devraient permettre d'augmenter la cohésion du système PEM, améliorant ainsi sa stabilité (Figure 41).

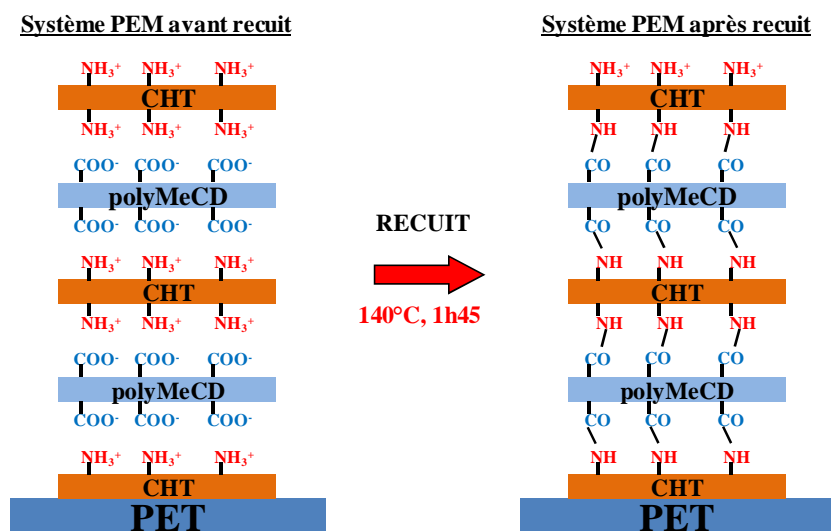


Figure 41. Schéma de la formation de liaison amide au sein du système PEM par une étape de recuit (à 140°C pendant 1h45).

b. Dégradation du système PEM

L'évolution de la dégradation du système PEM a été réalisée afin d'évaluer la stabilité du système PEM. Pour cela les échantillons ( $\varnothing$  11 mm, n=3) sont pesés ( $m_i$ ) puis plongés dans 10 mL d'une solution de PBS à 37°C à 80 rpm. Après différents temps de dégradation, les échantillons sont rincés à deux reprises par 2 mL d'eau ultrapure pour éliminer les sels adsorbés sur les textiles. Puis séchés à 90°C dans un four ventilé pendant 15 minutes. Après les avoir laissé refroidir au dessiccateur, ils sont pesés ( $m_d$ ) puis replacés à nouveau dans la solution de PBS renouvelée en totalité. Les résultats sont donnés en pourcentage de la masse restante en fonction du temps selon la formule suivante:

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

c. Chargement du système PEM par la chlorhexidine

Le chargement de la Chx est réalisé sur les échantillons enrobés par le système PEM. Les échantillons sont imprégnés dans une solution de Chx à 0,4 mg/mL avec un rapport de bain d'environ 15 mL pour 3 échantillons ( $\varnothing$  11 mm) sous agitation à 210 rpm pendant une nuit à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés dans l'eau ultrapure avec le même rapport de bain deux fois de suite dans des pots propres. Le textile est ensuite séché à 37°C pendant une journée.



#### 4. Caractérisations physico-chimique

##### a. Réaction entre le chitosane et la génipine

Une solution de CHT à 2,5%<sub>m/v</sub> dans 1%<sub>v/v</sub> d'acide acétique et une solution de Gpn à 0,1%<sub>m/v</sub> sont préparées. Ces deux solutions sont ensuite mélangées à volume identique de 500  $\mu\text{L}$  par aspiration-refoulement de la solution de Gpn dans une cuve en polystyrène (VWR®). L'évolution de l'absorbance de la solution est suivie en fonction du temps à 373 nm et 604 nm à température ambiante toutes les heures pendant 32 heures. Les résultats sont donnés en absorbance en fonction du temps de réaction.

##### b. Analyse infrarouge

Les échantillons sont analysés par IRTF et les spectres sont enregistrés avec un appareil Spectrum One (Perkin Elmer™) entre 650 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  (n=3) pour mettre en évidence la présence des fonctions amines du CHT et carboxyliques du CTR.

Un même échantillon est analysé à 6 reprises à différents points de l'échantillon afin de vérifier l'homogénéité de la fonctionnalisation c'est-à-dire de la présence des fonctions amines apportées par le CHT et la présence des fonctions carboxyliques apportées par le CTR.

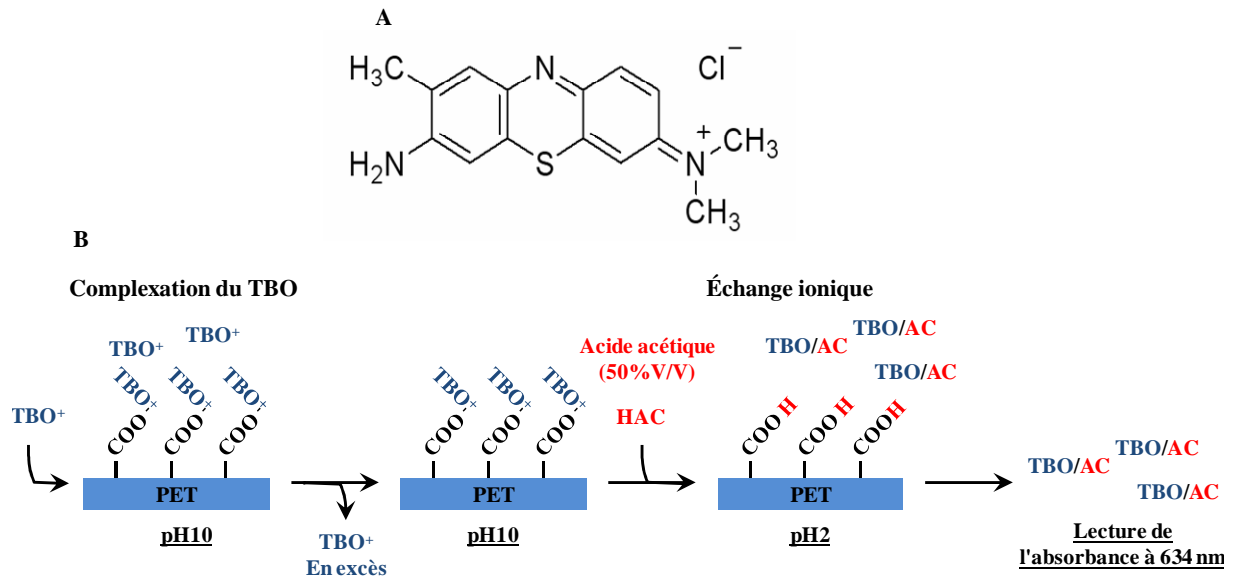
##### c. Microscopie électronique à balayage

La surface des échantillons fonctionnalisés est analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) (MEB, Hitachi S-4700 SEM FEG, Field Emission Gun) avec une tension d'accélération de 5 kV. Avant l'observation, les échantillons sont recouverts par une couche de carbone pour assurer une bonne conductivité de l'échantillon.

##### d. Quantification des groupements carboxyliques et amines

###### ▪ Quantification des groupements carboxyliques

La quantification des groupements carboxyliques libres, présents à la surface du textile, et apportés par le CTR est réalisée par un dosage indirect avec du bleu de toluidine (Figure 42.A.) (TBO, Toluidine Blue O, Mw: 305,83 g/mol,  $\approx 80\%$ ) selon le protocole décrit précédemment par l'équipe<sup>136</sup>. Le dosage fait intervenir une interaction ionique entre le TBO chargé positivement et les fonctions carboxyliques sous leur forme carboxylate à pH basique (Figure 42.B.).



*Figure 42. A. Formule chimique du TBO. B. Étapes de la quantification des fonctions carboxyliques libres par échange ionique.*

La détermination de la quantité de fonctions carboxyliques provenant du CTR est réalisée sur des échantillons textiles de 11 mm de diamètre. Une solution de TBO à  $5.10^{-4}$  M est préparée puis passée aux ultrasons pendant 15 minutes afin d'homogénéiser la solution. Après avoir ajusté le pH à 10 avec de la soude à 0,1 M et pesé les échantillons, ceux-ci sont placés dans 20 mL de la solution de TBO à pH 10 sous agitation à 200 rpm pendant 1 nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés par 2 fois 20 mL avec une solution de NaOH à  $10^{-4}$  M à pH 10 pendant 2 fois 15 minutes sous agitation à 200 rpm pour éliminer le TBO adsorbé de façon aspécifique. Pour finir, le TBO adsorbé spécifiquement sur le textile est désorbé dans 20 mL d'une solution d'acide acétique à 50%<sub>V/V</sub> à 200 rpm pendant 1 nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Une courbe d'étalonnage est préparée avec une solution de concentration en TBO à 0,02 mM dans l'acide acétique à 50%<sub>V/V</sub>. Les lectures de l'absorbance sont effectuées au spectrophotomètre UV (Shimadzu UV-1800) à 634 nm. La quantité totale de groupements carboxyliques est calculée selon la formule suivante:

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

Cette analyse est réalisée pour étudier l'évolution de la réaction entre le CHT et le CTR à différents temps (0, 5, 10, 15 et 30 minutes). L'étude de la quantité de fonctions carboxyliques en fonction de la concentration en CTR a aussi été menée par cette méthode et sur les systèmes PEM avec un nombre croissant de paires de couches. Cependant, la quantité

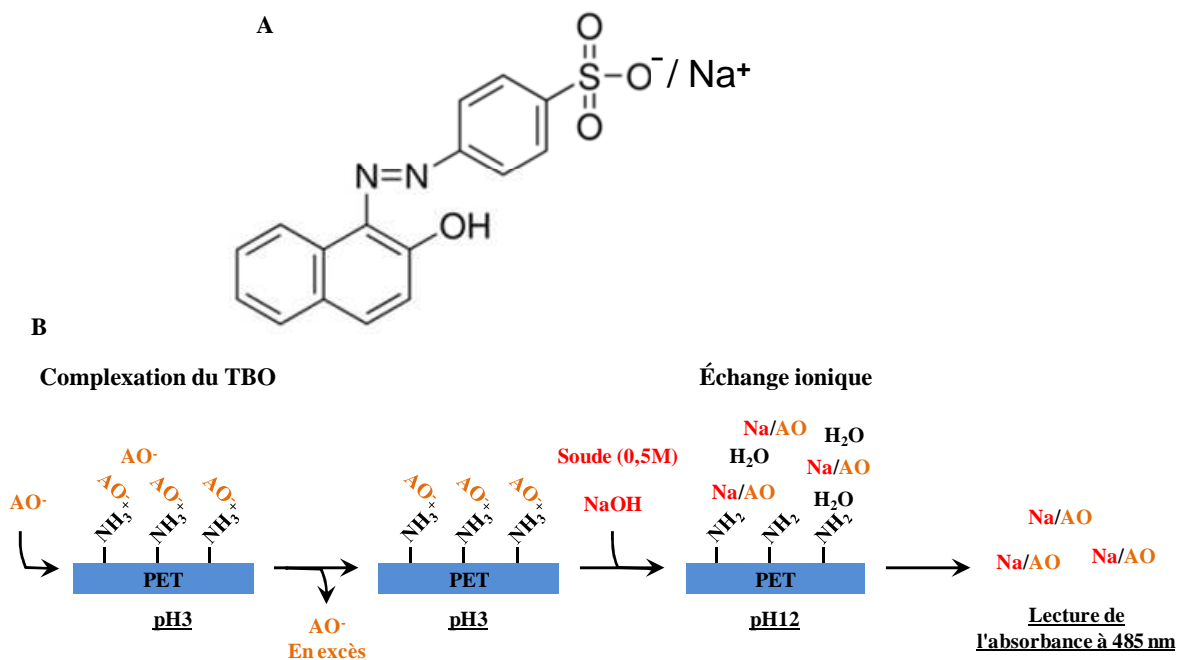
des groupements carboxyliques sur les systèmes PEM a été calculée selon la formule suivante:

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

Dans le cas des systèmes PEM, la quantité des groupements carboxylates n'est pas calculée en fonction de la masse des échantillons afin de mettre en évidence l'influence du nombre de paires de couches sur la quantité de fonctions carboxyliques.

▪ Quantification des groupements amines

La quantification des groupements amines libres apportés par le CHT greffés à la surface du textile est réalisée par un dosage indirect avec de l'acide orange ou sel de sodium d'orange II (Figure 43.A) (AO, Orange II sodium salt, Mw: 350, 32 g/mol,  $\geq 85\%$ , Sigma Aldrich™)<sup>137, 138</sup>. Le dosage fait intervenir, comme pour le TBO, une interaction ionique entre l'acide orange chargé négativement et les fonctions amines chargées positivement sous leur forme  $-\text{NH}_3^+$  à pH acide (Figure 43).



Une solution d'AO à  $2,5 \times 10^{-2}$  M est préparée dans l'eau ultrapure et ajustée à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique à 0,5 M. Chaque échantillon (11 mm de diamètre) est ensuite imprégné dans 10 mL de cette solution sous agitation à 200 rpm pendant une nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés par 2 fois 20 mL d'eau ultrapure ajustée à pH 3 avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 M sous agitation (200 rpm) pendant 5 minutes à deux reprises pour éliminer l'excès d'acide orange. La désorption de l'acide orange est réalisée dans un volume de 10 mL d'eau ultrapure dont le pH a été ajusté à pH 12 avec de la soude à 0,5 M pendant une nuit sous agitation à 200 rpm à l'abri de la lumière à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 485 nm après avoir ajusté le pH de la solution à pH 3 avec 1 mL d'acide chlorhydrique à 0,1 M afin d'obtenir une absorbance maximale à 485 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée au préalable avec une solution d'acide orange à 0,25 mM pour calculer la quantité totale de groupements amine selon la formule suivante:

$$\text{Fonctions } -\text{NH}_2, \text{ mmol/g} = \frac{\text{Absorbance} \times \text{Volume, L}}{\text{Coefficient d'extinction molaire, L} \cdot \text{mM}^{-1}} / \text{masse, g}$$

Cette analyse est réalisée pour étudier l'évolution de la réaction entre le CHT et le CTR. L'étude de la quantité de fonctions amines en fonction de la concentration en CTR et sur les systèmes PEM a aussi été menée par cette méthode. Cependant, la quantité des groupements amines sur les systèmes PEM a été calculée selon la formule suivante:

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

Dans le cas des systèmes PEM, la quantité des groupements amines n'est pas calculée en fonction de la masse des échantillons afin de mettre en évidence l'influence du nombre de paires de couches sur la quantité de fonctions amines.

e. Dosage des principes actifs

▪ Dosage de l'argent

La quantification de l'Ag a été réalisée par analyse élémentaire à Villeurbanne à Lyon par l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, UMR5280-CNRS).

Un dosage a également été mis au point durant ce projet de recherche afin de permettre la quantification de l'Ag en routine (Cf. Annexes IV).

Les échantillons ( $\emptyset$  11 mm) sont pesés ( $m_i$ ), plongés dans 5 mL de soude à 0,5 M et placés pendant 45 minutes aux ultrasons pendant une nuit sous agitation à 300 rpm. Ce traitement permet d'hydrolyser le polymère et provoque la libération de l'Ag dans la solution.

Un volume de 10 mL de polymère de Me $\beta$ CD (polyCTR-Me $\beta$ CD) à 6,25 mg/mL est ajouté à la solution puis placée sous agitation à 300 rpm toute la nuit. Le rôle du polymère est de stabiliser les ions Ag en solution. Une lecture des solutions à 400 nm est ensuite réalisée par spectroscopie UV/Visible (Shimadzu UV 1800). En parallèle, une gamme d'étalonnage d'une solution de sulfate d'argent est réalisée afin de corrélérer les absorbances aux concentrations selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'Ag, mg/g de textile} = \frac{\text{absorbance} \times \text{Volume, mL}}{\text{pente de la droite d'étalonnage, mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}} / m_i, \text{ g}$$

- Dosage de l'iode

La quantification de l'iode a été faite par une analyse élémentaire réalisée à Villeurbanne à Lyon par l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, UMR5280-CNRS).

- Dosage de la chlorhexidine

- Méthode de dosage par spectroscopie UV/Vis

La quantification de la Chx est réalisée par une lecture de l'absorbance des solutions par spectroscopie UV/Vis (Shimadzu UV-1800) à 254 nm. La concentration en Chx solubilisée est ensuite calculée à partir d'une gamme d'étalonnage ( $y=0,0518x$ ) obtenue à partir de solutions aqueuses de Chx.

- Méthode de dosage par HPLC

La quantification de la Chx chargée sur les systèmes PEM est évaluée par HPLC (Shimadzu LC-2010A-HT) selon la méthode décrite par Xue<sup>139</sup> et Kudo<sup>140</sup>. La phase mobile utilisée est un mélange acétonitrile/eau (40:60) contenant 0,05%<sub>v</sub> d'acide trifluoroacétique, 0,05%<sub>v</sub> d'acide heptafluorobutyrique et 0,1%<sub>v</sub> de triéthylamine. La phase mobile est pompée avec un débit de 1 mL/min dans une colonne Capcell pak® C18-MG (4,6 x 25 mm) maintenue à 40°C. Le volume d'injection est fixé à 10  $\mu$ L. Les lectures sont réalisées à 260 nm. Une gamme de concentration croissante en Chx est réalisée à partir d'une solution de Chx à 60  $\mu$ g/mL dans la soude à 0,5 M puis ajustée à pH 4 avec de l'acide acétique à 50%<sub>v</sub> afin de solubiliser la Chx. L'utilisation de la soude s'explique par la méthode de désorption de la Chx chargée sur les systèmes PEM. Après avoir filtré les solutions (filtre en PVDF de 0,2  $\mu$ m), une courbe de calibration rapportant l'aire du pic de rétention, correspondant à la Chx, à 6-7 minutes (en Unité Arbitraire, UA) est tracée en fonction de la concentration en Chx. La quantité de Chx sur les échantillons est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Quantité de Chx } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Aire du pic de la Chx (UA)}}{\text{Coefficient linéaire } (\mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL})} \times \text{Volume (mL)}$$

### - Diagramme de solubilité de la chlorhexidine

Le diagramme de solubilité (diagramme d'Higuchi<sup>141</sup>) de la Chx est réalisé afin de définir le polymère de CD le plus efficace pour solubiliser la Chx, composé lipophile. Le diagramme de solubilité a été réalisé avec différentes CD (HP- $\beta$ -CD, Méthyle- $\beta$ -CD (Me $\beta$ CD),  $\gamma$ -CD,  $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD), la maltodextrine (MD) et leurs polymères synthétisés avec le CTR décrits précédemment. Un volume de 4 mL de chaque solution aqueuse de CD ou polyCD (0; 5; 10; 20; 35; 50 et 100 mg/mL) est ajouté à  $100 \pm 1$  mg de Chx pour obtenir une concentration maximale théorique en Chx de 25 mg/mL. Les solutions sont ensuite vortexées pendant 30 secondes afin d'homogénéiser le mélange puis placées sous agitation à 210 rpm à température ambiante pendant une journée. Afin de récupérer la fraction soluble de Chx, chaque solution est filtrée avec un filtre cellulose de 0,45  $\mu$ m. La quantification de la Chx solubilisée est réalisée par spectrophotométrie UV/Vis. La ligne de base est réalisée avec une solution de CD ou de polymère à la même concentration que le complexe.

### - Quantification de la chlorhexidine chargée sur les systèmes PEM

Les échantillons chargés par la Chx sont plongés dans une solution de soude à 0,5 M puis passés aux ultrasons pendant 1 heure. Ils sont ensuite agités à 300 rpm pendant une nuit à température ambiante. Ils sont repassés aux ultrasons pendant 1 heure puis séchés à 90°C pendant 15 minutes. La quantification de la Chx est ensuite réalisée par HPLC.

### - Cinétique de libération de la Chx

La cinétique de libération de la Chx chargée sur le PEM est réalisée dans le PBS. Les échantillons ( $\emptyset$  11 mm) ayant un nombre de paires de couches 5,5; 7,5 et 10,5 traités thermiquement ou non et chargés ou non par la Chx ont été testés. Après avoir stérilisé les échantillons par un bref passage dans l'alcool absolu, les échantillons ont été déposés au fond d'une plaque 24 puits (CytoOne®). Un volume de 1 mL de PBS stérile est ajouté dans chaque puits et la plaque est placée à 37°C sous agitation pendant différents temps de libération (30 minutes, 1, 2, 3, 4 et 6 heures, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 30, 37, 41 et 51 jours). À chaque temps, le milieu est prélevé en totalité puis renouvelé par du milieu frais. Les prélèvements sont évalués par un test microbiologique décrit en 7.c. et par un dosage HPLC de la quantité de Chx libérée en utilisant la méthode décrite précédemment. La quantité de Chx libérée à chaque temps est calculée grâce à une droite de calibration réalisée dans le PBS à partir d'une concentration en Chx de 60  $\mu$ g/mL. Les résultats sont exprimés en quantité et en pourcentage de Chx cumulée en fonction du temps selon les formules suivantes:

$$\text{Quantité de Chx libérée au temps } t, \mu\text{g} = \frac{\text{Aire du pic de la Chx, UA}}{\text{Pente, } \mu\text{g/mL}} \times \text{Volume, mL}$$

$$\text{Quantité de Chx libérée au temps } t, \% = \frac{\text{Quantité de Chx libérée au temps } t, \mu\text{g}}{\text{Quantité totale chargée sur le textile, } \mu\text{g}} \times 100$$

### 5. Évaluation biologique *in vitro*

Les évaluations biologiques sont effectuées sur des cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain : lignée L132 (ATCC-CCL 5) en accord avec la norme ISO/EN 10993-5 standard<sup>142, 143</sup>. Ces cellules présentent la particularité de réagir sensiblement à la cytotoxicité, et surtout de former des clones avec des coefficients de clonage élevés (37 à 40%)<sup>144</sup>. Le choix de cette lignée cellulaire, L132 s'explique par la bonne reproductibilité de la lignée et de sa sensibilité en cas de toxicité d'un composé. Une flasque de 25 cm<sup>2</sup> (T25 Nunclon<sup>TM</sup> surface) estensemencée avec 3×10<sup>5</sup> cellules dans 5 mL de milieu minimum essentiel (MEM, Gibco®) supplémenté à 10%<sub>V/V</sub> de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules sont incubées pendant 3 jours à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Après 3 jours, la flasque (T25, 25 cm<sup>2</sup>) est vidée du milieu puis rincée par une solution tampon saline de Hank (HBSS) pour éliminer les traces de milieu contenant des protéases. Les cellules sont ensuite traitées par la trypsine (0,05%<sub>m/V</sub>) pendant 8 minutes à température ambiante afin de les détacher du support. Après avoir récupéré l'ensemble de la suspension cellulaire, du milieu de culture (MEM à 10%<sub>V/V</sub> de SVF) est ajouté pour neutraliser l'action de la trypsine grâce à la présence de protéases dans le milieu. La numération cellulaire est ensuite effectuée afin de déterminer le nombre de cellules par millilitre de milieu. Un volume correspondant à 300 000 cellules estensemencé dans une nouvelle flasque afin de conserver des cellules en culture. Les cellules sont ensuite replacées à l'étuve à 37 °C à 5% CO<sub>2</sub>. Une dilution est effectuée avec la suspension cellulaire restante afin d'obtenir une concentration de 10<sup>4</sup> cellules/mL pour le test de viabilité, et une concentration de 70 000 cellules/mL pour le test de prolifération et de vitalité cellulaire.

#### a. Évaluation de la cytocompatibilité des polymères

Les polymères de CTR/CHT et Gpn/CHT obtenus en **Partie 1. 2.** sont stérilisés aux UV pendant 15 minutes. Une suspension du polymère est réalisée à la concentration de 2 mg/mL dans le milieu essentiel minimum (MEM) de culture d'Eagle (Gibco®, gentamicine ; 50 μg/mL et SVF à 10%<sub>V/V</sub>), préparé au préalable. Une gamme de concentration en polymère (0, 25, 50, 100, 200 et 400 μg/mL) est effectuée avec cette solution stock de polymère. Puis, un volume correspondant à 900 cellules de la suspension cellulaire est ajouté avec du milieu.

Le mélange est ensuite réparti dans trois boîtes de Pétri (Ø 6 cm) (Nunc™) puis incubé à 37°C (5% CO<sub>2</sub>) pendant 9 jours. Après avoir ôté le milieu de culture, les clones sont colorés au cristal violet (0,2%<sub>m/v</sub>) pendant 5 minutes puis lavés à l'eau distillée. Les clones sont ensuite comptés après séchage. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules sans polymère, dont le pourcentage détermine un taux de survie relatif de 100%. L'expérience a été répétée deux fois avec des cellules L-132 pour le polymère CTR/CHT et Gpn/CHT.

b. Évaluation de la cytocompatibilité des textiles fonctionnalisés

Après avoir stérilisé les échantillons (15 mm de diamètre) par un bref passage dans l'alcool absolu et séché à 37°C pendant une nuit, les pastilles sont placées au fond d'une plaque 24-puits (Costar®). Des anneaux en Viton® sont insérés au-dessus pour maintenir les échantillons au fond des puits et ainsi éviter que les cellules prolifèrent en-dessous des échantillons. Après avoir ajouté 900 µL de MEM-10%<sub>v/v</sub> SVF, les cellules sont délicatement ensemencées dans chaque puits avec une densité cellulaire de 3500 cellules/cm<sup>2</sup>. Un contrôle, "tissue culture polystyrene" (TCPS), est réalisé avec des puits ensemencés sans échantillons. La vitalité cellulaire est évaluée après 3 et 6 jours d'incubation avec un renouvellement du milieu de culture. Le milieu de culture est retiré des puits et 0,5 et 1 mL de milieu de culture contenant du bleu Alamar à 10%<sub>v/v</sub> (AlamarBlue®), est ajouté dans chaque puits. Après incubation à 37°C pendant 2 heures, le milieu contenant le colorant est transféré dans une plaque 96-puits et la fluorescence est mesurée au fluorimètre (Twinkle LB970™) à 560 nm. Le taux de vitalité est exprimé en pourcentage de la moyenne de la fluorescence mesurée pour les échantillons d'un même groupe selon la formule suivante:

$$\text{Taux de vitalité, \%} = \frac{(\text{fluorescence échantillon} - \text{fluorescence de base})}{\text{fluorescence TCPS}} \times 100$$

**6. Évaluation microbiologique *in vitro***

Une culture de *Staphylococcus aureus* (CIP224) ou d'*Escherichia coli* (K12) est réalisée par ensemencement d'une gélose en pente Mueller-Hinton Agar (MHA) pendant une journée à 37°C. Les bactéries sont ensuite décrochées de la gélose à l'aide d'une pipette pasteur fermée dans 10 mL de milieu Ringer cystéiné (RC). Cette suspension constitue la suspension bactérienne stock à environ 1×10<sup>9</sup> UFC/mL et sera utilisée pour l'ensemble de l'évaluation microbiologique.



a. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination de la CMI est réalisée afin d'évaluer l'efficacité inhibitrice de l'Ag<sup>+</sup>, de l'iode ou de la Chx sur la prolifération bactérienne. Les mêmes souches de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été utilisées pour cette évaluation.

Une dilution en série (au ½) est réalisée avec le milieu de culture MH directement dans une plaque 96 puits (Iwaki®) à partir de la solution mère de sulfate d'argent (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 2,5 g/L, d'iode (I<sub>2</sub>) à 1,5 g/L ou de Chx à 0,4 mg/L. Une suspension bactérienne à 1×10<sup>4</sup> UFC/mL est préparée par dilution dans du milieu RC à partir de la suspension bactérienne stock. Un volume de 100 µL est ensuite ajouté et mélangé avec les différentes dilutions préparées dans la plaque 96 puits. Les bactéries sont incubées à 37°C pendant 24 et 48 heures. La détermination de la CMI est définie pour le puits contenant la solution à évaluer la plus diluée et ne présentant aucune turbidité du milieu. Afin de déterminer l'activité bactériostatique ou bactéricide sur ces bactéries, 100 µL du milieu à la concentration de la CMI et les cupules adjacentes avec des concentrations supérieures à la CMI ont étéensemencés sur une gélose MHA incubée à 37°C pendant 24 heures. Dans le cas d'un effet bactéricide, aucune bactérie ne devrait se développer alors que dans le cas d'un effet bactériostatique, les bactéries viables devraient proliférer. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme la concentration minimale bactéricide donc la concentration de la cupule ne présentant pas de subculture.

b. Cinétique de la réduction bactérienne: Kill-time

Cette évaluation est réalisée pour évaluer l'efficacité bactéricide des supports chargés par l'Ag, l'iode ou la Chx. Les mêmes souches de *S. aureus* et d'*E. coli* ont été utilisées pour cette évaluation.

Une suspension bactérienne à 1×10<sup>7</sup> UFC/mL est préparée dans du milieu RC à partir de la suspension bactérienne stock. Un volume de 200 µL de la suspension est déposé sur les échantillons disposés au fond d'une plaque 24 puits (CytoOne®). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant différents temps d'incubation (30 minutes, 2, 4, 6, et 24 heures). Après chaque temps d'incubation, les échantillons sont récupérés dans 2 mL de PBS puis passés aux ultrasons pendant 1 minute puis vortexés pendant 30 secondes afin de décrocher les bactéries adhérentes. La suspension obtenue, solution mère, est diluée successivement au 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à 10<sup>-4</sup>. Un volume de 100 µL de chaque dilution et de la solution mère est ensuiteensemencé sur une gélose MHA puis incubé à 37°C pendant 24 heures. Un

dénombrement est ensuite effectué afin de calculer la concentration bactérienne selon la formule suivante:

$$\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL} = \text{Log}_{10} (n \times 10 \times 10^d)$$

n=nombre de colonies ( $15 < n < 150$ )

d=dilution

Les résultats sont exprimés en  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL en fonction du temps.

c. Diamètre de la zone d'inhibition : Antibiogramme

Ce test est réalisé afin d'étudier la durée de l'activité antibactérienne des supports chargés par la Chx. Cette évaluation est réalisée sur la souche de *S. aureus*.

Pour effectuer la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, une suspension bactérienne à  $1 \times 10^5$  UFC/mL est préparée dans du milieu RC à partir de la suspension bactérienne stock. Des boîtes de Pétri sont préparées avec 18 mL de milieu MHA. Après avoirensemencé 100  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne sur la gélose solidifiée, des puits de 6 mm de diamètre (définissant la limite de détection) sont réalisés directement dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur. L'ensemble des prélèvements correspondant au milieu de libération à différents temps obtenus en e sont ensuite déposés à raison de 50  $\mu\text{L}$  par puits en triplicata. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition est réalisée après incubation à 37°C pendant une journée. Les résultats sont exprimés en millimètre en fonction du temps de libération.

## **Chapitre III: Résultats**

## **Partie 1: Fonctionnalisation et activation antibactérienne du textile**

La première partie de ce travail a été consacrée à la fonctionnalisation du textile (structure en 3 dimensions) en polyester (PET) par le CHT. L'objectif de cette fonctionnalisation étant de contrôler la nature et la densité des charges présentes à la surface du textile pour l'activer ensuite avec l'iode ou l'argent. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence des paramètres opératoires sur la fonctionnalisation du PET par le CHT. Pour cela nous avons étudié l'influence du temps de réaction et de la concentration des réactifs sur la réticulation du CHT par le CTR d'une part, et par la Gpn d'autre part. Après avoir caractérisé le support et validé sa cytocompatibilité, nous avons dans un second temps chargé les différents textiles fonctionnalisés par le CHT avec l'Ag et l'iode et nous avons évalué leur activité antibactérienne *in vitro*.

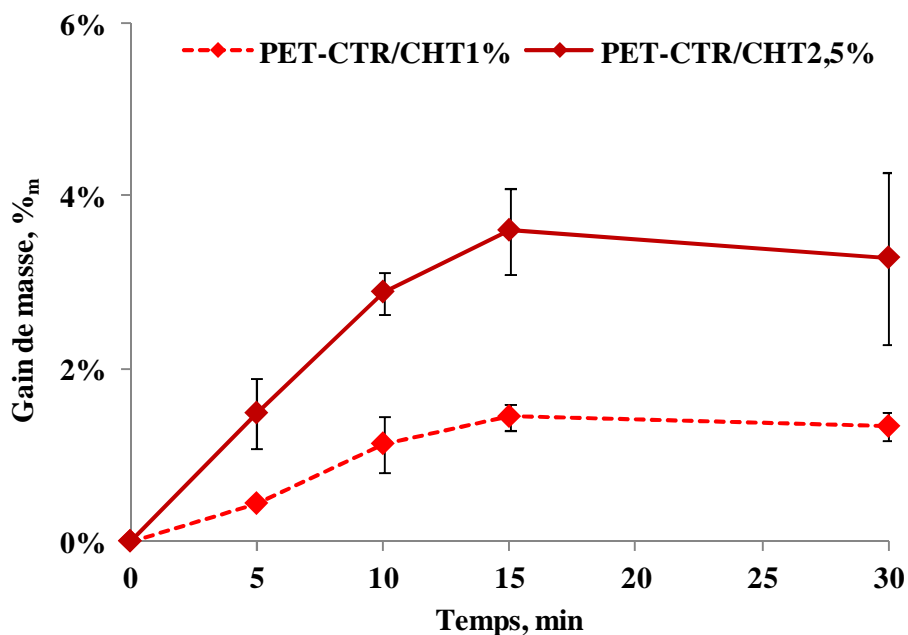
### **1. Fonctionnalisation du textile par le CHT**

#### a. Réticulation du CHT par le CTR

- *Influence de la concentration en CHT*

L'évolution de la réaction de réticulation entre le CHT et le CTR en fonction du temps de réaction a été étudiée, tout d'abord, par gravimétrie afin d'évaluer la prise de masse du PET après lavage, puis par dosage des fonctions réactives libres pour évaluer la nature et la densité de charges en surface.

L'étude du temps de réticulation par le CTR par gravimétrie (Figure 44) montre une augmentation du gain de masse jusqu'à 15 minutes puis une stabilisation de ce dernier avec une concentration en CTR de 5%<sub>m/v</sub> quel que soit la concentration en CHT (1%<sub>m/v</sub> et 2.5%<sub>m/v</sub>). Cependant, on remarque que le gain de masse après 15 minutes de réticulation est deux fois plus important avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/v</sub> par rapport à une concentration en CHT de 1%<sub>m/v</sub> avec un gain de masse respectif de 3,3%<sub>m</sub> et 1,3%<sub>m</sub>. La prise de masse du PET est donc directement dépendante de la concentration de la solution en CHT.



**Figure 44.** Évolution du gain de masse du PET en fonction du temps de réaction et de la concentration en CHT dans la solution d'imprégnation (1%<sub>m/V</sub> et 2,5%<sub>m/V</sub>). La concentration en CTR est fixée à 5%<sub>m/V</sub>.

D'après ces premiers résultats, nous avons donc fixé un temps de réaction de 15 minutes. Au-delà de 2,5%<sub>m/V</sub>, la solution de CHT est trop visqueuse pour pouvoir imprégner de façon homogène le textile. C'est la raison pour laquelle la suite de notre étude sera réalisée avec une concentration maximale en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>.

