



Titre: Fabrication, caractérisation et application de surfaces organiques
Title: fonctionnalisées pour le génie tissulaire

Auteur: Gaël Boespflug
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Boespflug, G. (2016). Fabrication, caractérisation et application de surfaces organiques fonctionnalisées pour le génie tissulaire [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2098/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2098/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michael R. Wertheimer, & Sophie Lerouge
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FABRICATION, CARACTÉRISATION ET APPLICATION DE SURFACES ORGANIQUES
FONCTIONNALISÉES POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

GAËL BOESPFLUG

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AVRIL 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

FABRICATION, CARACTÉRISATION ET APPLICATION DE SURFACES ORGANIQUES
FONCTIONNALISÉES POUR LE GÉNIE TISSULAIRE

présenté par : BOESPFLUG Gaël

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., présidente

M. WERTHEIMER Michael R., D. Sc. A., membre et directeur de recherche

Mme LEROUGE Sophie, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à Michel Wertheimer et Sophie Lerouge, qui ont accepté de m'accueillir dans leurs laboratoires et de m'intégrer à leurs projets. Merci de m'avoir guidé au cours de cette maîtrise, alternant entre autonomie et bons conseils. Et surtout, un immense merci pour m'avoir permis de découvrir le monde des biomatériaux, et le monde de la recherche en général. J'ai passé deux années passionnantes grâce à vous, au cours desquelles j'ai énormément appris.

Merci également aux autres membres du jury, Caroline Boudoux et Nick Virgilio, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier mes collègues de tous les jours, y compris ceux qui sont partis avant moi : Houman, Bernard, Matthieu, Audrey, Jessica, Mélusine, Pauline, Eve, Caroline, Arnaud, Fatima, Marion, Francesco, Sepideh, Elias, Atma, Yasaman, Mylène, Sean... pour m'avoir, selon les cas, intégré, côtoyé, soutenu. Merci pour la dose de bonne humeur quotidienne notamment, travailler dans un tel cadre était plus qu'agréable. Je voudrais remercier tout particulièrement Bernard pour son aide inestimable dans la caractérisation chimique des surfaces, mais aussi pour tous ses bons conseils et sa spontanéité ; et Marion, qui a consacré énormément de temps et d'énergie dans ce projet, et sans qui je serais encore en train de me battre avec les cellules.

Un grand merci à Josianne, pour son aide et son expertise sur tout ce qui touche à l'analyse XPS ; à Yves, pour son soutien technique sans faille ; à Richard, pour sa maîtrise de l'ellipsométrie ; et à Patricia pour celle de l'AFM.

Merci également à Grégory De Crescenzo et tous les membres de son laboratoire, notamment Benoît, Sam, Fred, Charles, Éric et Cyril, qui ont accepté que j'utilise leur espace et leur matériel, et même leurs techniques.

Je remercie aussi, bien sûr, tous ceux que j'ai côtoyés et qui m'ont soutenu durant ces deux années, trop nombreux pour être tous nommés : colocataires, amis, famille, collègues des laboratoires voisins...

Enfin, je voudrais remercier Frédéric Murschel et Thomas Gervais qui m'ont aiguillé pour trouver un projet de maîtrise et sans qui je serais peut-être rentré chez moi bredouille ; ainsi que la Fondation Pierre Arbour dont le soutien financier m'a permis d'effectuer cette maîtrise.

RÉSUMÉ

Face à l'inertie chimique de la plupart des polymères, la fonctionnalisation de surface a été proposée afin d'améliorer l'adhésion et la croissance cellulaires à la surface des biomatériaux, ou encore de greffer des biomolécules actives permettant d'optimiser davantage la réponse cellulaire. Ceci peut notamment permettre d'améliorer les implants vasculaires dont la paroi interne doit être recouverte d'un tapis de cellules endothéliales pour éviter des complications cliniques. Différents procédés sont étudiés au cours de ce projet, afin d'identifier les traitements et groupements chimiques les plus favorables à l'adhésion et la prolifération cellulaires.

Des films de polytéraphthalate d'éthylène (PET) ont été utilisés pour créer des surfaces riches en azote, par fonctionnalisation plasma (modification de surface à l'aide de plasma NH_3) (PETf), par polymérisation plasma (L-PPE:N), par dépôt chimique en phase vapeur (Parylène diX AM) ou greffage en phase liquide (PAAm) ; la polymérisation plasma a également été utilisée pour la fabrication de revêtements oxygénés (L-PPE:O) et de dépôts mixtes, à la fois oxygénés et azotés (L-PPE:O,N), sur des films de PET. Ces surfaces ont été comparées aux surfaces commerciales pour la culture cellulaire *Tissue culture Polystyrene* (TCP « FalconTM », oxygénée) et PrimariaTM (mixte) de la compagnie Corning Inc., connues pour promouvoir efficacement l'adhésion cellulaire. Toutes ces surfaces ont été caractérisées chimiquement par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS), et leur capacité à promouvoir l'adhésion cellulaire a été évaluée par la culture de cellules endothéliales (HUVEC). Les amines primaires $-\text{NH}_2$ étant connues pour favoriser l'adhésion des cellules, elles ont été quantifiées sur les surfaces azotées par dérivation chimique ; une méthode colorimétrique (Orange II) a également été utilisée. D'autre part, le taux de déposition et la solubilité des revêtements L-PPE:O,N, récemment développés par ce laboratoire, ont été évalués.

Chacune des surfaces caractérisées chimiquement a montré un haut degré de fonctionnalisation ; l'analyse par XPS en angle rasant a indiqué une fonctionnalisation des surfaces PETf, TCP et PrimariaTM à leur surface immédiate uniquement (sur une épaisseur de l'ordre de quelques nm). Les surfaces azotées L-PPE:N, PETf et PAAm, ainsi que les dépôts richement oxygénés L-PPE:O, ont permis une excellente prolifération cellulaire, comparable à celle obtenue sur le TCP, prouvant l'efficacité des groupements chimiques présents en surface : les groupements carboxyles et amines primaires, notamment, ont paru jouer un rôle clé dans l'adhésion des

cellules. La similitude du comportement cellulaire observé sur ces surfaces de compositions chimiques pourtant différentes montre, d'une part, qu'un seuil de concentration en groupements chimiques « actifs », à partir duquel leur quantité n'a plus d'influence sur l'affinité des cellules avec la surface, a été dépassé aussi bien pour les surfaces azotées qu'oxygénées, avec une efficacité comparable à favoriser l'adhésion cellulaire ; et d'autre part, que l'efficacité des surfaces riches en amines primaires ne dépend pas de la présence d'autres groupements azotés. Une exception a cependant été notée pour le Parylène diX AM qui, malgré une forte concentration en amines primaires, ne favorise pas bien l'adhésion et la croissance cellulaire, ce qui reste inexpliqué. Contrairement à la dérivation et l'analyse XPS, la technique de quantification par Orange II s'est révélée inadaptée pour comparer des surfaces aminées dans ce contexte, étant biaisée par le phénomène de diffusion dans le volume libre des différents échantillons.

L'association de groupements oxygénés et azotés peut résulter en une adhésion cellulaire encore accrue, comme dans le cas des surfaces Primaria™, par un effet de synergie. Malheureusement, cet effet n'a pas été observé sur les revêtements L-PPE:O,N considérés, possiblement à cause d'un manque de fonctions carboxyles.

En conclusion, des surfaces hautement fonctionnalisées ont été obtenues, avec une excellente réponse des HUVEC pour la plupart d'entre elles, indépendamment de leur nature azotée ou oxygénée. D'autre part, la combinaison de ces chimies peut, par synergie, permettre d'accroître encore l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales, et donc d'améliorer l'intégration des implants vasculaires, bien que cet effet n'ait pas pu être recréé au cours de ce projet.

Mots-clés : biomatériaux, implants vasculaires, couches minces, fonctionnalisation, polymérisation plasma, amines primaires, surfaces oxygénées, TCP, Primaria™, XPS, dérivation chimique, adhésion cellulaire, HUVEC.

ABSTRACT

The interactions between a biomaterial and a biological environment are largely influenced by surface chemistry, which can be controlled in order to enhance cell adhesion. This can be applied to the design of vascular grafts, the internal walls of which need to be fully covered by an endothelial cell layer in order to prevent harmful outcomes such as thrombosis. Various processes were considered in this project, in order to identify which coatings and chemical groups are the most advantageous for enhanced endothelial cell adhesion and -growth.

Nitrogen-rich surfaces were obtained on polyethylene terephthalate (PET) films by plasma treatment (NH_3 plasma modification, PETf), plasma polymerization (L-PPE:N), chemical vapor deposition (Parylene diX AM) or liquid-chemical covalent grafting of a polymer (PAAm); plasma polymerization was also used to create oxygen-rich films (L-PPE:O), as well as hybrid coatings containing both oxygen and nitrogen-based groups (L-PPE:O,N), on PET films. These surfaces were compared to commercial culture plates such as oxygen-rich *Tissue Culture Polystyrene* (TCP, “Falcon™”) and hybrid Primaria™, both developed and marketed by Corning Inc. and known for their ability to promote cell adhesion. The chemistry of all these surfaces was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and endothelial (HUVEC) cells were used to assess their ability to enhance cell adhesion. Primary amine groups ($-\text{NH}_2$), well known to enhance cell adhesion, were quantified on the nitrogen-rich surfaces by chemical derivatization, while the colorimetric method based on Orange II dye was used for comparison. In addition, the deposition rate and the solubility of newly developed hybrid L-PPE:O,N coatings were evaluated.

All of the surfaces investigated were found to be highly functionalized; the XPS analyses of PETf, TCP and Primaria™ at grazing angles showed this functionalization to reside only very near the surface (a few nm deep). Excellent cell proliferation was observed on nitrogen-rich L-PPE:N, PETf and PAAm, as well as on oxygen-rich L-PPE:O, with an efficacy comparable to TCP. These results prove that the efficacy of moieties created on these surfaces, especially of carboxylic and primary amine groups, seemed to play a key role in cell adhesion. Furthermore, the cellular behavior was found to be very similar on these diverse surfaces, despite their different chemical compositions. This suggests that a concentration threshold of “active” moieties was reached for both oxygen- and nitrogen-containing surfaces, with a similar efficacy to foster cell adhesion, above which threshold their quantities no longer appear to influence cell

attachment. It also shows that cell adhesion on nitrogen-rich surfaces is enhanced by primary amine groups regardless of the presence of other nitrogen-containing groups. Moreover, the efficient cell adhesion observed on surfaces such as PETf and TCP clearly confirmed that the influence of surface chemistry on cell behavior only involves the outermost surface region of biomaterials. For that reason, the Orange II quantification technique, which reacts with amine groups in the bulk of the polymer material, is inappropriate in this context.

The simultaneous presence of both oxygen- and nitrogen-based moieties can lead to an even better cell adhesion, perhaps due to a synergistic effect, as observed on Primaria™ surfaces. Unfortunately this could not be observed on L-PPE:O,N coatings, possibly due to insufficient carboxyl groups.

In conclusion, highly functionalized surface-near regions have been created on polymers, most of them displaying excellent cell response, whether they were nitrogen- or oxygen-rich. The association of these two types of chemistries may induce still further improvement of HUVEC attachment and proliferation, hence even better integration of vascular grafts, but this has so far not been achieved with L-PPE:O,N coatings.

Keywords: biomaterials, vascular grafts, thin coatings, functionalization, plasma polymerization, primary amines, oxygen-rich surfaces, TCP, Primaria™, XPS, chemical derivatization, cell adhesion, HUVEC.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Contexte clinique.....	4
2.1.1 Les maladies cardiovasculaires	4
2.1.2 Traitements existants.....	4
2.2 Adhésion cellulaire.....	7
2.2.1 Mécanisme	7
2.2.2 Affinités avec les biomatériaux.....	8
2.3 Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion cellulaire	10
2.3.1 Traitements par plasma	10
2.3.2 Dépôt chimique en phase vapeur	18
2.3.3 Greffage chimique de polymères en phase liquide	19
2.3.4 Greffage de biomolécules et facteurs de croissance.....	20
2.4 Objectifs du projet.....	22
CHAPITRE 3 MÉTHODES	23
3.1 Modifications de surface	23

3.1.1	Procédés plasma	23
3.1.2	Parylène diX AM	25
3.1.3	Greffage de polyallylamine (PAAm) par aminolyse.....	26
3.1.4	Greffage de sulfate de chondroïtine (CS) sur des surfaces aminées	27
3.1.5	Surfaces étudiées	28
3.2	Tests de caractérisation	30
3.2.1	Caractérisation physique	30
3.2.2	Caractérisation chimique.....	35
3.3	Culture de cellules HUVEC	44
3.3.1	Culture cellulaire et adhésion sur les surfaces	44
3.3.2	Caractérisation de l'adhésion et de la croissance	45
3.3.3	Analyse statistique.....	46
CHAPITRE 4	RÉSULTATS	47
4.1	Caractérisation des surfaces	47
4.1.1	Étude des revêtements plasma L-PPE:O,N.....	47
4.1.2	Composition chimique des surfaces	50
4.1.3	Greffage du sulfate de chondroïtine	65
4.2	Adhésion et croissance des HUVEC sur les surfaces	68
4.2.1	Surfaces aminées	68
4.2.2	Surfaces oxygénées	70
4.2.3	Surfaces hybrides	71
4.2.4	Effets du sulfate de chondroïtine.....	73
CHAPITRE 5	DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS	75
5.1	Synthèse et discussion des principaux résultats	75

5.1.1	Méthodes de caractérisation et profondeur d'analyse	75
5.1.2	Surfaces aminées	77
5.1.3	Surfaces oxygénées	80
5.1.4	Surfaces hybrides	82
CHAPITRE 6 CONCLUSION		89
BIBLIOGRAPHIE		91
ANNEXE – Épaisseur analysée par XPS		105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Principales réactions au sein d'un plasma (A* : atome excité, radical).....	11
Tableau 2.2 : Composition élémentaire du Primaria™ obtenue par analyse XPS, selon diverses références	17
Tableau 3.1 : Conditions expérimentales des dépôts plasma "L-PPE"	25
Tableau 3.2 : Surfaces étudiées dans le cadre de ce projet de maîtrise	28
Tableau 3.3 : Paramètres caractéristiques des éléments analysés par XPS.....	38
Tableau 3.4 : Paramètres utilisés pour la déconvolutions des pics C1s	39
Tableau 3.5 : Paramètres utilisés pour la déconvolutions des pics O1s	39
Tableau 4.1 : Taux de déposition des revêtements plasma obtenus par ellipsométrie (n=1). Celui du L-PPE:O est tiré de (Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015).	48
Tableau 4.2 : Composition chimique de diverses surfaces azotées obtenues par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal, n étant le nombre d'échantillons analysés.....	50
Tableau 4.3 : Composition chimique du PETf par XPS à différents angles d'analyse (n=4).....	52
Tableau 4.4 : Densités surfaciques de molécules d'Orange II adsorbées à la surface des revêtements aminés L-PPE:N, PETf et Parylène diX AM. Les valeurs de [NH ₂] mesurées par TFBA (analyse XPS en angle normal, cf. Tableau 4.2) ont été ajoutées pour comparaison.	54
Tableau 4.5 : Composition chimique des surfaces oxygénées obtenue par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal (n \geq 4).....	59
Tableau 4.6 : Composition chimique du TCP par XPS à différents angles d'analyse (n \geq 2)	60
Tableau 4.7 : Déconvolution du pic C1s pour les surfaces L-PPE:O et TCP (n=4)	61
Tableau 4.8 : Composition chimique des surfaces hybrides obtenue par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal (n \geq 3)	62
Tableau 4.9 : Composition chimique du Primaria™ par XPS à différents angles d'analyse (n=6)	63

Tableau 4.10 : Déconvolution du pic C1s pour les surfaces L-PPE:O,N et Primaria ($n \geq 4$)	64
Tableau 4.11 : Composition des revêtements L-PPE:N, avant et après greffage de CS ($n \geq 2$)	65
Tableau 5.1 : Bilan des compositions élémentaires et en amines primaires les principales surfaces considérées au cours de ce projet	78
Tableau 5.2 : Bilan des déconvolutions de pics C1s pour les surfaces oxygénées et hybrides.....	82
Tableau A.1: Libre parcours moyen inélastique dans le polystyrène, sous un rayonnement X ($h\nu=1253.6\text{eV}$)	105
Tableau A.2 : Épaisseurs de détection dans le polystyrène ($h\nu=1253.6\text{eV}$)	106