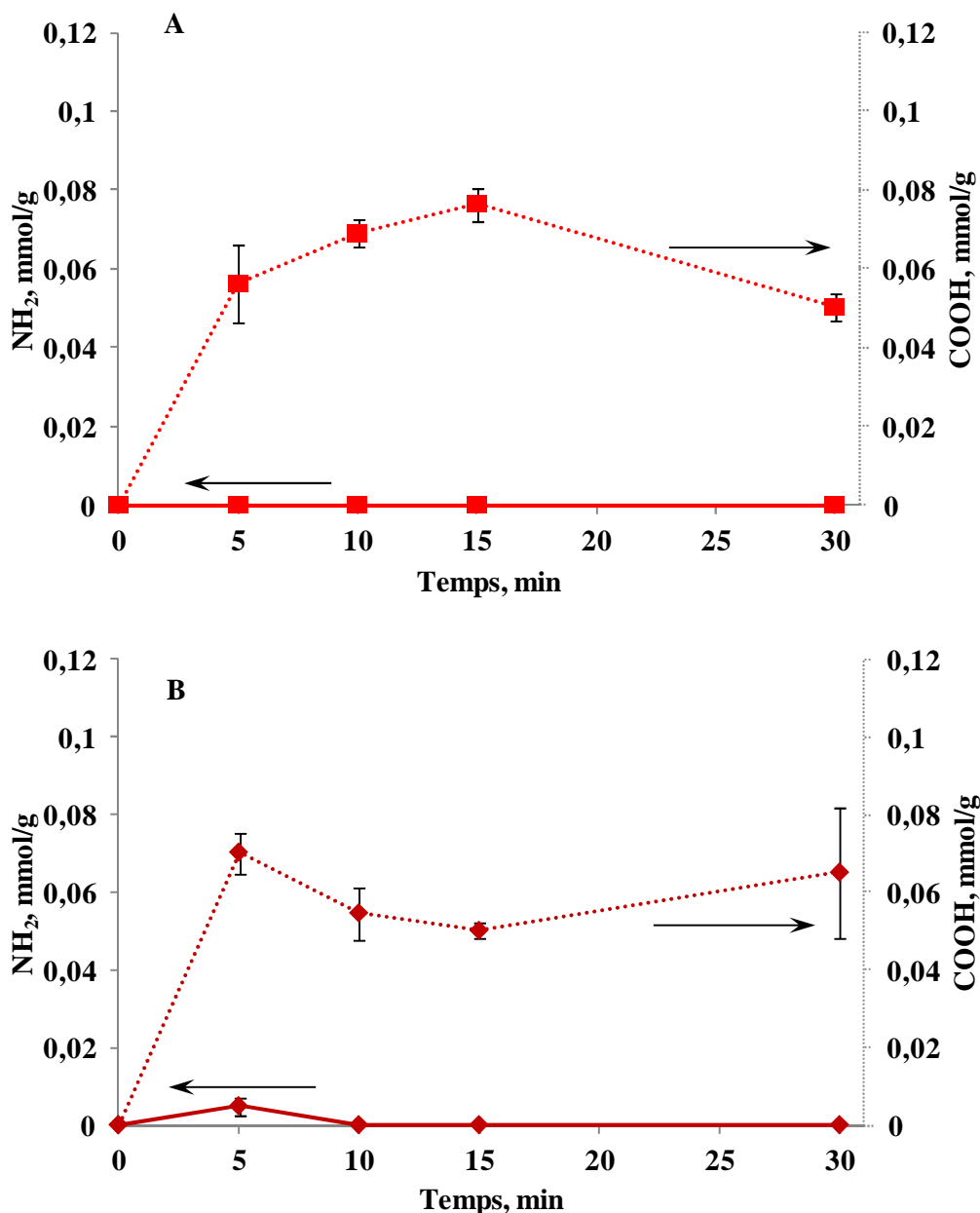
Nous avons ensuite étudié la quantité de fonctions réactives libres présentes sur les textiles fonctionnalisés pour compléter la méthode gravimétrique précédente. Cette étude permettra d'évaluer l'influence du temps de réaction sur la densité des groupements chimiques libres présents à la surface du textile à savoir les fonctions amines et acides carboxyliques. Pour cela, la quantification des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) apportées par le CHT et des fonctions carboxyliques (-COOH) apportées par le CTR a été réalisée à différents temps de réaction (Figure 45).

Avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/V</sub>, une densité maximale en fonctions carboxyliques de 0,08 mmol/g est atteinte après 15 minutes de réticulation allant dans le même sens que l'étude gravimétrique. Cette densité diminue à une valeur de 0,05 mmol/g après 30 minutes de réaction. Cette diminution de la densité de fonctions carboxyliques peut s'expliquer par la réaction entre les fonctions carboxyliques du CTR avec les groupements hydroxyles du CHT, lorsque toutes les fonctions amines ont été consommées. Par contre, quel

que soit le temps de réaction, aucune fonction amine n'est détectée (dans la limite de détection). Cela peut s'expliquer par la consommation rapide des fonctions amines par le CTR en large excès.

Avec une concentration de 2,5%<sub>m/V</sub> en CHT, la densité de fonctions carboxyliques atteint la valeur maximale de 0,07 mmol/g après 5 minutes de réaction. La densité de fonctions carboxyliques se stabilise ensuite à une valeur comprise entre 0,05 mmol/g et 0,07 mmol/g. La densité de fonctions amines atteint une valeur de 0,005 mmol/g après 5 minutes de réaction puis diminue en dessous de la limite de détection au-delà de 10 minutes de réaction. La présence de fonctions amines après 5 minutes de réaction peut s'expliquer par le fait que la consommation des amines par le CTR n'est pas terminée. Par rapport à une concentration en CHT de 1%<sub>m/V</sub>, la quantité de fonctions amines apportée par le CHT est, en effet, 2,5 fois plus importante. Le calcul du rapport molaire (Rm): -COOH/-NH<sub>2</sub>, dans la solution d'imprégnation confirme cela, car, pour une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>, le Rm est de 4 alors qu'avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/V</sub>, le Rm est de 11 (Cf. annexes II).

Quel que soit la concentration en CHT, pour une concentration fixe de CTR, le processus de fonctionnalisation est le même avec une réaction entre les fonctions amines du CHT et les fonctions carboxyliques du CTR. Ceci provoque une augmentation de la densité de fonctions acides carboxyliques et amines les premières minutes allant dans le même sens que l'évolution du gain de masse. Ce phénomène se voit particulièrement bien avec la concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>. Lorsque le gain de masse du textile se stabilise, la réaction se poursuit avec la consommation des fonctions hydroxyles du CHT par les fonctions carboxyliques. Ceci se voit particulièrement bien avec la concentration en CHT de 1%<sub>m/V</sub>



*Figure 45. Évolution de la densité de fonctions amines et carboxyliques sur les textiles fonctionnalisés par le CHT (1%<sub>m/v</sub> : A ou 2,5%<sub>m/v</sub> : B) en fonction du temps de réticulation (à 140°C). La quantité de CTR dans la solution d'imprégnation a été fixée à 5%<sub>m/v</sub>.*

L'étude de l'influence de la concentration en CHT et du temps de réaction sur la fonctionnalisation du PET permet de souligner l'influence de la concentration en CHT sur le gain de masse mais peu sur la nature et la densité de charges présentes sur le textile. En effet, avec le CTR (5%<sub>m/v</sub>), une densité de 0,07 mmol/g de fonctions carboxyliques est atteinte quel que soit la concentration en CHT. De plus, la quantité de fonctions amines présente sur le textile est négligeable même avec la plus forte concentration en CHT (2,5%<sub>m/v</sub>). La concentration en CTR (5%<sub>m/v</sub>) est probablement trop importante et consomme rapidement les

fonctions amines du CHT. Pour la suite de l'étude, nous avons donc évalué l'influence de la concentration en CTR sur la fonctionnalisation du PET par le CHT. Afin d'obtenir des fonctions amines en surface, nous avons poursuivi l'étude avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>.

- *Influence de la concentration en CTR*

L'évolution du gain de masse du textile fonctionnalisé par le CHT (2,5%<sub>m/V</sub>) en fonction de la concentration en CTR a été étudiée à 140°C pendant 15 minutes (Figure 46.A.). Parallèlement, la quantification des fonctions amines et acide carboxyliques a été réalisée (Figure 46.B.).

La Figure 48.A. montre une augmentation du gain de masse du textile en deux temps. En effet, jusqu'à une concentration de 2%<sub>m/V</sub> de CTR, le gain de masse évolue rapidement dû au greffage du CHT sur le textile. Au-delà de cette concentration en CTR, le gain de masse du textile continue d'augmenter mais de manière moins importante. La concentration en CHT restant inchangée, cette augmentation du gain de masse est probablement due au greffage du CTR en large excès sur le CHT aboutissant à la formation de liaison esters comme cela a été démontré par une analyse infrarouge sur un textile à base de polypropylène (Cf. annexes III).

La figure 48.B. montre que la quantité de fonctions amines évolue de façon importante jusqu'à une concentration de 1%<sub>m/V</sub> de CTR (0,06 mmol/g) puis décroît. À partir d'une concentration en CTR de 5%<sub>m/V</sub>, la quantité d'amine devient négligeable.

D'autre part, la quantité de fonctions carboxyliques augmente légèrement pour des concentrations en CTR comprises entre 0 et 1%<sub>m/V</sub>. Cela peut s'expliquer par la quantité de fonctions amines, apportées par le CHT dans la solution d'imprégnation, en excès par rapport à la quantité de fonctions carboxyliques. En effet le Rm entre 0 et 1%<sub>m/V</sub> en CTR est inférieur à 1, ce qui veut donc dire que les groupements carboxyliques présents dans la solution d'imprégnation réagissent rapidement avec les amines du CHT. Seule une des 3 fonctions carboxyliques du CTR reste libre.

Au-delà d'une concentration de 1%<sub>m/V</sub> en CTR, le Rm est supérieur à 1. Autrement dit la quantité de fonctions carboxyliques est en excès par rapport à la quantité de fonctions amines. Ceci explique l'augmentation importante de la quantité de fonctions carboxyliques sur le textile entre 1 et 2%<sub>m/V</sub> en CTR. Les fonctions acides résiduelles sont plus nombreuses car le CTR est en excès.

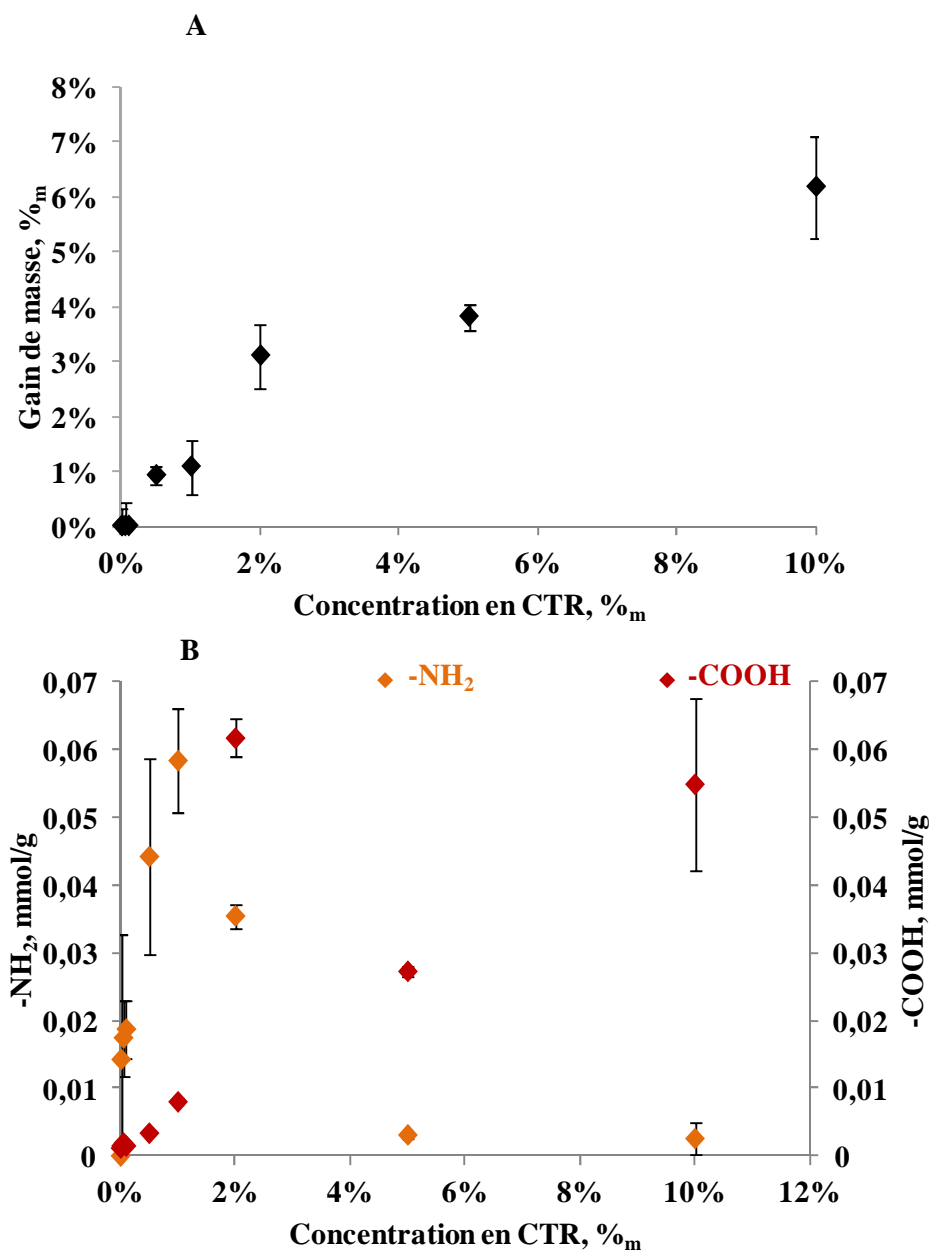


### Chapitre III: Résultats

Au-delà d'une concentration de 5%<sub>m/v</sub> en CTR, la densité de fonctions carboxyliques sur le textile est 2 fois moins importante qu'avec 2%<sub>m/v</sub> de CTR. Toutes les fonctions amines du CHT ayant réagi avec le CTR, les fonctions acides résiduelles et réactives du CTR déjà liées peuvent ainsi réagir avec les groupements hydroxyles du CHT disponibles.

La densité de fonctions carboxyliques augmente continuellement avec l'augmentation de la concentration de CTR jusqu'à 0,055 mmol/g. Ce qui s'explique toujours par la présence importante de CTR ( $R_m = 8,7$ ) et donc une réaction avec les fonctions hydroxyles du CHT.

Les résultats obtenus pour le dosage des fonctions chimiques est en corrélation avec l'étude gravimétrique. En effet, entre 0 et 2%, le gain de masse augmente et le CTR consomme toutes les fonctions amines disponibles du CHT. Ceci se traduit par une densité de fonctions amines majoritaires pour les faibles concentrations en CTR ( $< 1\%_{m/v}$ ) et de fonctions carboxyliques majoritaires pour les fortes concentrations en CTR ( $> 1\%_{m/v}$ ). Le gain de masse n'évolue plus de manière aussi importante car les fonctions amines du CHT ont été consommées. L'augmentation est due à la réaction entre le CTR en excès et les fonctions amines résiduelles du CHT puis avec les fonctions hydroxyles, confirmée par le dosage des fonctions amines (quasiment nulle au-delà de 5%<sub>m/v</sub> de CTR) et carboxyliques (augmentation au-delà de 5%<sub>m/v</sub> de CTR)



**Figure 46.** A. Gains de masse en fonction de la concentration en CTR dans la solution d'imprégnation. B. Quantité de groupement amine et acide sur le PET-CTR/CHT en fonction de la concentration en CTR dans la solution d'imprégnation. La concentration en CHT est fixée à 2,5%<sub>m/V</sub> et le temps de réaction à 15 minutes.

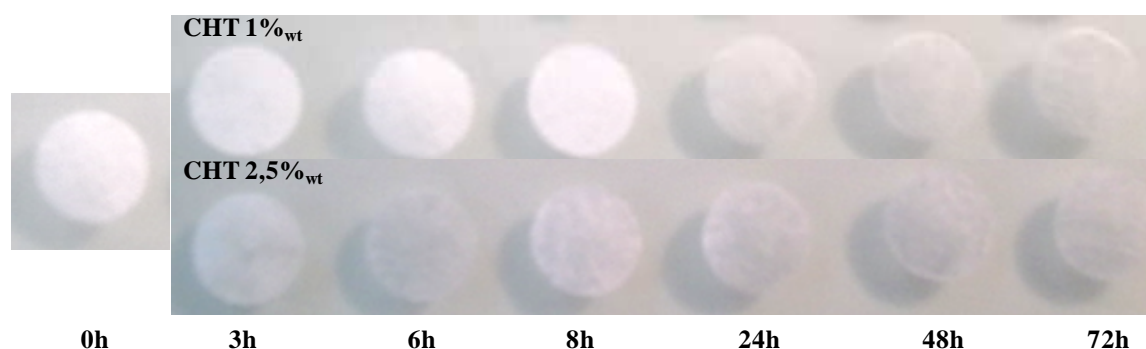
L'étude de l'influence de la concentration en CTR rapporte que celle-ci permet de contrôler la nature et la densité des charges présentes sur le PET. Ainsi une concentration de 1%<sub>m/V</sub> en CTR permet d'obtenir un textile riche en fonctions cationiques ( $-\text{NH}_3^+$ ) et entre 5 et 10%<sub>m/V</sub> un textile riche en fonctions anioniques ( $-\text{COO}^-$ ). Ce système modulé par la concentration en CTR permet ainsi d'obtenir un système chargé soit positivement soit négativement. Le Rm déterminé à partir de la quantité de fonctions carboxyliques réactives du CTR par rapport à la quantité de fonctions amines est égal à 1 avec une concentration en CTR

de 1%<sub>m/V</sub> et une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>. À cette concentration, la quantité de fonctions carboxyliques présentes dans la solution d'imprégnation est identique à la quantité de fonctions amines.

b. Réticulation du CHT par la Gpn

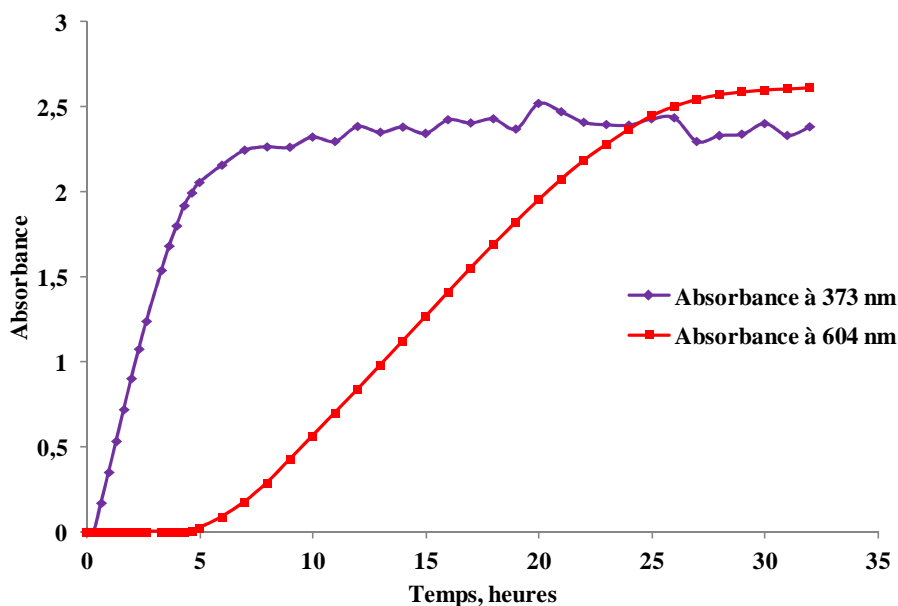
▪ *Influence de la concentration en CHT*

La réaction de réticulation du CHT par la Gpn aboutit progressivement à la coloration du textile en bleu (Figure 47). Cette coloration apparaît de façon homogène sur le textile. La concentration en CHT influence le temps d'apparition de la coloration. En effet celle-ci apparaît dès 3 heures de réaction avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub> alors qu'elle n'apparaît qu'après 24 heures avec une concentration de 1%<sub>m/V</sub> avec une concentration de Gpn de 0,1%<sub>m/V</sub>. Cette différence peut s'expliquer par l'apport de fonctions amines, dans la solution de réaction, proportionnel à la concentration en CHT. À une concentration donnée en Gpn, des quantités croissantes en CHT accélèrent la réaction de réticulation de la Gpn avec les fonctions amines de plus en plus présentes ce qui explique la différence observée.



**Figure 47. Photographie des échantillons de PET (b) avec du CHT (1%<sub>m/V</sub> et 2,5%<sub>m/V</sub>) réticulé par 0,1%<sub>m/V</sub> Gpn à 25°C pendant 3, 6, 8, 24, 48 et 72 heures.**

Le suivi de la cinétique de réaction entre la Gpn et le CHT réalisé par spectrophotométrie UV (Figure 48) montre une réaction de réticulation impliquant deux mécanismes réactionnels; une réaction rapide qui se produit dès le début, et, une réaction lente qui se produit progressivement et avec un retard d'environ 5 heures par rapport à la première réaction. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans les travaux de Butler<sup>86</sup>. On constate qu'à partir de 5 heures la première réaction semble se stabiliser. Cependant il faut noter qu'à partir de 5 heures, le signal sature, ce qui ne permet pas de suivre la réaction jusqu'au bout. En revanche, la seconde réaction semblerait se stabiliser à partir de 25 heures. Cependant, il est également possible, au regard de la valeur de l'absorbance, qu'un phénomène de saturation soit observé après 25 heures.

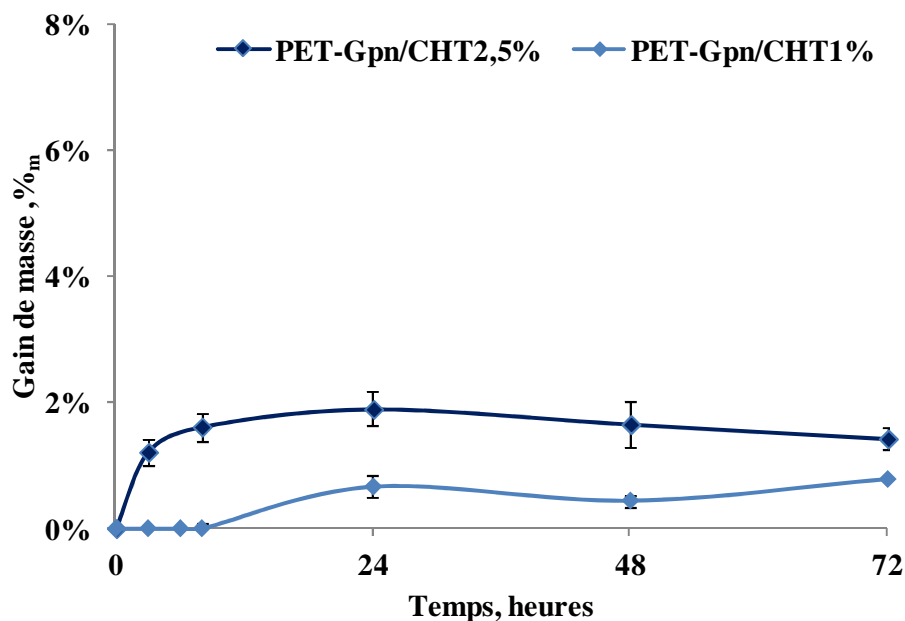


**Figure 48.** Cinétique de la réaction de réticulation par spectroscopie UV à 373 nm et 604 nm d'une solution de CHT (1,25%<sub>m/V</sub>) et de Gpn (0,05%<sub>m/V</sub>) à 25°C sous atmosphère saturée en humidité.

La Figure 49 montre l'évolution du gain de masse du textile fonctionnalisé avec le CHT (1%<sub>m/V</sub> et 2,5%<sub>m/V</sub>) réticulé avec la Gpn (0,1%<sub>m/V</sub>). Le temps de stabilisation correspondant au gain de masse maximum est de 24 heures et 48 heures avec des concentrations en CHT respectives de 2,5%<sub>m/V</sub> et 1%<sub>m/V</sub>. La concentration en CHT dans ce cas influence donc la vitesse de réaction comme le démontraient les observations du textile dans la Figure 47. À l'équilibre, on constate à nouveau, comme cela a été observé dans notre étude de réticulation par l'acide citrique, que les gains de masse sont deux fois plus importants avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub> par rapport à une concentration de 1%<sub>m/V</sub>. L'absence de gain de masse avant 24 heures avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/V</sub> peut s'expliquer par une réticulation insuffisante du CHT par la Gpn qui ne résiste pas après lavage.

L'utilisation d'une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub> dans la solution d'imprégnation permet d'obtenir des gains de masse plus importants par rapport à une concentration de 1%<sub>m/V</sub>. C'est pourquoi nous avons continué l'étude avec cette concentration de 2,5%<sub>m/V</sub>. Au-delà de 2,5%<sub>m/V</sub>, la solution de CHT est trop visqueuse pour pouvoir être imprégnée de façon homogène sur le textile comme nous l'avons déjà précisé avec l'étude du CTR comme agent réticulant.

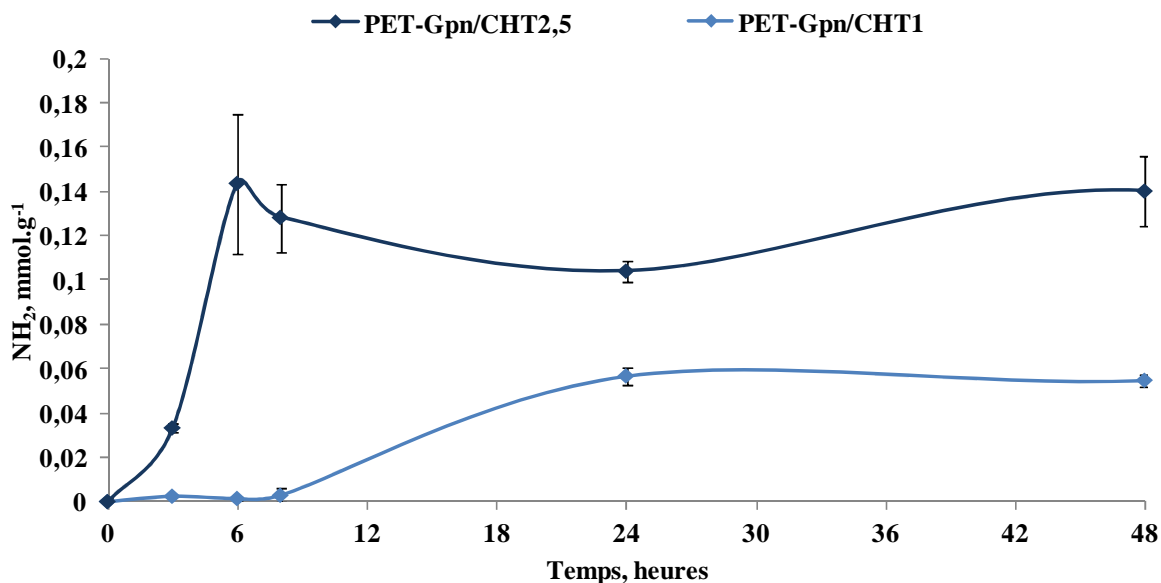
D'après ces premiers résultats, avec une concentration en Gpn de 0,01% et une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub>, nous avons donc fixé le temps de réaction à 24 heures.



**Figure 49.** Évolution du gain de masse du PET en fonction du temps de réaction et de la concentration en CHT dans la solution d'imprégnation (1%<sub>m/v</sub> et 2,5%<sub>m/v</sub>). La concentration en Gpn est fixée à 0,1%<sub>m/v</sub>.

Ces résultats rapportent uniquement les gains de masse du textile, nous avons donc étudié la quantité de fonctions réactives libres présentes sur ces différents textiles. Cette étude permet d'évaluer l'influence du temps de réaction sur la densité des groupements chimiques libres présents à la surface du textile. Pour cela, la quantification des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) apportées par le CHT a été réalisée en fonction du temps de réaction.

L'évolution des fonctions amines en fonction du temps de réaction (Figure 50) montre une réaction plus rapide avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/v</sub>. En effet, la densité maximale en fonctions amines est atteinte après 6 heures pour une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/v</sub> et après 24 heures de réaction avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/v</sub>. Après 24 heures de réaction, la quantité de fonctions amines avec une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/v</sub> est 2 fois plus élevée qu'avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/v</sub>. Les rapports molaires R<sub>m</sub> dans la solution d'imprégnation sont de 0,05 et 0,1 (Gpn à 0,1%<sub>m/v</sub>) avec une concentration en CHT de 1%<sub>m/v</sub> et 2,5%<sub>m/v</sub> respectivement. La réaction de réticulation fait donc intervenir 20 à 10 moles de fonctions amines pour 1 mole de Gpn respectivement. La quantité en CHT est en large excès par rapport à la quantité de Gpn.



**Figure 50.** *Quantité de groupements amines sur les échantillons PET-Gpn/CHT réticulés par la Gpn (0,1%<sub>m/V</sub>) en fonction de la concentration en CHT (1%<sub>m/V</sub> et 2,5%<sub>m/V</sub>) et du temps de réaction*

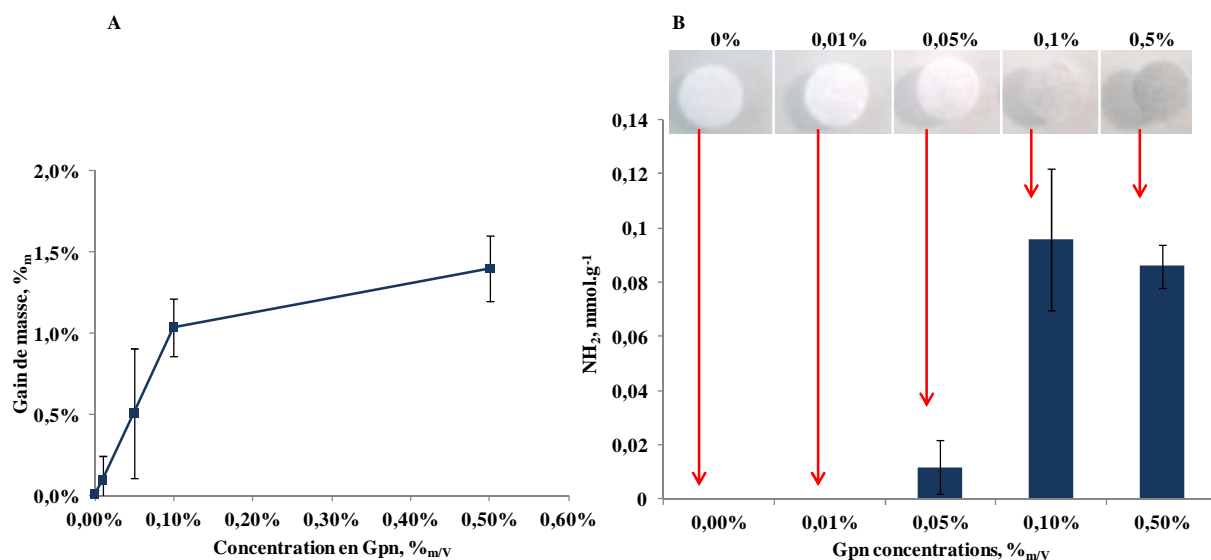
L'étude de l'influence de la concentration en CHT et du temps de réaction sur la fonctionnalisation du PET permet de souligner l'influence de la concentration en CHT sur le gain de masse et sur le temps de réaction. Une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub> permet d'obtenir des gains de masse plus importants après 24 heures de réaction avec la Gpn à 0,1%<sub>m/V</sub> et implique une réaction qui se stabilise plus rapidement. Pour la suite de l'étude, une concentration en CHT de 2,5%<sub>m/V</sub> sera utilisée avec un temps de réaction entre le CHT et la Gpn de 24 heures. Dans le but de contrôler la densité de fonctions amines, nous avons étudié l'influence de la concentration en Gpn sur la fonctionnalisation du PET par le CHT 2,5%<sub>m/V</sub>.

- *Influence de la concentration en Gpn*

La Figure 51.A. montre l'évolution du gain de masse en fonction de la concentration en Gpn. Les résultats montrent une augmentation rapide du gain de masse des textiles pour des concentrations en Gpn de 0 à 0,1%<sub>m/V</sub>. Au-delà d'une concentration de 0,1%<sub>m/V</sub> en Gpn, le gain de masse n'évolue plus de façon significative. On constate également que les gains de masse obtenus avec une concentration en Gpn inférieure à 0,01%<sub>m/V</sub> ne sont pas significatifs. Cela peut s'expliquer par une concentration trop faible en Gpn qui ne permet pas de greffer efficacement le CHT à la surface du PET.

L'observation des textiles sur la Figure 51B. montre l'apparition de la coloration bleue du textile à partir d'une concentration en Gpn de 0,05%<sub>m/V</sub>. La quantification des fonctions

amines montre qu'aucune fonction amine n'est détectée de façon significative avec des concentrations en Gpn inférieures à 0,05%<sub>m/v</sub>. L'absence de fonctions amines sur les textiles traités sans Gpn montre que le CHT n'est pas fixé, et ceci indique donc l'intérêt de la réticulation de ce dernier qui est nécessaire pour l'enrobage efficace des fibres textiles. La quantité d'amines obtenue avec une concentration en Gpn de 0,05%<sub>m/v</sub> est négligeable par rapport à celle obtenue avec une concentration en Gpn de 0,1 et 0,5%<sub>m/v</sub>. En effet, une quantité d'amines, plus de 8 fois supérieure, est obtenue avec une concentration en Gpn de 0,1 ou 0,5%<sub>m/v</sub>. Entre ces deux concentrations, aucune différence significative n'est observée. Ces résultats confirment ceux obtenus par gain de masse avec un début de fonctionnalisation du CHT (2,5%<sub>m/v</sub>) dès 0,05%<sub>m/v</sub> en Gpn.



**Figure 51. A. Gain de masse du PET-Gpn/CHT en fonction de la concentration en Gpn. B. Photographies et densité des fonctions amines en fonction de la concentration en Gpn sur les échantillons PET-Gpn/CHT. La concentration en CHT est fixée à 2,5%<sub>m/v</sub>.**

c. Conclusion sur la fonctionnalisation.

La modification de surface du PET par le CHT aboutit à un système présentant des charges (fonctions amines et carboxyliques) dont la densité peut être modulée par la concentration et la nature des agents réticulants (CTR ou Gpn). La Gpn permet d'obtenir un système présentant des charges cationiques uniquement. Le CTR, en fonction de son ratio molaire par rapport au CHT, permet de contrôler la charge globale présente à la surface du textile. Le CTR en défaut permet d'obtenir un système présentant majoritairement des charges cationiques ( $-\text{NH}_3^+$ ), tandis qu'en excès, il permet d'obtenir un système présentant majoritairement des charges anioniques ( $-\text{COO}^-$ ). Dans les études suivantes, le textile

fonctionnalisé avec le CHT par la Gpn (PET-Gpn0,1/CHT, densité =6,8 mg/cm<sup>2</sup>) et deux textiles fonctionnalisés avec le CHT réticulé par le CTR: l'un chargé négativement (PET-CTR1/CHT, densité =7,6 mg/cm<sup>2</sup>) et l'autre chargé négativement (PET-CTR10/CHT, densité = 9 mg/cm<sup>2</sup>) seront évalués.

Les textiles fonctionnalisés par le CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> réticulé par la Gpn à 0,1%<sub>m/V</sub> seront dénommés, pour la suite de l'étude, PET-Gpn. De même, les textiles fonctionnalisés par le CTR à 1 et 10%<sub>m/V</sub> avec le CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> seront dénommés respectivement PET-CTR1 et PET-CTR10.

***Tableau 6. Récapitulatif des trois textiles utilisés pour la suite de l'étude.***

Résultats	PET-Gpn	PET-CTR1	PET-CTR10
Paramètres de fonctionnalisation	à 25°C pendant 24 heures sous atmosphère saturée en eau	à 140°C pendant 15 minutes	
[CHT], % <sub>m/V</sub>	2,5% <sub>m/V</sub>		
[Agent réticulant], % <sub>m/V</sub>	0,1	1	10
Gain de masse, % <sub>m</sub>	1	1	6
Taux de -COOH, mmol/g	-	0,008	0,06
Taux de -NH <sub>2</sub> , mmol/g	0,1	0,06	0,002

## 2. Caractérisations physico-chimique et biologique des textiles

### a. Analyse infrarouge des textiles

L'analyse par infrarouge a été réalisée dans le but de mettre en évidence la présence des groupements caractéristiques du CHT réticulé par la Gpn ou le CTR par une caractérisation directe des textiles fonctionnalisés.

La Figure 52.A. montre les spectres infrarouges des échantillons fonctionnalisés. Le spectre du PET vierge met en évidence la présence des liaisons ester et les cycles aromatiques très présents dans la structure chimique du PET par une bande de vibration à 1700 cm<sup>-1</sup> et 750-800 cm<sup>-1</sup> respectivement. De nombreuses bandes additionnelles, correspondant aux liaisons C-H et C=O sont également observées à 1100 et 1400 cm<sup>-1</sup>.

Une bande large de vibration, correspondant aux fonctions amines est retrouvée entre 3000 et 3600 cm<sup>-1</sup>, sur les textiles fonctionnalisés montrant la présence du CHT sur les textiles. Les bandes de vibrations correspondant aux liaisons C-H et C=O à 1100 et 1400 cm<sup>-1</sup> sont toujours visibles sur les textiles fonctionnalisés. Les bandes de vibration correspondant aux fonctions carboxyliques présentes sur les échantillons fonctionnalisés ne sont pas mises



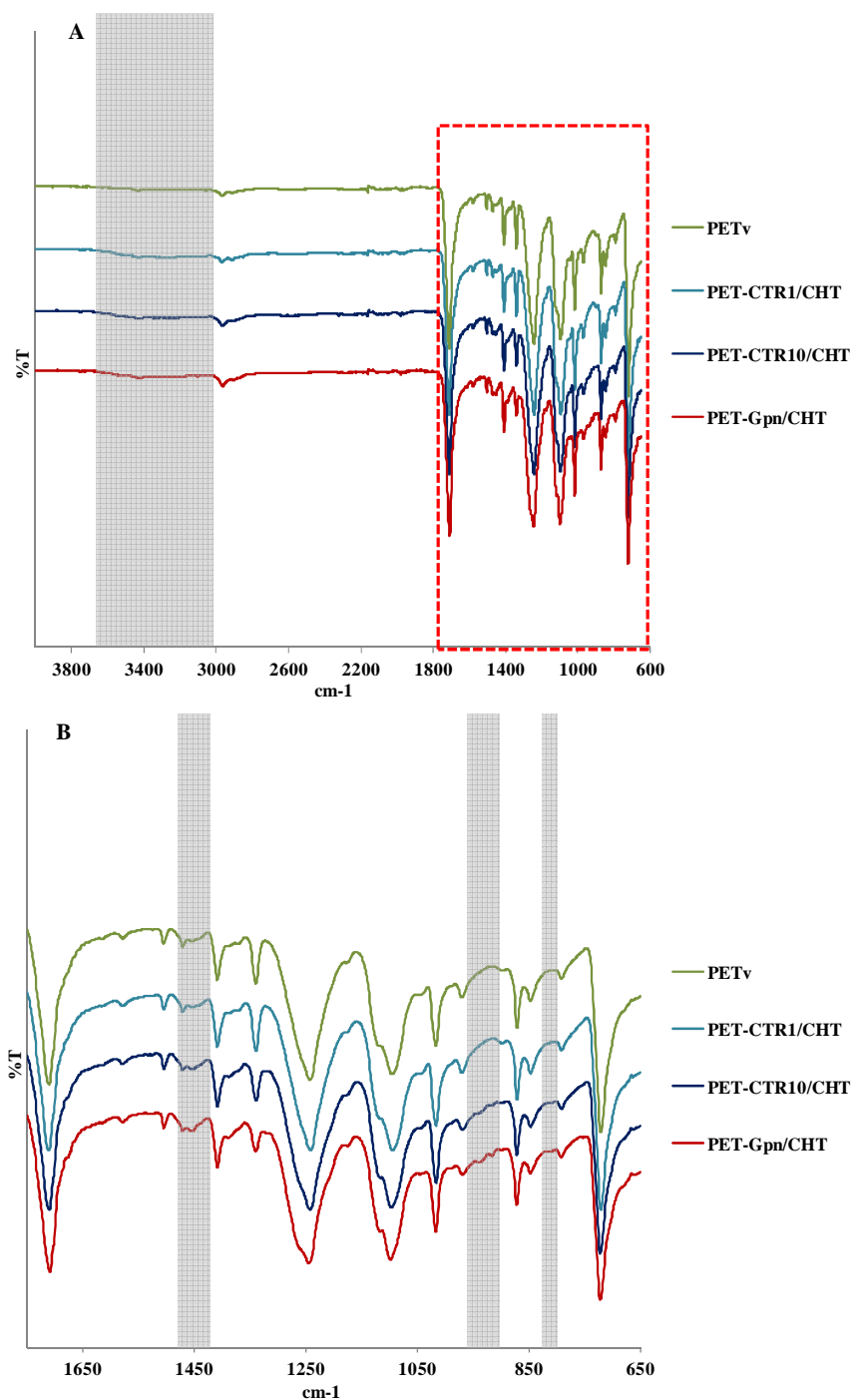
### Chapitre III: Résultats

en évidence car les bandes de vibration caractéristiques du PET empêchent la distinction du signal correspondant au textile et les bandes de vibration correspondant aux fonctions carboxyliques.

Deux bandes de vibrations de déformation à 900 et à 1400  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux fonctions amines sont également retrouvées sur le spectre agrandi dans la Figure 52.B. Une bande de vibration à 800  $\text{cm}^{-1}$  correspondants aux cycles aromatiques est retrouvée pour les échantillons PET-Gpn/CHT. La modification du spectre par rapport au PET à ce niveau reflète la présence d'hétérocycles aromatiques qui peuvent provenir de la Gpn.

Les liaisons amides n'ont pas été mises en évidence par cette analyse. La bande de vibrations correspondant à l'étirement des liaisons NH (NH *stretching*) à environ 3200  $\text{cm}^{-1}$  n'a pas été mise en évidence et les liaisons C=O et C-N ne peuvent pas être dissociées du signal correspondant au PET et aux fonctions amines.

L'analyse infrarouge des textiles fonctionnalisés démontre la présence du CHT sur ces textiles, quel que soit la nature et la concentration en agent réticulant.



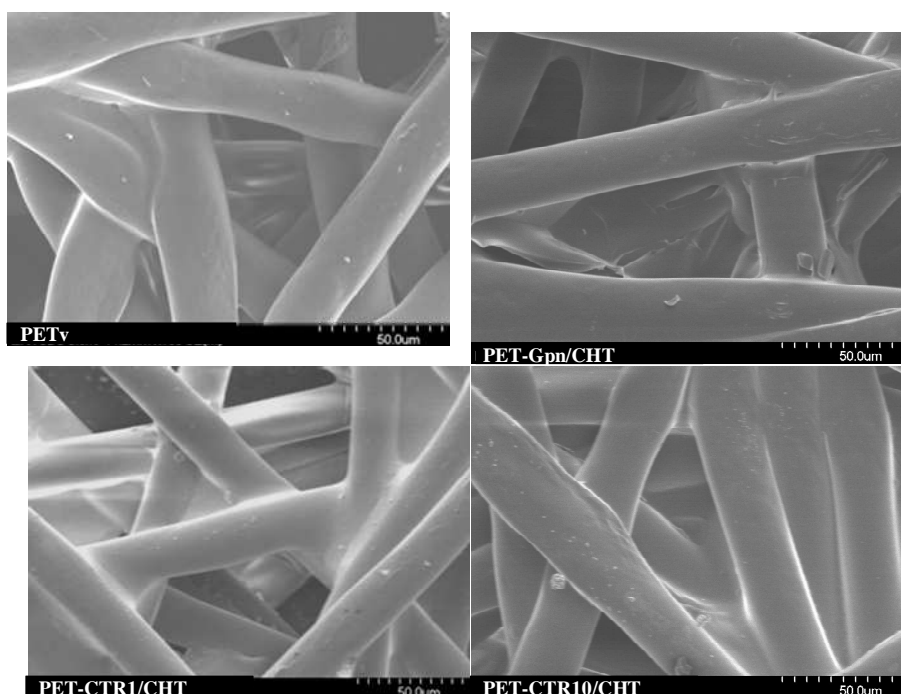
**Figure 52. A. Spectre infrarouge sur les différents types de supports textiles obtenus. B. Agrandissement des spectres entre 650 et 1700  $\text{cm}^{-1}$ .**

**b. Observation par microscopie électronique à balayage**

Une analyse MEB a ensuite été réalisée pour observer l'aspect du textile avant et après fonctionnalisation.

L'observation par MEB présentée sur la Figure 53 montre des fibres lisses pour le PET. On peut observer que certaines fibres sont légèrement déformées au niveau de leur

intersection. Cela s'explique par le procédé de fabrication du textile non tissé de base en PET qui subit un calandrage à chaud qui provoque l'écrasement des fibres. La fonctionnalisation du PET par le CHT réticulé par la Gpn laisse apparaître des fibres à la surface légèrement moins lisse (agrandissement plus important). On remarque que le revêtement polymère déposé est homogène autour des fibres et que les interstices, entre les fibres, sont partiellement comblés. L'observation de la surface du PET-CTR1/CHT ne montre pas de différence majeure avec le PET-Gpn/CHT. Cependant avec le PET-CTR10/CHT, on constate que les fibres présentent un diamètre plus important par rapport au PET et au PET-CTR1/CHT. L'augmentation du diamètre des fibres est en corrélation avec les gains de masse décrits précédemment qui sont respectivement de 1 et 6%<sub>m</sub> pour le PET-CTR1/CHT et le PET-CTR10/CHT. De plus, les interstices sont quasiment comblés en totalité au niveau de certains interstices.

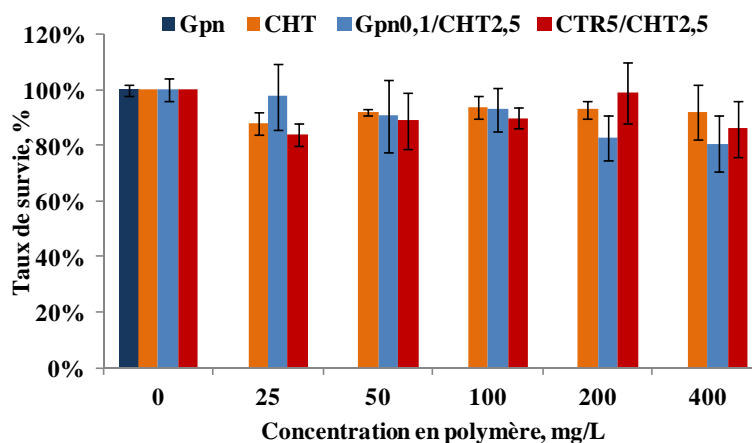


*Figure 53. Observation microscopique de la surface du PET fonctionnalisé par la CHT (2,5%<sub>m</sub>) réticulé par la Gpn (0,1%<sub>m</sub>) ou par le CTR (1 et 10%<sub>m</sub>) réalisée par microscopie électronique à balayage.*

c. Évaluation biologique des supports PET-CHT

La viabilité des cellules épithéliales L132 mises en présence des polymères dans le milieu de culture permet d'évaluer la cytocompatibilité de ces derniers.

La Figure 54 montre les taux de survie des cellules L132 en présence de concentrations croissantes en polymères de CHT réticulé avec le CTR ou la Gpn. Quel que soit le polymère testé (CHT, Gpn/CHT ou CTR/CHT), les taux de survie sont supérieurs à 80% aux plus fortes concentrations de 400 mg/L démontrant la cytocompatibilité des polymères. On constate ainsi que la Gpn est très toxique dès 25 mg/L mais l'absence de cytotoxicité du polymère Gpn0,1/CHT2,5 signifie que ce dernier ne contient pas de Gpn ayant réagit partiellement ou à l'état libre.

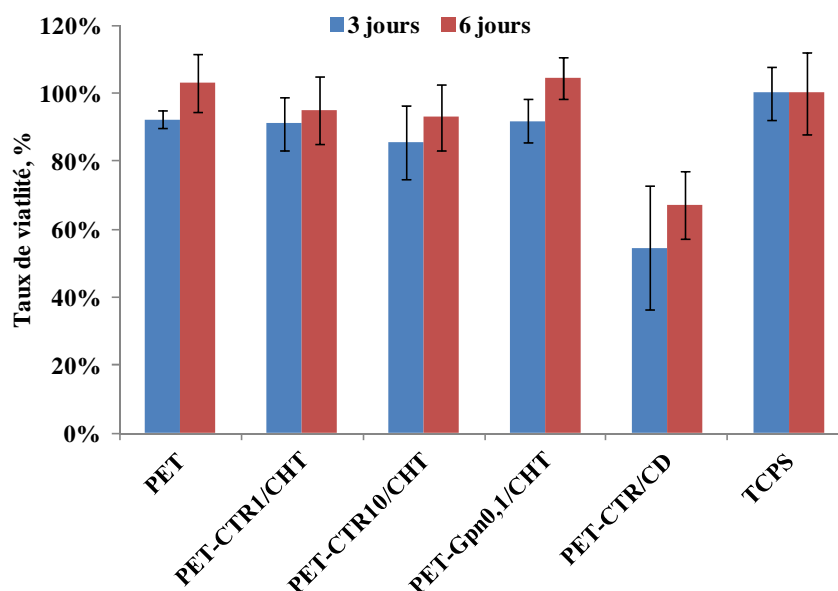


**Figure 54. Viabilité des cellules L132 en fonction de la concentration en polymère ou Gpn dans le milieu de culture après 9 jours de culture à 37°C.**

La Figure 55 montre les taux de vitalité des cellules L132ensemencées directement sur les textiles fonctionnalisés afin d'évaluer la cytocompatibilité du revêtement de polymère. Le PET fonctionnalisé par le polymère de  $\beta$ CD réticulé par le CTR a été évalué en tant que contrôle.

Les taux de vitalité des cellules sur le PET sont respectivement de 90% et 100% à 3 et 6 jours de culture. Le seul textile présentant une diminution de la cytocompatibilité par rapport au PET, est le PET-CTR/CD avec un taux de vitalité de 54 et 67% à 3 et 6 jours respectivement. Ce résultat est conforme aux différentes études précédentes menées par le laboratoire. Les autres textiles évalués montrent des taux de vitalité identiques au PET supérieurs à 80% après 3 jours de prolifération avec une légère augmentation de la vitalité au

6<sup>ème</sup> jour témoignant d'une excellente cytocompatibilité de nos textiles fonctionnalisés. Ainsi, quel que soit l'agent réticulant utilisé, la fonctionnalisation du PET par le CHT n'altère pas sa cytocompatibilité.



**Figure 55.** Vitalité des cellules L132 ensemencées sur les textiles fonctionnalisés par le CHT après 3 et 6 jours de culture à 37°C.

d. Conclusion sur les caractérisations physico-chimiques et biologiques

L'analyse infrarouge des textiles fonctionnalisés par le CHT montre la présence du CHT à la surface des textiles. Les liaisons amides et ester impliquées dans la réticulation du CHT par le CTR n'ont pu être distinguées du PET. L'observation microscopique de la surface des échantillons fait apparaître une fonctionnalisation homogène des fibres textiles où la présence du polymère est observée sur chaque fibre. L'évaluation biologique montre une excellente cytocompatibilité des polymères utilisés aussi bien seuls que déposés sur les textiles. Ainsi quel que soit l'agent réticulant et quel que soit la charge en surface du PET, les textiles sont cytocompatibles.

**3. Activation des textiles par l'argent ou l'iode**

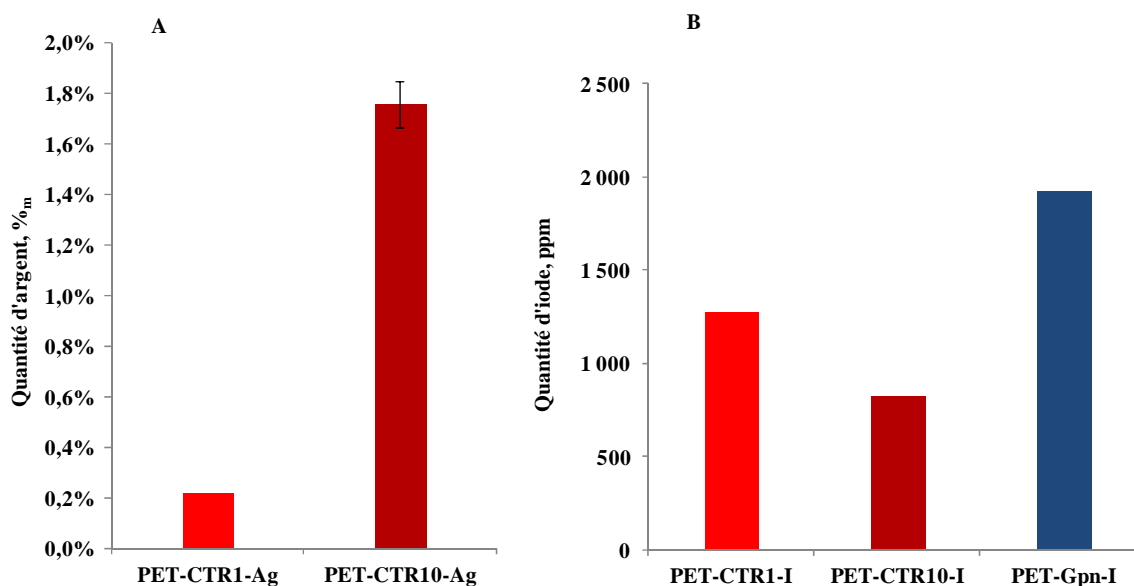
Les textiles fonctionnalisés par le CHT ont été activés par deux agents antibactériens de charges opposées en fonction de la charge globale du textile. De l'iode ( $I: I_3^-$ ) a été chargé sur le PET-Gpm/CHT et le PET-CTR1/CHT et de l'argent ( $Ag: Ag^+$ ) a été chargé sur le PET-CTR10/CHT. Les textiles ont été imprégnés dans une solution de sulfate d'argent ( $Ag_2SO_4$ ) à 10 g/L ou d'iode ( $I_2$ ) à 1,5 g/L pendant 24 heures comme décrit dans la méthode.

a. Quantification de l'argent et de l'iode adsorbé sur les textiles

La quantification de l'Ag et de l'iode sur les textiles a été réalisée par une analyse élémentaire afin d'évaluer la spécificité de chaque textile fonctionnalisé, riche en amine d'une part ou riche en acide carboxylique d'autre part. Le chargement préférentiel de l'Ag ou de l'iode sera ainsi étudié en fonction des charges présentes à la surface du textile.

La quantification par analyse élémentaire de l'Ag ou de l'iode chargé sur les textiles fonctionnalisés est présentée dans la Figure 56. Le PET-Gpn ne portant que des charges cationiques, le chargement d'Ag n'a pas été effectué sur ces supports. On constate sur la Figure 56.A. que l'Ag est adsorbé 8 fois plus sur le PET-CTR10 (1,76%<sub>m</sub>) que sur le PET-CTR1 (0,22%<sub>m</sub>). Les ions Ag<sup>+</sup> sont donc bien chargés préférentiellement sur le PET-CTR10 dont la charge globale est négative.

À l'inverse, on constate que l'iode est chargé 1,5 fois plus sur le PET-CTR1 (1277 ppm) par rapport au PET-CTR10 (823 ppm). Cela indique donc que l'iode est chargé préférentiellement sur un système dont la charge globale est positive. Le chargement de l'iode sur le PET-Gpn est évalué à 1923 ppm soit 1,5 fois plus que sur le PET-CTR1 (1277ppm). La différence de chargement de l'iode sur ces deux textiles, malgré une densité de fonctions amines identique décrite dans les résultats précédents, peut s'expliquer par la présence d'une faible quantité de fonctions carboxyliques sur le PET-CTR1 qui peut exercer un effet répulsif sur l'iode.



**Figure 56. Quantification de l'Ag (A) et de l'iode (B) par analyse élémentaire chargée sur les textiles fonctionnalisés.**

b. Évaluation microbiologique *in vitro*

▪ Concentration minimale inhibitrice de l'argent et de l'iode

Dans un premier temps, une évaluation de l'efficacité antibactérienne de l'iode et de l'Ag a été réalisée afin de déterminer la concentration minimale pour *S. aureus* et *E. coli* (Tableau 7). Quel que soit la souche et le temps d'incubation, la CMI de l'Ag est plus faible que celle de l'iode. Ce qui indique que l'Ag est efficace avec des concentrations inférieures par rapport à l'iode. En effet, la CMI de l'iode pour *S. aureus* est 13 à 26 fois plus élevée que celle de l'Ag à 24 et 48 heures respectivement. Pour *E. coli*, la CMI de l'iode est de 100 à 50 fois plus élevée que celle de l'Ag à 24 et 48 heures respectivement. De plus l'Ag est plus efficace sur *E. coli* car la CMI à 24 et 48 heures est respectivement de 6,94 mg/L et 13,88 mg/L contre 27,8 mg/L sur *S. aureus* à 24 et 48 heures. Les différences observées entre les temps 24 et 48 heures peuvent s'expliquer par la présence de quelques bactéries encore viables après 24 heures qui ont pu proliférer jusqu'à 48 heures après désactivation de l'Ag ou de l'iode par les autres bactéries.

Après 48 heures, les milieux déterminants la CMI ont été étalés sur des géloses MHA afin de vérifier l'effet bactériostatique ou bactéricide. L'absence de prolifération sur les géloses permet de conclure sur l'effet bactéricide de l'Ag ou de l'iode contre ces bactéries.

**Tableau 7: CMI d'une solution d'iode (KI+ I<sub>2</sub>, I<sub>2</sub> à 1,50 g/L) ou d'argent (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ag à 1,75 g/L) sur *S. aureus*, CIP224 et *E. coli*, K12 après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C.**

Temps, heures	<i>S. aureus</i> , CIP224		<i>E. coli</i> , K12	
	CMI, mg/L			
	Ag	I	Ag	I
24	27,8	364,5	6,9	729
48	27,8	729	13,8	729

Au regard de ces derniers résultats, l'utilisation de l'iode en tant qu'agent antibactérien sur les textiles est donc moins intéressant que l'Ag. En effet, des quantités plus importantes en I seront nécessaires pour obtenir une activité antibactérienne efficace par rapport aux quantités d'Ag. De plus, nous avons démontré que les quantités d'iode sur les textiles étaient inférieures à celles de l'Ag. L'argent sera donc conservé comme principe actif de choix dans le traitement des plaies infectées.

- Évaluation de l'efficacité antibactérienne

L'efficacité antibactérienne des textiles chargés par l'Ag a été évaluée par un test de réduction bactérienne ou *kill-time*. Ce test permet de suivre la quantité de bactéries viables (en UFC/mL) en fonction du temps et permet ainsi d'évaluer la vitesse et l'efficacité d'action de l'agent antibactérien.

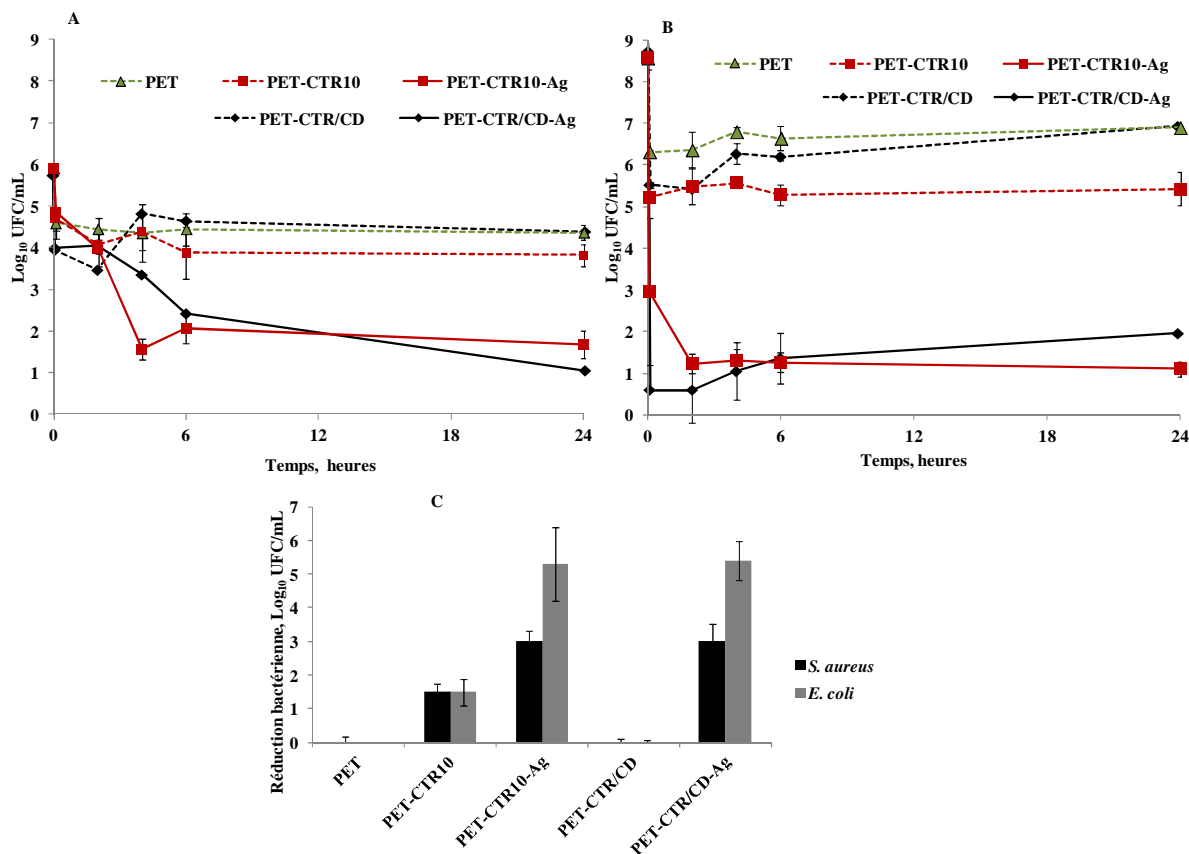
La Figure 57 montre les résultats obtenus sur *S. aureus* et *E. coli* avec les textiles chargés par l'Ag. Dans cette évaluation, le PET fonctionnalisé par le polymère de  $\beta$ -CD a été inclus dans cette étude en tant que témoin. Celui-ci a été inclus dans cette évaluation car il présente des charges négatives apportées par le CTR réticulant les CD.

Tout d'abord, on ne constate aucune différence significative en terme d'activité antibactérienne entre le PET et le PET-CTR/CD. Cependant on constate que le PET-CTR10 présente une réduction de 1 à 2 Log<sub>10</sub> sur *S. aureus* et *E. coli* respectivement après 24 heures par rapport au PET. Il est possible que cette légère réduction soit imputée à la présence du CHT ou bien au caractère acide de l'enrobage (riche en COOH). Une quantification des fonctions carboxyliques réalisée par échange ionique a permis de démontrer que le PET-CTR/CD présente 1,5 fois plus de fonctions carboxyliques que le PET-CTR10 (résultats non montrés). Ceci indiquerait donc que la légère réduction bactérienne observée avec le PET-CTR10 serait due aux propriétés antibactériennes du CHT.

Avec le PET-CTR10-Ag une réduction importante de plus de 5 Log<sub>10</sub> de *S. aureus* est obtenue dès 4 heures de contact avec le textile. Cela signifie que la concentration en bactéries viables se situe en dessous de la limite de détection (1 Log<sub>10</sub>/mL). La réduction bactérienne avec le PET-CTR/CD-Ag est progressive et atteint le même niveau que le PET-CTR10-Ag après 24 heures.

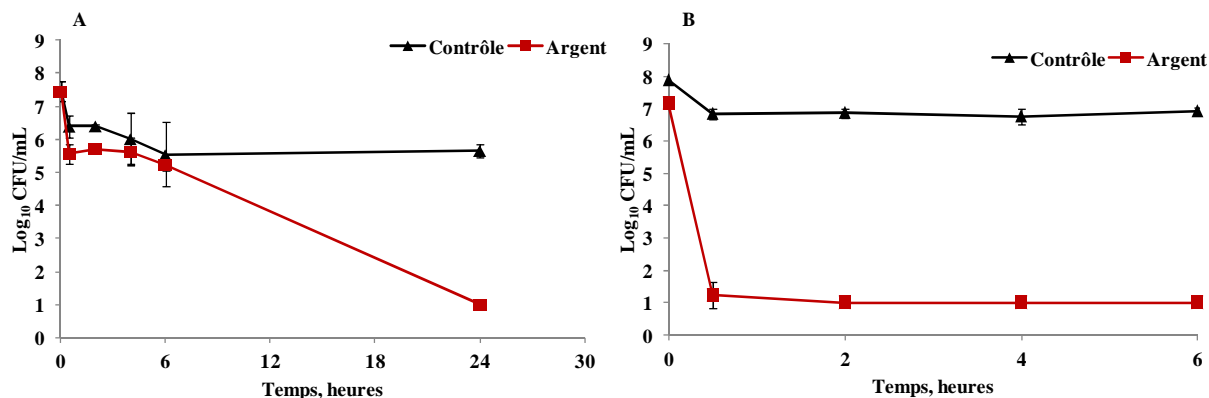
Concernant *E. coli*, une réduction de plus de 5 Log<sub>10</sub> est obtenue après seulement 2 heures de contact avec le PET-CTR10-Ag et dès 30 minutes avec le PET-CTR/CD-Ag. Le PET-CTR10-Ag semble donc efficace plus rapidement sur *E. coli* par rapport à *S. aureus*. La différence observée peut s'expliquer par la valeur de la CMI qui est 4 fois plus élevée à 24 heures pour *S. aureus* (27,76 mg/L) par rapport à celle d'*E. coli* (6,94 mg/L). Le chargement en Ag sur les textiles est donc supérieur à la CMI des deux bactéries. Le PET-CTR10-Ag démontre une efficacité antibactérienne importante contre *S. aureus* et *E. coli*. L'action de l'Ag sur *E. coli* semble plus rapide que sur *S. aureus* par contre on ne constate pas de différence significative avec le PET-CTR/CD-Ag.





**Figure 57.** Nombre de bactéries viables en fonction du temps sur les textiles chargés par l'Ag avec *S. aureus*, CIP224 (A) et *E. coli*, K12 (B). C. Bilan des résultats en réduction bactérienne sur les échantillons imprégnés par l'Ag après 24 heures sur *S. aureus* et *E. coli*. L'absence d'histogramme traduit une absence d'activité.

Afin d'expliquer la différence de vitesse d'activité de l'Ag sur *S. aureus* et *E. coli*, cette même évaluation a été réalisée avec des solutions d'Ag dans le but de s'affranchir de l'influence possible du textile. Les résultats sont donnés dans la Figure 58. On observe les mêmes profils de réduction bactérienne que ceux obtenus avec les textiles. Ces résultats indiquent donc que l'Ag réagit de façon différente sur *S. aureus* et *E. coli*. Ceci peut être expliqué par les différences structurelles de la membrane de ces bactéries. En effet, *S. aureus* est une bactérie Gram+ alors qu'*E. coli* est une bactérie Gram-. Or la structure de ces deux types de bactéries diffère notamment par l'épaisseur de la couche de peptidoglycane qui est plus épaisse chez les bactéries Gram+. Il est possible que dans ce cas, l'Ag nécessite plus de temps pour traverser la paroi bactérienne.



**Figure 58. Cinétique de réduction bactérienne sur *S. aureus*, CIP224 (A) et *E. coli*, K12 (B) avec une solution de sulfate d'argent à 5g/L.**

#### 4. Conclusion de la première partie

La fonctionnalisation du CHT par la Gpn permet d'obtenir un système présentant uniquement des fonctions amines en surface dont la charge globale est positive alors que l'utilisation de CTR en concentrations variables permet d'obtenir un système chargé soit positivement par la présence majoritaire de fonctions amines ( $[CTR] \leq 1\%_{m/v}$ ) soit négativement par la présence majoritaire de fonctions carboxyliques ( $[CTR] > 1\%_{m/v}$ ). Le taux de chargement de l'Ag ou de l'iode est ainsi dépendant de la charge globale à la surface du textile. Le PET-CTR1 permet de charger préférentiellement des espèces anioniques comme l'iode et le PET-CTR10, chargé négativement, permet le chargement préférentiel d'espèces cationiques comme l'Ag.

L'Ag rapporte une efficacité antibactérienne importante contre *S. aureus* et *E. coli*. Il est actif à une concentration plus faible que l'iode et montre également un effet bactéricide plus rapide. L'Ag semble, cependant, agir plus rapidement sur les bactéries Gram-, comme *E. coli* que sur les bactéries Gram+, comme *S. aureus*. Ceci devrait bien sûr être confirmé sur d'autres bactéries. L'Ag représente donc un bon candidat pour conférer, au PET fonctionnalisé, une activité antibactérienne.

Cependant, l'Ag présente une toxicité vis-à-vis des cellules (taux de vitalité nul sur les textiles activés par l'Ag, résultats non montrés). L'application de ce système, tel quel, sur une plaie pourrait provoquer une réponse inflammatoire importante au niveau des tissus sains voire même prolonger le temps de guérison. C'est la raison pour laquelle un système PEM a été construit sur ces textiles, dans le but de limiter la libération de l'Ag par diffusion hors du dispositif.