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Exemples de prothèses vasculaires en PET et PTFE.....	5
Figure 2.2 : Structure possible d'un polymère plasma d'éthylène (Tibbitt, Shen, et Bell 1976), reproduite avec permission.....	13
Figure 2.3 : Chimie de surface du Primaria™ selon Corning	17
Figure 2.4 : Structure chimique du Parylène diX AM (poly-aminomethyl-[2,2]-paracyclophane)	19
Figure 2.5 : Structure chimique du PVAm.....	20
Figure 2.6 : Différentes isoformes du sulfate de chondroïtine (Volpi 2007)	21
Figure 3.1 : Schéma du système plasma r.f. à basse pression utilisé dans le laboratoire du Pr. Wertheimer (EPM), reproduit de (Truica-Marasescu et al. 2008) avec permission.....	24
Figure 3.2 : Réaction d'aminolyse entre le PAAm le PET	27
Figure 3.3 : Exemple de polarisation d'un faisceau émis par l'ellipsomètre	30
Figure 3.4 : Schéma du trajet optique d'un ellipsomètre spectroscopique, tiré de (« Ellipsométrie Techniques de l'Ingénieur » 2015).....	31
Figure 3.5 : Immersion des dépôts L-PPE:O,N pour des tests de solubilité	33
Figure 3.6 : Principe de fonctionnement d'un AFM, schéma tiré de (« Microscopie à force atomique (AFM) Techniques de l'Ingénieur » 2015).....	34
Figure 3.7 : Exemple de scan XPS : Survol d'un échantillon de L-PPE:N.	36
Figure 3.8 : Exemple de déconvolution d'un pic à haute résolution : pic C1s du Primaria, analysé avec un angle de 70°	38
Figure 3.9 : Réaction du TFBA avec une amine primaire. Schéma reproduit de (Girard-Lauriault et al. 2005) avec permission.....	40
Figure 3.10 : Molécule d'Orange II, schéma reproduit de (Noel et al. 2011) avec permission.....	42
Figure 4.1 : Perte d'épaisseur de dépôts L-PPE:O,N après 24h d'immersion dans l'eau	49

Figure 4.2 : Exemples de survol XPS des surfaces aminées Parylène diX AM (a), L-PPE:N (b) et PETf (c)	51
Figure 4.3 : Quantification d'amines primaires par la méthode TFBA sur des films de PET fonctionnalisés par PAAM à divers pH	53
Figure 4.4 : Concentration surfacique de molécules d'orange II adsorbées à la surface de films de PET, traités par le PAAM à différents pH de réaction	55
Figure 4.5 : Densité « surfacique » de molécules Orange II liées à des fonctions amines, pour des revêtements L-PPE:N d'épaisseurs variées, mais fabriqués sous conditions identiques.	56
Figure 4.6 : Clichés AFM d'échantillons de PAAM obtenus à différents pH de réaction. A : pH = 11.5, Rq = 1.3 nm ; B : pH = 12.0, Rq = 1.0 nm ; C : pH = 12.6, Rq = 2.2 nm ; D : pH = 12.8, Rq = 5.9 nm.....	58
Figure 4.7 : Pics C1s du TCP analysé par XPS à angle normal (a) et rasant (b), et du L-PPE:O à angle normal (c)	60
Figure 4.8 : Pics C1s du Primaria analysé par XPS à angle normal (a) et rasant (b), et du L-PPE:O,N à angle normal (c)	64
Figure 4.9 : Survol XPS d'un échantillon de L-PPE:N après greffage de CS	66
Figure 4.10 : Concentration surfacique de TBO sur des surfaces aminées après greffage de CS (n > 30)	67
Figure 4.11 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces aminées après 24h, 4j et 7j de culture (n ≥ 8). En comparant les temps correspondants, on ne trouve pas de différence significative (p > 0.05) entre le PAAM, le PETf et le L-PPE:N, mais ceux-ci sont statistiquement différents du PET et du Parylène diX AM (* p < 0.05).....	68
Figure 4.12 : Adhésion et croissance des HUVECs sur des surfaces aminées, observées au microscope optique après coloration au cristal violet. Les taches pâles en arrière-plan sont dues au séchage inhomogène du substrat après rinçage.....	69
Figure 4.13 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces oxygénées (TCP, L-PPE:O) après 24h, 4j et 7j de culture, comparée au PET et au L-PPE:N (n ≥ 8). En comparant les temps correspondants, les résultats sur PET sont statistiquement inférieurs (*	

$p < 0.05$) aux autres surfaces. Une différence significative (* $p < 0.05$) entre le TCP et les revêtements L-PPE:O et L-PPE:N a été trouvée après 4 et 7 jours de culture, mais pas à 24h. Aucune différence significative n'a été trouvée entre le L-PPE:N et le L-PPE:O.....70

Figure 4.14 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur le dépôt L-PPE:O,N après 24h, 4j et 7j de culture, comparée au PET et aux revêtements L-PPE:N et L-PPE:O ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, les résultats sur le L-PPE:O,N sont statistiquement inférieurs (* $p < 0.05$) à ceux obtenus sur L-PPE:N et L-PPE:O, mais statistiquement supérieurs (* $p < 0.05$) au PET.....71

Figure 4.15 : Activité métabolique des cellules HUVEC dans des plaques 24-puits de type TCP et Primaria™ après 24h, 4j et 7j de culture ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, les résultats sur le Primaria™ sont significativement supérieurs à ceux obtenus sur le TCP (* $p < 0.05$).....72

Figure 4.16 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces aminées après greffage de CS, au bout de 24h, 4j et 7j de culture ($n \geq 8$).....73

Figure 5.1 : Illustration de la profondeur d'analyse par XPS, ARXPS et Orange II, sur des revêtements déposés sur un substrat (à gauche) et substrats modifiés en surface (à droite)..77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Note : De nombreux sigles et abréviations sont des acronymes du nom anglais désignant le produit ou procédé concerné

AFM	Microscope à force atomique (de l'anglais <i>Atomic Force Microscope</i>)
ANOVA	Analyse de la variance
AR-XPS	Spectroscopie Photoélectronique à rayons X à angle résolu
BOPP	Propylène biaxialement orienté (<i>Biaxially Oriented Polypropylene</i>)
CBB	Bleu de Coomassie (<i>Coomassie Brilliant Blue</i>)
C-C	Liaison simple entre deux atomes de carbone
C=C	Liaison double entre deux atomes de carbone
C-N	Liaison simple entre le carbone et l'azote
C-O	Liaison simple entre le carbone et l'oxygène
COOH	Groupe carboxyle
COOR	Groupe ester
C:H:O	Polymère-plasma oxygéné
CS	Sulfate de chondroïtine (<i>Chondroitin sulfate</i>)
CVD	Dépôt chimique en phase vapeur (<i>Chemical Vapor Deposition</i>)
diX AM	Type de parylène avec amines primaires : aminométhyl-[2-2]paracyclophane
Δ	Différence de phase entre $E_{s,r}$ et $E_{p,r}$
e_{AB} , e_{AC}	Différences d'épaisseur entre les zones A, B et C
E_b	Energie de liaison
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i>

E_k	Energie cinétique
EPM	Ecole Polytechnique de Montréal
$E_{p,i}$ et $E_{s,i}$	Composantes du champ électrique incident
$E_{p,r}$ et $E_{s,r}$	Composantes du champ électrique réfléchi
EtDA	Ethylène diamine
EtOH	Ethanol
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
F.W.H.M.	Largeur à mi-hauteur (<i>Full Width at Half Maximum</i>)
h	Constante de Planck ($6,626.10^{-34}$ J.s)
H-PPE:N	Polymère-plasma déposé à pression atmosphérique à base d'éthylène riche en azote
HUVEC	Lignée cellulaire de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
k	Coefficient d'extinction
L-PPE:N	Polymère-plasma déposé à basse pression à base d'éthylène riche en azote (<i>Low-Pressure Plasma-Polymerized PolyEthylene enriched in Nitrogen</i>)
L-PPE:O	Polymère-plasma déposé à basse pression à base d'éthylène riche en oxygène
L-PPE:O,N	Polymère-plasma déposé à basse pression à base d'éthylène riche en azote et en oxygène
MES	Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique
M.W	Poids moléculaire (<i>Molecular Weight</i>)
n	Indice de réfraction
n	Nombre d'échantillons dans un test statistique
N-C=O	Groupe amide
NH ₂	Groupe amine primaire
NHS	N-hydroxysuccinimide

ν	Fréquence de radiation d'un photon
Orange II	4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid sodium salt (<i>acid orange 7</i>)
p	Valeur de p dans un test statistique
p	Pression interne du réacteur
P	Puissance du plasma
PAAm	Polyallylamine
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCB	Para-chlorobenzaldehyde
PECVD	Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (<i>Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition</i>)
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
PETf	Film de PET fonctionnalisé par plasma d'azote
pH	Potentiel hydrogène
PP	Polymère-plasma
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVAm	Polyvinylamine
Φ	Constante caractéristique du système plasma
ψ	Différence d'amplitude entre $E_{s,r}$ et $E_{p,r}$
ρ	Ratio des coefficients de réflexion
R	Ratio des débits de gaz
R_q	Rugosité moyenne quadratique
r_p et r_s	Coefficients de réflexion complexes
TBO	Toluidine Bleu O (7-amino-8-methylphenothiazin-3-ylidene)-dimethylammonium)
TCP	Polystyrène pour la culture cellulaire (<i>Tissue Culture Polystyrene</i>)
TFAA	Anhydride trifluoroacétique

TFBA	4-(trifluoromethyl)benzaldehyde
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
U937	Lignée cellulaire de monocytes humains
VUV	Ultraviolets lointains (<i>Vacuum UltraViolets</i>)
[X]	Concentration de l'espèce X
X1s, X2p	Pic correspondant à l'orbitale 1s (resp. 2p) de l'élément X, sur un spectre XPS
XPS	Spectroscopie Photoélectronique à rayons X

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les biomatériaux ont été définis par Williams comme des « matériaux non vivants utilisés dans des dispositifs médicaux, conçus pour interagir avec des systèmes biologiques » (Williams 1987). Ce sont donc ces matériaux qui constituent les prothèses et implants, mais également les appareils de diagnostic, ou les dispositifs utilisés en laboratoire. Il est impératif que ces matériaux ne causent pas de réactions néfastes pour le corps biologique : c'est la notion de biocompatibilité, définie généralement comme la « capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique » (Williams 1987), et plus récemment comme la « capacité d'un matériau à déclencher et guider localement la cicatrisation non-fibreuse, la reconstruction et l'intégration tissulaire » (Ratner 2011). Les matériaux utilisés sont extrêmement variés selon les applications : métaux, alliages, polymères, céramiques... Les polymères synthétiques, notamment, sont souvent rencontrés dans ce domaine : leurs propriétés très variées aussi bien au niveau mécanique que chimique, ainsi que leur facilité de mise en forme et leur coût, permettent de les utiliser dans une grande gamme d'applications. De plus, certains sont biodégradables, ce qui présente un avantage certain pour des dispositifs temporaires par exemple.

Un des principaux défis consiste à obtenir un matériau possédant à la fois les propriétés volumiques et surfaciques requises pour le dispositif médical considéré. En effet, dans le cas d'une prothèse par exemple, le dispositif ne peut être fonctionnel que s'il possède une géométrie et un comportement mécanique appropriés à son utilisation ; d'autre part, sa surface, en contact avec le corps biologique, ne doit pas engendrer de réponse inappropriée, comme une inflammation ou la formation d'un caillot sanguin. Pour atteindre cet objectif, une méthode classique consiste à utiliser un dispositif possédant les propriétés mécaniques adéquates, et à y déposer un revêtement ou modifier sa surface pour obtenir toutes les propriétés requises.

Ce projet de maîtrise concerne des procédés de traitement de surface favorisant l'adhésion et la croissance de cellules sur des matériaux polymériques. L'application de tels procédés peut faciliter la régénération des tissus autour d'un implant, et prévenir des réactions inflammatoires par exemple. En effet, le comportement des cellules est largement influencé par la surface sur laquelle elles se trouvent : sa texture, et surtout sa composition chimique, sont des éléments déterminants. Certains groupements chimiques sont connus pour améliorer l'affinité des cellules

avec le substrat : des revêtements azotés, riches en amines primaires -NH_2 , mais aussi des surfaces oxygénées, sont utilisés pour encourager la formation de couches cellulaires sur des biomatériaux (Siow et al. 2006). Cette « fonctionnalisation » de surfaces polymériques sert également à la culture cellulaire, où le matériel doit pouvoir faciliter la prolifération des cellules. Par exemple, les surfaces *Tissue Culture Polystyrene* développées par Corning Inc. présentent des groupements fonctionnels oxygénés ; les surfaces Primaria™, dont la capacité à favoriser l'adhésion des cellules est encore accrue (Steele et al. 1995), ont la particularité d'être fonctionnalisées à la fois par des groupements azotés et oxygénés.

Les plasmas, gaz fortement ionisés et très réactifs, peuvent être utilisés pour obtenir des surfaces hautement fonctionnalisées. D'autres techniques, notamment chimiques, permettent d'obtenir les groupements fonctionnels désirés en surface d'un substrat polymérique. Dans ce mémoire, des surfaces fonctionnalisées par différents procédés sont étudiées, afin de comparer leur capacité à favoriser l'adhésion cellulaire, en lien avec la chimie de surface créée. Il s'inscrit dans le cadre d'un projet de conception d'implants vasculaires synthétiques, utilisés pour remplacer les vaisseaux sanguins défectueux, et pour lesquels le recouvrement de la paroi interne par une couche de cellules endothéliales est crucial. C'est pourquoi ces cellules seront utilisées pour évaluer la qualité de support des différentes surfaces azotées et oxygénées. D'autre part, l'association de ces deux types de groupements chimiques présente un potentiel remarquable, illustré par l'efficacité des surfaces Primaria™ ; un intérêt particulier sera donc porté à cette possible synergie. Enfin, la possibilité et les avantages de greffer des molécules bioactives en surface des revêtements seront examinés.

Organisation générale du mémoire

Le chapitre 2 consiste en une revue de la littérature, et présente les enjeux et les notions nécessaires à la compréhension de ce mémoire : le contexte clinique dans lequel il s'inscrit est précisé, puis les mécanismes régissant l'affinité entre cellules et biomatériaux sont expliqués, après quoi les différentes méthodes de fonctionnalisation de surface pour l'adhésion cellulaire sont exposées. On terminera ce chapitre en résumant les objectifs spécifiques de ce projet.

Dans le chapitre 3, les conditions expérimentales employées sont énoncées. Les procédés de fabrication des surfaces utilisées au cours de ce projet, et les différents paramètres utilisés, sont d'abord détaillés. Ensuite, les tests de caractérisation effectués sont présentés, ainsi que les notions théoriques sur lesquelles ils s'appuient. Les tests de culture cellulaire, incluant les conditions de culture et les techniques de caractérisation de la prolifération cellulaire, sont également précisés.

Le chapitre 4 rassemble les résultats obtenus au cours de ce projet. Après avoir déterminé le taux de déposition et la solubilité des revêtements L-PPE:O,N développés depuis peu dans nos laboratoires, les propriétés chimiques (composition élémentaire, fonctions chimiques présentes) des surfaces aminées, oxygénées et hybrides sont explicitées. Les résultats des tests de quantification du sulfate de chondroïtine greffé sur des surfaces aminées sont ensuite donnés. Enfin, l'adhésion et la croissance des cellules HUVEC sur les différentes surfaces sont comparées, respectivement 24h, 4 jours et 7 jours après l'ensemencement.

Le chapitre 5 propose une réflexion autour de ces résultats. La notion de profondeur de traitement et d'analyse des surfaces des biomatériaux est discutée. L'efficacité des différents procédés de fonctionnalisation est étudiée, permettant de commenter l'implication des différents groupements chimiques dans le processus d'adhésion des cellules endothéliales. Les limites de ce projet sont également développées.

Enfin, le chapitre 6 conclut sur les réalisations de ce projet.

En annexe, les calculs menant à l'évaluation de la profondeur d'analyse d'échantillons polymériques par XPS sont détaillés.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Contexte clinique

2.1.1 Les maladies cardiovasculaires

En 2009, 68 342 Canadiens sont décédés d'une maladie cardiovasculaire grave (« Mortalité : liste sommaire des causes : Faits saillants » 2016), ce qui représente plus de 28 % des décès. Les causes de ces maladies sont variées : elles peuvent être d'origine congénitale (cardiopathie congénitale) ou infectieuse (rhumatisme cardiaque), ou encore être liées à une faiblesse du muscle cardiaque (insuffisance cardiaque) ; toutefois, pour la plupart ce ne sont que des conséquences d'une défaillance du système circulatoire (cardiopathie ischémique, maladies cérébrovasculaires, maladies vasculaires périphériques) (Gouvernement du Canada 2004).

En effet, les vaisseaux sanguins peuvent être affectés par différentes pathologies, ayant pour conséquences des changements dans le flux sanguin, ce qui affecte finalement les organes comme le cœur ou le cerveau. C'est le cas de l'anévrisme, dilatation localisée de la paroi d'un vaisseau qui mène à la création d'une poche de sang attenante au vaisseau, et peut causer la formation d'une thrombose ou, en cas de rupture, d'une hémorragie interne, particulièrement critique dans le cas d'un anévrisme intracrânien. Une autre affection fréquente est l'athérosclérose, qui désigne une obstruction de l'artère due à l'accumulation de plaques dans l'*intima* (paroi interne de l'artère), entraînant une réaction inflammatoire (Fishbein et Fishbein 2009), un épaissement et un durcissement de la paroi (*athérome*) et éventuellement la formation d'un caillot sanguin (*thrombose*) (« Atherosclerosis » 2016). À terme, ce phénomène peut causer une occlusion complète du vaisseau et l'ischémie des tissus en aval. Dans le cas des artères coronaires, une telle thrombose mène à une crise cardiaque, potentiellement mortelle.

2.1.2 Traitements existants

Actuellement des traitements existent déjà pour ces pathologies affectant les vaisseaux sanguins. Par exemple, pour contrer les effets de l'athérosclérose, on a parfois recours à un *stent*, c'est-à-dire un treillis métallique, afin de maintenir le vaisseau ouvert (Sigwart et al. 1987). Pour cela on

utilise généralement des alliages comme le nitinol, l'acier inoxydable ou le cobalt-chrome (Williams 2008; Park et Lakes 2007), mais on trouve aussi d'autres métaux, comme le titane, le fer pur, ou des alliages de magnésium (Park et Lakes 2007; Mani et al. 2007). Ce type de traitement comprend notamment des risques de re-sténose, mais qui peuvent être limités par l'introduction d'un *stent* médicamenteux (Mani et al. 2007). Le principal inconvénient de cette méthode est en fait lié à des contraintes mécaniques apportées par la prothèse métallique (Moore et Berry 2002).

Le traitement le plus largement utilisé dans le cas de l'athérosclérose consiste à réaliser un pontage (Vara et al. 2005) : il s'agit de contourner la partie endommagée de l'artère en formant un « pont », généralement avec un autre vaisseau du même patient, ce qui présente des avantages en termes de compatibilité, à la fois physique et biologique. Cependant, chez de nombreux patients aucun vaisseau autologue ne peut être utilisé, soit parce qu'ils l'ont déjà été, soit en raison de leur mauvais état.

Une solution proposée consiste à remplacer l'artère affectée par une prothèse polymérique (*vascular grafts*, cf. Figure 2.1 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) ayant les mêmes propriétés qu'une artère fonctionnelle, aussi bien par son comportement mécanique qu'en termes de réponse biologique. Les polymères les plus utilisés sont le PET (polytéréphtalate d'éthylène) tissé, commercialisé sous le nom de Dacron®, et le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) (Devine et McCollum 2004; Williams 2008). Ces matériaux ont permis d'obtenir de bons résultats pour des artères de grand diamètre ; mais ils ne semblent pas adaptés aux plus petits vaisseaux (< 6 mm de diamètre) (Xue et Greisler 2003; Kannan et al. 2005), comme les artères coronaires. En effet, pour des prothèses de petite dimension, les risques de thrombose, par exemple, sont accrus.



Figure 2.1 : Exemples de prothèses vasculaires en PET et PTFE

Afin de limiter les réactions adverses telles que la thrombose ou l'hyperplasie, qui mèneraient à l'occlusion de la prothèse, il est crucial d'assurer l'endothélialisation du dispositif, c'est-à-dire la création d'une couche continue de cellules endothéliales sur la surface interne de la prothèse (Foxall et al. 1986).

Cette endothélialisation peut être effectuée *in situ*, ou être créée *in vitro* avant l'implantation de la prothèse (Deutsch et al. 1999). Dans tous les cas, l'adhésion, la prolifération et la rétention des cellules endothéliales à la surface luminale de la prothèse est essentielle. Elle est malheureusement faible sur les prothèses conventionnelles.

Certains laboratoires travaillent à l'utilisation de matériaux différents, par exemple en utilisant des polymères biodégradables pour former une matrice temporaire permettant de guider la réparation tissulaire (Rai et al. 2012; Soletti et al. 2010; Smith et Lamprou 2014), ou des procédés de fabrication permettant d'obtenir des structures plus proches de celle des tissus organiques, comme l'électrofilage (Vaz et al. 2005; Savoji et al. 2014).

Une autre approche consiste à modifier la surface luminale des prothèses pour améliorer les interactions entre la surface et les cellules endothéliales et favoriser leur adhésion, leur croissance et leur capacité à résister aux forces de cisaillement dues au flux sanguin (Feugier et al. 2005). Un défi important est la sélectivité de l'adhésion : s'il est crucial de maximiser l'adhésion des cellules endothéliales à la surface de la prothèse, il est tout aussi important de limiter l'adhésion d'autres éléments circulants comme les plaquettes et les leucocytes.

La section suivante décrit les mécanismes d'adhésion cellulaire sur les surfaces et comment les propriétés de surface d'un matériau peuvent influencer ce phénomène.

2.2 Adhésion cellulaire

2.2.1 Mécanisme

Dans un corps biologique, l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (composée principalement de glycoprotéines et de protéines, et notamment de collagène) se fait par l'intermédiaire de protéines d'adhésion, telles que la fibronectine ou la vitronectine. La cellule peut alors « identifier » des sites d'ancrage à la matrice grâce à des récepteurs membranaires spécifiques à l'adhésion cellulaire, comme les intégrines ou les protéoglycanes transmembranaires. D'autres molécules, comme les cadhérines, assurent l'adhésion entre les cellules (Freshney et Freshney 2005). Par conséquent, la capacité des cellules à adhérer à la surface d'un biomatériau dépend de la faculté des protéines d'adhésion à s'adsorber à sa surface. Par exemple, il a été montré que l'adsorption des fibronectines et des vitronectines joue un rôle crucial dans l'adhésion de cellules endothéliales (Steele et al. 1995).

Ces protéines contenues dans les fluides biologiques (sang, lymphe etc.) s'adsorbent spontanément à la surface des biomatériaux par des interactions de charges principalement. En effet, les protéines étant des polypeptides composés d'une succession d'acides aminés, elles portent de nombreux groupements chimiques chargés, positifs et négatifs, qui leur permettent d'interagir avec d'autres corps biologiques, ou encore de s'adsorber à la surface des biomatériaux, via des liaisons ioniques ou électrostatiques (Horbett 1996). Lorsque le biomatériau entre en contact avec un fluide biologique, les protéines diffusant le plus rapidement (typiquement, les protéines les plus petites, comme l'albumine) et en plus grande concentration sont les premières à s'adsorber à sa surface ; dans un second temps, ce sont les protéines ayant le plus d'affinités avec la surface qui s'y lient majoritairement (adsorption compétitive), provoquant le déplacement des premières : on parle d'effet Vroman (Wilson et al. 2005). L'affinité des protéines d'adhésion avec la surface du biomatériau est donc un facteur clé pour favoriser – ou inhiber – la formation d'une couche cellulaire.

2.2.2 Affinités avec les biomatériaux

2.2.2.1 Propriétés de surface

La capacité d'adhésion des cellules sur un substrat synthétique repose alors sur différents paramètres, qui influencent l'adsorption des protéines à sa surface. Les caractéristiques physiques de la surface comme sa topographie et sa porosité sont déterminantes (Evans, Dalton, and Steele 1999) : par exemple, une surface rugueuse augmente l'aire de contact, et donc le nombre de liaisons possibles avec les protéines. Ainsi, l'albumine et la fibronectine ont montré une adsorption accrue sur des surfaces plus rugueuses, favorisant significativement l'adhésion de cellules de la moelle osseuse (Deligianni et al. 2001). D'autre part, la charge de surface joue bien sûr un rôle prépondérant dans l'adsorption des protéines, considérant que celle-ci dépend principalement d'interactions électrostatiques. L'énergie de surface est également un paramètre important : sa composante polaire, notamment, détermine le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface, ce qui influence largement la nature des interactions avec les protéines, et donc leur affinité avec le substrat. Par exemple, la fibronectine et l'albumine ont montré une meilleure affinité pour une composante polaire plus élevée (Michiardi et al. 2007). Ainsi, l'adhésion et la prolifération cellulaires sont généralement favorisées sur des surfaces plutôt rugueuses, hydrophiles, chargées positivement, et d'énergie de surface élevée (Saltzman and Kyriakides 1997; Katti, Vasita, and Shanmugam 2008).

2.2.2.2 Composition chimique

La composition chimique en surface du substrat joue un rôle décisif dans le comportement des protéines et, par conséquent, des cellules ; c'est pourquoi elle forme le sujet central de ce projet de maîtrise. En effet, la nature des groupements chimiques à la surface régit les interactions avec les protéines, détermine la charge de surface, son hydrophobicité, etc.

Différentes études ont montré que des surfaces à haute teneur en azote permettent d'obtenir une bonne adhésion cellulaire sur des substrats polymériques (Mirengi et al. 2000; Girard-Lauriault et al. 2005) ; toutefois, de manière générale la littérature semble montrer que la présence d'azote ne suffit pas à elle seule (Ertel, Ratner, et Horbett 1990). D'autres recherches ont donc mené à l'identification de groupements chimiques spécifiques à l'origine de cet effet. Ainsi, l'équipe de Griesser (Griesser et al. 1993; Griesser et al. 1994) a proposé que les groupements amides

(-CONH₂) sont les principaux promoteurs de l'adhésion cellulaire, mais nuançait déjà ces conclusions : *“there is no universal, single group responsible for supporting cell attachment”* (Griesser et al. 1993). En effet, de nombreux articles pointent aussi l'efficacité des amines, et notamment des amines primaires (C-NH₂), pour l'adhésion cellulaire, et ce depuis la même période (Nakayama et al. 1988). Cette efficacité est attribuée, entre autres choses, à la charge positive de ces groupements en milieu aqueux à pH physiologique (pH \approx 7.4), dans lequel ils prennent la forme ionique -NH₃⁺ qui peut attirer les protéines, chargées négativement. Il a notamment été montré qu'il existe une concentration minimale en amines primaires ([NH₂]_{crit} \approx 4,2 %) pour permettre l'adhésion de monocytes U-937 sur une surface polymérique (Girard-Lauriault et al. 2009). D'autre part, les amines primaires sont des fonctions chimiquement réactives pouvant être utilisées pour l'immobilisation covalente de molécules bioactives, ce qui présente de grands avantages pour l'ingénierie tissulaire et, en l'occurrence, la conception d'implants vasculaires. Néanmoins, ces groupements possèdent un inconvénient, qui est le vieillissement (Gengenbach et al. 1994; Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010) : leur stabilité limitée les expose à des réactions avec le milieu environnant, comme l'oxydation par l'oxygène de l'air, ou encore l'hydrolyse.

Des surfaces oxygénées peuvent également être utilisées pour promouvoir la prolifération cellulaire. Pourtant, bien que le substrat utilisé au cours de ce projet (PET) soit un polymère oxygéné, les cellules adhèrent peu à sa surface : comme pour l'azote, ce sont certaines fonctions chimiques spécifiques qui favorisent l'adhésion des cellules. D'autres sont même connues pour avoir des propriétés antiadhésives, et sont utilisées pour cette raison dans différents domaines – y compris le domaine biomédical : par exemple, la séquence (-CH₂CH₂O-) du polyéthylène glycol est utilisée pour son caractère répulsif (Brétagne et al. 2006; Da Ponte et al. 2012). A l'inverse, différentes études ont montré qu'une surface riche en oxygène, et notamment en groupements hydroxyles (-OH), carbonyles (C=O) et carboxyles (-COOH), favorisait l'adhésion cellulaire (Ertel, Ratner, et Horbett 1990; Siow et al. 2006). En effet, ces groupements polaires, et majoritairement ionisés (négativement) en milieu aqueux, permettent aux groupements aminés des protéines de se lier à la surface du biomatériau.

Les implants vasculaires actuels sont fabriqués à partir de polymères comme le PTFE ou le PET, choisis principalement pour leurs propriétés mécaniques, mais dont l'aptitude à encourager l'adhésion et la prolifération cellulaires est loin d'être satisfaisante. Cette capacité peut être améliorée en modifiant la surface du matériau, notamment par le dépôt d'un revêtement, de manière à obtenir une surface présentant les caractéristiques citées, et surtout une composition chimique performante (*fonctionnalisation*).

2.3 Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion cellulaire

2.3.1 Traitements par plasma

2.3.1.1 Plasma : Généralités

Le plasma est considéré comme le quatrième état de la matière (les autres étant les états solide, liquide et gazeux), introduit sous ce terme par Langmuir en 1929 (Langmuir 1929). Il constitue 99 % de la matière de l'univers : les étoiles, incluant le Soleil, sont composées de matière sous forme de plasma. Il s'agit d'un gaz dans lequel toutes ou une partie des particules sont ionisées ou excitées ; mais sa charge électrique globale est nulle (on parle de *quasi-neutralité*). Un plasma est notamment caractérisé par son degré d'ionisation et la quantité de collisions entre les particules qui le composent. Ainsi, lorsque les collisions sont nombreuses (notamment à pression élevée), elles induisent un effet thermique qui entraîne davantage l'ionisation de particules : on parle alors de *plasma chaud*, ou plasma « thermique », qui atteint l'équilibre thermodynamique et dans lequel même les particules lourdes sont excitées (Fauchais 2000). C'est le cas des plasmas solaires, des arcs, des réacteurs à fusion,... A l'inverse, si la distance parcourue par les particules entre deux collisions est plus importante, l'effet thermique est très réduit ; l'ionisation, plus faible, est alors due aux collisions entre les électrons « chauds » et les particules neutres. Dans ce cas, seuls les électrons atteignent une énergie importante, tandis que les particules lourdes (atomes, molécules, ions) restent à une température relativement basse : il s'agit de *plasmas froids*, où l'équilibre thermodynamique n'est pas atteint. Les plasmas de décharge, les flammes, les aurores, en sont des exemples.

Un plasma peut être créé en exposant un gaz à des radiations de haute énergie, un fort champ électrique, ou encore une température élevée (Conrads et Schmidt 2000). Seuls les plasmas froids, créés entre deux électrodes par une différence de potentiel générée par une source électrique, normalement à radiofréquence, seront considérés au cours de ce projet. Ce procédé permet d'accélérer les électrons libres contenus dans le gaz, qui peuvent alors entrer en collision avec d'autres particules. Si la tension appliquée, ou la fréquence, est assez élevée, les électrons acquièrent suffisamment d'énergie pour ioniser une particule neutre, éjectant alors des électrons capables, à leur tour, d'ioniser le gaz (phénomène d'avalanche) : on obtient un plasma autonome (Pointu, Perrin, et Jolly 1998).

Différents types de réactions peuvent avoir lieu au sein d'un plasma : des électrons peuvent être éjectés ou capturés ; les atomes peuvent être excités, ionisés, recombinaison ; des radicaux sont créés, etc. (Liebermann et Lichtenberg 2005). Les principales réactions rencontrées sont rassemblées dans le Tableau 2.1 (Pointu, Perrin, et Jolly 1998).