Dans un premier temps, la construction du système PEM a d'abord été optimisée sur le PET-Gpn qui présente l'avantage de porter uniquement des charges cationiques; il représente donc un système plus simple que le PET-CTR/CHT dont la charge varie en fonction de la concentration en CTR. Dans un second temps, une fois que la construction du système PEM a été optimisée, celui-ci a été construit sur le PET-CTR10-Ag.

### **Partie 2: Construction du système polyélectrolyte multicouche**

La construction du système PEM est basée sur la méthode décrite par A. Martin *et al.* utilisant un polymère de cyclodextrine comme PE<sup>-</sup> et le chitosane comme PE<sup>+</sup>. Le but est d'apporter un effet barrière pour limiter la diffusion de l'Ag cytotoxique mais également d'apporter une activité thérapeutique supplémentaire au textile par le biais du système PEM chargé par un principe actif (antibactérien, antalgique ou pro-cicatrisant,...). La Chx a été choisie pour son efficacité antibactérienne et comme principe actif de choix dans certains pansements.

Pour cela, une étude préalable a été réalisée, sur le choix du polyCD (en fonction de la CD polymérisée:  $\beta$ CD,  $\gamma$ CD, MeCD,...) à utiliser dans la construction du système PEM. Le but est de choisir le polyCD capable de solubiliser la plus grande quantité de Chx pour qu'il soit ensuite utilisé pour la construction du système PEM. La construction du système PEM sur le PET-Gpn a ensuite été réalisée avec le polyCD défini puis la Chx a été chargée sur le système PEM.

#### **1. Optimisation de la construction du système PEM**

##### **a. Choix du polymère de cyclodextrine**

L'étude de la solubilité de la Chx a été établie par la réalisation d'un diagramme de solubilité (Higuchi et Connors, 1965<sup>141</sup>) afin de déterminer le polyCD capable de solubiliser le mieux ce principe actif lipophile. Le polyCD sera ainsi utilisé dans la construction du système PEM.

Le diagramme de solubilité présenté sur la Figure 59 montre la concentration en Chx solubilisée en fonction de la concentration en CD ou en polyCD. La solubilité de la Chx dans l'eau passe de 76,4  $\mu$ g/mL en l'absence de CD à 16 mg/mL en présence de 100 mg/mL de polyCTR-HP $\beta$ CD ou de polyCTR-Me $\beta$ CD (augmentation de la solubilité d'un facteur 210 environ) alors qu'elle n'est que de 3,73 et 6,68 mg/mL pour l'HP $\beta$ CD et la MeCD non polymérisées respectivement (augmentation de la solubilité d'un facteur 49 et 88).

L'amélioration de la solubilité de la Chx avec la CD seule correspond à la capacité intrinsèque de solubilisation de la CD. La différence de solubilité de la Chx entre le polymère de CD et la CD seule s'explique par la participation du CTR dans la solubilisation de la Chx. La solubilisation de la Chx par le CTR s'explique par un échange ionique entre les fonctions carboxyliques du CTR et les fonctions guanidines de la Chx. En tenant compte de la solubilité de la Chx avec le polymère de CD ou avec la CD seule, le polymère de MeCD est donc le plus efficace pour solubiliser la Chx en solution aqueuse.

En tenant compte de la solubilité de la Chx avec le polymère de CD ou avec la CD seule, le polymère de MeCD est donc le plus efficace pour solubiliser la Chx en solution aqueuse.

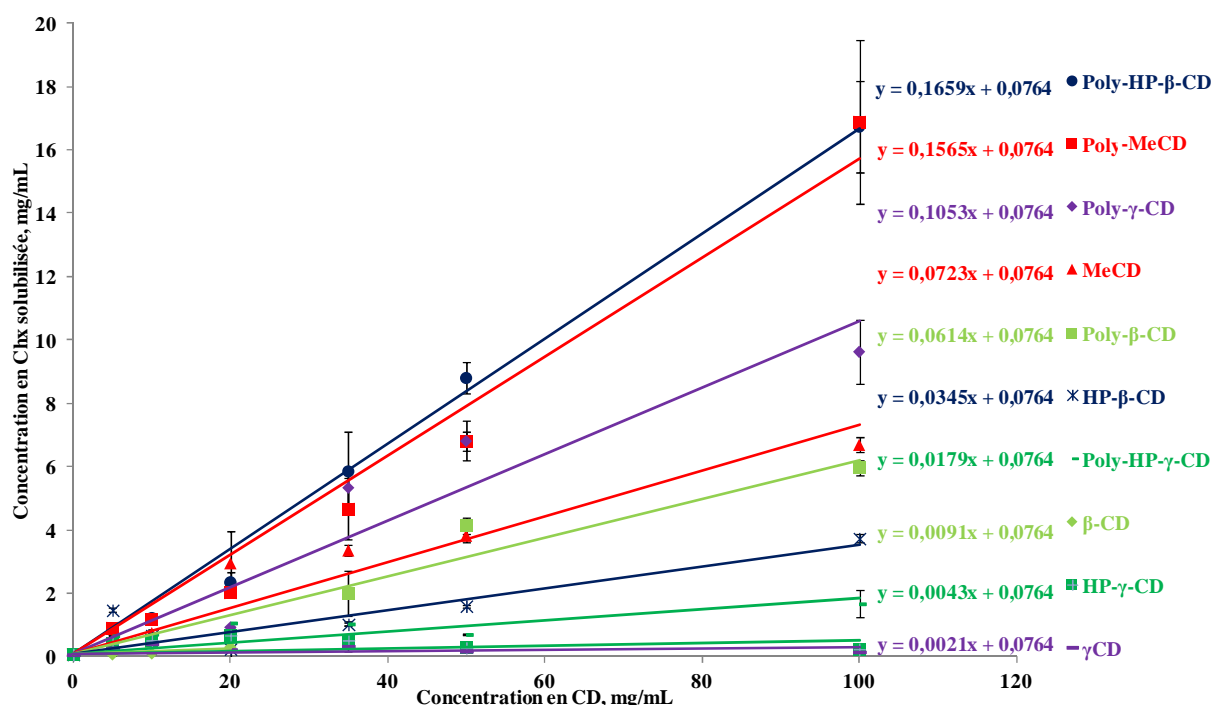


Figure 59. Diagramme de solubilité de la Chx en fonction de la concentration en CD native ou du polymère de CD associé après une nuit sous agitation à 180 rpm à température ambiante.

**Tableau 8. Solubilité de la Chx en fonction de la CD et du polyCD à 100 mg/mL.**

	Solubilité de la Chx, mg/mL	
	CD à 100 mg/mL	polyCD à 100 mg/mL
Me-β-CD	6,7	17
HP-β-CD	3,7	17
γ-CD	0,2	9,6
β-CD	0,3 (à 20 mg/mL)	6
HP-γ-CD	0,2	1,7

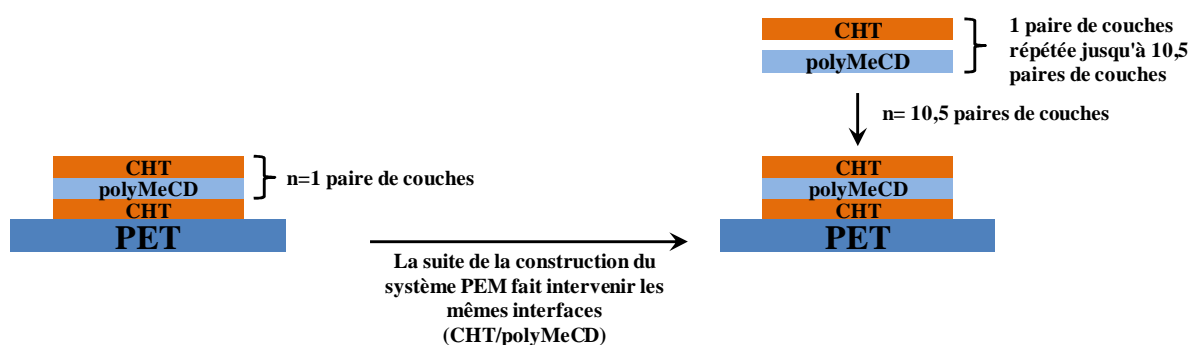
D'après les résultats obtenus avec le diagramme de solubilité de la Chx, on constate que la présence du CTR dans la structure du polyCTR-CD permet d'améliorer fortement la solubilité de la Chx. C'est pour cette raison que la solubilisation de la Chx par la maltodextrine (MD) ou le polymère de maltodextrine (polyCTR-MD) a été réalisée pour évaluer le rôle de la CD dans la solubilisation de la Chx. Cependant la solubilisation de la Chx par la MD ou le polyMD n'a pu être évaluée qu'avec des concentrations inférieures à 20 mg/mL de MD ou polyMD. À cette concentration, le polyMD solubilise 10 fois moins de Chx que le polyCTR-Me $\beta$ CD à la même concentration.

b. Chargement de la chlorhexidine sur les textiles

Afin de charger la Chx sur le système PEM, deux voies ont été évaluées à savoir l'imprégnation du système PEM dans une solution de Chx (0,4 mg/mL avec un rapport de bain de 5 mL/échantillon,  $\varnothing$  11 mm) ou bien l'utilisation d'une solution de polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexé avec la Chx. Les concentrations choisies pour obtenir le complexe polyCTR-Me $\beta$ CD/Chx ont été fixées par rapport aux résultats obtenus dans le diagramme de solubilité de la Chx (35 mg/mL de polyCTR-Me $\beta$ CD et 10 mg/mL de Chx).

Tout d'abord, il a donc été nécessaire d'étudier la construction du système PEM avec le complexe polyCTR-Me $\beta$ CD-Chx par rapport au polyCTR-Me $\beta$ CD seul. Pour cela, l'étude a été réalisée sur un système PEM de 1,5 paires de couches seulement afin de confirmer les résultats obtenus par A. Martin lors de ses travaux de thèse<sup>98</sup>.

Le choix de ce système à 3 monocouches permet d'une part d'évaluer le dépôt d'une seule couche de polyCTR-Me $\beta$ CD et d'autre part d'évaluer l'influence du complexe polyCTR-Me $\beta$ CD-Chx sur l'interaction avec les couches inférieures et supérieures (Figure 60). Ce système étant ensuite répété dans la construction du système PEM, les différences qui seront observées seront répétées avec un système PEM constitué de 10,5 paires de couches.

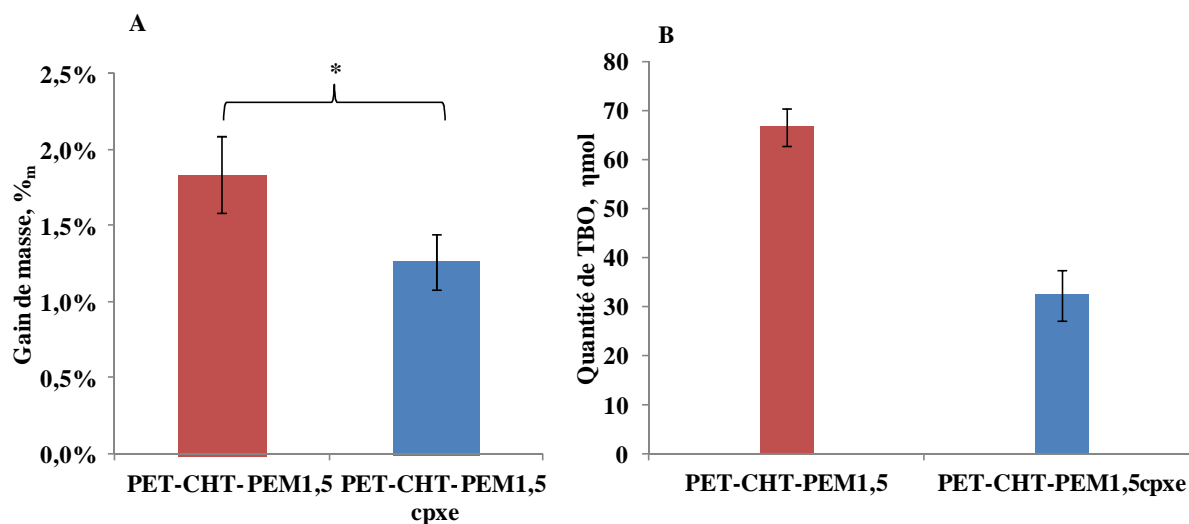


**Figure 60.** La construction du système PEM fait intervenir l'interaction polyCTR-Me $\beta$ CD/CHT répétée *n* fois en fonction du nombre *n* de paires de couches souhaitées.

La Figure 61.A. montre ainsi les gains de masse après la construction d'un système PEM constitué de 1,5 paires de couches avec le complexe polyCTR-Me $\beta$ CD-Chx ou non.

On remarque que le gain de masse pour un système PEM construit avec le polyCTR-Me $\beta$ CD non pré-complexé (1,83%<sub>m</sub>) est 1,5 fois plus élevé qu'avec le polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexé (1,25%<sub>m</sub>).

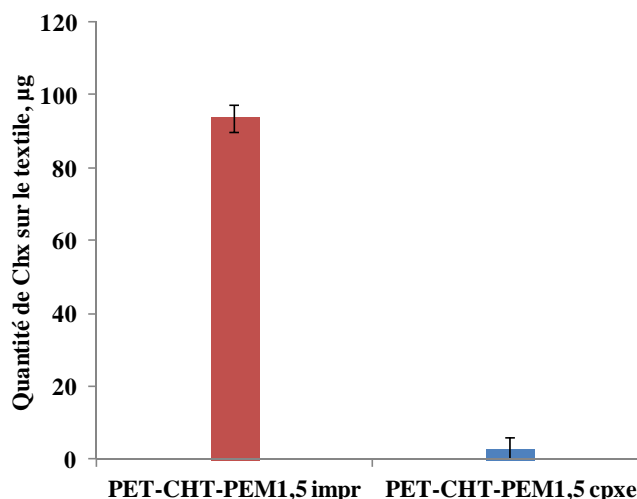
La Figure 61. B. montre la quantité de fonctions carboxyliques présentes sur le textile après dépôt du système PEM comprenant 1,5 paires de couches. Les résultats rapportent une quantité de 67  $\mu$ mol de fonctions carboxyliques sur le système PEM ayant été construit avec le polyCTR-Me $\beta$ CD seul alors que la quantité de fonctions carboxyliques est de 32  $\mu$ mol sur le système PEM utilisant le complexe polyCTR-Me $\beta$ CD-Chx. L'utilisation d'un complexe préformé de polyCD avec la Chx altère donc la construction du PEM et l'intégration du polyCD dans le système PEM.



**Figure 61. A. Gain de masse des textiles après la construction d'un système PEM de 1,5 paire de couches en fonction de l'imprégnation dans une solution du complexe polyCTR-Me $\beta$ CD-Chx (cpxe) ou non. Test t de Student,  $p < 0,5$ .**

**B. Quantification des groupements carboxyliques sur les systèmes PEM de 1,5 paires de couches en fonction de l'imprégnation dans une solution de polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexée (cpxe) ou non.**

Le dosage de la quantité totale de Chx présente sur le textile a ensuite été réalisé afin de vérifier la quantité en Chx encore présente après la construction du système PEM. Les résultats montrent une quantité de Chx 39 fois plus importante sur le système PEM construit avec le polyCTR-Me $\beta$ CD puis imprégné dans une solution de Chx (93,57  $\mu$ g) par rapport au système PEM construit avec le complexe polyCTR-Me $\beta$ CD.



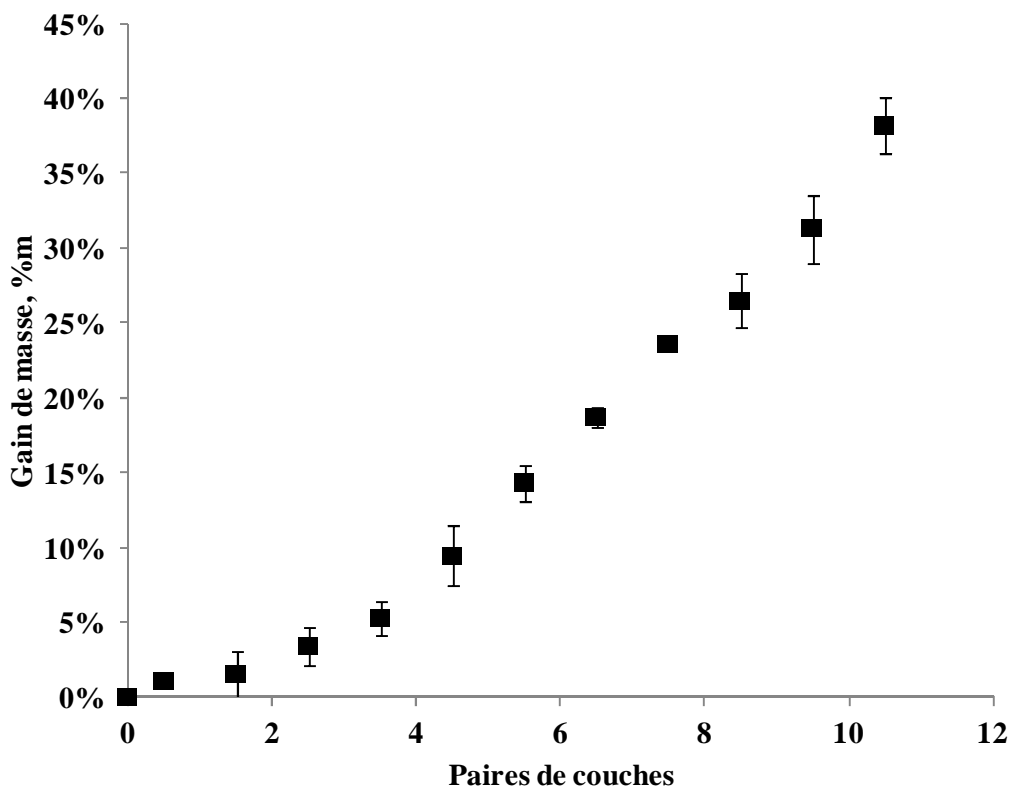
**Figure 62.** Quantification de la Chx totale sur les systèmes PEM de 1,5 paire de couches construit avec le polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexé avec la Chx (cpxe) ou imprégné dans une solution de Chx (0,4 mg/mL) après construction du système PEM (impr).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, le chargement par la Chx sera donc effectué après la construction du système PEM afin de permettre une construction optimale du système PEM et permettre le chargement maximal en Chx.

## 2. Construction du système polyélectrolyte multicouche

### a. Construction par gravimétrie

L'évolution de la construction du système PEM en fonction du nombre de paire de couches est présentée sur la Figure 63. La première couche correspondant à la fonctionnalisation du PET par le CHT réticulé par la Gpn correspond donc à une monocouche ( $n=0,5$ ) dont le gain de masse est de 1%. Le gain de masse évolue suivant deux phases, l'une correspondant à une faible augmentation du gain de masse entre 0 et 3,5 paires de couches, la seconde décrivant une évolution importante et linéaire au-delà de 3,5 paires de couches ( $r^2=0,9946$  entre 3,5 et 10,5 paires de couches). À partir de 3,5 paires de couches, le gain de masse moyen entre deux paires de couches est de 5%<sub>m</sub>. La première phase dans l'évolution du gain de masse peut s'expliquer par une densité faible en charge au démarrage de la construction. Le phénomène de surcompensation des charges, déjà démontré par A. Martin, permet ensuite une évolution linéaire du gain de masse après la construction de 3,5 paires de couches.



*Figure 63. Évolution du gain de masse en fonction du nombre de paires de couches sur le PET-Gpn/CHT.*

b. Amélioration de la stabilité du système polyélectrolyte multicouche

Lors de travaux précédents réalisés par A. Martin, une dégradation rapide du système PEM après 6 heures dans une solution de PBS a été observée. Afin d'améliorer la stabilité du système PEM, deux voies sont alors possibles. L'une déjà étudiée par A. Martin, correspond à la réticulation du système PEM, après sa construction, par la Gpn. Les résultats n'étant pas concluants, une seconde voie a été envisagée et repose sur un traitement thermique, un recuit, qui est réalisé sur le système PEM après sa construction.

Aussi, afin d'évaluer l'efficacité du recuit, un test de dégradation dans le PBS dont les résultats sont présentés sur la Figure 64 a été réalisé. Les résultats représentent la masse restante en pourcentage en fonction du temps pour chaque échantillon. Les systèmes PEM construits sur le PET-Gpn seront dénommés PEM<sub>n</sub> avec n le nombre de paires de couches.

Aucune dégradation significative n'a été observée sur les échantillons PET et PET-Gpn après 5 semaines, ce qui confirme la stabilité du PET et celle de la couche de CHT réticulé par la Gpn dans ce milieu. En revanche, on constate que les systèmes PEM non recuits subissent une dégradation rapide et importante après 3 jours de séjour dans la solution de PBS. La dégradation se stabilise ensuite après 3 jours correspondant à la dégradation de la



quasi-totalité du système PEM au regard de la fraction en masse du système PEM. Ainsi, le système PEM avec 5,5; 7,5 et 10,5 paires de couches perdent respectivement 10%<sub>m</sub>, 15%<sub>m</sub> et 20%<sub>m</sub> de sa masse, ce qui correspond à la totalité du système PEM. Les échantillons traités par un recuit se dégradent nettement moins avec des taux de dégradation de 4,3%<sub>m</sub>, 4%<sub>m</sub> et 4,5%<sub>m</sub> pour les systèmes PEM avec 5,5; 7,5 et 10,5 respectivement.

Le traitement de recuit permet donc d'améliorer de façon significative la stabilité du système PEM dans un milieu salin tamponné tel que le PBS.

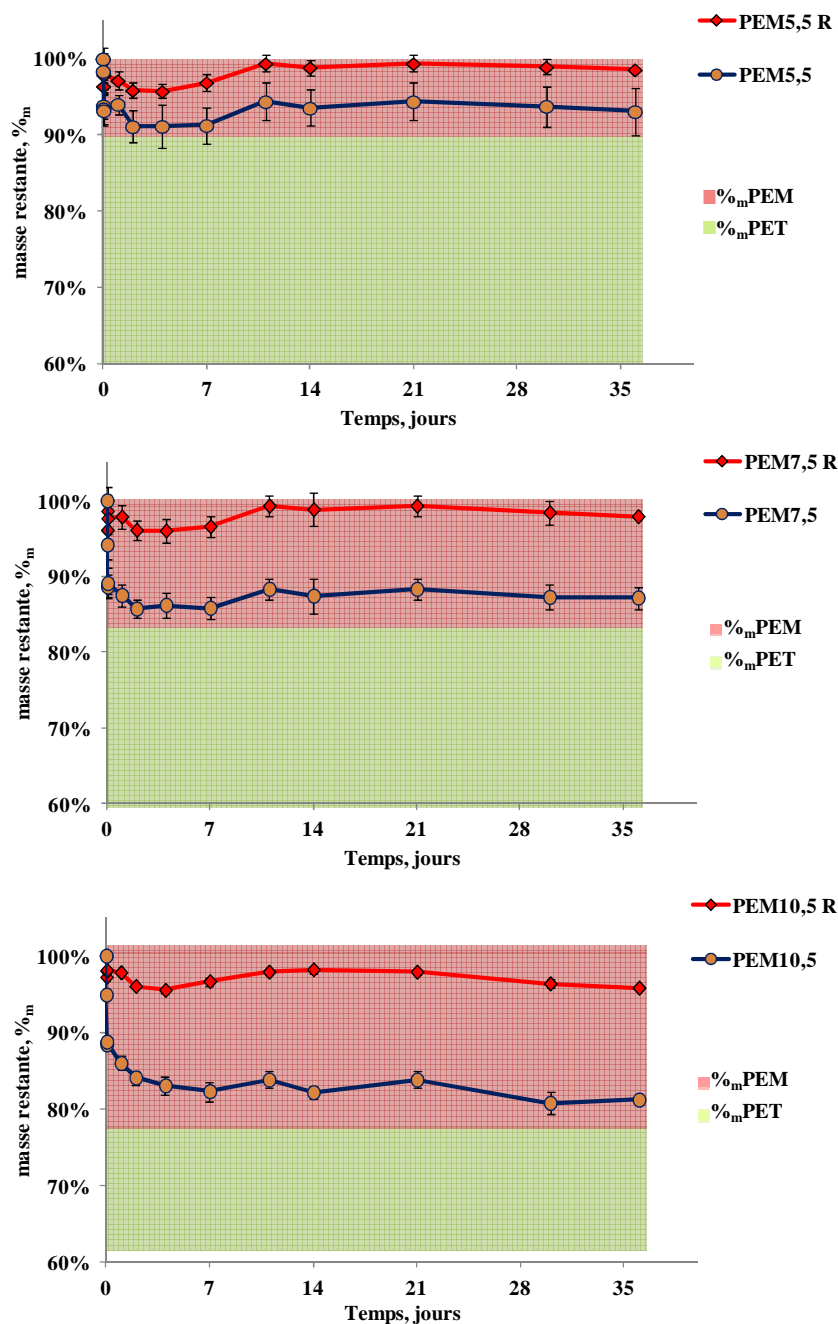


Figure 64. Perte de masse (en %<sub>m</sub>) des systèmes PEM5,5/7,5 et 10,5 recuits (R) ou non dans le PBS à 37°C à 80 rpm (11 mm de diamètre, n=3). Les zones colorées représentent la fraction en masse (%<sub>m</sub>) du PET (vert) et du système PEM (rouge).

### c. Caractérisation physico-chimique

Un dosage des fonctions carboxyliques et amines a été réalisé sur le système PEM afin de mettre en évidence et quantifier la présence du CHT et du polyCTR-Me $\beta$ CD sur le PET en fonction du nombre de paire de couches.

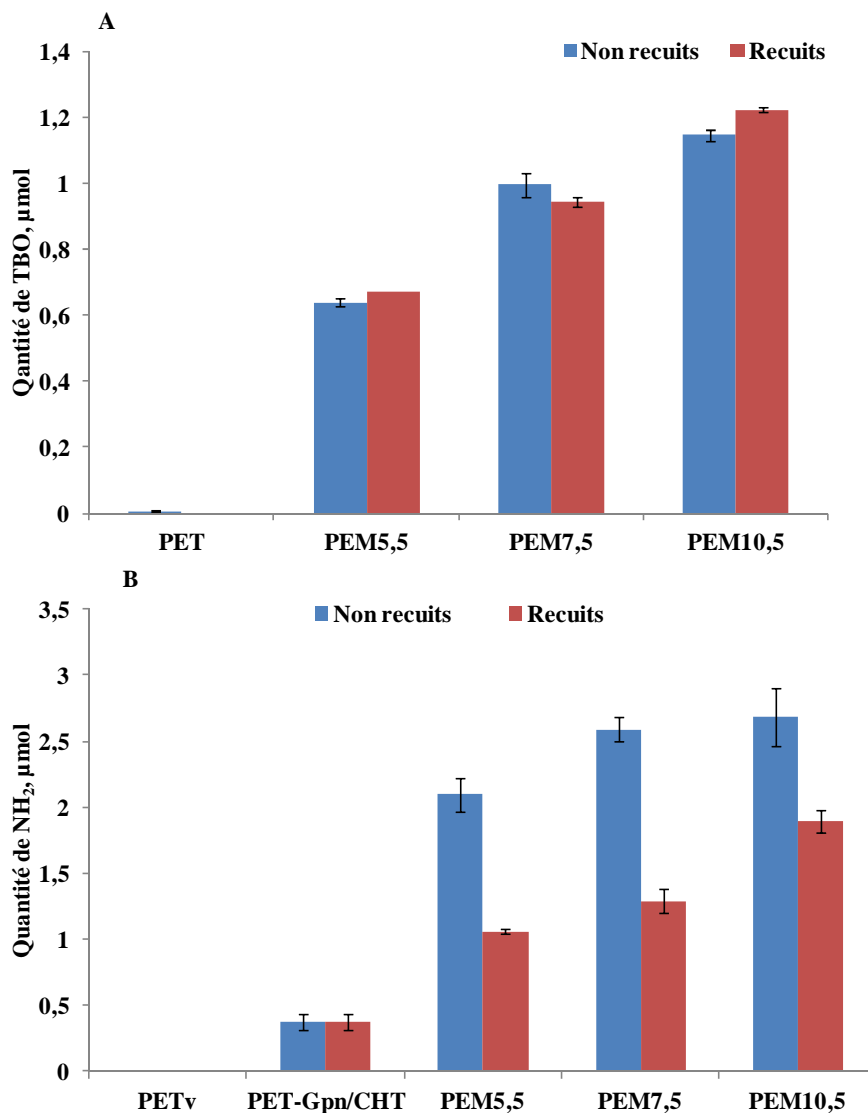
#### ▪ Quantification des fonctions carboxyliques

La Figure 65.A. montre la quantité de TBO adsorbée sur les textiles en fonction d'un nombre de paires de couches croissant. L'adsorption du TBO sur les textiles comprend l'interaction avec les groupements carboxylates ( $-\text{COO}^-$ ) et la formation de complexe d'inclusion avec les CD comme cela a déjà été démontré<sup>145</sup>. L'absence de fonctions carboxyliques sur le PET et le PET-Gpn a été démontrée et on ne remarque pas de différence significative entre les systèmes PEM recuits et non recuits. La quantité de fonctions carboxyliques sur les échantillons recouverts du système PEM augmente avec le nombre de paire de couches avec 0,6  $\mu\text{mol}$  et 0,9  $\mu\text{mol}$  respectivement pour 5,5 et 7,5 paires de couches. La quantité de fonctions carboxyliques est donc 1,5 fois plus importante avec 7,5 paires de couches par rapport à 5,5 paires de couches. De même la quantité de fonctions carboxyliques est de 1,2  $\mu\text{mol}$  avec 10,5 paires de couches soit 2 fois plus qu'avec 5,5 paires de couches.

Ces résultats montrent que le polymère de CD se dépose proportionnellement au nombre de paire de couches avec environ 0,12  $\mu\text{mol}$  de COOH par couche de polyCTR-Me $\beta$ CD déposée.

#### ▪ Quantification des fonctions amines

Le dosage des fonctions amines est représenté sur la Figure 65.B. Une quantité de 0,4  $\mu\text{mol}$  d'amines est obtenue sur le PET-Gpn. On constate également que l'étape de recuit ne modifie pas la quantité de fonctions amines sur cet échantillon. Sur les systèmes PEM, la quantité de fonctions amines augmente avec le nombre de paires de couches avec un facteur de 1,3 entre le PEM5,5 et le PEM10,5. L'étape de recuit provoque une diminution significative d'un facteur 2 environ de la quantité d'amines libres présentes sur les textiles recuits par rapport aux textiles non recuits. La réduction de la quantité d'amines après l'étape de recuit peut s'expliquer par la consommation des amines dans la formation de liaison amide ou par la diffusion difficile de l'AO à travers le système PEM plus dense.

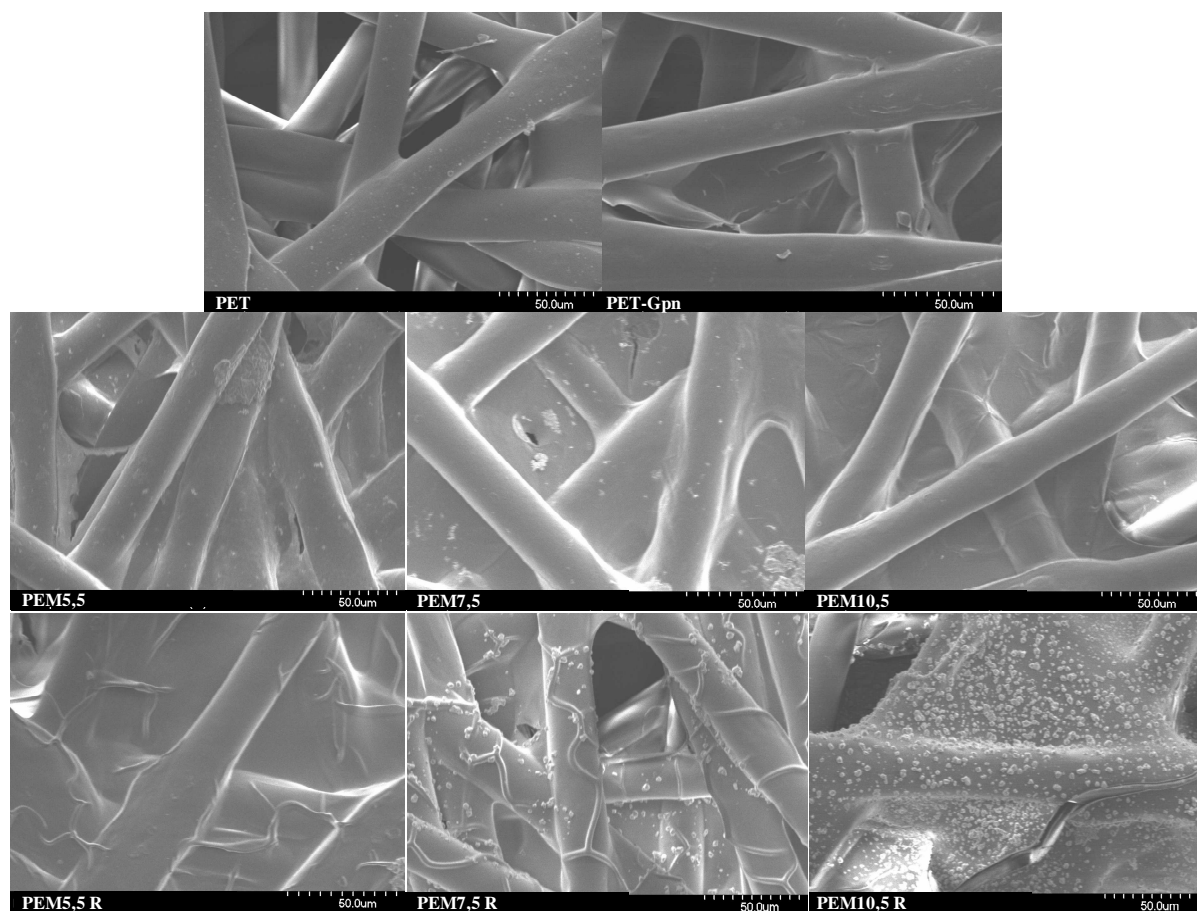


**Figure 65. Quantification des groupements carboxyliques (A) et amines (B) sur le PET-Gpn/CHT et les systèmes PEM avec un nombre de paires de couches croissantes recuits ou non ( $n=3$ ).**

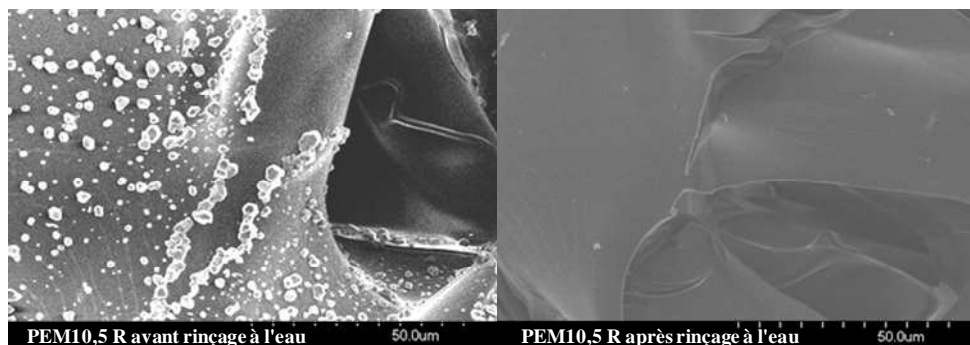
▪ Observation par microscopie électronique à balayage

L'observation de la surface des textiles recouverts d'un système PEM avec un nombre croissant de paires de couches (5,5; 7,5 et 10,5) par microscopie électronique à balayage est présentée sur la Figure 66. Les fibres du PET vierge sont d'apparence lisse, les interstices sont vides et on remarque que certaines fibres sont légèrement déformées et soudées entre elles, dû au procédé de fabrication du textile par calandrage des fibres à chaud. Le PET-Gpn laisse apparaître la présence du polymère à la surface des fibres par une modification de l'apparence des fibres qui sont moins lisses. Le polymère est craquelé au niveau des interstices comblés partiellement par le polymère de CHT. Le nombre croissant en paires de couches du système PEM fait apparaître de plus en plus l'aspect plus rugueux de la surface des fibres. De plus les

interstices sont de plus en plus comblés par les polymères jusqu'à leur obturation totale après 10,5 paires de couches. Les échantillons recuits font apparaître un revêtement polymérique nervuré qui s'accroît avec un nombre de paires de couches croissant. L'apparition de ces nervures peut s'expliquer par une fusion partielle du polymère qui, en refroidissant, formerait ces nervures. Le recuit fait également apparaître la présence de petites particules qui deviennent plus nombreuses avec un nombre de paires de couches croissant. La surface du PEM10,5 R est recouverte à 80% de ces particules. Un grossissement plus important réalisé a permis de révéler qu'il s'agit de cristaux. Une analyse par EDX a révélée qu'il s'agit de cristaux de sels et un rinçage par de l'eau distillée a permis de les éliminer totalement comme le montre la Figure 67.