Tableau 2.1 : Principales réactions au sein d'un plasma (A^* : atome excité, radical)

Type de réaction	Processus	Effet macroscopique
Collision élastique	$e^- + A \rightarrow e^- + A$	Mobilité électronique
Ionisation	$e^- + A \rightarrow 2e^- + A^+$	Multiplication des électrons
Recombinaison	$e^- + A^+ \rightarrow A$	Déionisation du plasma
Excitation	$e^- + A \rightarrow e^- + A^*$	Production de métastables
Dissociation	$e^- + AB \rightarrow e^- + A^* + B^*$	Production de métastables
Ionisation dissociative	$e^- + AB \rightarrow e^- + A^+ + B^-$	Production d'ions atomiques
Ionisation associative	$A^* + A \rightarrow e^- + AB^+$	Formation d'ions moléculaires
Transfert de charges	$A^+ + B \rightarrow A + B^+$	Mobilité ionique

Selon le gaz utilisé et les conditions appliquées (pression, puissance), le plasma peut avoir différents effets sur le substrat auquel il est exposé (Pointu, Perrin, et Jolly 1997; Madou 2002). Ainsi, un plasma d'argon ou d'hélium peut servir à nettoyer un échantillon (OKane et Mittal 1974) ; les plasmas d'oxygène peuvent graver (*etching*) différents matériaux, propriété très utile pour la microélectronique ; d'autres gaz permettent de fonctionnaliser la surface du substrat exposé, grâce au greffage de groupes chimiques rendus très réactifs ; certains plasmas permettent également de déposer des couches minces sur un substrat, par exemple en créant un dépôt

chimique en phase vapeur (PECVD) ou par polymérisation d'un gaz « monomérique » organique.

Bien que le plasma puisse être obtenu à pression atmosphérique (Conrads et Schmidt 2000), au cours de ce projet, les plasmas seront uniquement créés à basse pression, ce qui permet de mieux contrôler le milieu, de limiter la contamination par d'autres particules (e.g. fuites d'air atmosphérique), tout en réduisant les quantités de gaz utilisées.

2.3.1.2 Polymérisation par plasma

Un plasma formé à partir de molécules organiques (« monomères ») peut donner naissance à une couche simili-polymérique à la surface d'un substrat solide. Il ne s'agit pas d'un polymère au sens « classique » du terme, du fait de l'absence d'unité répétitive : les *polymères plasma* (PP) sont des composés très réticulés, composés de chaînes courtes liées de manière aléatoire au cours de la polymérisation (Figure 2.2). Ce procédé peut être appliqué à des substrats de nature différente (métal, silicium, polymère...) et possède de nombreuses applications dans des domaines variés : il peut permettre de créer un revêtement protecteur, modifier les propriétés de surface telles que l'hydrophobicité, la dureté, etc. Dans le domaine biomédical, les PP peuvent être utilisés pour favoriser l'immobilisation de protéines et l'adhésion cellulaire, ou au contraire donner des propriétés antiadhésives, à la surface d'implants ou de matériel médical.

Au sein du plasma, les molécules monomériques (précurseurs) sont excitées, ionisées, subissent des collisions avec des électrons chauds, etc., résultant en la formation de radicaux, hautement réactifs. Ces molécules, une fois activées, peuvent entrer en collision et se fragmenter ou se recombiner en créant des liaisons covalentes (par exemple, carbone-carbone) ; la répétition de ce processus entraîne la formation de fragments moléculaires de plus en plus gros (Biederman 2004). D'autre part, la surface du substrat elle-même peut subir un processus similaire : des radicaux peuvent être formés à partir des molécules constitutives ou adsorbées, qui peuvent réagir avec les molécules en présence dans le plasma. Ainsi, une couche polymérique peut croître sur le substrat.

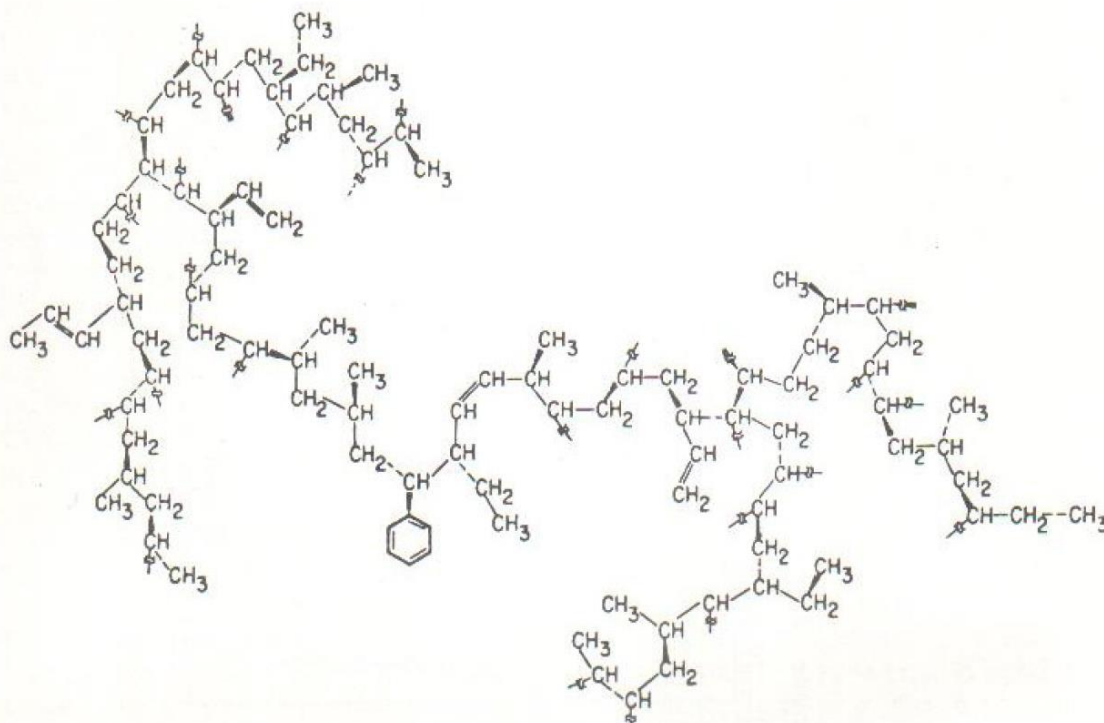


Figure 2.2 : Structure possible d'un polymère plasma d'éthylène (Tibbitt, Shen, et Bell 1976), reproduite avec permission

Cette réaction est en compétition avec la réaction d'ablation : les collisions des particules excitées mènent aussi à la fragmentation des molécules, aussi bien dans la phase gazeuse que la phase solide, et donc à l'ablation des chaînes formées en surface du substrat (Yasuda et Yasuda 2000). L'importance de cette réaction compétitive dépend notamment de l'énergie des particules : Hegemann et al. ont déterminé qu'une densité d'énergie de 10 eV par atome est suffisante pour générer une bonne adhésion, mais au-delà de 20 eV un phénomène de gravure par les ions en présence peut avoir lieu (Hegemann 2013). On caractérise alors la polymérisation plasma par son *taux de déposition* r , généralement mesuré en nm/min, qui indique la vitesse de croissance de la couche *PP*. Il dépend de différents paramètres appliqués au système, tels que la pression, la puissance électrique fournie, la nature du monomère utilisé (en particulier son énergie d'activation), le flux de gaz, etc. (Gazicki et Yasuda 1984; Hegemann et al. 2007; Körner, Fortunato, et Hegemann 2009). Ces paramètres ont aussi une forte influence sur la nature de la couche mince polymérisée et sur ses propriétés : en les modifiant, on peut faire varier la composition, le degré de réticulation, la densité du revêtement, sa topographie, sa solubilité, etc.

Ce procédé permet également d'obtenir une grande variété de compositions chimiques selon le ou les gaz précurseurs utilisés ; des revêtements fonctionnalisés pour promouvoir l'adhésion cellulaire peuvent donc être créés. Par exemple, on peut obtenir un dépôt riche en oxygène à partir d'un plasma d'acide acrylique ou d'acide propargylique (Siow et al. 2006), ou bien par copolymérisation de l'acide acrylique et de l'octadiène (Daw et al. 1998) ; tandis que des monomères aminés (l'allylamine, le diaminocyclohexane, le n-heptylamine, le butylamine, etc.) forment des couches minces riches en azote et en amines primaires (Förch et al. 2007). Toutefois, les groupements fonctionnels propres à ces monomères ne seront pas nécessairement conservés : au cours de la polymérisation, les groupements atomiques peuvent être fragmentés et se recombinaient différemment avec les particules présentes et le film en croissance.

Une autre méthode consiste à associer un gaz monomère avec une molécule fonctionnalisante, comme l'éthylène avec le dioxygène : en faisant varier la concentration relative des deux gaz, on peut contrôler la quantité d'oxygène, et donc favoriser la formation de certains groupements chimiques. En Suisse, des revêtements « C:H:O », très riches en groupements fonctionnels oxygénés, ont été déposés par polymérisation plasma à partir de mélanges gazeux C_2H_4/CO_2 et acétone/ CO_2 (Hegemann et al. 2010; Drabik et al. 2014), et ont notamment été étudiés pour le développement de tissu musculaire (Guex et al. 2012). Dans notre laboratoire, des revêtements semblables « L-PPE:O » ont été développés à basse pression, à partir de plasmas d'éthylène associé au dioxyde de carbone ou au dioxygène (dilué dans l'argon afin de limiter les effets de gravure) (Ruiz, Girard-Lauriault, et al. 2010; Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015).

De la même manière, l'obtention de revêtements riches en amines primaires ($-NH_2$) est favorisée en utilisant l'éthylène associé à l'ammoniac (NH_3) : notre laboratoire a mis au point un film polymérisé par plasma d'éthylène et d'ammoniac permettant d'atteindre jusqu'à 40 % d'azote, avec une excellente spécificité en amines primaires (rapport $[NH_2]/[N]$ jusqu'à 35 %) pour les revêtements réalisés à basse pression (dits « L-PPE:N ») (Truica-Marasescu et al. 2008). D'autres tests ont montré que les revêtements L-PPE:N créés avec un ratio de flux de gaz $F_{NH_3}/F_{C_2H_4}$ égal à 0,75 sont quasi-insolubles en milieu aqueux et présentent une concentration en amines primaires $[NH_2] \approx 7\%$, ce qui permet l'adhésion de différents types de cellules (Lerouge et al. 2007; Mwale et al. 2011; Wertheimer et al. 2012), ainsi que l'immobilisation de molécules bioactives telles que le sulfate de chondroïtine (Thalla et al. 2014). Un procédé similaire, non

étudié dans ce mémoire, consiste à photo-polymériser la couche mince par rayonnement VUV au lieu d'un plasma (St-Georges-Robillard et al. 2012).

Il faut toutefois noter que la composition chimique ainsi obtenue n'est pas immuable : elle est soumise au vieillissement, en particulier à l'oxydation (St-Georges-Robillard 2012). En effet, lors de la polymérisation, tous les radicaux libres ne participent pas à la formation du polymère, et certains restent piégés dans le revêtement. Exposés à l'air, ils réagissent notamment avec l'oxygène, formant de nouveaux groupements chimiques en surface du dépôt. L'oxydation peut aussi être entraînée par post-réaction de $-NH_2$ instables avec l'oxygène atmosphérique pour former des amides.

2.3.1.3 Modification de surfaces par plasma

Pour certaines applications, les propriétés de surface requises peuvent être obtenues par simple fonctionnalisation de surface par plasma : dans ce cas, on n'utilise pas de gaz précurseur susceptible de polymériser (autrement dit, pas de molécule carbonée), mais uniquement des molécules permettant de créer les groupements chimiques voulus à la surface immédiate du substrat. Ce type de traitement ne crée pas de couche protectrice comme la polymérisation plasma, pourtant il permet de modifier certaines propriétés particulières en surface : son hydrophobicité par exemple, mais aussi son énergie de surface, sa charge, etc. (Liston, Martinu, et Wertheimer 1993). En pratique, les atomes sont incorporés dans les premières couches atomiques en surface du substrat, sur quelques nanomètres de profondeur tout au plus (Gerenser 1987; Bubert et al. 2003)

Le principe est similaire à celui qui a été détaillé précédemment : les molécules composant le gaz sont excitées, créant un plasma dans lequel elles sont activées, ionisées, éventuellement fragmentées ; elles peuvent alors créer des liens covalents avec le substrat, par exemple si celui-ci est un polymère. Les paramètres tels que la pression, la puissance fournie ou la durée du traitement ont un impact important sur le degré de fonctionnalisation.

Ainsi, la surface d'un polymère peut être modifiée par un traitement plasma avec un gaz d'ammoniac, de diazote, ou une combinaison de ces gaz avec du dihydrogène ou de l'argon, ce qui permet d'insérer des groupements azotés (et aminés en particulier) à sa surface immédiate :

Girardeaux et al., par exemple, ont pu greffer 14 à 20 % d'azote sur des échantillons de PET en faisant varier le procédé de traitement plasma (Girardeaux et al. 1996).

Des surfaces riches en groupements hydroxyles (-OH) et carboxyles (-COOH) ont également été synthétisées pour favoriser l'adhésion cellulaire : on peut trouver des exemples d'échantillons de PET rendus plus hydrophiles par un traitement par plasma d'oxygène et utilisés pour promouvoir l'adhésion cellulaire (Jaganjac et al. 2014), l'adsorption de protéines (Recek et al. 2013) ou même le greffage de molécules bioactives (Junkar et al. 2009). Des traitements par plasma de dioxyde de carbone ont aussi été réalisés (Cueff et al. 1997), ainsi que des mélanges de gaz O_2/H_2 et O_2/H_2O qui ont donné de très bons résultats de croissance pour des cellules endothéliales (Ramires et al. 2000).

Les surfaces obtenues sont elles aussi sujettes au vieillissement : si peu de radicaux peuvent être piégés contrairement à la polymérisation plasma, les groupements chimiques créés en surface peuvent, eux, être oxydés à l'air libre ; ou bien subir une reconfiguration qui les entraîne sous la surface pour atteindre un niveau de plus faible énergie (*hydrophobic recovery*), surtout dans le cas de groupements polaires (Chatelier et al. 1995).

2.3.1.4 Cas des surfaces commerciales pour la culture cellulaire

Le matériel utilisé pour la culture cellulaire est, lui aussi, traité afin de favoriser la culture des cellules, i.e. leur adhésion et prolifération à la surface. En effet, le polystyrène a commencé à remplacer le verre dans les années 1960 à cause de sa transparence, sa légèreté et résistance au bris, sa facilité de mise en forme, la possibilité de le stériliser par radiations, etc. ; mais son hydrophobicité ne permet pas aux cellules d'adhérer aisément, aussi des traitements par décharges corona et par plasma micro-ondes ont été appliqués afin de créer des groupements fonctionnels oxygénés et ainsi de le rendre plus efficace. Parmi ces produits, on peut citer les surfaces de culture développées par Corning (Bryhan et al. 2003) ; on retrouve souvent ces types de surfaces dans la littérature sous le nom de TCPS ou TCP (*Tissue culture Polystyrene, FalconTM*), utilisé comme matériel de référence compte tenu de ses excellentes propriétés pour la culture cellulaire (Shen et Horbett 2001; Baek et al. 2010; Fricke et al. 2012).

De la même manière, les surfaces Primaria™ ont été développées par Corning par traitement du polystyrène (Bryhan et al. 2003; Fryer et al. 2009) ; leur particularité est de présenter à la fois des fonctions chimiques oxygénées *et* azotées, formant des groupements chargés positivement et négativement, respectivement. Ces surfaces ont montré d'excellentes propriétés pour la culture cellulaire, parfois même meilleures que les surfaces TCP, seulement oxygénées (Steele et al. 1995; Shen et Horbett 2001). Toutefois, la chimie des surfaces Primaria™ est encore floue : le schéma fourni par Corning, présenté en Figure 2.3, est peu satisfaisant du fait de sa linéarité, peu crédible dans le cas d'un traitement par plasma ; et les résultats de caractérisation du Primaria™ dans la littérature, généralement obtenus par analyse XPS, sont très variés (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Composition élémentaire du Primaria™ obtenue par analyse XPS, selon diverses références

Références	Angle d'analyse	[C]	[N]	[O]
(Mwale et al. 2007)	ND	79 %	6 %	15 %
(Fricke et al. 2012)	ND	83,9 %	4,5 %	11,6 %
(Ertel, Ratner, et Horbett 1990)	45°	72,2 %	13,16 %	14,64 %
(Fryer et al. 2009)	45°	77,0 %	10,2 %	12,8 %
(Shen et Horbett 2001)	55°	74,6 %	11,1 %	14,1 %

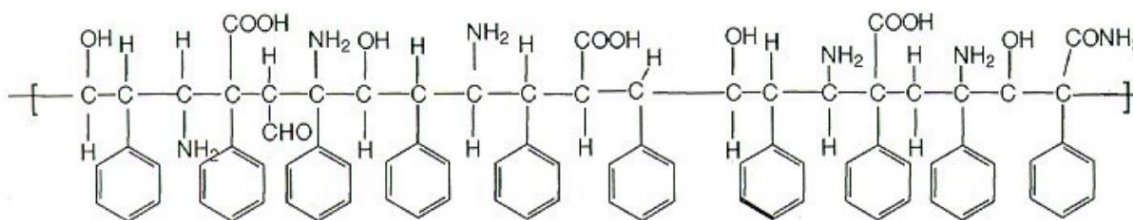


Figure 2.3 : Chimie de surface du Primaria™ selon Corning

L'efficacité du Primaria™ est sans doute liée à son caractère hydrophile (angle de contact avec l'eau de 40° environ (Baek et al. 2010)), ainsi qu'à une possible synergie entre les groupements azotés (chargés positivement) et oxygénés (chargés négativement). Quelques laboratoires ont utilisé avec succès des surfaces « hybrides » équivalentes : Chen et al., par exemple, ont montré

que des cellules endothéliales bovines ont une meilleure adhésion et une meilleure croissance sur un substrat de PTFE traité par un plasma d'ammoniac et de dioxygène, que sur le même substrat non traité ou traité par un plasma d'un de ces gaz uniquement (Chen et al. 2003). Cela semble confirmer l'existence d'une synergie entre les fonctions oxygénées et azotées, bien que les études sur le sujet soient encore très rares.

2.3.2 Dépôt chimique en phase vapeur

Le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) est un procédé consistant à créer une couche mince fonctionnalisée à partir de précurseurs en phase vapeur qui réagissent en surface d'un substrat chauffé. Il permet d'obtenir des dépôts très uniformes, de matériaux très variés (silicium, carbone, métaux, céramiques, semi-conducteurs, même polymères...) et sur des substrats de géométrie complexe. Généralement, une de ses limitations est la nécessité d'un précurseur volatile à une température proche de celle de la pièce. On trouve ce procédé dans divers domaines, tels que la microélectronique, l'optoélectronique, les nanotechnologies, etc.

Différents procédés de réaction existent (Creighton et Ho 2001), dépendamment de l'application du dépôt et des propriétés requises (morphologie, épaisseur, uniformité) ainsi que de la nature du substrat. En effet, le CVD peut être effectué dans un réacteur à parois chaudes, pour une réaction à haute température et souvent à basse pression, pour des dépôts très uniformes ; ou bien dans un réacteur à parois froides, où le substrat seul est chauffé, pour des réactions à plus haute pression. D'autres procédés impliquent l'utilisation d'un plasma, d'un laser, de rayonnement ultraviolet, etc. Différents types de réactions peuvent avoir lieu à la surface du substrat, parmi lesquelles on trouve la pyrolyse, l'oxydation, la réduction...

En ce qui concerne le « CVD », nous nous intéresserons principalement au dépôt de couches polymériques. Dans ce cas, le précurseur monomérique ou dimérique est d'abord évaporé ou sublimé dans une chambre séparée, après quoi la vapeur obtenue est transférée vers la chambre de dépôt en présence du substrat. Les molécules réactives sont alors adsorbées à la surface de celui-ci, sur laquelle elles peuvent subir une diffusion latérale, et éventuellement s'agréger pour former des *nuclei*. Le film peut alors croître grâce à la réaction entre ces agrégats et les espèces présentes sous forme de vapeur à la surface, menant à la formation d'un dépôt uniforme. Les

sous-produits de la réaction peuvent être gazeux, auquel cas ils sont emportés par le flux de gaz, ou bien être piégés dans le dépôt sous forme de contaminants. De nombreux types de polymères peuvent être déposés par CVD, comme les poly-p-xylylènes (parylènes) (Lahann 2006), les polyimides, polynaphtalènes, etc., ainsi que des composites organiques-inorganiques. Ce procédé permet d'obtenir des films très uniformes et purs, sur des substrats de dimensions variées, et rend possible la formation de multi-couches (Vedula, Kaza, et Desu 2000).

Dans le présent travail, nous nous intéressons tout particulièrement au Parylène diX-AM (Figure 2.4), revêtement lisse et richement aminé de la gamme des parylènes, dont le dépôt fait l'objet d'un brevet déposé par William F. Gorham en 1966 (Gorham 1966). Ce polymère possède une structure chimique bien définie, munie d'un unique groupement $-NH_2$ par unité répétée (« mer »), contrairement aux surfaces plasma dont la chimie est plus variée, voire chaotique.

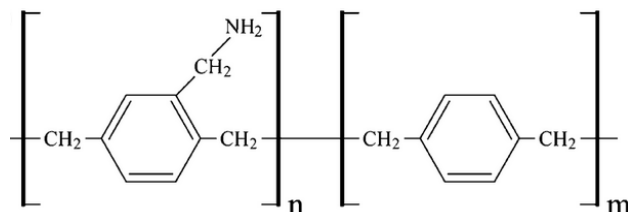


Figure 2.4 : Structure chimique du Parylène diX AM (poly-aminométhyl-[2,2]-paracyclophane)

2.3.3 Greffage chimique de polymères en phase liquide

Des polymères en phase liquide peuvent également être utilisés pour recouvrir un substrat d'une couche polymérique ; la réaction a alors lieu à l'interface solide-liquide. Le polymère peut être déposé par différents procédés, tels que la technique Langmuir-Blodgett, par simple adsorption, ou encore par greffage chimique covalent (Stamm 2008). Ce dernier est le plus contrôlable et permet d'obtenir des dépôts stables et de haute densité surfacique ; c'est donc lui que nous privilégierons au cours de ce projet, et dans ce mémoire.

Le greffage chimique de polymères sur un substrat requiert la présence de groupements chimiques réactifs appropriés à sa surface, grâce auxquels le polymère peut se lier au substrat ; deux processus différents peuvent alors être employés (Minko 2008). Le premier consiste à greffer le polymère à l'état liquide directement sur la surface (processus « *grafting to* ») en formant des liens avec des groupements chimiques complémentaires. Dans le second processus,

les molécules en présence sont des monomères, qui polymérisent à la surface (« *grafting from* ») à l'aide d'un initiateur. Le polymère est alors synthétisé directement sur le substrat, selon les mécanismes classiques de polymérisation (polycondensation, polyaddition, etc.).

Au terme de la réaction de greffage, le polymère est attaché au substrat de manière covalente, et forme donc une couche polymérique stable susceptible d'avoir les propriétés de surface requises. On peut noter que la configuration du polymère peut varier selon sa nature chimique, la longueur des chaînes, le solvant utilisé, etc.

L'équipe du Pr. De Crescenzo, à l'École Polytechnique de Montréal, a greffé des polymères aminés sur des substrats de PET, par une réaction d'aminolyse (Noel et al. 2011; Noel et al. 2013) : des chaînes de polyvinylamine (PVAm, Figure 2.5) ont notamment pu être greffées grâce à la réaction de certains groupements NH_2 avec des groupements esters du PET, formant des liens amides très stables et sans modification des propriétés mécaniques du substrat, critère d'importance pour la conception d'implants vasculaires. Comme dans le cas du Parylène diX AM, le greffage chimique du PVAm permet d'obtenir une surface polymérique fonctionnalisée spécifiquement avec des amines primaires.

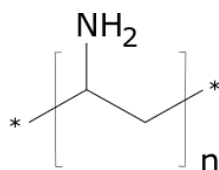


Figure 2.5 : Structure chimique du PVAm

2.3.4 Greffage de biomolécules et facteurs de croissance

Des réactions biologiques spécifiques à la surface des biomatériaux, comme l'adhésion focale, la résistance à l'apoptose ou l'accumulation de plaquettes, peuvent être favorisées ou réduites par l'effet de certaines molécules biologiquement actives. Elles peuvent par conséquent être utilisées en remplacement ou complément de la fonctionnalisation chimique en surface des biomatériaux. Ainsi, l'héparine (Hoshi et al. 2013), le perlecan (Lord et al. 2009), le sulfate de chondroïtine

(Charbonneau et al. 2007), sont des molécules utilisées pour favoriser l'adhésion de cellules endothéliales.

Le sulfate de chondroïtine (CS), notamment, a été employé dans notre laboratoire pour ses propriétés antiadhésives pour les protéines du plasma et les plaquettes, ce qui permet d'envisager une sélectivité dans l'adhésion des éléments biologiques sur le biomatériau (Thalla et al. 2014). Il s'agit d'un polysaccharide hydrophile du groupe des glycosaminoglycanes présent dans les tissus conjonctifs (Volpi 2006), doté de groupements carboxyles et sulfates (Figure 2.6) chargés négativement à pH physiologique, qui sont à l'origine de ses propriétés anticoagulantes et antiadhésives (McGee et Wagner 2003; Keuren et al. 2003). Ses groupements carboxyles permettent de lier ce polysaccharide de manière covalente à une surface riche en amines primaires, par une chimie carbodiimide (EDC/NHS) (Charbonneau et al. 2007; Charbonneau et al. 2011).

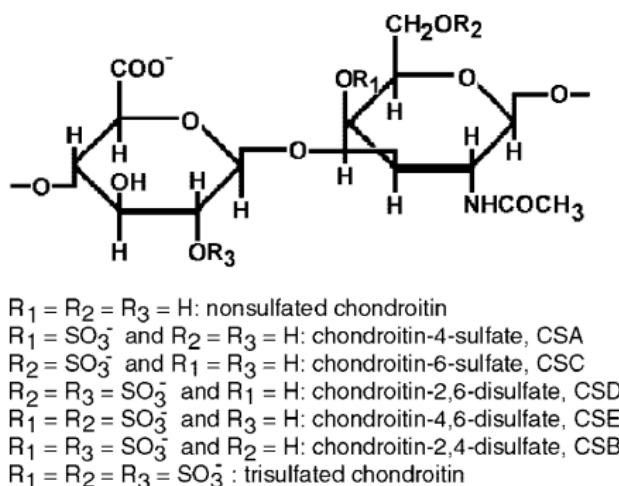


Figure 2.6 : Différentes isoformes du sulfate de chondroïtine (Volpi 2007)

En plus de ses propriétés intrinsèques, le CS peut servir à immobiliser des facteurs de croissance, afin de favoriser la guérison autour des endoprothèses par exemple. En effet, des facteurs de croissance EGF (*epidermal growth factor*), immobilisés sur une surface aminée via des liens amides avec le CS, ont montré leur capacité à accroître l'adhésion, la croissance et la résistance à l'apoptose de cellules musculaires lisses vasculaires, et donc, potentiellement, à promouvoir la réparation du tissu vasculaire autour des implants (Charbonneau et al. 2011; Charbonneau et al. 2012).

2.4 Objectifs du projet

Le succès des implants vasculaires dépend en partie de leur capacité à former rapidement une couche de cellules endothéliales sur leur paroi interne. Il existe différents procédés de fonctionnalisation de surfaces permettant la création de groupements amines primaires ou oxygénés, afin d'améliorer l'adhésion et la croissance cellulaires à la surface des biomatériaux, ou encore de greffer des biomolécules actives permettant d'optimiser davantage le comportement cellulaire. L'objectif principal de ce projet est de mener une **étude comparative de différentes surfaces organiques fonctionnalisées pour favoriser l'adhésion cellulaire**. Cette étude inclura des surfaces développées en laboratoire, différentes à la fois par leur structure (revêtements CVD ou PECVD polymérisés par plasma, polymères greffés chimiquement, substrats modifiés en surface par traitement plasma...) et par leur nature chimique (surfaces oxygénées, azotées, mixtes ou « hybrides »), qui seront également comparées à des surfaces commercialisées pour la culture cellulaire.

Trois objectifs spécifiques seront associés à ce projet :

- Identifier les revêtements les plus favorables à l'adhésion cellulaire, et les fonctions chimiques associées à cette capacité. En effet, parmi plusieurs groupements qui se sont avérés être d'excellents promoteurs de l'adhésion cellulaire, certains d'entre eux peuvent se révéler particulièrement efficaces ; il s'agira par exemple de déterminer s'il y a une différence marquée entre les fonctions azotées et oxygénées.
- Étudier un possible effet de synergie entre les groupements oxygénés et azotés sur des surfaces « hybrides », suggéré par l'efficacité des surfaces Primaria™.
- Évaluer la capacité de différentes surfaces aminées à permettre le greffage de molécules de sulfate de chondroïtine, ainsi que son impact sur l'adhésion et la croissance de cellules endothéliales.

CHAPITRE 3 MÉTHODES

Ce chapitre détaille les procédés mis en œuvre pour la fabrication des différentes couches minces utilisées au cours de ce projet. Les techniques de caractérisation employées y sont également expliquées. Enfin, les tests biologiques, des conditions de culture à la caractérisation de la prolifération cellulaire, sont présentés.

3.1 Modifications de surface

3.1.1 Procédés plasma

3.1.1.1 Réacteur plasma

La polymérisation et la fonctionnalisation par plasma sont effectuées à l'aide d'un système déjà décrit dans la littérature (Truica-Marasescu et al. 2008), dans une chambre cylindrique en aluminium et en acier de 20 cm de hauteur et 20 cm de diamètre (Figure 3.1). Le substrat à traiter est fixé sur une électrode de 10 cm de diamètre, puis la chambre est mise à basse pression (< 1 mTorr, mesurée par une jauge de Pirani) à l'aide d'une pompe turbomoléculaire (Leybold, Cologne, Allemagne), secondée par une pompe à palettes à deux étages (Leybold, Cologne, Allemagne). Les gaz désirés (Air Liquide, Canada) sont ensuite introduits dans la chambre par un distributeur de type "pomme de douche" (*shower head gas distributor*) de 10 cm de diamètre, distant de 15 cm de l'électrode, et selon un flux contrôlé par un régulateur de débit massique. La pression est maintenue constante grâce à une vanne papillon, et monitorée par un manomètre capacitif (MKS "Baratron", Andover, MA) durant la réaction. Un plasma à couplage capacitif est alors créé par un générateur de radiofréquences de 13,56 MHz (ENI, Rochester, NY), assisté par un système d'adaptation d'impédances automatique (Plasma-Therm, St-Petersburg, FL) et connecté à l'électrode, tandis que les parois de la chambre sont mises à la terre.

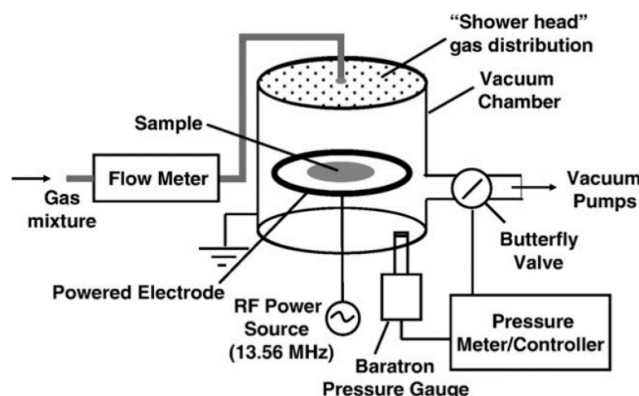


Figure 3.1 : Schéma du système plasma r.f. à basse pression utilisé dans le laboratoire du Pr. Wertheimer (EPM), reproduit de (Truica-Marasescu et al. 2008) avec permission.