**Figure 66.** Observation microscopique réalisée par MEB du PET, du PET-Gpn et des systèmes PEM avec un nombre de paires de couches croissants recuits ou non.

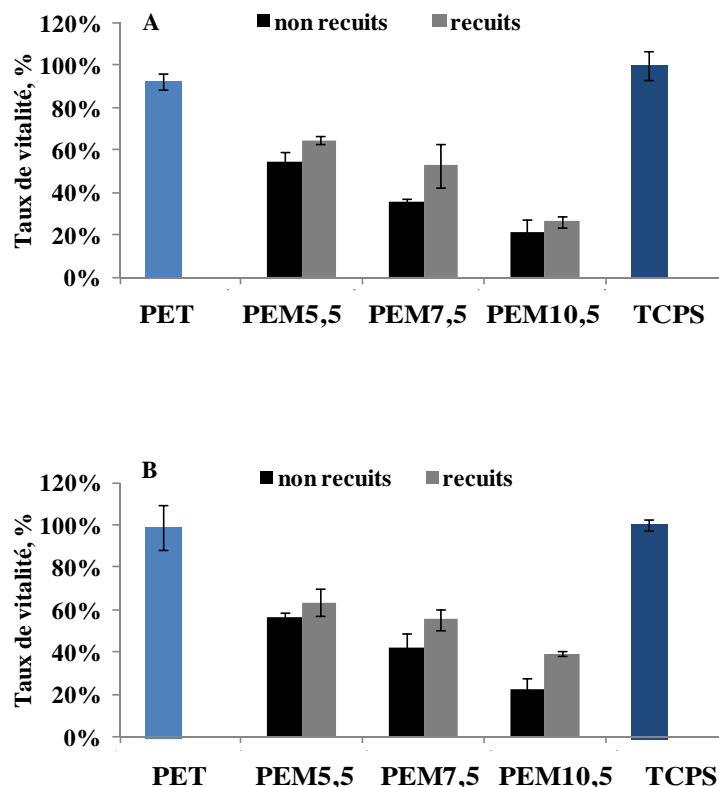


*Figure 67. Observation réalisée par MEB du PEM10,5 R avant et après rinçage à l'eau distillée.*

### 3. Évaluation biologique

L'évaluation biologique réalisée par un test de vitalité sur les cellules L132 (Figure 68), permet d'évaluer la cytocompatibilité des différents systèmes PEM (nombre de paires de couches et recuit).

Le PET rapporte des taux de vitalité supérieurs à 90% à 3 et 6 jours de culture, ce qui témoigne du caractère cytocompatible du PET. Cependant les taux de vitalité pour les échantillons recouverts d'un système PEM présentent des taux de vitalité inférieurs à 70% quel que soit le temps de culture, le nombre de paires de couches et le traitement thermique. On remarque également que le taux de vitalité diminue avec le nombre de paires de couches croissant quel que soit le temps de culture et le traitement thermique, de 54 à 21% et de 57 à 22% à 3 et 6 jours respectivement pour les échantillons non recuits. De même pour les échantillons recuits, le taux de vitalité diminue également avec le nombre de paires de couches de 65 à 26% et 64 à 39% à 3 et 6 jours respectivement. Une tendance se dégage de ces résultats à savoir que les taux de vitalité sur les échantillons recuits sont plus élevés par rapport aux échantillons non recuits. Le traitement thermique permet, comme nous l'avons démontré précédemment, de diminuer de façon significative la dégradation du système PEM et donc de diminuer significativement la libération de polymère dans le milieu de culture. Cela permet d'écarter l'hypothèse d'une concentration toxique en polymères dans le milieu de culture. Au regard des résultats obtenus avec les échantillons recuits, la diminution du taux de vitalité avec un nombre croissant de paires de couches peut s'expliquer par un effet de surface (topographie de surface).



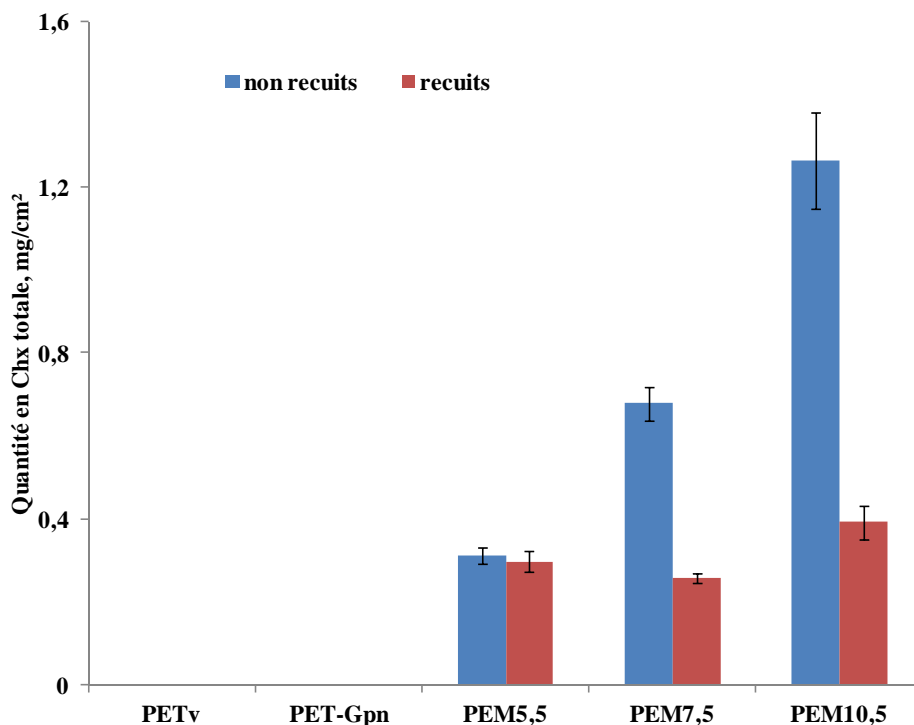
**Figure 68.** Taux de vitalité des cellules L132 ensemencées sur le PET et les systèmes PEM5,5 / 7,5 et 10,5 (15 mm de diamètre) pendant 3 (A) et 6 jours (B) à 37°C.

#### 4. Activation du système PEM par la chlorhexidine

##### a. Chargement de la chlorhexidine

Après avoir construit le système PEM, il a été chargé par imprégnation dans une solution de Chx à 0,4 mg/mL à raison de 5 mL par échantillon (Ø 11 mm). Une quantification a ensuite été réalisée sur les textiles chargés pour étudier l'influence du nombre de paires de couches et du recuit sur le chargement de la Chx. La quantification de la Chx totale chargée sur les systèmes PEM a été réalisée par HPLC. Aucune trace de Chx n'est détectée sur les textiles PET et PET-Gpn/CHT, ce qui indique que la présence de polyCTR-Me $\beta$ CD, dans ce cas, est indispensable pour permettre le chargement de Chx. En effet, la quantité totale en Chx sur les systèmes PEM augmente avec le nombre de paires de couches. Une quantité en Chx 4 fois plus élevée est retrouvée sur le PEM10,5 par rapport au PEM5,5. En revanche, les systèmes PEM recuits ne permettent pas de charger plus de 0,30 mg/cm<sup>2</sup> de Chx quel que soit le nombre de paires de couches. Cela peut s'expliquer par le traitement recuit qui rend le système PEM plus dense, empêchant ainsi la diffusion de la Chx au sein du système PEM. La Chx diffuserait au niveau des couches les plus superficielles uniquement, ce qui pourrait expliquer la différence observée entre les échantillons non recuits et recuits.

La présence du polyCD, apporté par le système PEM, est indispensable pour permettre le chargement efficace de Chx sur le textile au regard des résultats obtenus pour le PET et le PET-Gpn/CHT.



**Figure 69. Quantification de la Chx totale chargée sur les systèmes PEM en fonction du nombre croissant en paires de couches (11 mm de diamètre, n=3) par HPLC.**

**b. Cinétique de libération de la chlorhexidine**

L'étude de la cinétique de libération de la Chx dans une solution tampon de PBS pH 7,4 a ensuite été réalisée afin d'évaluer l'influence du nombre de paires de couches et du traitement thermique sur la cinétique de libération.

L'analyse a été réalisée par HPLC afin de s'affranchir de l'absorbance parasite du système PEM dans le dosage de la Chx. La Figure 70 montre les résultats exprimés en quantité de Chx libérée par échantillon (Ø 11 mm). On constate que la quantité de Chx libérée est plus importante avec un nombre de paires de couches croissant. En effet, après 50 jours, la quantité de Chx libérée est 1,5 fois plus élevée pour le PEM10,5 par rapport au PEM5,5. En revanche, pour les textiles recuits, la dose de Chx libérée après 50 jours est inversement 1,5 fois plus élevée pour le PEM5,5 R par rapport au PEM10,5 R. Les doses libérées sont plus élevées avec les systèmes PEM non recuits.

La Figure 71 présente les résultats exprimant la quantité de Chx totale libérée par rapport à la quantité totale de Chx chargée avant libération. On constate que la libération de la Chx est plus lente pour les systèmes PEM contenant un nombre croissant de paires de couches. En effet, que les échantillons soient traités ou non par le recuit, après 10 jours de libération 70%, 43% et 30% de la Chx est libérée pour les systèmes PEM5,5 / 7,5 et 10,5 non recuits et 60%, 32% et 14% pour les systèmes recuits. Après une quarantaine de jours de libération, seuls les systèmes PEM avec 5,5 paires de couches atteignent un plateau.

Le nombre de paires de couches permet de prolonger la libération de la Chx que les échantillons soient recuits ou non et il permet également de libérer des quantités plus importantes en Chx pour les systèmes PEM non recuits. Le recuit permet, également, de prolonger de façon significative le temps de libération de la Chx.

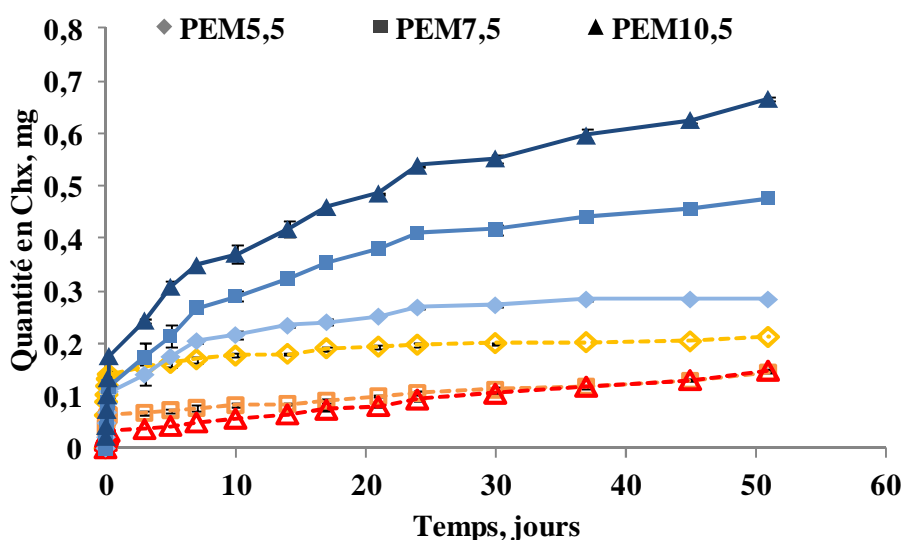


Figure 70. Quantité totale de Chx libérée en fonction du temps pour les systèmes PEM5,5/7,5 et 10,5 non recuits (■) et recuits (□).

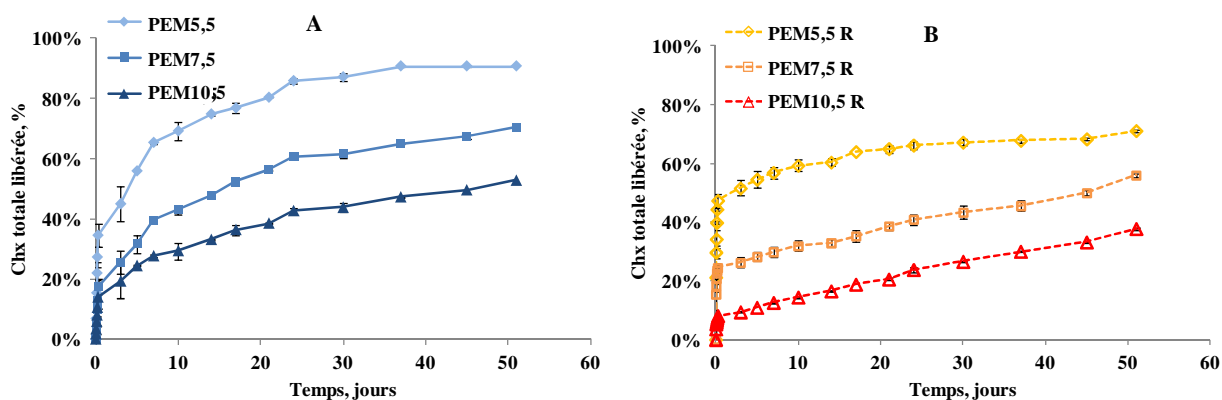


Figure 71. Quantité totale de Chx libérée en pourcentage de la quantité totale chargée en fonction du temps pour les systèmes PEM5,5/7,5 et 10,5 non recuits (A) et recuits (B).



c. Évaluation microbiologique

Un test de diffusion basé sur le principe d'un antibiogramme a été réalisé afin d'évaluer la durée d'efficacité antibactérienne des systèmes PEM chargés par la Chx.

La Figure 72 montre les zones d'inhibition qui ont été obtenues, après 24 heures à 37°C autour des puits contenant le milieu de libération.



**Figure 72. Photographie des zones d'inhibition obtenues après le dépôt de 50  $\mu$ L du milieu de libération dans des puits réalisés sur une gélose MHAensemencée par *S. aureus* (24 heures d'incubation à 37°C).**

La Figure 73. A. montre les diamètres de la zone d'inhibition obtenus pour les systèmes PEM non recuits chargés par la Chx. La Figure 71. B. montre les résultats obtenus avec les systèmes PEM recuits et chargés par la Chx. Comme le montre la Figure 72, le diamètre des puits dans lesquels ont été déposés les prélèvements est de 6 mm et définit ainsi la limite de détection pour ce test. Sur la Figure 73, rapportant le diamètre de la zone d'inhibition pour les systèmes PEM chargés par la Chx, une zone d'inhibition est observée quel que soit le nombre de paires de couches, le recuit et le temps de libération. Seul les textiles PEM5,5 montrent une zone d'inhibition non significative après 50 jours de libération. Cela indique que la quantité en Chx sur ce système PEM est épuisée au bout de 50 jours. Ceci peut s'expliquer par l'épuisement de cet échantillon en Chx, confirmé sur la Figure 70.

Le chargement de la Chx sur le système PEM permet de charger une quantité suffisante permettant d'observer une activité antibactérienne jusqu'à 50 jours.

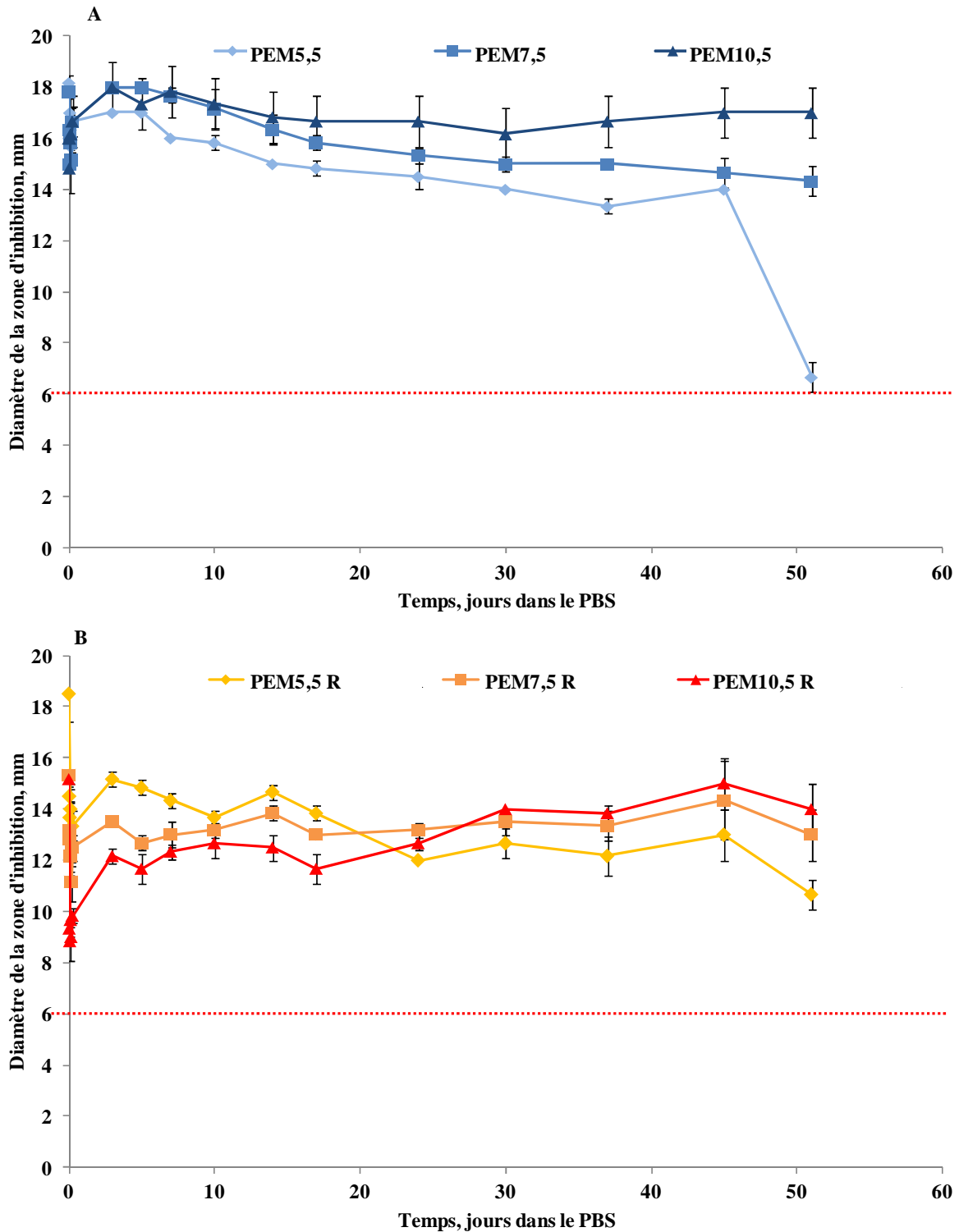


Figure 73. Mesure du diamètre de la zone d'inhibition sur *S. aureus* (CIP224) pour les systèmes PEM5,5/ 7,5 et 10,5 recuits (A) ou non (B) (diamètre du puits-dépôt de 6 mm,  $n=3$ ).

La capacité du système PEM à charger un principe actif lipophile tel que la Chx augmente avec un nombre de paires de couches croissant pour un système non recuit. La quantité en Chx chargée sur un système PEM recuit n'est pas influencée par le nombre de

paires de couches mais la libération est prolongée par rapport à un même système non recuit. L'efficacité antibactérienne des systèmes PEM chargés par la Chx a été démontrée jusqu'à 51 jours de libération.

L'étude de la construction du système PEM, son chargement par un principe actif lipophile antibactérien, le suivi de la cinétique de libération de ce principe actif et enfin son efficacité antibactérienne ont été démontrés.

### **5. Conclusion de la seconde partie**

Dans cette partie, nous avons démontré que le polyCTR-Me $\beta$ CD est le plus efficace pour solubiliser la Chx grâce aux propriétés intrinsèques de la MeCD et également à la présence du CTR dans le polyCD. Concernant la méthode de chargement du principe actif, nous avons confirmé les résultats obtenus avec un autre principe actif par A. Martin dans ses travaux de thèse, à savoir que la construction du système PEM est plus efficace avec le polyCD non pré-complexé.

De même, nous confirmons la construction linéaire du système PEM, comme l'avait déjà démontré A. Martin sur un autre support, chargé cette fois ci positivement. Le problème de stabilité du système PEM qui s'est également posé lors des travaux d'A. Martin, est résolu par le recuit à 140°C pendant 1h45 comme le montre l'évaluation de la dégradation du système PEM dans le PBS. En effet, les systèmes PEM non recuits sont totalement dégradés après 3 jours alors que ceux recuits montrent une dégradation de moins de 5% après 35 jours.

La cytocompatibilité des supports, évalués par les taux de vitalité, rapportent des taux inférieurs à 60%. Cependant, l'évaluation biologique réalisée sur les polymères utilisés ne montre pas de toxicité.

La quantification des fonctions carboxyliques, apportées par le polyCTR-Me $\beta$ CD, montre un dépôt proportionnel du polyCTR-Me $\beta$ CD en fonction du nombre de paires de couches que les échantillons soient recuits ou non. Le chargement de la Chx, est corrélé avec les résultats obtenus pour les systèmes PEM non recuits car la quantité de Chx chargée augmente proportionnellement avec le nombre de paires de couches. Le chargement de la Chx sur les systèmes PEM recuits est indépendant du nombre de paires de couches et est constant sur ces différents systèmes.

Les doses de Chx libérées augmentent avec le nombre de paires de couches pour les systèmes PEM non recuits et diminuent avec le nombre de paires de couches pour les systèmes PEM recuits. La libération de la Chx est donc prolongée pour les systèmes PEM

### Chapitre III: Résultats

recuits malgré des quantités en Chx plus faibles sur ces systèmes. De plus, la quantité de Chx totale libérée après 50 jours est plus importante pour les systèmes PEM non recuits par rapport aux systèmes recuits. Le recuit permet donc de prolonger la libération de la Chx en régulant sa libération.

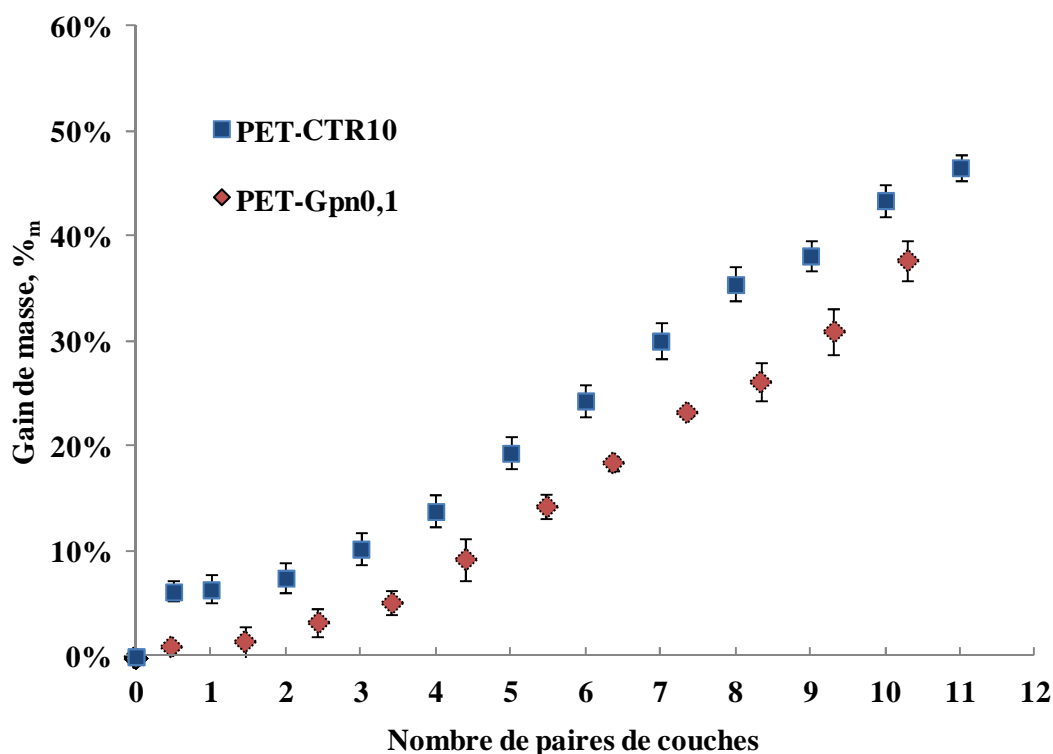
L'évaluation microbiologique réalisée démontre l'efficacité antibactérienne du système PEM sur 50 jours. Pour les systèmes PEM non recuits, les diamètres de la zone d'inhibition semblent diminuer progressivement en fonction du temps alors que pour les systèmes PEM recuits, les diamètres semblent relativement stables en fonction du temps. Ces résultats confirment ceux obtenus pour la cinétique de libération de la Chx.

### **Partie 3 : Construction d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag**

#### **1. Comparaison de la construction du système PEM avec le PET-CTR10**

Nous avons démontré qu'il était possible de construire le système PEM sur le PET-Gpn0,1. Dans cette partie, nous avons étudié la construction du système PEM sur le PET-CTR10 afin de vérifier que la construction de celui-ci se réalise de la même façon.

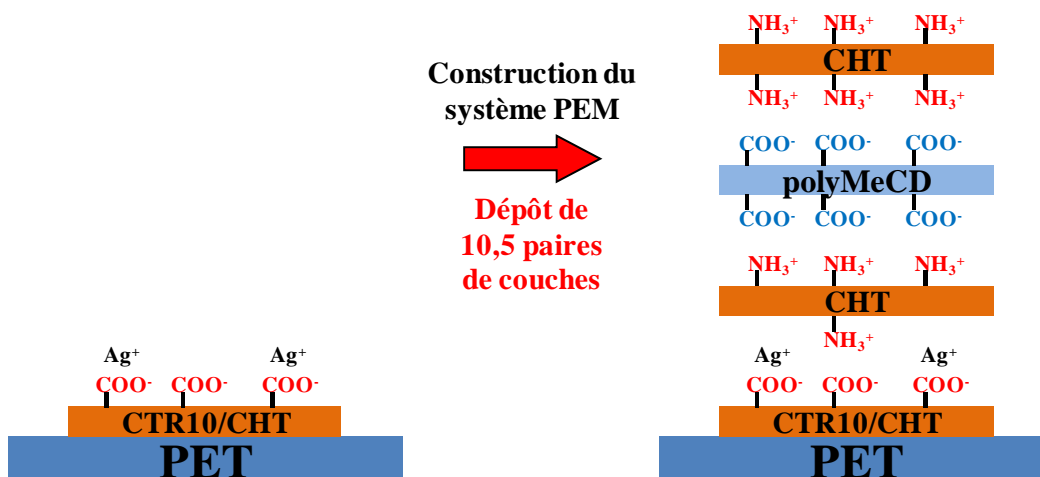
On constate que les gains de masse évoluent de la même façon pour le PET-CTR10 par rapport au PET-Gpn0,1 en fonction du nombre de paires de couches. La différence observée dès 0,5 paires de couches correspond à la prise de masse du textile lors de sa fonctionnalisation à savoir  $6\%_m$  et  $1\%_m$  pour le PET-CTR10 et le PET-Gpn0,1 respectivement. L'écart de gain de masse entre ces deux textiles reste le même après le dépôt de chaque paire de couches; ce qui indique que la construction du système PEM évolue de la même façon sur ces deux textiles.



*Figure 74. Évolution du gain de masse en fonction du nombre de paires de couches sur le PET-CTR10 et le PET-Gpn0,1.*

## 2. Construction d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag

Nous rappelons que la construction du système PEM sur le PET-CTR10 chargé par l'Ag a pour objectif de limiter la libération de l'Ag hors du dispositif. Pour cela le système PEM est construit directement au-dessus du PET-CTR10-Ag comme le montre la Figure 75.

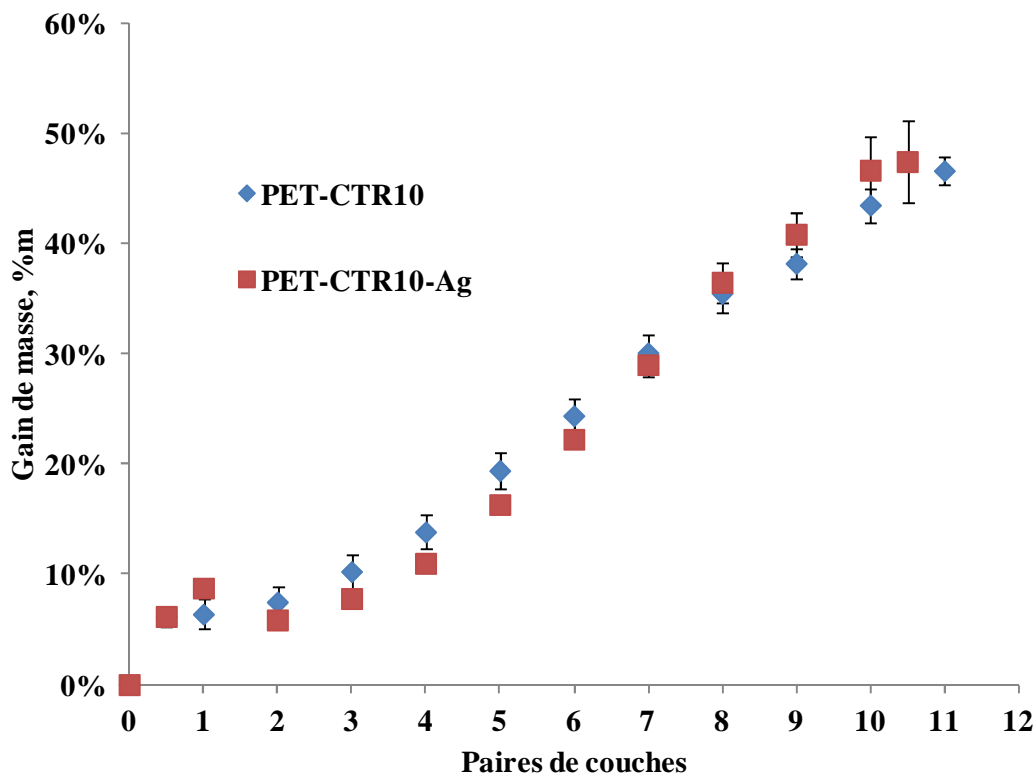


**Figure 75. Principe de la construction du système PEM sur le PET-CTR10-Ag.**

Nous avons démontré que la construction du système PEM se réalise de la même façon sur le PET fonctionnalisé par le CHT avec la Gpn ou le CTR. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si la présence d'Ag sur le textile influence la construction du système PEM. La construction d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag a donc été réalisée en comparaison avec le PET-CTR10 afin d'évaluer l'influence de l'activation par l'Ag sur la construction du système PEM.

On remarque que la présence d'Ag sur le textile fonctionnalisé (Ag considéré comme une monocouche) ne montre pas de différence significative dans l'évolution du gain de masse au regard de celle du PET fonctionnalisé sans Ag.

### 3. Évolution de la construction



*Figure 76. Évolution du gain de masse en fonction du nombre de paire de couches sur le PET-CTR10 chargé ou non avec l'Ag. L'évolution du gain de masse sur le PET-Gpn est représentée en comparaison en rose (PEM10,5).*

### 4. Évaluation de la stabilité du système PEM

L'étude de la dégradation a ensuite été réalisée sur les systèmes PEM chargés par l'Ag afin d'évaluer l'influence de la présence d'Ag sur la stabilité du système PEM. Les résultats sont présentés dans la Figure 77.

On constate que la dégradation en fonction du temps avec le système PEM sur le PET-CTR10 est semblable à celle obtenue précédemment avec le système PEM construit sur le PET-Gpn. La présence d'Ag sur le PET-CTR10 montre une dégradation légèrement plus importante du système PEM avec une dégradation du textile de plus de 20%<sub>m</sub>. Cependant, comme cela a été démontré précédemment, le recuit renforce la stabilisation du système PEM et aucune différence significative n'est observée sur la dégradation du système PEM avec ou sans Ag.

La présence d'Ag sur les textiles augmente légèrement la dégradation du système PEM lorsqu'il est non recuit mais ne modifie pas de façon significative la dégradation dans les cas des textiles recuits.