Toutes les modifications de surface (fonctionnalisation et polymérisation plasma) ont été effectuées à une pression constante de 600 mTorr (80 Pa) et à une puissance nominale constante de 10 W.

3.1.1.2 Polymérisation plasma

Des couches minces riches en azote (“L-PPE:N”), en oxygène (“L-PPE:O”) ou en azote *et* oxygène (“L-PPE:O,N”) ont été polymérisées par plasma sur différents substrats, l’éthylène servant de gaz précurseur pour chaque revêtement. Les gaz et les paramètres utilisés sont résumés dans le Tableau 3.1. Un paramètre déterminant est le ratio R , rapport du flux de gaz fonctionnalisant (respectivement F_{NH_3} , F_{O_2} , $F_{\text{N}_2\text{O}}$) sur le flux de gaz précurseur ($F_{\text{C}_2\text{H}_4}$ en l’occurrence). Les durées des dépôts ont été déterminées de façon à obtenir un revêtement d’environ 100 nm d’épaisseur. Dans le cas du L-PPE:N et L-PPE:O, les conditions ont été basées sur les travaux antérieurs de l’équipe du Pr. Wertheimer (Truica-Marasescu et al. 2008; Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015). Dans le cas spécifique du revêtement “L-PPE:O,N”, diverses conditions expérimentales ont d’abord été testées afin de déterminer le taux de déposition et la solubilité des dépôts, réalisés à différentes concentrations (cf. section 3.2.1) ; pour le reste du projet, les dépôts “L-PPE:O,N” ont été effectués avec $R = F_{\text{N}_2\text{O}}/F_{\text{C}_2\text{H}_4} = 0,6$ par une exposition au plasma de 3 minutes.

Tableau 3.1 : Conditions expérimentales des dépôts plasma "L-PPE"

Nom du revêtement	Gaz	Flux	R ($F_{\text{gaz réactif}}/F_{\text{C}_2\text{H}_4}$)	Durée du dépôt
L-PPE:N¹	Éthylène (C ₂ H ₄)	20 sccm	0,75	8 min
	Ammoniac (NH ₃)	15 sccm		
L-PPE:O²	Éthylène (C ₂ H ₄)	20 sccm	0,15	6 min
	Dioxygène (O ₂) 10%*	30 sccm		
L-PPE:O,N	Éthylène (C ₂ H ₄)	20 sccm	Variable	Variable
	Protoxyde d'azote (N ₂ O)	Variable		

*Dilué dans l'argon

Divers substrats ont été utilisés pour la polymérisation plasma selon les applications, sans conséquence sur la nature et l'épaisseur des revêtements (Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010) : gaufres de silicium (University Wafer, South Boston, MA), lames de verre (Leica Biosystems, Richmond, IL), et films de PET (Goodfellow, Huntingdon, England).

3.1.1.3 Fonctionnalisation plasma

Des films de PET ont aussi été fonctionnalisés par plasma (et nommés "PETf"), dans le même système que celui décrit ci-dessus, et dans des conditions identiques ($p = 600$ mTorr, $P = 10$ W). Dans ce cas, le plasma généré est un plasma d'ammoniac (NH₃) uniquement ; le gaz est inséré à un débit de 20 sccm, dans des conditions déjà utilisées précédemment (Girardeaux et al. 1996; Charbonneau et al. 2012), et le film de PET est exposé au plasma d'ammoniac durant 10 min.

3.1.2 Parylène diX AM

Les revêtements de Parylène diX AM (poly-aminométhyl-[2,2]-paracyclophane) ont été réalisés par un procédé de dépôt chimique en phase vapeur (CVD), tel que mentionné en section 2.3.2, et

¹ (St-Georges-Robillard et al. 2012; Girard-Lauriault et al. 2005; Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010; Lerouge et al. 2007; Truica-Marasescu et Wertheimer 2008)

² (Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015)

auquel l'auteur de ce mémoire n'a pas pris part, le système utilisé (Kisco Conformal Coating LLC, San Jose, CA) se situant à l'Institut Fraunhofer du génie des interfaces et biotechnologies (FhIGB, Stuttgart, Allemagne).

Le procédé de fabrication du Parylène est décrit en détails par Lahann et al. (Lahann, Klee, et Höcker 1998), et fait l'objet d'un brevet déposé par William F. Gorham (Gorham 1966). Brièvement, le dimère du Parylène diX AM est introduit sous forme de poudre, chauffée à 130°C jusqu'à sublimation. La vapeur est alors exposée à haute température (650°C), entraînant la dissociation des dimères en deux fragments moléculaires (radicaux-monomères), puis dirigée dans un compartiment à température ambiante et sous vide, en présence du substrat à revêtir. Ces conditions facilitent la condensation de la vapeur monomérique, qui polymérise en une fine couche lisse et uniforme.

Les échantillons utilisés au cours de ce projet consistent en un revêtement de Parylène diX AM (cf. Figure 2.4) de 100 nm d'épaisseur environ, déposé sur une couche intermédiaire de Parylène C inerte (approximativement 500 nm), sur un substrat de BOPP (polypropylène biorienté). Après fabrication, ils ont été envoyés à Montréal dans des sachets scellés sous argon (inerte), et stockés à basse température (-80°C) après réception afin d'éviter leur dégradation par oxydation.

3.1.3 Greffage de polyallylamine (PAAm) par aminolyse

Une méthode de fonctionnalisation par voie humide mise au point par le laboratoire du Pr. De Crescenzo à l'École Polytechnique de Montréal permet de greffer de manière covalente des molécules ou polymères aminés, comme l'éthylènediamine (EtDA) ou le polyvinylamine (PVAm), sur du PET (Noel et al. 2011; Noel et al. 2013), sans modification de ses propriétés mécaniques. Il s'agit d'un procédé permettant de faire réagir certains groupements amines avec les fonctions ester du PET, créant ainsi des liens amides forts entre le composé aminé et le substrat de PET. Dans le cadre de ce projet, ce procédé a également été adapté pour le greffage covalent du polyallylamine (PAAm, cf. Figure 3.2) sur le PET, tel que décrit ci-dessous.

Une solution alcaline est préparée par dissolution de sels NaOH et KCl dans de l'eau Milli-Q (1 : 1, 100 mM), à laquelle on ajoute une solution de PAAm (15% w/v dans l'eau,

M.W. = 15 000) et du 1,4-dioxane (99,8%, M.W. = 88,11 g/mol), selon les proportions 69,5 : 3,8 : 26,7 % v/v. Avant l'ajout du dioxane, le pH de la solution est mesuré, et ajusté à la valeur désirée par ajouts successifs de quelques microlitres de HCl (12,3 M), le tout effectué en agitant la solution à l'aide d'un barreau aimanté. La solution obtenue est ensuite soumise à la sonication dans un bain à ultrasons, jusqu'à absence de bulles ; puis des échantillons de films de PET sont immergés dans la solution, dans des tubes individuels subséquentment recouverts de Parafilm (film plastique de paraffine) et de papier d'aluminium, et une nouvelle exposition aux ultrasons est effectuée durant 20 min.

On laisse alors les échantillons réagir dans un bain-marie à 70°C pendant 24h, après quoi ils sont rincés successivement dans l'eau Milli-Q, le méthanol, et l'eau Milli-Q à nouveau, et enfin laissés sécher à l'air libre.

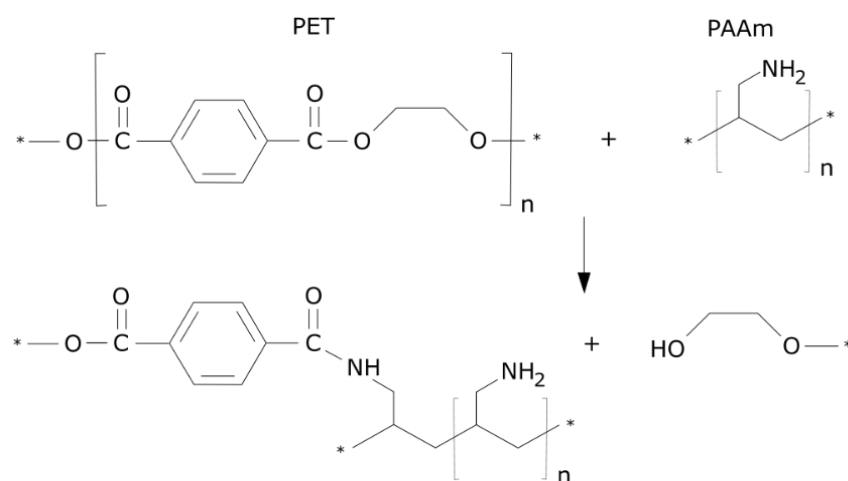


Figure 3.2 : Réaction d'aminolyse entre le PAAm le PET

3.1.4 Greffage de sulfate de chondroïtine (CS) sur des surfaces aminées

Le sulfate de chondroïtine peut être greffé de manière covalente sur des surfaces aminées, via une chimie EDC/NHS, décrite en détails par Charbonneau et al. (Charbonneau et al. 2011). Brièvement, les molécules de EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), NHS (N-Hydroxysuccinimide) et MES (Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) servent à

« activer » le sulfate de chondroïtine, entraînant la formation de liens amide entre les groupements amines primaires et les fonctions carboxyliques du CS.

Concrètement, le greffage de CS (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) s'est effectué sur diverses surfaces aminées, sous la forme de disques de 10 mm de diamètre, de la manière suivante : la solution de greffage est obtenue par mélange de MES (50 mM), EDC (22,8 mM), NHS (4,6 mM), EtOH (40% v/v), H₂O stérile (34,7% v/v) et une solution stock de CS (préparée par dissolution, 10% w/v, et filtrée). Une goutte de 65 µL est alors déposée sur chaque échantillon, et laissée agir durant 1h, après avoir couvert les échantillons pour limiter l'évaporation. Ceux-ci sont ensuite rincés avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) et deux fois à l'eau, incluant 2 min dans un bain à ultrasons à chaque rinçage.

3.1.5 Surfaces étudiées

Le Tableau 3.2 résume l'ensemble des surfaces considérées dans le cadre de ce travail. En plus des surfaces obtenues grâce aux procédés mentionnés ci-dessus (les surfaces aminées ayant été étudiées avec et sans CS), des surfaces commerciales fonctionnalisées ont été utilisées, comme contrôle mais aussi pour mieux comprendre leur composition et leur effet sur les cellules. Il s'agit des surfaces TCP (Falcon™) et Primaria™ décrites dans la revue de littérature (section 2.3.1.4), développées par Corning à l'aide de traitements par plasma micro-ondes a priori (Bryhan et al. 2003; Fryer et al. 2009).

Tableau 3.2 : Surfaces étudiées dans le cadre de ce projet de maîtrise

Type de surface	Procédé utilisé	Hétéroatome
L-PPE:N	Polymérisation plasma	Azote
PETf	Traitement plasma	Azote
PAAm	Greffage chimique	Azote
Parylène diX AM	CVD	Azote
L-PPE:O	Polymérisation plasma	Oxygène
L-PPE:O,N	Polymérisation plasma	Mixte, O+N
TCP (Falcon™)	Traitement plasma	Oxygène
Primaria™	Traitement plasma	Mixte, O+N

Ces surfaces ont été analysées à l'aide des techniques décrites ci-dessous. En bref, l'ellipsométrie et la profilométrie (Dektak®) ont été utilisées pour avoir une meilleure connaissance des dépôts mixtes L-PPE:O,N récemment développés dans notre laboratoire, en caractérisant respectivement la vitesse de dépôt et leur solubilité dans l'eau ; le microscope à force atomique (AFM) a été employé pour déterminer la rugosité de différentes surfaces PAAm. Toutes les surfaces étudiées ont été caractérisées chimiquement par analyse XPS, complétée par la dérivation chimique (TFBA) et la colorimétrie (Orange II) dans le cas des surfaces azotées. Enfin, le greffage de CS a été mesuré par XPS et par colorimétrie (TBO).

3.2 Tests de caractérisation

3.2.1 Caractérisation physique

3.2.1.1 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique optique de caractérisation basée sur le changement d'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane (« Archive-1 Ellipsométrie | Techniques de l'Ingénieur » 2015). En effet, elle consiste à diriger vers l'échantillon un faisceau de lumière (onde plane) ayant un champ E_i , décomposable en une composante parallèle au plan d'incidence $E_{p,i}$ et une composante perpendiculaire $E_{s,i}$ (Figure 3.3). Les composantes parallèle et perpendiculaire de la lumière réfléchie, respectivement $E_{p,r}$ et $E_{s,r}$, sont différentes de la polarisation incidente : une polarisation initialement rectiligne ou circulaire devient généralement, après réflexion du faisceau, elliptique dû au changement de ces paramètres.

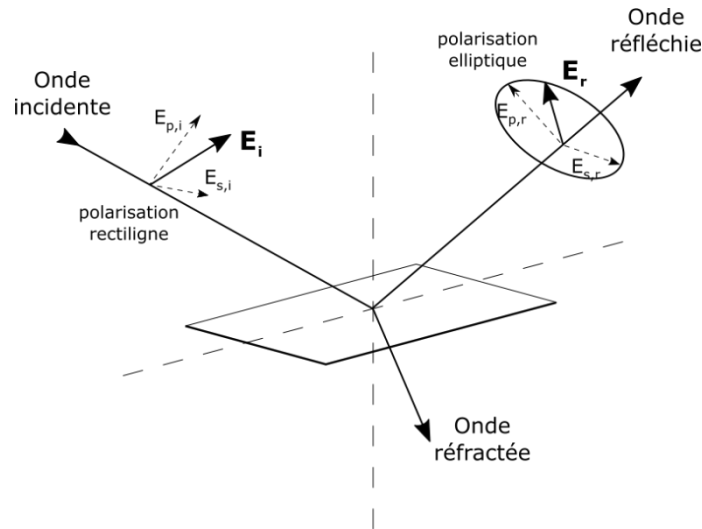


Figure 3.3 : Exemple de polarisation d'un faisceau émis par l'ellipsomètre

On définit également les coefficients de réflexion complexes $r_p = \frac{E_{p,r}}{E_{p,i}}$ et $r_s = \frac{E_{s,r}}{E_{s,i}}$. La mesure du rapport $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ par un analyseur permet alors de calculer les paramètres $\tan\Psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}$ et Δ la différence de phase. Ces grandeurs sont liées aux propriétés optiques de l'échantillon sur lequel le faisceau est réfléchi. De plus, dans le cas d'un échantillon composé d'une ou plusieurs couches minces, la lumière est réfléchie sur chaque interface, avec des coefficients différents dus aux

propriétés optiques propres de chaque couche. Ce phénomène permet alors d'analyser les différentes couches, notamment leurs caractéristiques optiques (en particulier l'indice de réfraction n et le coefficient d'extinction k), mais également leurs épaisseurs.

De manière générale, un ellipsomètre est composé d'une source de lumière, d'un polariseur (permettant d'obtenir la polarisation d'incidence voulue), d'un analyseur, et d'un détecteur. Certains éléments peuvent être ajoutés ou modifiés selon le mode de mesure utilisé. En effet, différentes techniques d'ellipsométrie peuvent être rencontrées, comme la méthode d'extinction de signal (ou « de zéro »), basée sur une mesure angulaire et utilisant un faisceau monochromatique polarisé rectilignement ; ou la méthode de modulation par élément tournant, qui est une mesure faite sur un large domaine spectral (on parle alors d'ellipsométrie spectroscopique, cf. schéma en Figure 3.4).

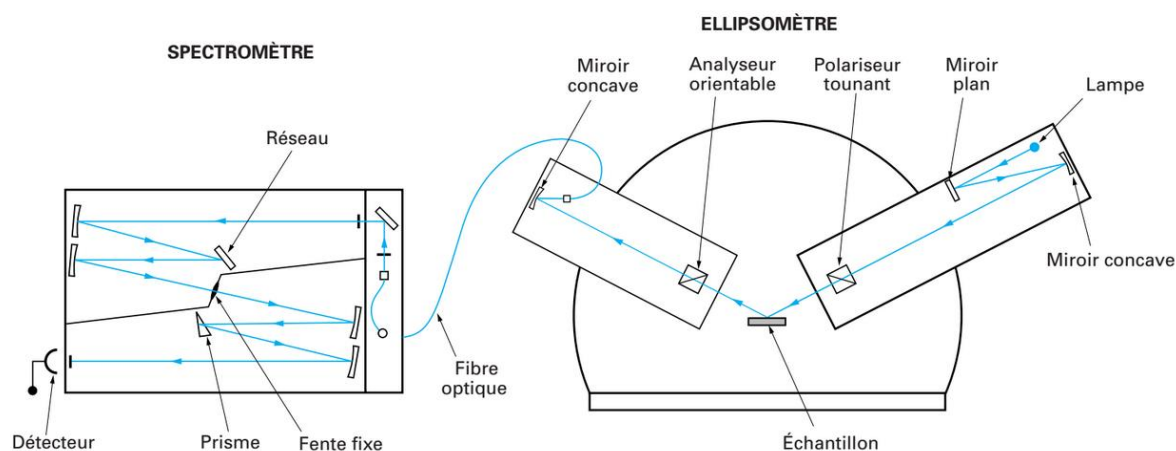


Figure 3.4 : Schéma du trajet optique d'un ellipsomètre spectroscopique, tiré de (« Ellipsométrie | Techniques de l'Ingénieur » 2015)

Toutefois, la caractérisation des propriétés de l'échantillon (indices optiques n et k , épaisseur) ne peut se faire directement à partir des grandeurs Ψ et Δ , mais nécessite un modèle numérique, basé sur des hypothèses quant au nombre de couches de l'échantillon, leur épaisseur approximative, etc., généralement conçu à partir de mesures sur des échantillons connus.

Au cours de ce projet, un ellipsomètre M-2000FI (J.A. Woollam Co, Inc., Lincoln, NB) a été utilisé en mode angulaire pour mesurer l'épaisseur de dépôts L-PPE:O,N notamment, et l'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel CompleteEase v4.48. Les échantillons analysés sont des dépôts

réalisés par polymérisation plasma sur des gaufres de silicium, qui permet une mesure plus aisée et plus fiable que d'autres substrats comme le PET (notamment à cause de sa transparence et son faible indice de réfraction, trop proche de celui du L-PPE:O,N).

3.2.1.2 Profilométrie – Tests de solubilité

La profilométrie est une technique visant à caractériser la topographie d'une surface. Comme son nom l'indique, elle permet d'obtenir un profil du relief de la surface analysée. Cette technique peut être basée sur différents principes : tout d'abord, la profilométrie de contact (ou profilométrie à stylet), consiste à faire parcourir une surface à une pointe en diamant. Le déplacement vertical de cette pointe est alors mesuré (généralement à l'aide d'un capteur inductif), et un profil de la surface $z=f(x)$, sur la ligne parcourue, peut alors être établi. Bien que ce principe soit peu rapide et potentiellement dommageable pour l'échantillon, il a l'avantage d'être compatible avec un grand nombre de surfaces, quelles que soient leurs propriétés optiques, et les profilomètres de contact sont peu chers. Les profilomètres optiques, en revanche, peuvent être plus dispendieux, mais sont souvent plus rapides et permettent d'obtenir un profil sans avoir à entrer en contact direct avec l'échantillon. Ils se distinguent en deux familles : les profilomètres optiques à balayage, munis d'un capteur de distance ponctuel permettant de mesurer l'altitude de chaque point analysé lors du balayage, et les profilomètres optiques matriciels, tels que la microscopie confocale, qui, par capture d'image, utilisent différents principes optiques pour en déterminer la topographie.

Dans le cadre de ce projet, deux techniques de profilométrie ont été utilisées : un profilomètre à stylet Dektak® pour évaluer la stabilité des couches déposées (absence de dissolution dans l'eau) par mesure de l'épaisseur de la couche ; et la microscopie à force atomique (AFM) pour étudier l'homogénéité et la nanorugosité des surfaces (voir section suivante)

Le Dektak® a permis de déterminer, de manière approximative, la solubilité de revêtements L-PPE:O,N dans l'eau. En effet, bien que ces dépôts aient déjà été à l'étude dans ce laboratoire, leur insolubilité n'avait pas encore été vérifiée. Pour cela, des dépôts ont été réalisés selon différentes conditions ($P = 10 \text{ W}$, $p = 600 \text{ mTorr}$, $t = 30 \text{ min}$, $F_{\text{C}_2\text{H}_4} = 20 \text{ sccm}$, $F_{\text{N}_2\text{O}}$ variable), sur des lames de verre partiellement masquées à l'aide d'un ruban de cuivre. Le masque permet de créer une zone vierge de dépôt sur le substrat, soit une zone de « niveau zéro ». Les lames sont

alors partiellement immergées dans l'eau pendant 24h, et on distinguera 3 zones (cf. Figure 3.5) : la zone A, masquée durant le dépôt et supposée vierge ; la zone B, non masquée (revêtue du dépôt L-PPE:O,N) et immergée dans l'eau ; et la zone C, non masquée et non immergée (exposée à l'air pendant ce temps). Après séchage, le Dektak® est utilisé pour mesurer la différence de marche entre les zones ; la valeur d'intérêt étant la différence d'épaisseur entre les zones B et C. Toutefois, cette valeur peut difficilement être mesurée directement : les mouvements de l'eau ont pu rendre floue la limite entre ces zones, empêchant l'observation d'une marche distincte ; de plus, une partie du dépôt non immergé proche de l'eau aura pu être modifiée par la présence de l'eau, par simple effet de capillarité.

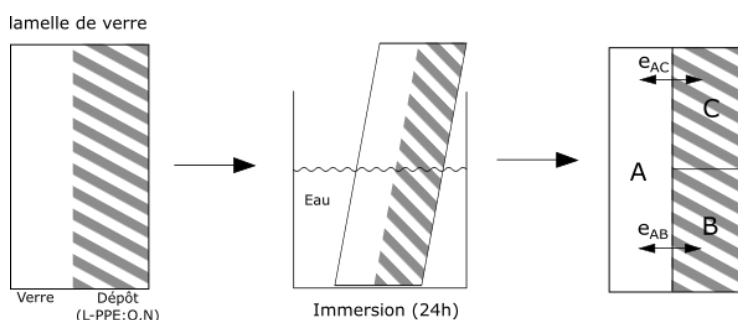


Figure 3.5 : Immersion des dépôts L-PPE:O,N pour des tests de solubilité

Ainsi, le Dektak® est utilisé pour mesurer la différence de marche entre les zones A et B d'une part, et A et C d'autre part (cette dernière valeur étant validée par le calcul de l'épaisseur du dépôt, possible grâce à l'obtention du taux de déposition par ellipsométrie). Le pourcentage de perte d'épaisseur est alors calculé comme suit :

$$\%_{perte} = \frac{e_{AC} - e_{AB}}{e_{AC}} \times 100$$

3.2.1.3 Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique est un type de microscope à sonde locale à très haute résolution, inventé en 1986 et commercialisé en 1989 pour l'étude de surfaces de matériaux isolants à l'échelle atomique. Son précurseur, le microscope à effet tunnel, avait valu à ses inventeurs le Prix Nobel de Physique en 1986 (« All Nobel Prizes in Physics » 2015). Aujourd'hui, différents modes de fonctionnement de l'AFM sont possibles, selon les types de matériaux analysés ou de

propriétés recherchées (Binnig, Quate, et Gerber 1986). Il peut aussi être utilisé dans différentes conditions : sur des échantillons isolants ou conducteurs, sur des échantillons biologiques, dans un fluide, dans l'air ou sous vide, à basse température, en présence d'un champ magnétique, etc.

Pour sonder la surface à analyser, le microscope à force atomique utilise une pointe extrêmement précise (fine de quelques nanomètres afin d'assurer une excellente résolution latérale), souvent en silicium ou en nitrure de silicium. La pointe est fixée sur un *cantilever* (ou « levier », structure en porte-à-faux), sur lequel un faisceau laser est dirigé. La déviation du faisceau réfléchi sur le *cantilever*, capté par une diode photoélectrique segmentée, permet de mesurer le mouvement de la pointe, et donc les interactions de celle-ci avec l'échantillon (cf. Figure 3.6).

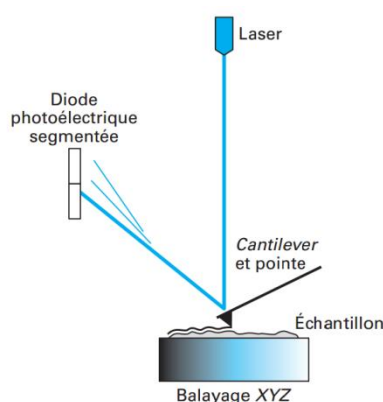


Figure 3.6 : Principe de fonctionnement d'un AFM, schéma tiré de (« Microscopie à force atomique (AFM) | Techniques de l'Ingénieur » 2015)

Il existe différents modes de fonctionnement de l'AFM : en mode *contact* (ou mode *statique*), la pointe balaye la surface, et est déplacée par les interactions répulsives avec celle-ci. Le déplacement du levier, ou plus souvent le signal requis pour rétablir la position du levier, est mesuré pour analyser le contour de la surface. Il s'agit d'un mode rapide, qui permet d'effectuer des mesures complémentaires simultanément (frottement, adhérence...). Le mode *tapping* (ou *contact intermittent*) est le plus utilisé, notamment pour l'analyse topographique, et permet de limiter le contact de la pointe avec l'échantillon, et donc son usure. Il consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence de résonance, et mesurer les changements d'amplitude de la vibration dus à l'interaction pointe-surface, qui modifie la fréquence de résonance du système. La phase du signal permet de révéler les hétérogénéités de surface. Le mode *résonant* (ou *résonant linéaire*, ou *non-contact*) consiste à faire vibrer le système un peu plus loin de la surface, à hauteur

constante, sur de plus petites amplitudes (1 à 10 nm). Il est alors davantage sensible aux forces de plus longue portée, telles que les forces électriques ou magnétiques. Toutefois, un balayage en mode *tapping* est généralement nécessaire au préalable, afin de s'affranchir des effets liés à la topographie. Enfin, d'autres variantes de ces modes peuvent être utilisées, pour des applications particulières : mode frottement, mode élasticité, mode pulsé...

Au cours de ce projet, seul le mode *tapping* a été utilisé, pour analyser la topographie des surfaces, et notamment leur rugosité. On retiendra les valeurs de rugosité moyenne quadratique R_q , calculée par le logiciel Nanoscope, selon la formule :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n h_i^2}$$

où n est le nombre de points et h_i leur hauteur associée. Les mesures ont été réalisées par Patricia Moraille sur un AFM Icon/FastScan (Bruker, Santa Barbara, CA), en mode *tapping* utilisant un cantilever en silicium (RTESPA, Bruker) de raideur $k \approx 42$ N/m et de rayon (en pointe) inférieur à 10 nm, à une fréquence de résonance de 300 kHz environ.

3.2.2 Caractérisation chimique

3.2.2.1 Spectroscopie Photoélectronique à rayons X (XPS)

La spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS, ou ESCA pour Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique), est une technique de caractérisation chimique quantitative (ou semi-quantitative, considérant qu'elle ne peut pas détecter efficacement les atomes légers que sont l'hydrogène et l'hélium), permettant de déterminer la composition chimique à la surface d'un matériau. Elle a également valu à son inventeur, Kai Siegbahn, le Prix Nobel de Physique en 1981 (« All Nobel Prizes in Physics » 2015). Il s'agit d'une technique basée sur l'analyse d'électrons de cœur, éjectés de leur orbite par des photons de haute énergie (rayons X), et est réalisée sous un vide poussé, à une pression inférieure à 1.10^{-8} Torr, soit $1,33.10^{-6}$ Pa.

Un système d'analyse XPS est principalement composé d'une source de rayons X (généralement une source d'aluminium ou de magnésium) dirigée vers l'échantillon à caractériser, et un analyseur d'électrons. Lorsqu'un photon X (énergie supérieure au keV) est projeté sur un atome, celui-ci l'absorbe, avec pour conséquence l'émission d'un électron de cœur, dont l'énergie d'ionisation est du même ordre de grandeur que celle du photon absorbé. Le photoélectron éjecté possède alors une énergie cinétique égale à l'énergie du photon, moins l'énergie nécessaire pour rompre la liaison électron-atome :

$$E_k = h \cdot \nu - E_b - \Phi$$

h étant la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s), ν la fréquence de radiation du photon incident (s^{-1}), E_k l'énergie cinétique de l'électron éjecté (J), E_b son énergie de liaison (J), et Φ une constante caractéristique du système (J) (Friedbacher et Bubert 2011). L'analyseur mesure l'énergie de tous les électrons reçus, et, connaissant l'énergie (constante) des photons incidents, permet d'établir un spectre d'énergies de liaison (exemple en Figure 3.7). Les électrons de cœur étant caractéristiques de l'atome auquel ils sont liés, le spectre d'énergie indique la nature des éléments présents au sein de la surface à analyser. Par exemple, un pic à $E_b = 285$ eV indique qu'une grande quantité d'électrons de cœur possédait cette énergie de liaison, qui est caractéristique de l'orbitale 1s des atomes de carbone : ce pic révèle donc la présence de carbone dans l'échantillon analysé.

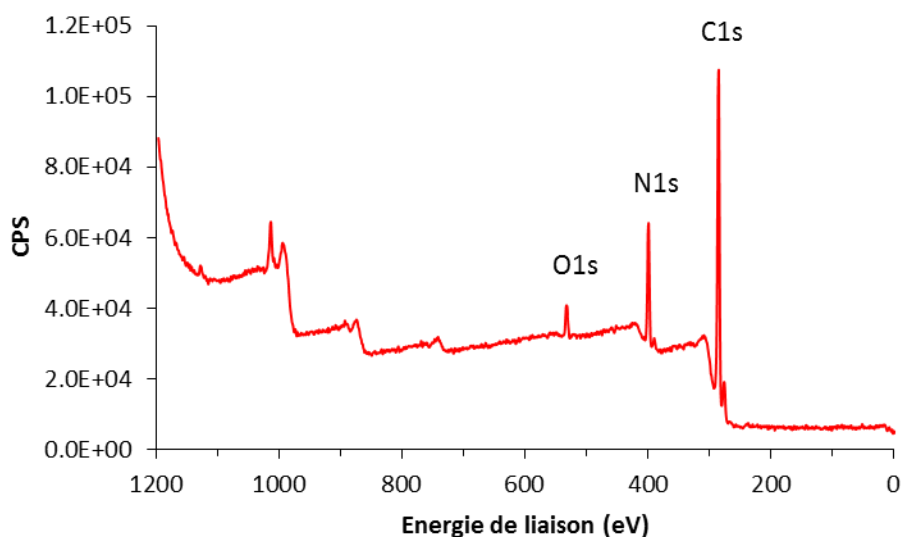


Figure 3.7 : Exemple de scan XPS : Survol d'un échantillon de L-PPE:N.

La technique d'analyse par XPS est considérée comme une analyse de surface ; toutefois il est important de préciser qu'il s'agit d'une analyse qui porte sur les 10 premiers nanomètres d'épaisseur de l'échantillon, lorsque l'analyse se fait perpendiculairement à l'échantillon. Cette épaisseur d'analyse peut être réduite en utilisant la méthode AR-XPS (XPS à angle résolu), qui consiste à utiliser un angle d'analyse rasant, ce qui a pour effet de ne détecter que les électrons éjectés sur les premiers nanomètres. Le calcul de l'épaisseur d'analyse, qui dépend de l'angle de détection, mais aussi du matériau considéré et de l'élément d'origine de l'électron, est détaillé en Annexe A.