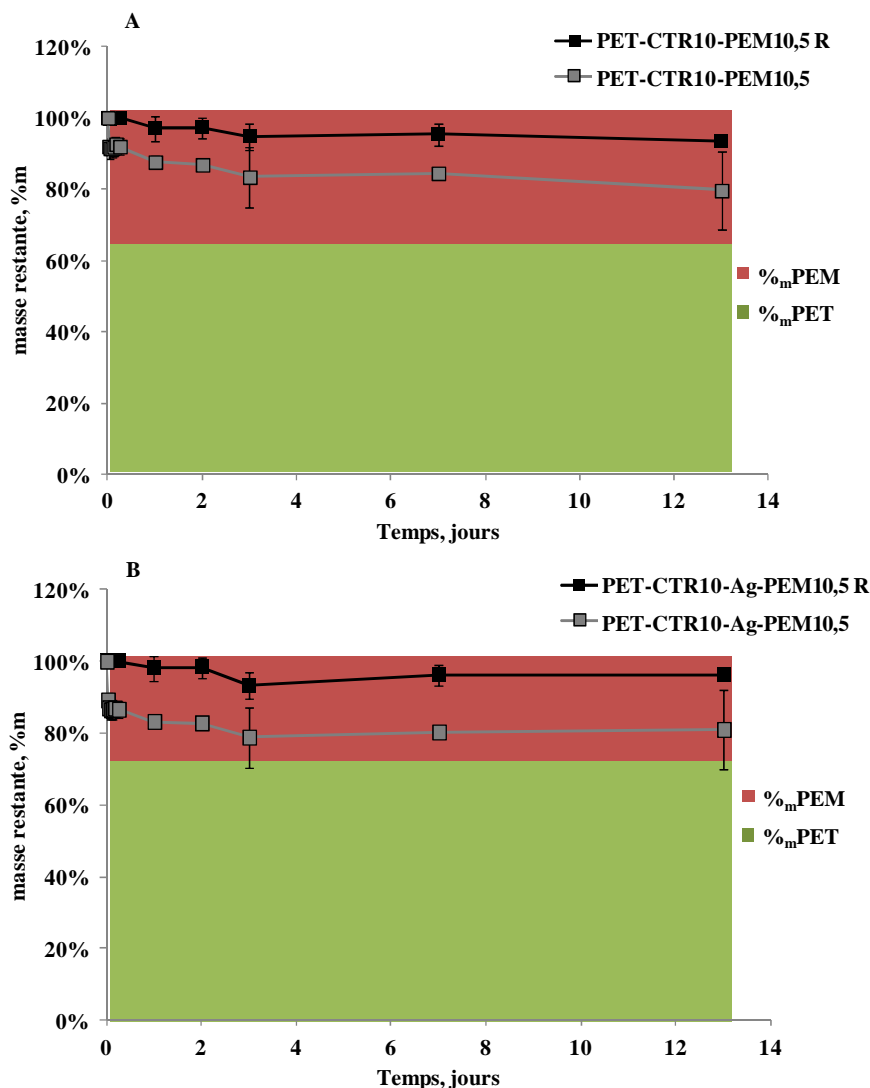


Figure 77. Perte de masse (en %<sub>m</sub>) du système PEM10,5 construit sur le PET-CTR10 avec (B) ou sans Ag (A) recuits (R) ou non, dans le PBS à 37°C à 80 rpm (11 mm de diamètre, n=3). Les zones colorées représentent la fraction en masse (%<sub>m</sub>) du PET (vert) et du système PEM (rouge).

### 5. Quantification de l'Ag

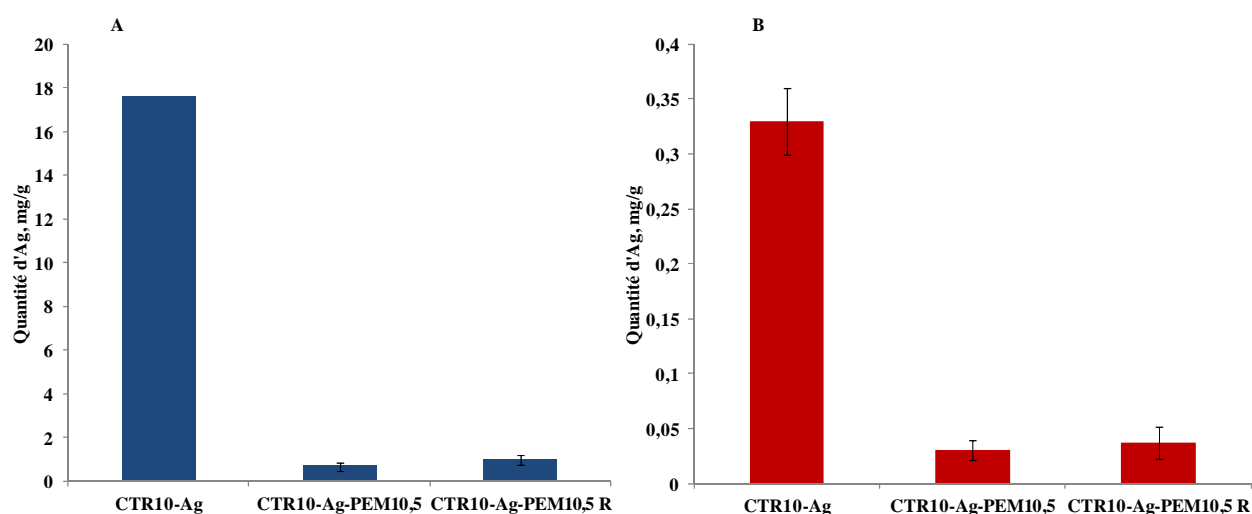
La quantification de l'Ag sur les textiles a donc été réalisée après la construction du système PEM (Figure 78. A.).

On constate que la quantité d'Ag sur les textiles PET-CTR10-Ag est 20 fois plus importante par rapport aux textiles avec le système PEM. Cela signifie que la construction du système PEM sur les échantillons chargés en Ag provoque une perte importante de la quantité d'Ag.



La quantification de l'Ag libérée dans un milieu de libération aqueux a été réalisée afin d'évaluer la capacité du système PEM à limiter la libération de l'Ag hors du système.

Les résultats sont présentés dans la Figure 78. B. La méthode de quantification d'Ag sur les textiles étant destructive, les mêmes échantillons n'ont pu être réutilisés pour la quantification de l'Ag après libération. C'est la raison pour laquelle la quantification de l'Ag a été réalisée sur les milieux de libération. On constate que la quantité d'Ag libérée sur le système PEM recuit ou non recuit est identique. La quantité d'Ag libérée pour le textile CTR10-Ag est 8,6 fois plus élevée par rapport aux textiles avec le système PEM. Au regard de la quantité d'Ag chargée 1,8% de l'Ag est libéré pour le textile CTR10-Ag alors que pour les textiles avec le système PEM, 4,5% de la quantité d'Ag chargée est libérée.



**Figure 78. A. Quantification de l'Ag chargé sur les textiles (11 mm de diamètre, n=3). B. Quantification de l'Ag libéré dans le milieu de libération après 24 heures à 37°C sous agitation à 80 rpm.**

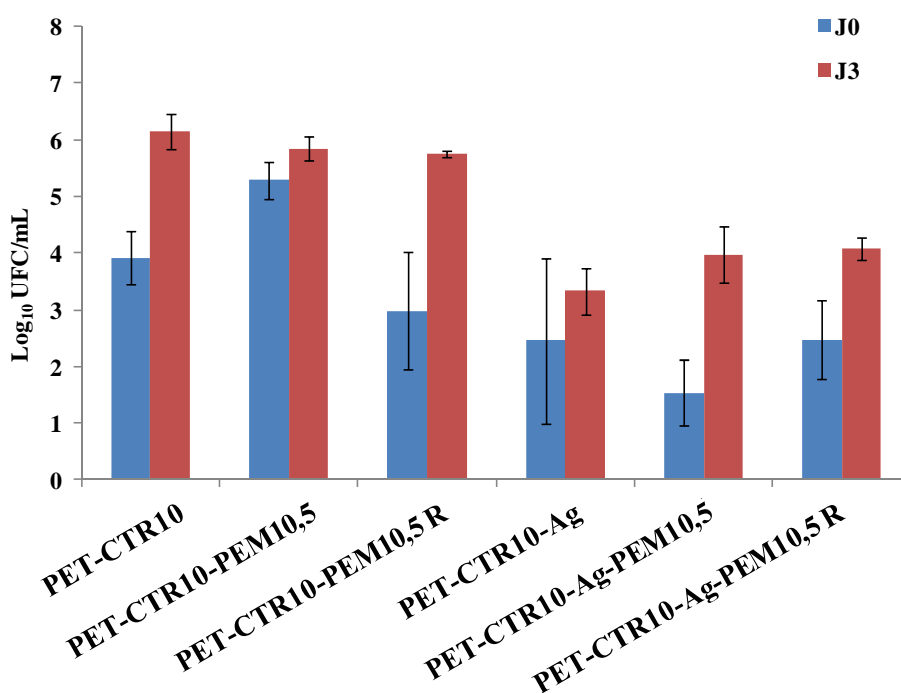
## 6. Évaluation microbiologique

L'évaluation de l'efficacité antibactérienne des textiles chargés d'Ag et recouverts par un système PEM a été réalisée afin d'évaluer l'influence du système PEM sur l'efficacité antibactérienne.

Cette évaluation, menée par un test de *kill-time* sur les textiles avant (J0) et après 3 jours (J3) de libération dans une solution de PBS, est présentée sur la Figure 79. Les témoins sans Ag présentent une réduction bactérienne à J0 de 2, de 0,5 et de 3 Log<sub>10</sub> pour le PET-CTR10, le PET-CTR10-PEM et le PET-CTR10-PEM R respectivement. Cette réduction bactérienne peut s'expliquer par un effet de surface dû à la présence de fonctions acides sur le PET-CHT et les systèmes PEM. En effet, après 3 jours de libération dans une solution de PBS, on remarque que cette activité antibactérienne n'apparaît plus pour ces échantillons. La

solution de PBS exercerait un effet neutralisant sur les fonctions acides. En revanche, on remarque que la réduction bactérienne à J0 sur les échantillons chargés d'Ag présentent une réduction de 1,5; 3,7 et 0,5 Log<sub>10</sub> pour le PET-CTR10-Ag, le PET-CTR10-Ag-PEM et le PET-CTR10-Ag-PEM R respectivement par rapport aux témoins correspondant sans Ag. L'activité antibactérienne des textiles à J3 est significativement maintenue pour les échantillons avec l'Ag, même après le passage dans le PBS. Les résultats obtenus à J3 témoignent de l'efficacité de l'Ag sur les systèmes PEM recuits ou non. Aucune différence significative n'étant observée entre le PET-CTR10-Ag et le PET-CTR10-Ag-PEM, cela signifie que le système PEM n'altère pas l'efficacité de l'Ag chargé sur PET fonctionnalisé.

Le dépôt d'un système PEM sur le PET-CTR10-Ag n'influence pas l'efficacité antibactérienne de l'Ag contre *S. aureus*.

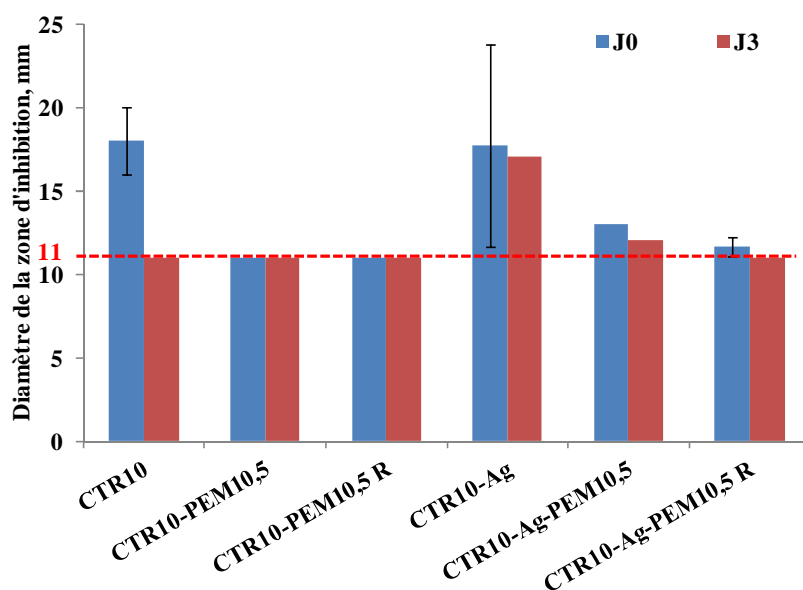


**Figure 79. Nombre de bactéries viables de *S. aureus*, CIP224 avant et après 3 jours de libération des textiles dans le PBS.**

Un test de diffusion a été ensuite réalisé afin d'évaluer l'activité de l'Ag hors du textile. Ce test permet donc d'évaluer la capacité du système à limiter la libération d'Ag hors du système.

On constate une nouvelle fois que le support PET-CTR10 présente un cercle d'inhibition qui s'explique par l'acidité du support qui diffuse dans la gélose. En effet, après un passage dans le PBS pendant 3 jours, la neutralisation de l'acidité par les sels présents dans le PBS permet d'éliminer cette activité intrinsèque de l'enrobage. Cependant, une zone

d'inhibition est observée sur les échantillons PET-CTR10-Ag ayant subi un passage de 3 jours dans le PBS. Ceci montre l'activité de l'Ag présent sur les textiles, même après 3 jours dans le PBS. De plus, on constate que les textiles chargés en Ag et enrobés d'un système PEM ne montrent pas de zone d'inhibition importante par rapport au PET-CTR10-Ag et aux textiles témoins sans Ag. Ceci indiquerait donc que la diffusion efficace de l'Ag est réduite pour les textiles recouverts par le système PEM.



**Figure 80.** Diamètre de la zone d'inhibition observé autour des textiles (11 mm de diamètre) avant et après libération pendant 3 jours dans le PBS à 37 °C sous agitation à 80 rpm.

### Conclusion de la troisième partie

La présence d'Ag sur le PET-CTR10 n'influence pas l'évolution de la construction du système PEM par rapport au textile sans Ag. Cependant la dégradation du système PEM est plus importante après 2 jours pour les systèmes non recuits avec l'Ag par rapport aux textiles sans Ag. Le recuit permet, cependant, de stabiliser les systèmes PEM avec des résultats identiques à ceux obtenus sur le système PEM construit avec le PET-Gpn. De plus la construction du système PEM au-dessus du PET-CTR10-Ag montre une activité antibactérienne de l'Ag identique au PET-CTR10-Ag seul, ce qui indique que le système PEM n'inhibe pas l'activité antibactérienne. On constate cependant que la construction du système PEM cause une perte importante de l'Ag chargé sur le PET-CTR10. Cette différence ne permet pas de conclure sur l'efficacité du système PEM pour limiter la libération de l'Ag.

# Discussion

## **Fonctionnalisation du PET par le chitosane**

### **1. Réticulation par l'acide citrique ou la génipine**

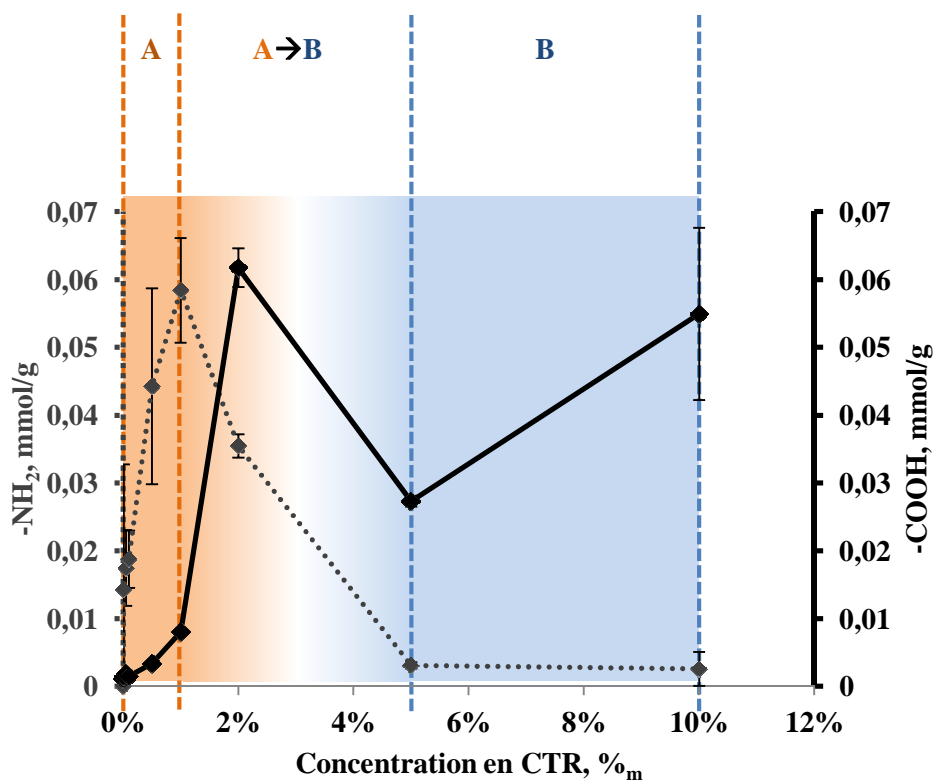
L'utilisation des deux agents réticulants présente chacun son intérêt; le CTR engage une réaction rapide qui nécessite une quinzaine de minutes et la Gpn implique une réaction qui ne nécessite aucun apport d'énergie. Comme le démontrait Butler dans ses travaux, sur l'étude de la réticulation du CHT par la Gpn<sup>86</sup>, la réaction de réticulation fait intervenir deux mécanismes réactionnels que nous avons mis en évidence par spectroscopie UV/Vis (Figure 48). Ces deux réactions qui interviennent sur une même molécule de Gpn conduisent à la formation de liaisons de la Gpn avec deux fonctions amines, indispensables pour obtenir la réticulation du CHT. L'absence de gain de masse observée avec le CHT à 1%<sub>m</sub> et la Gpn à 0,1%<sub>m</sub>, entre le début de la réaction et 24 heures après peut s'expliquer par une réticulation insuffisante du CHT rendant l'enrobage fragile. En effet, les solutions de rinçage, obtenues au soxhlet, se sont colorées en bleu pour ces échantillons. Ceci signifie donc que la réaction de réticulation a bien eu lieu, par l'observation d'une coloration bleue sur les textiles avant lavage, mais insuffisant pour permettre un enrobage suffisamment résistant pour être maintenu sur les textiles après lavage.

La réticulation du CHT par le CTR permet d'obtenir un système modulable par rapport à la nature et la densité des charges présentes à la surface du textile. Lorsque les résultats de la Figure 46 sont repris, comme le montre la Figure 81, on peut ainsi délimiter 3 zones en fonction de la concentration en CTR:

- entre 0 et 1%<sub>m</sub> en CTR: la quantité de CTR est suffisante pour permettre l'enrobage du CHT mais d'après le R<sub>m</sub>, les fonctions amines sont en excès par rapport aux fonctions carboxyliques. D'où la présence majoritaire de fonctions amines.

- entre 1 et 5%<sub>m</sub> en CTR: Il s'agit d'une zone de transition. Le R<sub>m</sub> s'inverse avec un excès de fonctions carboxyliques par rapport aux fonctions amines dans la solution d'imprégnation. Ce qui explique l'augmentation de la quantité de fonctions carboxyliques sur les textiles. La concentration de 5%<sub>m</sub> s'explique par le fait que toutes les fonctions amines ont réagi avec le CTR. Cependant il est possible que certaines fonctions carboxyliques du CTR soient encore réactives (à savoir 2 fonctions sur les 3 du CTR) dûes à leur large excès par rapport aux fonctions amines, et qu'elles réagissent à leur tour sur les groupements hydroxyles du CHT.

- entre 5 et 10%<sub>m</sub>: La quantité de fonctions carboxyliques qui augmente s'explique par la réaction du CTR sur les groupements hydroxyles libres du CHT.



**Figure 81.** Quantité de groupements amines et acide sur le PET-CTR/CHT en fonction de la concentration en CTR dans la solution d'imprégnation. La concentration en CHT est fixée à 2,5%<sub>m/V</sub> et le temps de réaction à 15 minutes.

La réaction du CTR se ferait donc exclusivement avec les fonctions amines du CHT puis, une fois que celles-ci ont réagi, les groupements hydroxyles réagiraient à leur tour avec le CTR. Cela a pu être démontré sur une étude parallèle réalisée sur le polypropylène par spectroscopie infrarouge (**Figure 85**, en Annexe).

Le Rm dans la solution d'imprégnation avec une concentration en Gpn de 0,5%<sub>m/V</sub> et CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> est de 0,1739. Une concentration en CTR de 0,2%<sub>m/V</sub> serait donc nécessaire pour obtenir le même Rm de 0,1739 dans la solution d'imprégnation. Or on constate que seule une concentration en CTR supérieure à 0,5%<sub>m/V</sub> a permis d'obtenir un gain de masse significatif dont la valeur est de 0,92%<sub>m</sub> alors qu'une concentration en Gpn de 0,5%<sub>m/V</sub> a permis d'obtenir un gain de masse de 1,4%<sub>m</sub>. En effet en-dessous d'une concentration en CTR de 0,5%<sub>m/V</sub> dans la solution d'imprégnation, la masse du PET n'a pas augmenté de façon significative. Avec un même Rm, la Gpn est donc plus efficace pour fonctionnaliser le PET avec le CHT.

## 2. Toxicité de la génipine

Concernant la forte toxicité de la Gpn rapportée dans la Figure 54, les résultats de viabilité obtenus sur le polymère de Gpn/CHT (Figure 54) et de vitalité sur le textile PET-

Gpn/CHT (Figure 55) rapportent la cytocompatibilité du revêtement polymérique sur le textile et en solution. Ces résultats indiquent donc que l'utilisation de la Gpn ne représente pas un risque de toxicité pour les cellules une fois réagie avec le CHT. La différence de cytocompatibilité entre le Gpn seule et réticulée s'explique par le fait que son implication dans le polymère réticulé de CHT la rend inactive sur les cellules du fait de la formation de liaisons covalentes avec les fonctions amines du CHT. La réaction totale de la Gpn a été vérifiée avec les eaux de lavage qui n'ont pas montré d'apparition de coloration lorsqu'elles ont été mélangées avec une solution de CHT.

### 3. Intérêt de la fonctionnalisation par le chitosane

Lorsque l'on compare les résultats de vitalité obtenus sur le PET fonctionnalisé par le polyCD et les PET fonctionnalisés par le CHT, il semble que, pour une application en tant que pansement, l'utilisation du CHT semble appropriée. En effet, l'application cutanée d'un tel dispositif est plus justifiée vis-à-vis d'une réponse inflammatoire qui serait provoquée avec le PET-CTR/CD. Compte tenu du renouvellement et des débits faibles des liquides physiologiques au niveau d'une plaie par rapport à une application du PET-CTR/CD en tant que prothèse vasculaire<sup>72</sup>, comme cela a déjà été étudié, l'utilisation du CHT semble donc plus appropriée.

### 4. Activité antibactérienne de l'argent et de l'iode

La réduction bactérienne identique, à 24 heures, observée sur le PET-CTR10-Ag avec *S. aureus* et *E. coli* démontre que la quantité d'Ag sur les textiles est suffisante et au-dessus de la CMI évaluée pour ces deux bactéries. Les différences observées sur la vitesse d'action de l'Ag s'expliquent par les différences de la structure de la paroi bactérienne de ces deux souches. En effet *S. aureus* est une bactérie Gram+ dont la paroi bactérienne comprend une couche de peptidoglycane plus épaisse par rapport à *E. coli*. La pénétration des ions  $\text{Ag}^+$  serait donc ralentie pour les bactéries Gram+. Afin de confirmer la vitesse d'action différente entre les Gram+ et les Gram-, une étude complémentaire sur d'autres souches bactériennes devrait être réalisée. Cependant une étude réalisée par Jung *et al*<sup>146</sup> a déjà démontré cette différence d'action de l'Ag sur ces deux bactéries.

L'efficacité antibactérienne sur *S. aureus* avec le PET-CTR1-I démontre que l'iode chargé sur le textile possède une activité bactéricide. Compte tenu de la forme active antibactérienne,  $\text{I}_2$ , et de la charge cationique du support, cela indique donc que la forme  $\text{I}_3^-$  serait la forme principalement chargée sur les textiles. Il serait possible alors d'améliorer le

chargement de ce complexe en déplaçant l'équilibre de la réaction décrite en 5. avec un excès de l'espèce I à une température inférieure à 25°C.

### **Intérêt et propriétés du système PEM**

La construction du système PEM suit une évolution relativement linéaire comme le démontrait A. Martin. L'évolution faible de la construction du gain de masse lors du dépôt des premières paires de couches (jusqu'à 3,5 paires de couches) s'expliquerait par une différence de densité de charge nécessaire à la construction du système PEM par rapport au support PET-CTR/CD utilisé par A. Martin. La construction du système PEM sur le PET-Gpn et le PET-CTR nécessiterait donc, dans un premier temps, d'accumuler suffisamment de charges avant de se construire de façon linéaire.

Au regard des résultats obtenus dans l'évaluation de la dégradation sur la Figure 64, on constate que la dégradation du système PEM est rapide (en 3 jours) pour les systèmes non recuits. L'intérêt du recuit est démontré dans la stabilisation du système PEM car après 35 jours une dégradation du système PEM de seulement 5% est observée. Cependant, au regard des résultats obtenus pour la libération de la Chx chargée sur le système PEM (Figure 70 et Figure 71), les systèmes PEM non recuits comprenant 7,5 et 10,5 paires de couches libèrent la Chx jusqu'à plus de 50 jours. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus pour la dégradation du système PEM qui rapportaient une dégradation du système PEM en 3 jours. Cette différence peut s'expliquer par une augmentation de la stabilité du système PEM grâce à la Chx.

La présence des sels observés sous forme de cristaux par MEB peut s'expliquer par l'utilisation d'eau distillée dans la préparation des solutions d'imprégnation.

### **Chargement et interaction de la chlorhexidine avec le système PEM**

L'étude de la solubilisation de la Chx par plusieurs CD et leurs polymères associés décrite dans la Figure 59 rapporte une solubilisation proportionnelle à la concentration en CD ou en polyCD. La solubilisation de la Chx avec les CD utilisées suit une évolution linéaire. La solubilisation de la Chx par le polyCD fait intervenir également des interactions ioniques entre les fonctions carboxyliques du polyCD et les fonctions amines de la Chx. L'augmentation de la solubilisation observée avec le polyCD par rapport à la CD seule s'explique par ce phénomène. La participation des fonctions carboxyliques résiduelles du CTR contribue à la solubilisation de la Chx. Cependant le rôle de la CD dans la solubilisation de la Chx est démontré grâce aux résultats obtenus avec la MD et la polyMD. En effet, la



solubilisation de la Chx seule n'a pu être évaluée par l'impossibilité de filtration des solutions contenant la MD seule. De plus, le polyMD n'a permis de réaliser une filtration que pour les concentrations inférieures à 20 mg/mL en polyMD. La MD ne possède pas la capacité de former des complexes d'inclusion de par sa conformation linéaire associant 2 à 20 molécules de glucose liées par des liaisons  $\alpha$ 1-4 contrairement aux CD qui présentent une structure cyclique formant une cavité hydrophobe.

La méthode de chargement de la Chx après la construction du système PEM est plus appropriée que l'utilisation d'un polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexé avec la Chx. En effet, les quantités en Chx sont plus élevées sur les systèmes PEM imprégnés dans la solution de Chx que ceux obtenus avec le polyCTR-Me $\beta$ CD pré-complexé. Les résultats ont permis de confirmer ceux obtenus par A. Martin.

La quantité de Chx chargée sur des systèmes PEM contenant un nombre de paires de couches croissant rapportent des quantités croissantes de Chx chargée sur les systèmes PEM non recuits. En revanche, le recuit influence le chargement car pour les échantillons recuits, la quantité de Chx chargée n'évolue plus en fonction du nombre de paires de couches (Figure 68) et est identique quel que soit le nombre de paires de couches. L'augmentation de la densité du système PEM par le recuit limiterait donc la diffusion de la Chx au sein du système PEM. De plus, les fonctions carboxyliques résiduelles apportées par le CTR du polyCTR-Me $\beta$ CD sont probablement partiellement consommées lors du recuit et ne peuvent donc plus participer au chargement de la Chx. La Chx serait donc chargée principalement sur les couches superficielles de polyCTR-Me $\beta$ CD. Cependant, malgré la quantité plus faible en Chx chargée sur les systèmes PEM recuits, la libération de la Chx est prolongée par rapport aux systèmes non recuits (Figure 70) et montre une activité antibactérienne significative. Il n'est pas nécessaire et justifié de vouloir charger plus de Chx compte tenu de l'efficacité antibactérienne du système chargé par la Chx et de sa libération prolongée. La question se poserait, cependant, vis-à-vis du chargement d'un autre principe actif dont l'activité serait dose-dépendante.

### **Biodisponibilité des agents antibactériens**

Quel que soit le nombre de paires de couches et le traitement recuit ou non, l'efficacité antibactérienne des supports textiles chargés par la Chx est toujours présente après 40 jours. Au regard d'une des problématiques posées au départ, la nécessité d'obtenir un pansement ayant une activité antibactérienne jusqu'à 3 jours est largement obtenue. Cependant, une activité prolongée au-delà de 3 jours dépasse les nécessités et l'utilisation d'un tel dispositif.

En effet, un tel pansement ne serait pas appliqué sur la peau pour une durée d'utilisation dépassant plus de 3 jours.

La construction d'un système PEM sur les textiles chargés par l'Ag ne modifie pas de façon significative son action bactéricide. Cela indique donc que le système PEM ne modifie pas l'action de l'Ag malgré la présence de nombreuses charges au sein du système PEM et la perte d'Ag lors de la construction du système PEM. On peut noter que les quantités en Ag chargées sur le PET-CTR10 sont 2,7 fois moins élevées que d'autres pansements déjà commercialisés tel que UrgoTul Ag® qui contient 0,35 mg/cm<sup>2</sup> d'Ag<sup>147</sup> tout en conservant une activité antibactérienne comparable.

### **Cytocompatibilité du système PEM**

Les taux de vitalité obtenus sur les systèmes PEM sont inférieurs à 60%. Ceci indique donc que les cellules prolifèrent plus faiblement sur les textiles par rapport au contrôle et au PET vierge. Cependant, il faut souligner que le but du dispositif est d'être appliqué sur la peau afin de créer une barrière synthétique. On peut donc considérer que les taux de vitalité relativement faibles constituent un avantage pour un tel dispositif puisque l'objectif du pansement est d'éviter, au contraire, la colonisation du pansement par les cellules. Ainsi, lors du retrait du pansement, les tissus néoformés ne seront pas arrachés avec le dispositif. Ceci devrait être vérifié par des tests in vivo pour évaluer la réponse inflammatoire et l'intégrité du tissu nouvellement formé après le retrait du textile.

### **Argent et système PEM**

Après la construction du système PEM, une perte d'Ag importante a été démontrée. Cette perte peut s'expliquer par un phénomène de compétition d'une part avec le CHT chargé positivement qui interagit avec les fonctions carboxylates sur lesquels l'Ag interagissait et d'autre part avec le polyMe $\beta$ CD qui contient des fonctions carboxyliques qui peuvent interagir avec l'Ag chargé sur le textile. Ce phénomène a pu être observé par la coloration des solutions d'imprégnation indiquant que l'Ag chargé sur les textiles se retrouve en partie dans la phase liquide lors des étapes d'imprégnation. Pour cette raison, l'Ag, sur les systèmes PEM, est donc présent sur l'ensemble des couches constituant le système PEM. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'Ag sur les systèmes PEM est libéré avec des taux de 4,5% sur la quantité totale d'Ag sur les textiles par rapport au 1,8% d'Ag libéré par le PET-CTR10-Ag. Au regard des résultats obtenus sur la dégradation du système PEM, il est donc possible que l'Ag quantifié

## Discussion

dans le milieu de libération soit dû à la dégradation du système PEM et donc d'une partie de l'Ag présent au sein du système. Afin de vérifier l'intérêt du système PEM à limiter la libération d'Ag, il serait donc nécessaire de s'affranchir de la présence d'Ag au sein du système PEM. Des résultats préliminaires réalisés sur l'évaluation de la cytocompatibilité ont révélés une toxicité du système PEM plus élevée avec les textiles chargés par l'Ag. Cela pourrait s'expliquer également par la présence d'Ag au sein du système PEM.

# Perspectives

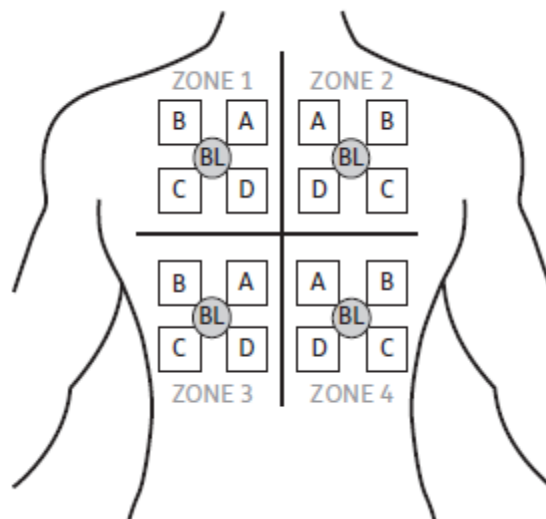
### Amélioration du dispositif

Afin de s'affranchir de la présence d'Ag au sein du système PEM, la construction devrait être réalisée avec des solutions d'imprégnation renouvelées. Une évaluation biologique et microbiologique devra ensuite être réalisée afin de confirmer les résultats obtenus et la capacité du système PEM à limiter la libération de l'Ag hors du système.

Le chargement du système PEM par un antalgique devrait permettre d'obtenir un système présentant à la fois une activité antibactérienne, par la présence d'Ag sur le textile fonctionnalisé, et, un effet antalgique par le chargement d'un principe actif, tel que la ropivacaïne au sein du système PEM, qui serait libéré au niveau local.

### Évaluation *in vivo*

L'efficacité antibactérienne des textiles devra être reconfirmée par un test *in vitro* sur un panel de souches plus larges puis par une évaluation biologique *in vivo*. Afin d'évaluer l'influence du dispositif sur la flore cutanée commensale, il est possible d'utiliser la méthode décrite par Carty<sup>165</sup> et en accord avec la *Food and Drug Administration* (FDA) et la Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH). Le principe repose sur l'évaluation de la réduction bactérienne avant et après application du pansement sur différentes zones.



**Figure 82. Diagramme illustrant les démarcations du dos en quatre zones subdivisées en quatre sous-sections A, B, C et D. La densité bactérienne de base est réalisée au centre de chaque zone et dénommée BL. Carty et al.<sup>165</sup>**

L'évaluation antibactérienne devra également être réalisée sur d'autres souches telles que le SARM, le *P. aeruginosa* et sur des souches de cas cliniques. Cette étude pourra être

## Perspectives

réalisée sur un modèle murin infecté, déjà utilisé par l'équipe pour l'étude *in vivo* d'une prothèse vasculaire, qui devra être adapté par rapport à une application locale cutanée.

Une étude histomorphométrique sera réalisée pour évaluer la réponse inflammatoire. Pour cela, les acteurs cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire seront recherchés au niveau de coupes histologiques après la réalisation d'un marquage spécifique. Le niveau de réponse inflammatoire permettra ainsi d'évaluer l'impact du dispositif sur les tissus cutanés.

L'étude sur l'efficacité antibactérienne du dispositif sera réalisée par l'évaluation de la quantité de bactéries viables sur les textiles (bactéries adhérentes) d'une part et sur des explants tissulaires effectués au niveau de la plaie (colonisation de la plaie). Dans un premier temps, cette évaluation sera réalisée sur les mêmes souches bactériennes afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*; et, dans un second temps, sur des souches cliniques (prélèvements réalisés sur des cas cliniques avec l'accord du patient).

Un modèle devra être adapté afin d'évaluer l'effet antalgique apporté par l'utilisation d'un antalgique. Par exemple, l'étude comportementale peut être réalisée afin d'évaluer la douleur chez l'animal (appétit, déplacements,...)<sup>166, 167</sup>. L'évaluation est basée principalement sur la comparaison du comportement normal de l'animal avec son comportement au moment de l'expérimentation. Les conditions environnementales (température, stress, luminosité, bruits,...) doivent bien sûr être parfaitement contrôlées afin de pouvoir réaliser une telle étude<sup>168</sup>.

### **Autres perspectives**

Selon une étude réalisée par Wang<sup>169</sup>, la  $\beta$ -CD est capable de former un complexe d'inclusion avec l'iode ( $I_2$ ). Le chargement d'iode avec le polyCD serait donc envisageable sur le système PEM. On peut supposer que les quantités de l'espèce  $I_2$ , ayant une activité antibactérienne, seraient chargées plus efficacement qu'avec la solution de Lugol qui contient également des espèces non actives de l'iode. Le chargement d'iode directement sous sa forme active contre les bactéries permettrait peut-être d'observer une activité antibactérienne supérieure de l'iode.

### **Enduction d'un gel**

Dans l'objectif de limiter la libération de l'Ag hors du dispositif, une seconde voie pourrait également être étudiée et repose sur l'enduction d'un gel directement sur les textiles chargés par l'Ag pour limiter la libération d'Ag d'une part et d'autre part afin d'apporter, au

dispositif, une capacité d'absorption des exsudats de plaies. Grâce à la présence de fonctions carboxyliques dans la formule chimique du poly $\beta$ CD, l'Ag devrait être retenu dans le gel en interagissant avec le poly $\beta$ CD. Cette seconde voie a été envisagée face au difficile transfert technologique de la méthode de construction du système PEM. De plus, l'enduction d'un gel présente l'avantage de pouvoir être utilisé sur n'importe quel textile et pourrait être intéressante pour une application sur plaie exsudative.

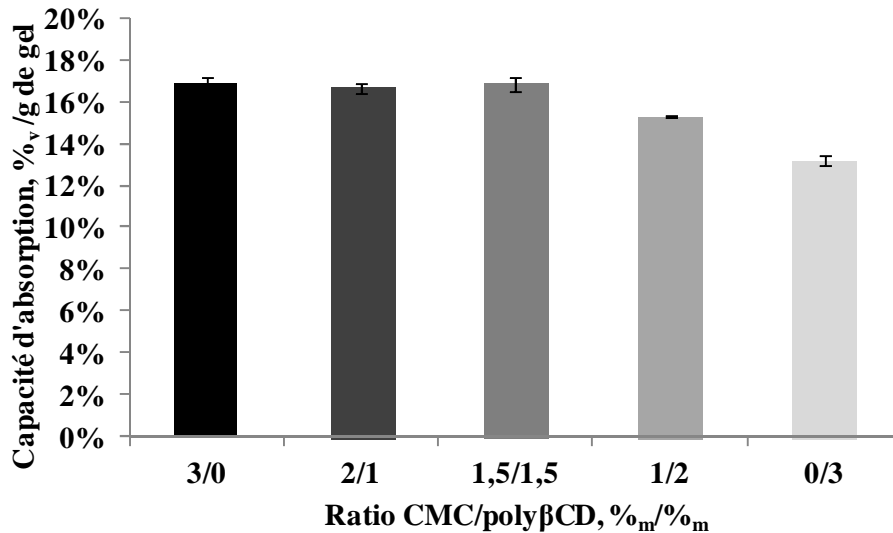
Dans notre cas, l'enduction du gel permettrait de limiter les pertes d'Ag causées par la construction d'un système PEM au-dessus. D'après des premiers résultats obtenus, un gel à base de carboxyméthylcellulose (CMC) a été élaboré. Ce gel est non adhérent, cohésif et est capable de gonfler dans un milieu aqueux.

Afin d'apporter au gel une fonction supplémentaire, le poly $\beta$ CD a été inclus dans la formulation du gel de CMC, pour permettre le chargement d'un principe actif au sein du gel. Les premières évaluations ont porté sur les capacités d'absorption du gel humide afin de déterminer, si, le gel une fois enduit sur les textiles, devrait être conservé tel quel ou bien séché. Pour cela, la CMC constituant le gel a été progressivement remplacée par le poly $\beta$ CD, comme le montre les premiers résultats dans la **Figure 83**.

On constate que la diminution du ratio CMC/poly $\beta$ CD ne modifie pas la capacité d'absorption entre 0 et 1,5%<sub>m</sub> de poly $\beta$ CD. Au-delà d'une concentration de 1,5%<sub>m</sub> de poly $\beta$ CD, la capacité d'absorption diminue.

D'après ces résultats, la formulation du gel comprenant le poly $\beta$ CD et la CMC pourrait être formulée avec un ratio CMC/poly $\beta$ CD de 1,5%<sub>m</sub>/1,5%<sub>m</sub> tout en conservant les propriétés d'absorption maximale du gel de CMC.

## Perspectives



**Figure 83.** Capacité d'absorption du gel humide (10 mL) en fonction du ratio concentration en CMC (%<sub>m</sub>) / concentration en polyβCD dans le PBS à 37°C pendant 24 heures.

L'incorporation de polyβCD avec un ratio CMC/polyβCD de 1,5/1,5%<sub>m</sub> permet de conserver la capacité d'absorption au maximum tout en apportant une propriété supplémentaire au gel, à savoir la complexation avec des principes actifs.

La cytocompatibilité des textiles chargés par l'Ag et enduit par le gel de CMC/polyCD devra être évaluée. Le chargement d'un principe actif tel que la ropivacaïne au sein du gel devra également être étudié.



## **Conclusion Générale**

## Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, la conception et l'évaluation d'un dispositif médical pour le traitement des plaies chroniques ont été réalisées. Les différentes propriétés que doit présenter un tel dispositif que sont l'activité antibactérienne, son efficacité prolongée, sa cytocompatibilité et sa capacité d'absorber les exsudats de plaie ont été abordées. Pour cela, la construction d'un système PEM ou l'enduction d'un gel a été évaluée afin de limiter la libération de l'Ag pour réduire la toxicité du dispositif.

Dans un premier temps, nous avons obtenu un textile fonctionnalisé par le CHT réticulé par le CTR. En fonction des concentrations en fonctions amines apportés par le CHT et en fonctions carboxyliques apportés par le CTR, la charge du textile peut être modulée et dépend du ratio CTR (-COOH)/CHT (-NH<sub>2</sub>). Ainsi, à une concentration fixe en CHT, le système est chargé positivement avec un Rm (-COOH/-NH<sub>2</sub>) inférieur à 1,7 et chargé négativement avec un Rm (-COOH)/(-NH<sub>2</sub>) supérieur à 1,7. En fonction de la charge du textile, de l'iode (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) a été chargé préférentiellement sur le système chargé positivement et de l'argent (Ag<sup>+</sup>) a été chargé préférentiellement sur le système chargé négativement.

Par rapport aux textiles chargés d'iode qui ont démontré une activité antibactérienne seulement sur *S. aureus*, les textiles chargés avec l'Ag ont démontré une efficacité antibactérienne significative sur les deux espèces évaluées, *S. aureus* et *E. coli*. La différence de vitesse d'action de l'Ag contre ces deux souches a été observée avec une efficacité maximale après 30 minutes pour *E. coli* et après 24 heures pour *S. aureus*.

La fonction de barrière pour la libération de l'Ag a été étudiée par la construction du système PEM ou par l'enduction d'un gel.

Concernant le système PEM, nous avons démontré l'intérêt du recuit sur la stabilité du système après construction. Le chargement et la libération d'un principe actif au sein de ce système PEM a permis de démontrer l'influence du nombre de paires de couches par rapport à la quantité de principe actif chargé, à la dose libérée en fonction du temps et par rapport à la libération prolongée de ce principe actif. La construction du système PEM sur les textiles chargés par l'Ag provoque une perte d'Ag après construction. Cependant les quantités présentes sur le textile permettent d'obtenir une activité antibactérienne significative.

Concernant l'enduction d'un gel, les propriétés d'absorption étant plus importante que le système PEM, cela permettrait d'apporter au dispositif une capacité d'absorption des exsudats plus élevée sans réduire l'efficacité de l'Ag chargé sur les textiles fonctionnalisés. De plus l'enduction d'un gel présente l'avantage de pouvoir être déposé sur n'importe quel textile; ce qui ouvre des perspectives non négligeables sur l'enduction d'un gel actif (présence du polyCD) à la surface des pansements.

## Conclusion générale

L'intérêt majeur du système PEM et/ou de l'enduction d'un gel contenant le polyCD sur ce dispositif est la possibilité d'apporter différentes activités thérapeutiques comme un effet synergique avec le chargement d'un second agent antibactérien compatible ou un effet antalgique pour lutter contre la douleur.

## Références

4. Larousse médical. La peau. <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/peau/15217>.
5. Robinson W. Use of urea to stimulate healing in chronic purulent wounds. *The American Journal of Surgery* 1936;33(2):192-197.
6. Laplante A. La peau : Régénération et cicatrisation.
7. Urgo médical. La peau et les plaies. <http://www.urgomedical.fr/Physiopathologie/La-peau-et-les-plaies/Plaies-aigues>.
8. Société Francophone de Médecine d'Urgences. Prise en charge des plaies aux urgences. 12<sup>ème</sup> Conférence de Consensus 2005.
9. Tortora GJ, Grabowski SR, Parent J. Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou: Centre Éducatif et Culturel inc 1994:1203 pages.
10. Collège des Enseignants en Dermatologie de France (Cedef) Cours de sémiologie, la cicatrisation cutanée. 2011.
11. Khoury M, Giral P, Bruckert E, Chapman J, Beaudeau JL. Le système MMP/TIMP : une cible thérapeutique de l'athérosclérose ? *Sang Thrombose Vaisseaux* 2006;18(5): 247-256.
12. Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget E, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2005 2005/01/01;269(1):209-216.
13. Winter GD. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature* 1962;193(4812):293-294.
14. Smith DA, Barker IK, Allen OB. The effect of ambient temperature and type of wound on healing of cutaneous wounds in the common garter snake (*Thamnophis sirtalis*). *Canadian Journal of Veterinary Research* 1988;52(1):120-128.
15. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative Normothermia to Reduce the Incidence of Surgical-Wound Infection and Shorten Hospitalization. *New England Journal of Medicine* 1996;334(19):1209-1216.
16. Xia Z, Sato A, Hughes MA, Cherry GW. Stimulation of fibroblast growth in vitro by intermittent radiant warming. *Wound Repair and Regeneration* 2000;8(2):138-144.
17. Filston H, Vennes G. Temperature as a factor in wound healing. *Surgery, gynecology & obstetrics* 1968;126(3):572-584.
18. Kloth LC, Berman JE, Dumit-Minkel S, Sutton CH, Papanek PE, Wurzel J. Effects of a normothermic dressing on pressure ulcer healing. *Advances in skin & wound care* 2000;13(2):69-74.
19. Haute Autorité de Santé H. Parcours du dispositif médical. Guide pratique. 2013;Actualisation 2013.
20. Haute Autorité de Santé H. Évaluation des Pansements Primaires et Secondaires. Révision des descriptions génériques de la liste des produits et prestations remboursables. 2007.

## Références

21. Noble WC, Willie JA. Carriage of inhibitor-producing organisms on human skin. *J Med Microbiol* 1980;13(2):329-332.
22. Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J* 2012;9(1):14-32.
23. World Union of Wound Healing Societies. Infection des plaies en pratique clinique. Un consensus international Principes de bonne pratique 2008;[http://www.smith-nephew.com/global/assets/pdf/products/wound/woundinfsn\\_french.pdf](http://www.smith-nephew.com/global/assets/pdf/products/wound/woundinfsn_french.pdf).
24. Decoster A. Classification des antibiotiques. <http://annedecosterfreefr/atb/atbhtm>.
25. St-Cyr D. Wound infection: local and systemic treatment. *Perspect Infirm* 2011;8(1):27-28.
26. Lemarchand F, Gourvalin P. Les antibiotiques. Back to basic. *La recherche* 2008;424:77.
27. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet* 2005 2005/2/18/;365(9459):579-587.
28. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: Applications and safety. *American Journal of Infection Control* 1996;24(3):209-218.
29. Stewart MJ, Parikh S, Xiao G, Tonge PJ, Kisker C. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *Journal of Molecular Biology* 1999;290(4):859-865.
30. Syracuse Research Corporation. Chlorhexidine. ChemID Lite Toxicology Data Network <http://chemsisinlmnihgov/chemidplus/rn/55-56-1>.
31. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999 January 1, 1999;12(1):147-179.
32. Langgartner J, Linde H-J, Lehn N, Reng M, Schölmerich J, Glück T. Combined skin disinfection with chlorhexidine/propanol and aqueous povidone-iodine reduces bacterial colonisation of central venous catheters. *Intensive Care Med* 2004 2004/06/01;30(6):1081-1088.
33. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dental Materials* 2006;22(7):647-652.
34. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal* 2009;42(4):288-302.
35. Hibbard JS. Analyses Comparing the Antimicrobial Activity and Safety of Current Antiseptic Agents: A Review. *Journal of Infusion Nursing* 2005;28(3):194-207.
36. Mulberry G, Snyder AT, Heilman J, Pyrek J, Stahl J. Evaluation of a waterless, scrubless chlorhexidine gluconate/ethanol surgical scrub for antimicrobial efficacy. *Am J Infect Control* 2001;29(6):377-382.
37. Lim KS, Kam PC. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care* 2008;36(4):502-512.
38. Couquet Y, Desmoulière A, Rigal M-L. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités Pharmaceutiques* 2013;52(531):22-25.

## Références

39. Jull AB, Rodgers A, Walker N. Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;8(4).
40. Bergman A, Yanai J, Weiss J, Bell D, David MP. Acceleration of wound healing by topical application of honey. An animal model. *Am J Surg* 1983;145(3):374-376.
41. Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *ScientificWorldJournal* 2011;11:766-787.
42. Goetz P. Le miel comme traitement local désinfectant et cicatrisant des plaies. *Phytothérapie* 2009 2009/04/01;7(2):91-93.
43. Kim TN, Feng QL, Kim JO, Wu J, Wang H, Chen GC, *et al.* Antimicrobial effects of metal ions (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1998;9(3):129-134.
44. Fuhrmann G-F, Rothstein A. The mechanism of the partial inhibition of fermentation in yeast by nickel ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1968;163(3):331-338.
45. Furr JR, Russell AD, Turner TD, Andrews A. Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate. *J Hosp Infect* 1994;27(3):201-208.
46. Yoshikuni Y, Takayuki S, Hidetoshi U, Tatsuya Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 1980;74(7):2171-2178.
47. Bragg PD, Rainnie DJ. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 1974;20(6):883-889.
48. Smith&Nephew. Silver as an Antimicrobial. [http://www.smith-nephew.com/uk/products/wound\\_management/product-search/acticoat/](http://www.smith-nephew.com/uk/products/wound_management/product-search/acticoat/) 2004.
49. Herbert LF, Hendrik AvD. A 92-year-old asymptomatic Caucasian man. 2008.
50. Dooderm. Le fil des peaux sensibles. <http://www.dooderm.com/index.php/technologie/fabrication>.
51. Tonnerre D. Dooderm, un pyjama doux contre l'eczéma. *Nord éclair* 2012;21 octobre 2012.
52. Fleming A. The action of chemical and physiological antiseptics in a septic wound. *British Journal of Surgery* 1919;7(25):99-129.
53. Chang S. Modern concept of disinfection. *Journal of Sanitary Engineering Division Proc ASCE* 1971;97:689.
54. Bruchertseifer H, Cripps R, Guentay S, Jaeckel B. Analysis of iodine species in aqueous solutions. *Anal Bioanal Chem* 2003;375(8):1107-1110.
55. Gottardi W. Disinfection, Sterilization and Preservation. Chapter 8 : Iodine and Iodine Compounds. 5th edition Seymour SBlock, Lippincott Williams & Wilkins 2001:159-184.
56. Cooper R. Iodine revisited. *International Wound Journal* 2007;4(2):124-137.
57. Krusé CW, Asce M, Hsu YC, Annabel CGAC, Stringer R. Halogen action on bacteria, viruses, and protozoa. In proceedings of the National Specialty Conference on Disinfection 1970:113-136.

## Références

58. Gottardi W. The uptake and release of molecular iodine by the skin: chemicals and bactericidal evidence of residual effects caused by povidone-iodine preparations. *Journal of Hospital Infection* 1995;29:9-18.
59. Toussaint P. Larvotherapie. Service de Dermatologie HIA R Picqué 33998 BORDEAUX Armées 2008.
60. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3(2):223-227.
61. Barnard D. Skeletal muscular mechanisms of the larva of *Lucilia sericata* (Meigen) in relation to feeding habit. *The Pan-Pacific Entomologist* 1997;53:223-229.
62. Beasley WD, Hirst G. Making a meal of MRSA-the role of biosurgery in hospital-acquired infection. *J Hosp Infect* 2004;56(1):6-9.
63. Thomas S, Jones M. Maggot can benefit patients with MRSA. *Pract Nurse* 2000;20:101-104.
64. Graninger M, Grassberger M, Galehr E, et al. Biosurgical debridement facilitates healing of chronic skin ulcers. *Archives of Internal Medicine* 2002;162(16):1906-1907.
65. Erdmann G, Khali S. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm. *Journal of Medical Entomology* 1986;23:208-211.
66. Robinson W. The healing properties of allantoin and urea discovered through the use of maggots in human wounds. *Annual report of the Board of Regents of the Smithsonian* 1937:451-461.
67. Lamme EN, Gustafsson TO, Middelkoop E. Cadexomer-iodine ointment shows stimulation of epidermal regeneration in experimental full-thickness wounds. *Arch Dermatol Res* 1998;290(1-2):18-24.
68. Kulaga E. antimicrobial coatings for sot materials. Université de Haute Alsace 31/01/2014.
69. White R, Cutting K. Exploring the Effects of Silver in Wound Management—What is Optimal? *Wounds* 2006;18(11):307-314.
70. Hermans MH. Silver-containing dressings and the need for evidence. *Am J Nurs* 2006;106(12):60-68.
71. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 2007;33(2):139-148.
72. Blanchemain N, Karrouit Y, Tabary N, Neut C, Bria M, Siepmann J, et al. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomaterialia* 2011;7(1):304-314.
73. Crini G, Badot PM, Guibal E. Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application. Presses Univ Franche-Comté 2009.
74. Balan V, Verestiuc L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *European Polymer Journal* 2014;53(0):171-188.
75. Fei Liu X, Lin Guan Y, Zhi Yang D, Li Z, De Yao K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 2001;79(7):1324-1335.

## Références

76. Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 2004;95(2):147-155.
77. No HK, Young Park N, Ho Lee S, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 2002;74(1-2):65-72.
78. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, *et al.* Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(7):932-936.
79. Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann WP, *et al.* Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomaterialia* 2010;6(7):2562-2571.
80. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57(1):19-34.
81. Mi F-L, Tan Y-C, Liang H-C, Huang R-N, Sung H-W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12(8):835-50 2001;12(8):835-850.
82. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62(1):83-99.
83. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2004;274(1-2):1-33.
84. Fouda MMG, Wittke R, Knittel D, Schollmeyer E. Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2009;1(1):61-64.
85. Liu B-S, Huang T-B. A novel wound dressing composed of nonwoven fabric coated with chitosan and herbal extract membrane for wound healing. *Polymer Composites* 2009;31(6):1037-1046.
86. Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2003;41(24):3941-3953.
87. Mi F-L, Shyu S-S, Peng C-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2005;43(10):1985-2000.
88. Villiers A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1891;112:536-538.
89. Chang HY, Irwin PM, Nikolov ZL. Effects of mutations in the starch-binding domain of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase. *J Biotechnol* 1998;65(2-3):191-202.
90. Abdel-Halim ES, Abdel-Mohdy FA, Fouda MMG, El-Sawy SM, Hamdy IA, Al-Deyab SS. Antimicrobial activity of monochlorotriazinyl- $\beta$ -cyclodextrin/chlorohexidin diacetate finished cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers* 2011;86(3):1389-1394.



## Références

91. Denadai ÂML, Teixeira KI, Santoro MM, Pimenta AMC, Cortés ME, Sinisterra RD. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. *Carbohydrate Research* 2007;342(15):2286-2296.
92. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59(7):645-666.
93. Pupe CG, Villardi M, Rodrigues CR, Rocha HVA, Maia LC, de Sousa VP, *et al.* Preparation and evaluation of antimicrobial activity of nanosystems for the control of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *International Journal of Nanomedicine* 2011;6:2581-2590.
94. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews* 1998 2014/03/18;98(5):2045-2076.
95. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *Journal of Applied Polymer Science* 2005;97(2):433-442.
96. Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET Prostheses Surface Modification with Cyclodextrin Coating: Development of a New Drug Delivery System. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2005;29(6):628-632.
97. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Martel B, Neut C, Hildebrand HF, Haulon S. Safety, healing, and efficacy of vascular prostheses coated with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin polymer: experimental in vitro and animal studies. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;43(2):188-197.
98. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, Aubert-Viard F, *et al.* Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue-poly(cyclodextrin) complex. *Biomedical Materials* 2013;8(6):065006.
99. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, *et al.* Multilayered textile coating based on a  $\beta$ -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers* 2013;93(2):718-730.
100. Blanchemain N, Laurent T, Haulon S, Traisnel M, Neut C, Kirkpatrick J, *et al.* In vitro study of a HP $\gamma$ -cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2007 2007/04/01;57(1-4):675-681.
101. Ducoroy L, Martel B, Bacquet B, Morcellet M. Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2007 2007/04/01;57(1-4):271-277.
102. Zasadzinski J, Viswanathan R, Madsen L, Garnaes J, Schwartz D. Langmuir-Blodgett films. *Science* 1994 March 25, 1994;263(5154):1726-1733.
103. Scientific B. Langmuir-Blodgett Film <http://www.biolinscientific.com/application/langmuir-blodgett-film/>.
104. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 1997 August 29, 1997;277(5330):1232-1237.
105. Lvov Y, Yamada S, Kunitake T. Non-linear optical effects in layer-by-layer alternate films of polycations and an azobenzene-containing polyanion. *Thin Solid Films* 1997;300(1-2):107-112.

## Références

106. Dubas ST, Schlenoff JB. Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction. *Macromolecules* 2001 2001/05/01;34(11):3736-3740.
107. Vautier D, Hemmerle J, Vodouhe C, Koenig G, Richert L, Picart C, *et al.* 3-D surface charges modulate protrusive and contractile contacts of chondrosarcoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;56(3):147-158.
108. Caruso F, Niikura K, Furlong DN, Okahata Y. 1. Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination. *Langmuir* 1997 1997/06/01;13(13):3422-3426.
109. Rinckenbach S, Hemmerlé J, Dieval F, Arntz Y, Kretz J-G, Durand B, *et al.* Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;84A(3):576-588.
110. Seo J, Lutkenhaus JL, Kim J, Hammond PT, Char K. Effect of the layer-by-layer (LbL) deposition method on the surface morphology and wetting behavior of hydrophobically modified PEO and PAA LbL films. *Langmuir* 2008;24(15):7995-8000.
111. Decher G, Hong JD. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1991;95(11):1430-1434.
112. Seantier B, Deratani A. Chapitre 18: Polyelectrolytes at Interfaces: Applications and Transport Properties of Polyelectrolyte Multilayers in Membranes Ionic Interactions in Natural and Synthetic Macromolecules Edited by Alberto Cifferri (Editor) and Angelo Perico (Editor) ISBN: 978-0-470-52927-0 2012:683-726.
113. De Villiers MM, Otto DP, Strydom SJ, Lvov YM. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(9):701-715.
114. Svensson O, Lindh L, Cardenas M, Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan--Influence of surface properties, concentration and type of mucin. *J Colloid Interface Sci* 2006;299(2):608-616.
115. Schlenoff JB, Dubas ST, Farhat T. Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* 2000 2000/12/01;16(26):9968-9969.
116. Izquierdo A, Ono SS, Voegel JC, Schaaf P, Decher G. Dipping versus Spraying: Exploring the Deposition Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir* 2005 2005/08/01;21(16):7558-7567.
117. Hong H, Steitz R, Kirstein S, Davidov D. Superlattice Structures in Poly(phenylenevinylene)-Based Self-Assembled Films. *Advanced Materials* 1998;10(14):1104-1108.
118. Kharlampieva E, Kozlovskaya V, Chan J, Ankner JF, Tsukruk VV. Spin-Assisted Layer-by-Layer Assembly: Variation of Stratification as Studied with Neutron Reflectivity†. *Langmuir* 2009 2009/12/15;25(24):14017-14024.
119. Cho J, Lee S-H, Kang H, Char K, Koo J, Seung BH, *et al.* Quantitative analysis on the adsorbed amount and structural characteristics of spin self-assembled multilayer films. *Polymer* 2003;44(18):5455-5459.
120. Quinn A, Such GK, Quinn JF, Caruso F. Polyelectrolyte Blend Multilayers: A Versatile Route to Engineering Interfaces and Films. *Advanced Functional Materials* 2008;18(1):17-26.

## Références

121. Quinn A, Tjipto E, Yu A, Gengenbach TR, Caruso F. Polyelectrolyte Blend Multilayer Films: Surface Morphology, Wettability, and Protein Adsorption Characteristics. *Langmuir* 2007 2007/04/01;23(9):4944-4949.
122. Lavallo P, Gergely C, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, *et al.* Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study. *Macromolecules* 2002 2002/05/01;35(11):4458-4465.
123. Porcel C, Lavallo P, Decher G, Senger B, Voegel JC, Schaaf P. Influence of the polyelectrolyte molecular weight on exponentially growing multilayer films in the linear regime. *Langmuir* 2007;23(4):1898-1904.
124. Richert L, Lavallo P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz J-F, *et al.* Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir* 2003 2004/01/01;20(2):448-458.
125. Pavlukhina S, Sukhishvili S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(9):822-836.
126. Kharlampieva E, Erel-Unal I, Sukhishvili SA. Amphoteric Surface Hydrogels Derived from Hydrogen-Bonded Multilayers: Reversible Loading of Dyes and Macromolecules†. *Langmuir* 2006 2007/01/01;23(1):175-181.
127. Zhao Q, Mao Z, Gao C, Shen J. Assembly of multilayer microcapsules on CaCO<sub>3</sub> particles from biocompatible polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17(9):997-1014.
128. Bethke W. A Kinder, Gentler Corneal Cross-linker? Review of Ophthalmology 2010;17(11):p17.
129. Garza JM, Schaaf P, Muller S, Ball V, Stoltz JF, Voegel JC, *et al.* Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* 2004;20(17):7298-7302.
130. Wood KC, Chuang HF, Batten RD, Lynn DM, Hammond PT. Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006 July 5, 2006;103(27):10207-10212.
131. Martel B, Blanchemain N, Boschin F, Haulon S, Delcourt-Debruyne E, Morcellet M, *et al.* Biomateriaux porteurs de cyclodextrines aux propriétés d'absorption améliorées et de libération progressive et retardée de molécules thérapeutiques. Google Patents, 2006.<http://www.google.com/patents/WO2006051227A1?cl=fr>
132. Bernard M, Michel M, Marek W. Polymères de cyclodextrine(s) et/ou dérivés de cyclodextrine(s) présentant des propriétés complexantes et échangeuses d'ions et leur procédé de fabrication. Google Patents, 2000.<http://www.google.com/patents/WO2000047630A1?cl=fr>
133. Martel B, Morcellet M, Ruffin D, Ducoroy L, Weltrowski M. Finishing of Polyester Fabrics with Cyclodextrins and Polycarboxylic Acids as Crosslinking Agents. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 2002;44(1-4):443-446.
134. Martel B, Weltrowski M, Ruffin D, Morcellet M. Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *Journal of Applied Polymer Science* 2002;83(7):1449-1456.

## Références

135. Martin A., Tabary N., Leclercq L., Junthip J., Degoutin S., Aubert-Viard F., *et al.* Multilayered textile coating based on a  $\beta$ -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers* 2013;93((2)):718-730.
136. Blanchemain N, Aguilar MR, Chai F, Jimenez M, Jean-Baptiste E, El-Achari A, *et al.* Selective biological response of human pulmonary microvascular endothelial cells and human pulmonary artery smooth muscle cells on cold-plasma-modified polyester vascular prostheses. *Biomedical Materials* 2011;6(6):065003.
137. Hamerli P, Weigel T, Groth T, Paul D. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylenterephtalat membranes. *Biomaterials* 2003;24(22):3989-3999.
138. Uchida E, Uyama Y, Ikada Y. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir* 1993 2014/02/24;9(4):1121-1124.
139. Xue Y, Tang M, Hieda Y, Fujihara J, Takayama K, Takatsuka H, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of chlorhexidine in whole blood by solid-phase extraction and kinetics following an intravenous infusion in rats. *Journal of Analytical Toxicology* 2009;33(2):85-91.
140. Kudo K, Ikeda N, Kiyoshima A, Hino Y, Nishida N, Inoue N. Toxicological Analysis of Chlorhexidine in Human Serum using HPLC on a Polymer-Coated ODS Column. *Journal of Analytical Toxicology* 2002;26:119-122.
141. Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques. *Advanced Analytical Chemistry Instruments* 1965;4:117-212.
142. Standard ISO 10993-5. Évaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5: Essais de cytotoxicité: méthodes in vitro. 1992.
143. EN 30993-5. Biological evaluation of medical devices. Tests for cytotoxicity, in vitro methods. 1994.
144. Hornez JC, Lefèvre A, Joly D, Hildebrand HF. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomolecular Engineering* 2002;19(2-6):103–117.
145. Ilanchelian M, Retna Raj C, Ramaraj R. Spectral Studies on the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Toluidine Blue O and Meldola's Blue in Aqueous Solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2000 2000/01/01;36(1):9-20.
146. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2008 April 1, 2008;74(7):2171-2178.
147. Voisard M, Pretre A. Communiqué de presse: UrgoTul Ag® et UrgoCell Ag®. Buzz & compagnie Novembre 2011.

# **Annexes**

### Calcul du rapport molaire

Le rapport molaire ( $R_m$ ) est calculé en fonction de la quantité des groupements réactifs des agents réticulants par rapport à la quantité de fonctions amines présente dans la solution d'imprégnation. Quel que soit l'agent réticulant, la solution de CHT à 2,5%<sub>m/V</sub> représente une masse de CHT de 0,025 g pour 1 mL. D'après un résultat obtenu précédemment par IRTF sur le CHT (low molecular weight, DD 85%), la quantité d'amines présentes dans 1 g de CHT a été évaluée à 5,083 mmoles/g de CHT. Ainsi la quantité de fonctions amines ( $-NH_2$ ) présentes dans la solution de réaction par millilitre est de:

$$\text{Quantité de } -NH_2, \text{ mmoles} = 0,025 \times 5,083 = 0,127075 \text{ mmol/mL}$$

De même, la quantité de fonctions carboxyliques réactives du CTR est calculée sur la possibilité de réaction de 2/3 des groupements carboxyliques ( $-COOH$ ) par mole de CTR soit une masse molaire de 90 g/mol.

En fonction de la concentration en CTR, la quantité de fonctions carboxyliques réactives est calculée de la façon suivante:

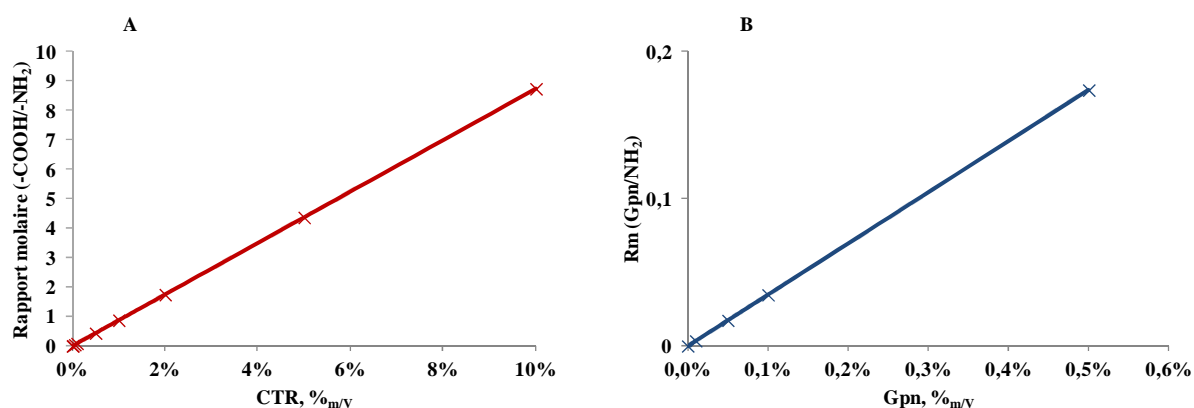
$$\text{Quantité de } -COOH, \text{ mmoles} = \frac{\text{masse de CTR dans 1 mL, g}}{9 \times 10^4, \text{ g/mmoles}}$$

Pour la Gpn, la quantité est calculée directement avec sa masse molaire et la concentration utilisée:

$$\text{Quantité de Gpn, mmoles} = \frac{\text{masse de Gpn dans 1 mL, g}}{2,26 \times 10^5, \text{ g/mmoles}}$$

Le  $R_m$  est ensuite calculé selon la formule suivante:

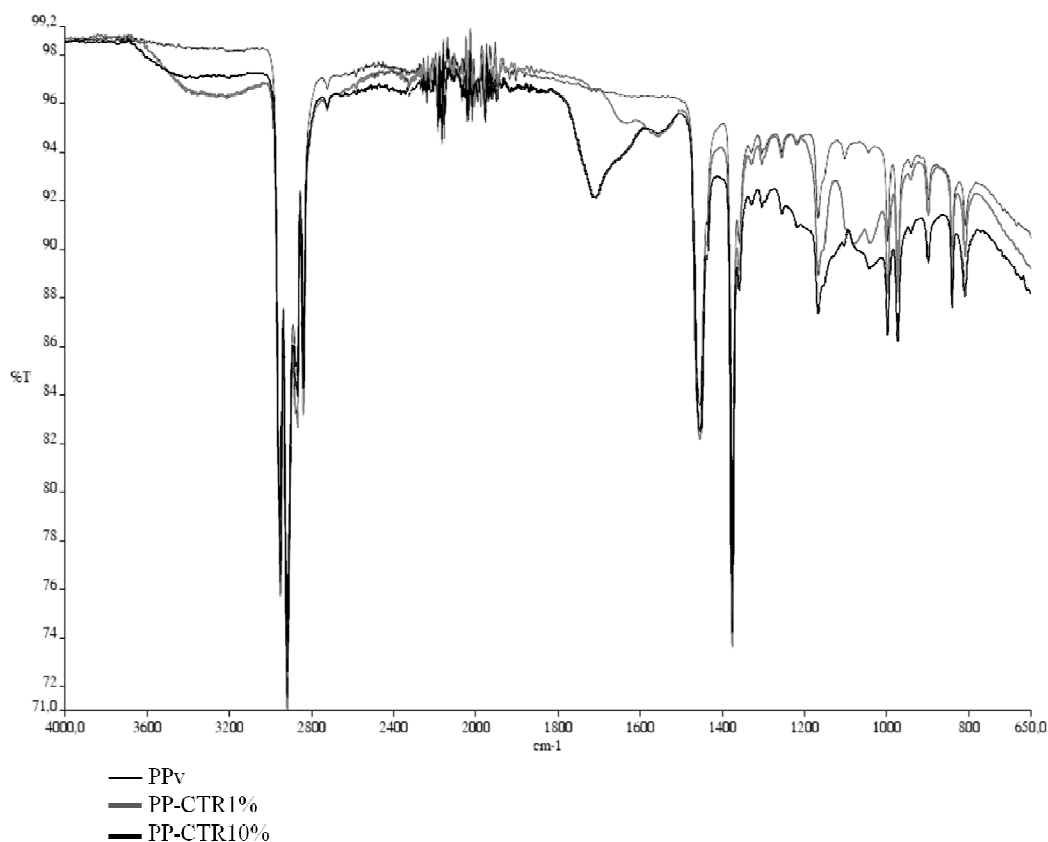
$$R_m = \frac{\text{Quantité de Gpn ou de } -COOH, \text{ mmoles}}{\text{Quantité de } -NH_2, \text{ mmoles}}$$



**Figure 84. Rapport molaire ( $R_m$ ) en fonction de la concentration en agent réticulant dans la solution d'imprégnation: CTR (A) ou Gpn (B). La concentration en CHT est fixée à 2,5%<sub>m/V</sub>.**

### Analyse infrarouge du polypropylène fonctionnalisé

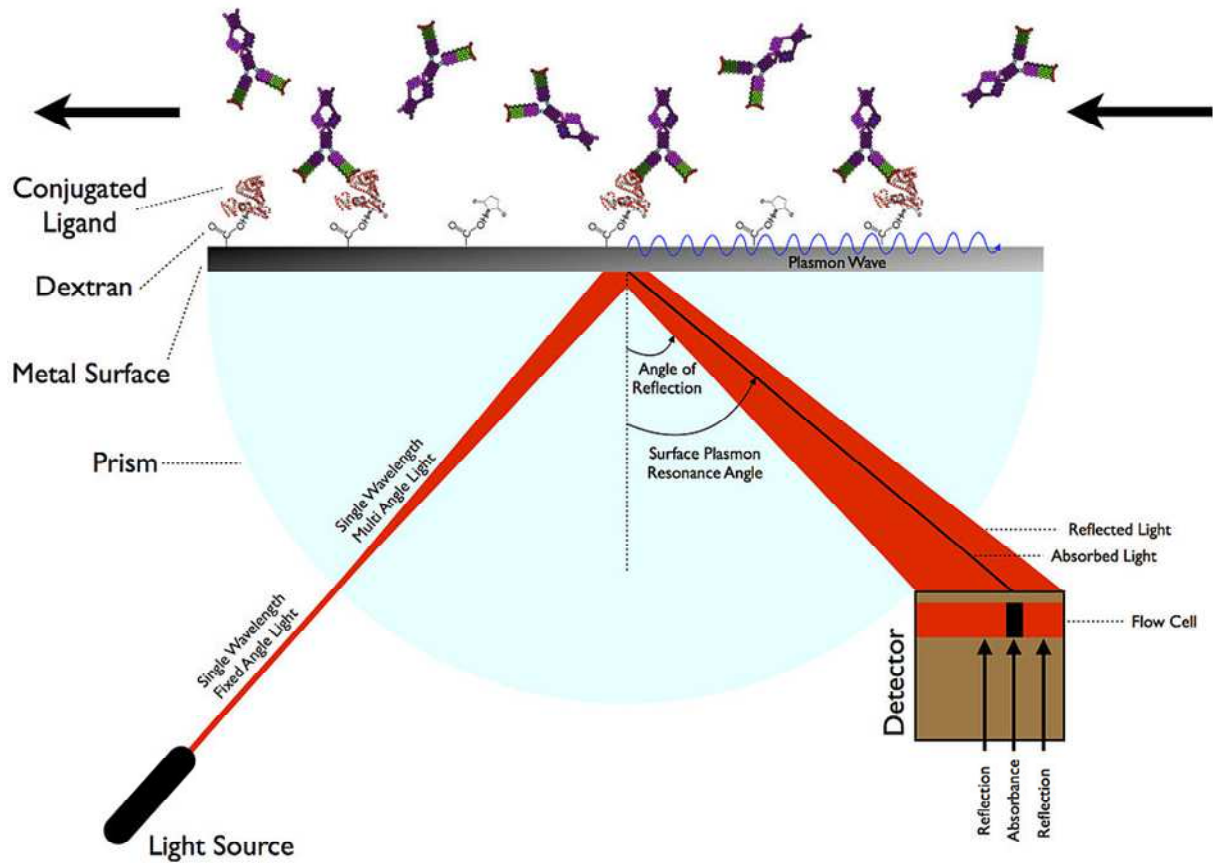
L'analyse infrarouge du polypropylène (PP) fonctionnalisé par le même procédé confirme l'enrobage du PP par le CHT avec le CTR à 1% et 10% m par la présence de bandes de vibration additionnelles sur le PP fonctionnalisé par rapport au PP vierge. Tout d'abord, les liaisons C-N du CHT sont visibles sur les spectres des deux textiles fonctionnalisés. Ensuite une large bande autour de  $3100\text{ cm}^{-1}$  caractérisant les (CO)O-H des fonctions carboxyliques du CTR prédomine la bande de vibration des N-H des fonctions amine du CHT. Avec des concentrations croissantes en CTR, on constate tout d'abord l'apparition de liaison amide puis de liaison ester. En effet, par rapport au spectre du PP-CTR1%, une double bande à 1550 et  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondant respectivement aux liaisons N-H et C=O caractérise la présence de liaison amine des unités glucosamines du CHT et de la réticulation du CHT avec les unités glucosamines par le CTR. De plus, le spectre du PP-CTR10% montre une bande additionnelle à  $1720\text{-}1775\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretch) caractérisant les liaisons esters entre les fonctions carboxyliques du CTR et les groupements hydroxyles du CHT.



**Figure 85. Spectre infrarouge du PP vierge et fonctionnalisé par le CHT ( $2,5\%_{m/V}$ ) réticulé par le CTR ( $1$  et  $10\%_{m/V}$ ) à  $140^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes de réaction.**

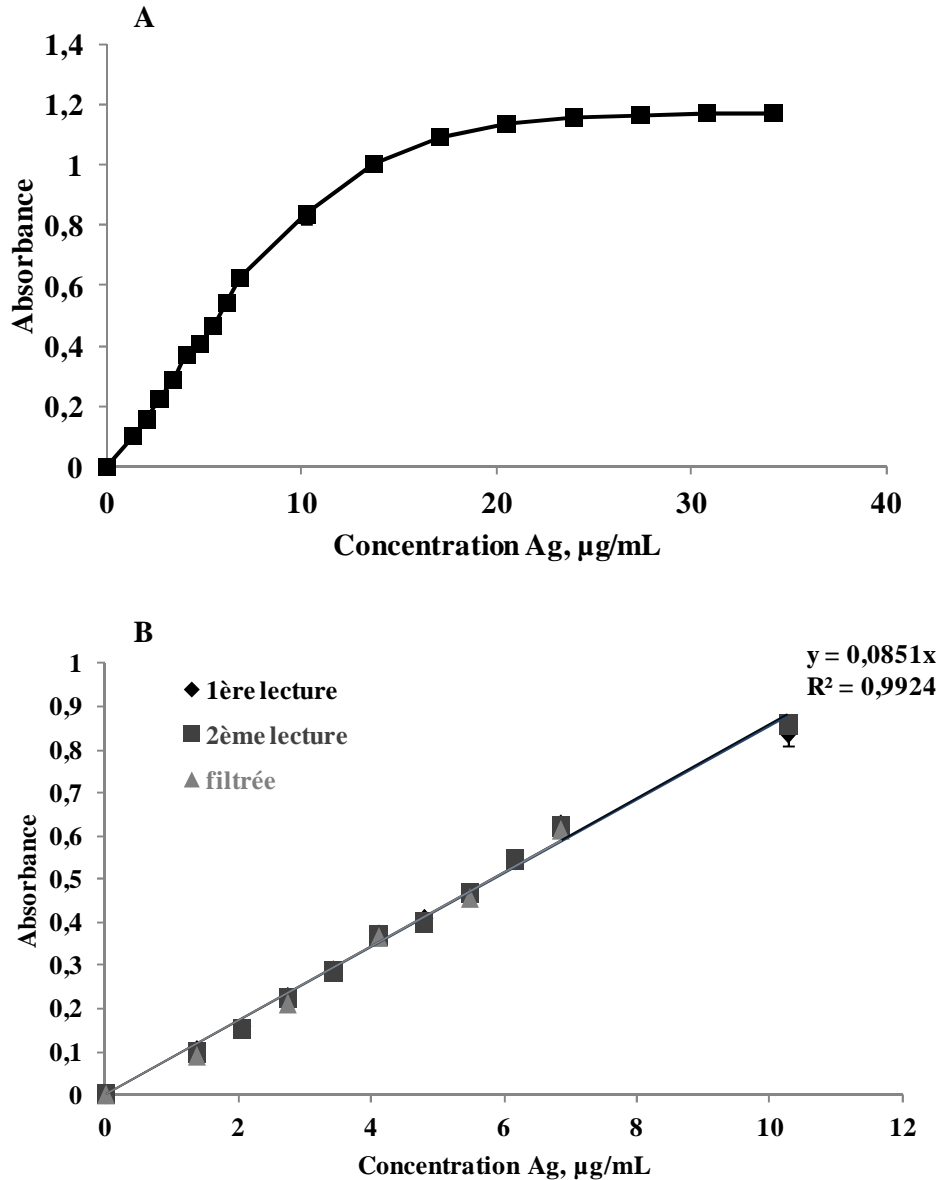
## Dosage de l'argent

Le dosage de l'argent élaboré au laboratoire repose sur le principe de résonance de plasmons de surface (SPR) (**Figure 86**). La quantification de l'Ag par cette méthode repose sur la lecture de l'absorbance à 400 nm rendue possible par la déviation de l'angle du rayon lumineux proportionnelle à la quantité d'Ag dans la solution.



*Figure 86. Principe de la résonance de plasmons de surface.*

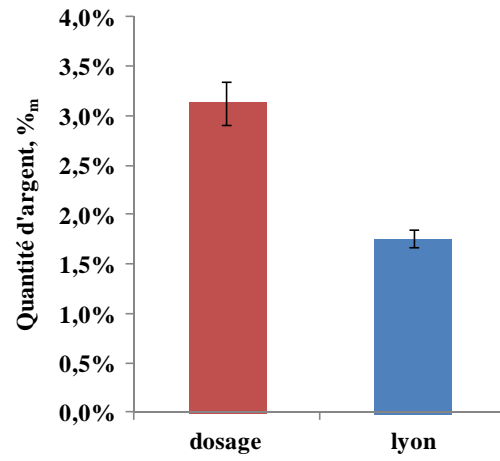




**Figure 87.** Absorbance (à 400 nm) de solutions de concentrations croissantes en sulfate d'argent après une nuit sous agitation par la méthode de dosage de l'argent mise au point entre 0 et 34,25 µg/mL (A) et entre 0 et 10,27 µg/mL après 24 heures: 1<sup>ère</sup> lecture, 48 heures: 2<sup>ème</sup> lecture et après filtration (B).

La comparaison de la quantification réalisé par analyse élémentaire (ISA-UMR 5280 CNRS-Villeurbanne) et par spectrophotométrie rapporte une quantité d'Ag sur le PET-CTR10 comparable, comme le montre la **Figure 88**.

## Annexes



*Figure 88. Quantité d'argent sur le PET-CTR10/CHT par le dosage de l'argent mis au point et par analyse élémentaire.*

## **Titres et Travaux**

### **Full paper in international, peer-reviewed journals**

1. Martin, A; Tabary, N; Chai, F; Leclercq, L; Junthip, J; Aubert-Viard, F; Neut, C; Weltrowski, M; Blanchemain, N; Martel, B  
Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue–poly(cyclodextrin) complex.  
*Biomedical Materials* 8, 065006, **2013**
2. Martin, A; Tabary, N; Chai, F; Leclercq, L; Junthip, J; Degoutin, S; Aubert-Viard, F; Cazaux, F; Lyskawa, J; Janus, L; Bria, M; Martel, B  
Multilayered textile coating based on a  $\beta$ -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs.  
*Carbohydrate Polymers* 93, 718-730, **2013**

### **Short notes in international, peer-reviewed journals**

1. Aubert-Viard, F; Martin, A; Chai, F; Tabary, N; Neut, C; Maton, M; Martel, B; Blanchemain, N  
Antibacterial Activity of Nonwoven Polyethylene Terephthalate Textile Finished with Silver Ion via Cyclodextrin Polymer Coating.  
*Proceedings of the 5th edition of the “ International Conference of Applied Research on Textile ” CIRAT-5, Sousse (Tunisia), 2013.*

### **Poster presentations**

1. Aubert-Viard, F; Martin, A; Tabary, N; Chai, F; Blanchemain, N; Martel, B  
Multilayer wound dressing based on cyclodextrin and chitosan polymers for the controlled drug release.  
*4ème réunion annuelle de l'ITS*  
Lille (France), October, 8<sup>th</sup> – 9<sup>th</sup>, **2012**
2. Aubert-Viard, F; Martin, A; Chai, F; Tabary, N; Neut, C; Hildebrand, H F; Martel, B; Blanchemain, N.  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*25th European Conference on Biomaterials*  
Madrid, Spain, September 8<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, **2013.**
3. Aubert-Viard, F; Rahmouni, O; Martin, A; Chai, F; Tabary, N; Neut, C; Martel, B; Blanchemain, N  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*International Cyclodextrin Symposium*  
Saarbruecken, Allemagne, May, 29<sup>th</sup>-31<sup>th</sup>, **2014**
4. Aubert-Viard, F; Rahmouni, O; Martin, A; Chai, F; Tabary, N; Neut, C; Martel, B; Blanchemain, N  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*Training School*  
Greenwich, Angleterre, July, 16<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>, **2014**

### **Oral presentations**

## Annexes

1. Aubert-Viard, F; Martin, A; Chai, F; Tabary, N; Neut, C; Maton, M; Martel, B; Blanchemain, N.  
Antibacterial Activity of Nonwoven Polyethylene Terephthalate Textile Finished with Silver Ion via Cyclodextrin Polymer Coating.  
*International Conference of applied Research in Textile, CIRAT-5*  
Sousse (Tunisia), January 24th – 27th , **2013**
2. Aubert-Viard, F; Martin, A; Tabary, N; Chai, F; Neut, C; Martel, B; Blanchemain, N  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*7<sup>th</sup> annual PSSRC Meeting Cluster*,  
Lille (France), July 4<sup>th</sup>- 6th, **2013**
3. Aubert-Viard, F; Martin, A; Tabary, N; Chai, F; Neut, C; Martel, B; Blanchemain, N  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*PRIM Forum Scientifique*  
Lille (France), May, 28<sup>th</sup> , **2013**
4. Tabary, N; Martin, A; Leclercq, L; Junthip, J; Aubert-Viard, F; Chai, F; Blanchemain, N; Martel, B.  
Multilayer textile coating based on a  $\beta$ -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs.  
*25th European Conference on Biomaterials*  
Madrid, Spain, September 8th-12th, **2013**
5. Martin, A; Tabary, T; Chai, F; Leclercq, L; Junthip, J; Aubert-Viard, F; Neut, C; Blanchemain, N; Martel, B  
Antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue – poly(cyclodextrin) complex.  
*3rd European conference on cyclodextrins*  
Antalya, Turkey, October 2-4<sup>th</sup> , **2013**

## Prix

1. Prix de la meilleure présentation orale.  
Multilayer coated textile with extended drug release for wound dressing application.  
*PRIM Forum Scientifique*  
Lille (France), May, 28<sup>th</sup> , **2013**

## **Antibacterial Activity of Nonwoven Polyethylene Terephthalate Textile Finished with Silver Ion via Cyclodextrin Polymer Coating**

AUBERT-VIARD F.<sup>1</sup>, MARTIN A.<sup>2</sup>, CHAI F.<sup>1</sup>, TABARY N.<sup>2</sup>, NEUT C.<sup>3</sup>, MATON M.<sup>1</sup>, MARTEL B.<sup>2</sup> and BLANCHEMAIN N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1008, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Université Lille 2, Lille, France

<sup>2</sup> Unité Matériaux et Transformation (UMET), Ingénierie des Systèmes Polymères, Université de Lille 1, Villeneuve D'Ascq, France

<sup>3</sup> INSERM U995, Laboratoire de Bactériologie, Université Lille 2, Lille, France

### **Abstract:**

The antibacterial activity of polyethylene terephthalate textile functionalized by  $\beta$ -cyclodextrin/citric acid polymer with further silver activation (PET-CTR/CD-Ag) has been investigated, regarding to two tested bacterial strains. The Minimal Inhibition Concentration (MIC) of the silver sulfate was defined for concentrations starting from 39.06 mg.L<sup>-1</sup>. The results from disk diffusion test showed an efficient inhibitory effect on the bacterial growth. The time-kill test performed with PET-CTR/CD-Ag revealed its efficiency to induce the bacterial death (up to 4 log CFU/mL reduction compared with that for PET-CTR/CD) within 24 hours. Therefore, this study revealed that polyCTR/CD finishing could promote the loading of silver ions onto PET textile and its sustained release, which could be a promising method for the development of anti-infective wound dressing.

**Key Words:** Silver, Cyclodextrin, Dressing, Antibacterial

### **INTRODUCTION**

A wound is a rupture of the cutaneous barrier, which can facilitate the penetration of infectious agents into the organism. Thus, the infection of a wound, when remaining it untreated, can have morbid (an amputation) or mortal consequences (death after septicemia). In particular, the infection of the diabetic wounds is frequent, delays healing and may evolve to bone destruction. The silver-finished textiles are elaborated to decrease such a risk of cutaneous infection, notably due to *S. aureus*, also for the patients suffering from atopic dermatitis (Fontenoy, Sellal 2010).

In this fight against infections, silver has proven its efficiency. Indeed, it has broad-spectrum antibacterial properties. In 1884,

Crede firstly recognized the silver as an antibacterial agent by applying a solution of silver nitrate at 1% (Grier 1983) to prevent the ocular infections of new-borns. This is why pure silver or silver salts are used as antimicrobial agent in preventive and curative health care since centuries. To exert the bactericidal effect, the positively charged silver ions can form electrostatic bonds at negatively charged sites (lipopolysaccharide) on bacterial cell walls and facilitate their penetration into bacteria. The ionic silver can also degenerate DNA, RNA and the cytosolic proteins, and lead to mitochondrial dysfunction causing cell death (Li et al., 2010).

Currently, many researches are conducted on silver, in particular with the development of nano-biotechnologies,

which promotes important progress for the health and becomes a special domain for development of antibacterial biomaterials. For this reason, silver wound dressings are currently the most widespread silver-finished medical devices on the health market.

The effectiveness of applying silver on textile devices was already proved in several studies, some of which are commercialized, such as Urgotul<sup>®</sup> Ag (Urgo, France), Intergard silver<sup>®</sup> (Maquet, Sweden) Silver Graft<sup>®</sup> (B. Braun, Germany), *etc.* While in the application, they showed limited antibacterial effect because of insufficient release of silver (Agarwal et al., 2010). Therefore, one of the priorities is to develop the functionalized textiles for local delivery of bioactive molecules in order to limit the viral and bacterial infection and improve the life-comfort for the patients. Thus, to avoid the complications existed with the current silver-finished medical devices such as low level of silver release due to silver immobilization and low bioavailability due to rapid consumption of silver by proteins, *etc.* More effective treatment plans or designs for silver-finished devices are highly demanded.

An alternative solution to the problem is to functionalize the textiles by a cyclodextrin (CD) polymer. Several previous studies reported the interest of the functionalization of textiles by CD polymers (Martel et al., 2002; Blanchemain et al., 2008; Blanchemain et al., 2011; Laurent et al., 2011; Blanchemain et al., 2012). This concept essentially works through the capacity of the CD to form inclusion complexes with different guest molecules *e.g.* bioactive molecules. Their results have shown that the complexation between bioactive agent (like ciprofloxacin) and CD polymer leads to a significant extension of release of ciprofloxacin (Blanchemain et al., 2011). In addition, the good *in vivo* biocompatibility of these systems was also demonstrated (Blanchemain et al., 2008;

Jean-Baptiste et al., 2012). Nevertheless, those studies also displayed that the use of citric acid as grafting/crosslinking agent provided ion exchange properties to the textiles, due to the presence of COOH groups in the poly-CTR/CD structure. In particular, Ducoroy (Ducoroy et al., 2008) showed that such property of textiles could also be applied for water decontamination and recycling, by virtue of their efficient sorption of lead cations.

The aim of this study was to apply the CD-citric acid crosslinked system to a polyethylene terephthalate (PET)-based wound dressing textile in order to promote silver sorption and its prolonged local release for a better control of infection.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of the CD/ silver functionalized textile samples

After washing of the non-woven PET (provided by PGI Nordlys, Bailleul, France) by isopropanol and distilled water in soxhlet, the sample were treated by a pad-dry-cure textile finishing process using the following reactants:  $\beta$ -CD (Kleptose<sup>®</sup>  $\beta$ -CD, Roquette), sodium dihydrogen hypophosphite as catalyst ( $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , Aldrich Chemicals) and citric acid as crosslinking agent (CTR, Aldrich Chemicals). This finishing treatment resulted in the coating of the PET fibres by a cross-linked polymer named poly-CTR/CD made of cyclodextrin moieties cross-linked by citric groups through the esterification reaction. The grafting rate of the modified PET-CTR/CD was  $19.62 \pm 1.7$  wt-% according to the weight increase of the textile due to poly-CTR/CD fixation upon finishing treatment under the standard conditions.

Antibacterial activation with silver, was performed by soaking PET-CTR/CD finished samples (1.1 cm in diameter) in the solution of silver sulfate ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) overnight at  $37^\circ\text{C}$  and 80 rpm. Then the samples were rinsed in distilled water

to eliminate the excess of uncomplexed silver ions onto PET-CTR/CD-Ag.

### Microbial tests

Two bacterial strains used in this study were *S. aureus* CIP224 and *E. coli* K12. Each bacterial strain was prepared with a final concentration of  $1 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> for different tests.

To determine the Minimal Inhibition Concentration (MIC) the bacterial suspension was diluted to  $1 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup> in RC. 100  $\mu$ L of this suspension were added to 100  $\mu$ L of serial dilution from silver solution (10 g.L<sup>-1</sup>) by MH into microplate. The bacteria were incubated for 24 hours at 37°C. The turbidity was observed to determine the MIC.

For the disk diffusion test, the bacterial suspension was diluted to  $1 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> in a diluent. Firstly, virgin PET and PET-CTR/CD with or without silver were soaked in PBS for 3, 6, 24 and 48 hours. Then the disks were withdrawn and deposited onto Mueller-Hinton Agar (MHA) plates, which were pre-inoculated by 100  $\mu$ L of the bacterial suspension, and incubated for 24 hours at 37°C. The diameter of inhibition zone for different groups of samples was then measured.

For the time-kill test, the bacteria were diluted to  $1 \times 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> in cysteinated Ringer's solution (RC). 200  $\mu$ L of this suspension were deposited onto the samples and incubated at 37°C for 30 minutes, 2, 4, 6 and 24 hours, respectively. Then the bacteria on the samples were collected in 2 mL of phosphate buffered saline (PBS) and enumerated by serial dilution and plating to MHA. The viable colonies count was obtained after 24 hours of incubation at 37°C, to determine the concentration of the initial bacterial suspension and the treated samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

The MIC of the silver sulfate for *S. aureus* and *E. coli* was determined for concentrations of 39.06 mg.L<sup>-1</sup> (Table 1). These results attested to the antibacterial activity of the silver sulfate regarding to two tested bacterial strains.

Table 9: Minimal Inhibition Concentration (MIC) of the silver sulfate for *S. aureus* and *E. coli* for 24 and 48 hours.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Time (hours)	MIC (mg.L <sup>-1</sup> )	
24	39.06	39.06
48	39.06	39.06

The results of the disk diffusion test by measuring the diameter of inhibition zone (Figure 1) revealed that, for virgin PET, PET-Ag and PET-CTR/CD groups, the diameter of inhibition zone was less than or equal to 1.1 cm (the exact diameter of disk samples). While for PET-CTR/CD-Ag group, the inhibition zone was larger than 1.5 cm. Therefore, the influence of the CD polymer finish on the extension of silver delivery was highlighted, *i.e.* only the poly-CTR/CD functionalized PET showed an inhibitory activity against both bacterial strains for over 24 hours. These results imply that the silver complexed by poly-CTR/CD on the textile could be liberated at a sufficient concentration, which is effective to inhibit bacterial proliferation.

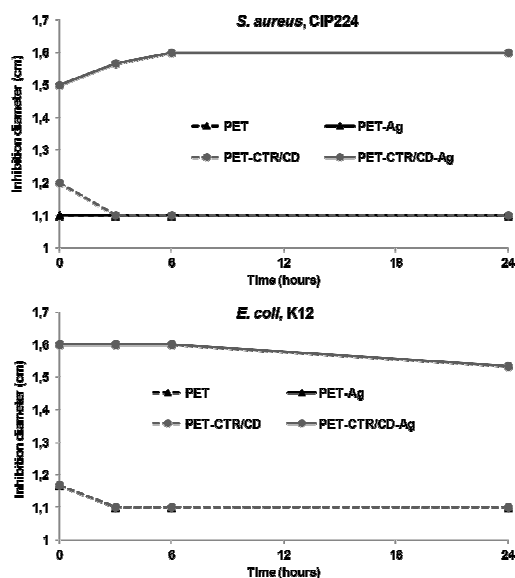


Fig. 1: Measurement of diameter (cm) of inhibition zone from virgin PET and CD polymer functionalized PET with or without silver.

The time-kill test aimed to observe the killing-capacity of the sample in direct contact with bacteria. The results showed the efficiency of PET-Ag and PET-CTR/CD-Ag to reduce the bacterial population during 24 hours for 4 Log CFU/mL (Figure 2), whereas for virgin PET and PET-CTR/CD, the bacterial population remained the same as initially. The results of significant immediate reduction of *E. coli* observed with PET-Ag (untreated by poly-CTR/CD) may be explained by the presence of residual silver physically adsorbed onto the PET. It is probable that this residual silver induced a latent state in bacteria. The reduction observed with PET-Ag on *S. aureus* may be explained by an accumulated silver release in the RC with time (24 hours) leading to the cell death. These results compared to the MIC meant that PET-CTR/CD-Ag finished samples (1.1 cm in diameter) could release at least 7.812  $\mu\text{g}$ . To confirm these results, the quantification of silver release level will be necessary to determine the delivery kinetics and the total quantity of silver loading.

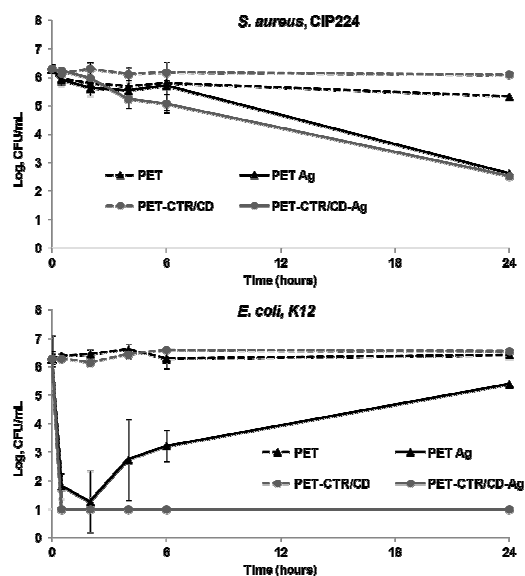


Fig. 2: Microbial time-kill test reveals the reduction of bacterial population after direct contact with the disk samples for different culture durations.

## CONCLUSION

To conclude, PET finished with CTR and CD with further silver activation showed an efficient inhibitory effect on the bacterial growth regarding to two tested bacterial strains (Gram-positive and Gram-negative, respectively) in the disk diffusion test. The time-kill test performed with PET-CTR/CD-Ag revealed its efficiency to induce the bacterial death for over 24 hours. Therefore, the results showed that PET-CTR/CD finishing promoted the silver ions loading onto the PET textile, and its sustained release. In consequence, this promising *in vitro* study should be confirmed by *in vivo* tests.

## REFERENCES

Agarwal, A., Weis, T. L., Schurr, M. J., Faith, N. G., Czuprynski, C. J., McAnulty, J. F., Murphy, C. J. and Abbott, N. L. (2010). Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. *Biomaterials* 31(4): 680-690, 0142-9612.



- Blanchemain, N., Karrouit, Y., Tabary, N., Bria, M., Neut, C., Hildebrand, H. F., Siepmann, J. and Martel, B. (2012).** Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydrate Polymers* 90(4): 1695-1703, 0144-8617.
- Blanchemain, N., Karrouit, Y., Tabary, N., Neut, C., Bria, M., Siepmann, J., Hildebrand, H. F. and Martel, B. (2011).** Methyl- $\beta$ -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta Biomaterialia* 7(1): 304-314, 1742-7061.
- Blanchemain, N., Laurent, T., Chai, F., Neut, C., Haulon, S. p., Krumpkonvalinkova, V., Morcellet, M., Martel, B., Kirkpatrick, C. J. and Hildebrand, H. F. (2008).** Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: Cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta Biomaterialia* 4(6): 1725-1733, 1742-7061.
- Ducoroy, L., Bacquet, M., Martel, B. and Morcellet, M. (2008).** Removal of heavy metals from aqueous media by cation exchange nonwoven PET fabrics modified with  $\beta$ -cyclodextrin and polycarboxylic acids. *Reactive and Functional Polymers* 68: 594-600.
- Fontenoy, C. and Sellal, K. O. (2010).** L'argent dans les dispositifs médicaux : marketing ou réel intérêt clinique ? *Le Pharmacien Hospitalier* 45(3): 131-141, 0768-9179.
- Grier, N. (1983).** Silver and its compounds. *Block SS, editor. Disinfection, sterilization, and preservation, 3rd Ed. Philadelphia: Lea & Febiger: 375-389.*
- Jean-Baptiste, E., Blanchemain, N., Martel, B., Neut, C., Hildebrand, H. F. and Haulon, S. (2012).** Safety, Healing, and Efficacy of Vascular Prostheses Coated with Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin Polymer: Experimental In Vitro and Animal Studies. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 43(2): 188-197, 1078-5884.
- Laurent, T., Kacem, I., Blanchemain, N., Cazaux, F., Neut, C., Hildebrand, H. F. and Martel, B. (2011).** Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta Biomaterialia* 7(8): 3141-3149, 1742-7061.
- Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Zeng, H.-Y., Ou-Yang, Y.-S. and Chen, Y.-B. (2010).** Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4): 1115-1122, 0175-7598.
- Martel, B., Morcellet, M., Ruffin, D., Ducoroy, L. and Weltrowski, M. (2002).** Finishing of Polyester Fabrics with Cyclodextrins and Polycarboxylic Acids as Crosslinking Agents. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44(1): 443-446, 0923-0750.

Annexes

**Estimation du coût de la thèse**

Frais de personnel	salaire brut	chargé x 1,4	x 36 mois	coeff	Total
Directeur de Thèse 1, Maître de conférences	3 000	4 200	151 200	20%	30 240 €
Encadrant 2, Professeur	4 000	5 600	201 600	5%	10 080 €
Encadrant 3, Ingénieur d'étude	2 000	2 800	100 800	15%	15 120 €
Encadrant 4, Ingénieur de recherche	2 500	3 500	126 000	5%	6 300 €
Stagiaire 1	350	490	17 640	50%	8 820 €
Assistante administrative, Secrétaire	1 600	2 240	80 640	5%	4 032 €
Salaires personnels, bourse ministérielle	2000*	2 800	100 800	100%	100 800 €
<b>Total</b>	<b>13 450</b>	<b>21 630</b>	<b>778 680</b>		<b>175 392 €</b>

\*1500 € correspondant à la bourse ministérielle + 500 € correspondant à un forfait enseignement/monitorat (64 heures/an)

Infrastructure	Coût	Loyer et amortissement	x mois	Coeff, Quantité	Total
<b>-Communication et bureautique</b>					
Bureau	200		0	50%	100 €
Téléphone	800		0	1/9	90 €
Ordinateur	700	0	0	100%	700 €
<b>-Matériel (Analyse et expériences)</b>					
HPLC	21000	21000/5 ans 12600/3ans	12	1/6	700 €
Spectrophotomètre UV	5000	5 (acheté en 2003)	36	1/9	- €
Infra rouge		200/demi-journée			1 000 €
Poste de Sécurité Microbiologique (PSM)	5000	5000/5 1000x3	36	1/9	330 €
Compteur cellulaire	20000				
Microscope Électronique à Balayage		200/demi-journée		3	600 €
<b>Logiciels spécifiques</b>					
UV probe	500	500/5 ans 300/3ans	36	1/9	33 €
Lab Solution	500	500/5 ans 300/3ans	12	1/6	17 €
Spectrum One	500				inclus dans infra rouge
<b>Consommables</b>					
colonne HPLC	1000			1	1 000 €
Produits chimiques et réactifs Contenants plastique		(15000-20000)/projet + 10000 (évaluation microbiologique)			27 500 €
<b>Total</b>	<b>55 200</b>	<b>0</b>	<b>132</b>		<b>32 070 €</b>

Documentation, Logiciel de bureautique	Coût	Loyer mensuel, amortissement	x 36 mois	Coeff, Quantité	Total
Accès BiblioINSERM	Label Inserm				- €
Commande de publication	5			2	10 €
Microsoft Office	80*	80/5ans 48/3ans	36	1	48 €
<b>Total</b>	<b>55 205</b>	<b>0</b>	<b>36</b>		<b>58 €</b>

\*Licence par poste

Transport, Hébergement, Restauration	Coût	Loyer mensuel, amortissement	x 36 mois	Coeff, Quantité	Total
Logement perso		750	27000	1/24 heures	1 125 €
Abonnement transport	2	22,25*	801	4/7 jours	459 €
Voiture	8 000	80**	2880	30 km X (1/5 jours) / 500 km	1 635 €
<b>-Congrès</b>					
Frais d'inscription	300			4	1 200 €
Voyage	700			3	2 265 €
Hebergement	165			1	
Repas	80 €/jour***			14 (au total)	1 120 €

\*45,5 €/mois - participation 50% par l'université

\*\*40 € d'assurance/mois + 40 € de GPL

\*\*\*Forfait

<b>Total</b>	<b>9167</b>	<b>750</b>	<b>30681</b>		<b>7 803 €</b>
<b>Grand Total</b>					<b>215 323 €</b>