Au cours de ce projet, le système utilisé est un modèle VG ESCALAB 3MkII, avec une source de photons X provenant de la raie $K\alpha$ d'une cible de magnésium ($h\nu = 1253,6$ eV) (O'Connor et Sexton 2003; Beamson et Briggs 1992). Les spectres recueillis sont analysés à l'aide du logiciel Advantage v4.12 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Les résultats (concentration des éléments en pourcentage atomique, at.%) sont obtenus en mesurant l'aire des pics correspondant à une orbitale de chaque élément. Pour cela, le spectre est d'abord « calibré » : la charge en surface de l'échantillon, résultant en partie de l'éjection d'électrons, crée un décalage de l'énergie perçue, et donc un *shift* en énergie du spectre. Celui-ci est donc étalonné en prenant comme référence le pic de carbone à 285 eV. D'autre part, pour calculer les aires sous les pics il est nécessaire d'éliminer le bruit de fond : dans ce projet, le modèle Shirley est utilisé (Riviere et Myhra 2009). Enfin, pour quantifier les atomes en présence, les aires doivent être normalisées par des facteurs de sensibilité (S.F.) propres à chaque élément. Le logiciel d'analyse XPS peut alors calculer le pourcentage de chaque élément dans le matériau analysé, par le ratio de l'aire normalisée de cet élément sur la somme des aires normalisées des éléments observés :

$$[X](\%) = \frac{\frac{Aire(X)}{S.F.(X)}}{\sum \frac{Aire(i)}{S.F.(i)}} \times 100$$

Les facteurs de sensibilité utilisés sont issus des tables de Wagner (Wagner et al. 1981), et rassemblées dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Paramètres caractéristiques des éléments analysés par XPS

Orbitale	S.F.	E_b (eV)
C1s	0,250	285
N1s	0,420	399
O1s	0,660	532
F1s	1,000	688

D'autre part, des spectres haute résolution sont effectués afin de mieux caractériser les groupements chimiques présents à la surface. En effet, l'énergie de liaison E_b ne dépend pas seulement de la nature de l'élément chimique, mais aussi des atomes voisins de celui-ci, avec lesquels il possède des liaisons chimiques, et dont l'effet attracteur ou répulsif modifie légèrement l'énergie de liaison. Ainsi, un pic d'énergie est en fait la résultante de plusieurs pics d'énergies légèrement différentes, qui peuvent être identifiés par la déconvolution de pics analysés en haute résolution par XPS (cf. Figure 3.8). Cette analyse permet alors d'identifier, et dans une certaine mesure de quantifier, les fonctionnalités chimiques dans lesquelles les atomes sont impliqués.

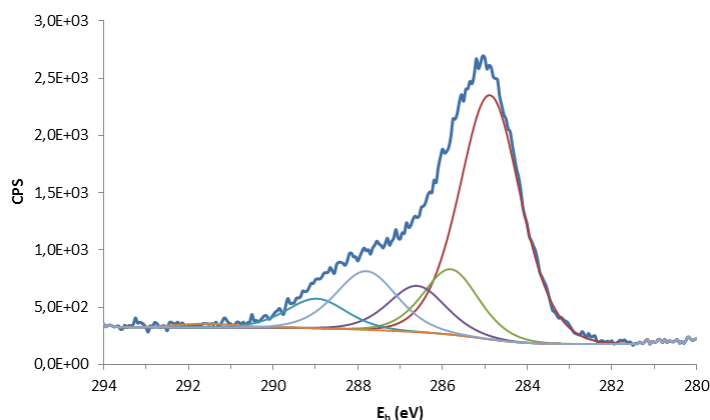


Figure 3.8 : Exemple de déconvolution d'un pic à haute résolution : pic C1s du Primaria, analysé avec un angle de 70°

Il s'agit d'un exercice complexe, car les énergies correspondant à des liaisons différentes peuvent être très proches, dépendamment de l'environnement de chaque atome, notamment l'électronégativité des atomes voisins et la nature des liaisons (simple, double...) avec ceux-ci. Il est donc nécessaire de donner une certaine « liberté » en énergie pour chaque pic (une erreur de $\pm 0,2$ eV en général), ainsi qu'une largeur à mi-hauteur (F.W.H.M.) suffisamment grande, pour

englober les différentes possibilités d'environnement de l'atome considéré. Ainsi, certains pics d'énergie proche peuvent se chevaucher ; c'est pourquoi ces résultats sont souvent à considérer avec précaution. Ainsi, dans le cas des pics C1s, la proximité en énergie des liaisons C-O et C-N nous a obligés à contraindre davantage le sous-pic correspondant aux liaisons C-O (en fixant $E_b = 286,5 \pm 0,1$ eV, avec une largeur à mi-hauteur maximale de 1,6 eV). Les paramètres utilisés pour la déconvolution des pics C1s et O1s, effectuées à l'aide du logiciel CasaXPS v2.3.16, sont rassemblés dans les Tableau 3.4 et Tableau 3.5, respectivement.

Tableau 3.4 : Paramètres utilisés pour la déconvolutions des pics C1s

Liaisons	Énergie E_b (eV)	F.W.H.M. (eV)
C-C	$285,0 \pm 0,2$	1,5 – 1,7
C-N	$286,0 \pm 0,2$	1,5 – 1,7
C-O	$286,5 \pm 0,1$	1,5 – 1,6
C=O/N-C=O	$288,0 \pm 0,2$	1,5 – 1,7
COOR/H	$289,3 \pm 0,2$	1,5 – 1,7
Shake-up	$291,8 \pm 0,2$	1,5 – 1,7

Tableau 3.5 : Paramètres utilisés pour la déconvolutions des pics O1s

Liaisons	Énergie E_b (eV)	F.W.H.M. (eV)
C-O	$533,4 \pm 0,2$	1,9 – 2,1
C=O	$532,2 \pm 0,2$	1,8 – 2,0
N-C=O	$231,5 \pm 0,2$	1,5 – 1,7

3.2.2.2 Dérivation chimique

L'analyse par XPS ne permet toutefois pas d'identifier certaines fonctionnalités, même par une analyse à haute résolution, notamment du fait de la difficulté de détection des atomes d'hydrogène. Par exemple, il est impossible de distinguer des fonctions amines primaires C-NH₂ d'autres fonctions impliquant une liaison C-N par une simple analyse XPS. Dans ce cas, ou afin de quantifier de manière plus précise certains groupements, il est possible d'avoir recours à une

méthode de dérivation chimique, qui consiste à fixer de manière spécifique une molécule « marqueur » aux groupements à identifier. La quantification du marqueur, supposé aisément observable par XPS, permet alors de mesurer la concentration du groupement ciblé. Ainsi, les groupements hydroxyles peuvent être marqués par le TFAA (anhydride trifluoroacétique) (Dickie et al. 1982; Sutherland et al. 1994; Snyders et al. 2007; Pippig et al. 2009), les groupements carboxyles par le TFE (2,2,2-trifluoroéthanol) (Chilkoti, Ratner, et Briggs 1991; Snyders et al. 2007), les amines primaires par le TFBA (4-(trifluorométhyl)benzaldehyde) (Favia, Stendardo, et d'Agostino 1996; Tušek et al. 2001; Girard-Lauriault et al. 2013) ou le PCB (para-chlorobenzaldehyde) (Snyders et al. 2007).

Au cours de ce projet, les amines primaires sont quantifiées par dérivation chimique par le TFBA, selon un protocole déjà utilisé dans nos laboratoires (St-Georges-Robillard 2012; Truica-Marasescu et Wertheimer 2008). Il s'agit d'une molécule facilement identifiable et quantifiable par XPS (dans le cas d'échantillons non fluorés), grâce à la présence de trois atomes de fluor, rattachés au cycle aromatique par un atome de carbone (Figure 3.9). La dérivation s'effectue dans un contenant en verre, au fond duquel se trouvent des billes de verre (2 mm de diamètre), sur une hauteur de 1 cm environ, et sur lesquelles sont déposées quelques gouttes d'une solution de TFBA (98%). Les échantillons sont fixés sur une lamelle de verre, déposée sur les billes en présence du TFBA. Le contenant fermé est alors placé à 45°C durant 3h, assurant une complète dérivation des amines primaires (Girard-Lauriault et al. 2009; Truica-Marasescu et Wertheimer 2008; Truica-Marasescu et al. 2008; Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015).

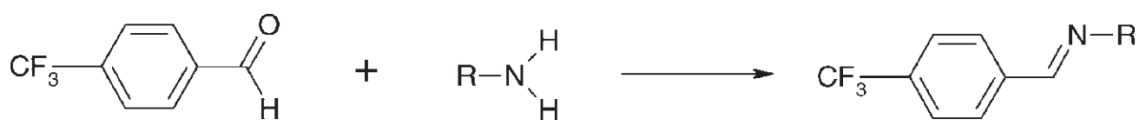


Figure 3.9 : Réaction du TFBA avec une amine primaire. Schéma reproduit de (Girard-Lauriault et al. 2005) avec permission

La concentration d'amines primaires $[\text{NH}_2]$ est obtenue grâce à l'analyse XPS de l'échantillon, avant (indice « u » pour *underivatized*) et après (indice « d ») dérivation, selon les formules issues de la littérature (Truica-Marasescu et Wertheimer 2008) :

$$\frac{[\text{NH}_2]_u}{[\text{N}]_u} = \frac{[\text{F}]_d}{3[\text{N}]_d} \times 100$$

$$\frac{[\text{NH}_2]_u}{[\text{C}]_u} = \frac{[\text{F}]_d[\text{N}]_u}{3[\text{N}]_d[\text{C}]_u} \times 100$$

Le pourcentage d'amines primaires en présence étant la grandeur que l'on considérera préférentiellement dans ce rapport, nous utiliserons plutôt cette variante de l'équation :

$$[\text{NH}_2]_u = \frac{[\text{F}]_d[\text{N}]_u}{3[\text{N}]_d} \times 100$$

Il semble toutefois nécessaire de préciser que cette technique, bien qu'ayant été très largement utilisée et ayant fourni des résultats appréciables dans de nombreux laboratoires, a récemment fait l'objet de critiques par certains chercheurs ou laboratoires. Ainsi, certains estiment que le TFBA peut réagir avec les fonctions imines (Klages, Khosravi, et Hinze 2013), ou – bien que peu probablement – aminales (Girard-Lauriault et al. 2012), remettant en cause la sélectivité de la réaction avec les amines primaires, avec pour effet une surestimation de la quantité d'amines primaires. D'autres avancent la possibilité de rupture de liens C-F lors de la dérivation (Yegen et al. 2009), conduisant à une sous-estimation de la quantité d'amines primaires. Tenant compte de ces débats, la position que nous prenons dans ce travail est la suivante : on considérera que les résultats obtenus par la méthode de dérivation par TFBA sont exploitables, bien qu'à considérer avec précautions dû à un biais probable. La fiabilité de cette technique semble tout de même suffisante pour la comparaison de surfaces aminées dans le cadre de la culture de cellules : elle a notamment déjà permis à notre laboratoire de déterminer un seuil critique de concentration en amines primaires pour la culture de monocytes U937 sur des surfaces polymérisées par plasma et par rayons ultraviolets (Girard-Lauriault et al. 2009).

3.2.2.3 Méthode colorimétrique Orange II

Les fonctions amines peuvent également être quantifiées par des méthodes chimiques, comme le Coomassie Brilliant Blue (Noel et al. 2011) (CBB) ou l'Orange II (*4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid sodium salt*, également appelé *Acide Orange 7*) (Uchida, Uyama, et Ikada 1993; Hamerli et al. 2003; Zemljič et al. 2009; Noel et al. 2011) qui sont des méthodes colorimétriques. Dans ce dernier cas, les molécules d'Orange II (Figure 3.10) se lient avec les amines chargées positivement dans un milieu acide, et s'en dissocient en milieu basique. On peut alors quantifier les molécules désorbées par spectrophotométrie. Cette méthode est bien entendu destructive, mais a l'avantage d'être simple et peu coûteuse. C'est pourquoi nous avons choisi de l'utiliser dans le cadre de ce projet et de comparer les résultats aux autres méthodes employées (XPS avec dérivation chimique)

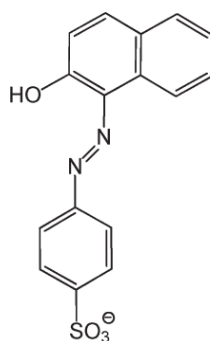


Figure 3.10 : Molécule d'Orange II, schéma reproduit de (Noel et al. 2011) avec permission

Tout d'abord, les échantillons aminés sont mis à réagir avec une solution d'Orange II réalisée par dissolution de sels d'Orange II dans une solution acide (solution d'eau milli-Q ajustée au pH = 3 par ajout de HCl à 1 M), à raison de 14 mg/mL. La réaction se fait à 40°C et dure 30 min, puis les échantillons sont rincés trois fois avec la solution acide (pH = 3), afin de retirer les molécules non adsorbées aux échantillons, et séchés. Ils sont ensuite plongés dans 1 mL de solution alcaline (solution d'eau milli-Q ajustée au pH = 12 par ajout de NaOH), où les molécules d'Orange II sont désorbées et colorent la solution. L'absorbance de la solution de désorption est alors mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 484$ nm, après avoir abaissé son pH (pH \approx 3) par ajout de 1% v/v de HCl (12,3 M).

Une courbe de calibration est effectuée lors de chaque expérience, en mesurant l'absorbance de solutions d'Orange II de concentrations connues, afin d'établir une relation absorbance-[OrangeII]. Cela permet d'obtenir la concentration en Orange II des solutions de désorption, d'où, connaissant le volume initial, la quantité de molécules adsorbées puis désorbées, et donc la quantité d'amines détectées. La concentration surfacique en amines des échantillons, d'aire connue, est enfin exprimée en pmol/mm^2 .

3.2.2.4 Méthode colorimétrique TBO

Le Toluidine Bleu O (*7-amino-8-methyl-phenothiazin-3-ylidene*)-dimethyl-ammonium, également appelé *tolonium chloride*) est un colorant, réagissant avec des groupements chargés négativement (Tiraferri et Elimelech 2012). Il est principalement utilisé en histologie, grâce à sa capacité à identifier l'héparine (Arisaka et al. 2013; Smith, Mallia, et Hermanson 1980).

Au cours de ce projet, il a été utilisé pour quantifier le sulfate de chondroïtine (CS) greffé sur des surfaces aminées. Il s'agit d'une méthode de quantification proche de celle décrite plus haut, basée sur l'adsorption et la désorption des molécules colorantes sur des groupements ciblés (en l'occurrence, les groupements négatifs $-\text{COO}^-$ et $-\text{SO}_3^-$ du CS). Chaque type de surface considéré a été soumis à cette coloration avec et sans greffage de CS, afin de s'assurer de la faible réactivité du TBO avec les surfaces aminées.

Une solution de TBO de $100 \mu\text{M}$ est préparée par dissolution de sels de TBO dans une solution basique ($\text{pH} = 10$, préparée par ajout de NaOH 1M dans de l'eau milli-Q, ajustée à l'aide d'un pH-mètre), à raison de 30 mg/L . Les échantillons à analyser sont immergés dans la solution de TBO durant 1h à 40°C , puis rincés trois fois avec la solution basique ($\text{pH} = 10$) afin de retirer les molécules non adsorbées. Le TBO est ensuite désorbé dans une solution d'acide acétique 50% v/v, puis l'absorbance de la solution de désorption est mesurée aux longueurs d'onde 630 nm (longueur d'onde principale d'absorption du TBO en milieu basique) et 531 nm (utilisée comme contrôle). La seconde mesure est soustraite à la première pour obtenir la valeur d'absorbance finale.

Là aussi, une courbe de calibration est réalisée en mesurant les absorbances (à 630 nm et 531 nm) de solutions de TBO de concentrations connues. Notons que cette méthode est semi-quantitative :

bien qu'elle permette de quantifier les groupements négatifs en surface, appartenant aux chaînes de CS, elle ne permet en aucun cas de quantifier le nombre de ces chaînes. En effet, leur longueur varie considérablement, et donc le nombre de groupements fonctionnels qu'elles contiennent ; d'autre part, certains des groupements carboxyles du CS sont impliqués dans la liaison avec les amines primaires du substrat.

3.3 Culture de cellules HUVEC

Dans le cadre du développement d'implants vasculaires, il est important de favoriser l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales sur des surfaces polymériques. C'est pourquoi ces cellules ont été utilisées pour comparer le potentiel des différentes surfaces à cet effet.

Des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC ; Lonza, Canada) ont été mises en culture sur des surfaces aminées, oxygénées et hybrides, dont le mode de conception est décrit plus haut dans ce mémoire, et sous forme d'échantillons discaux de 10 mm de diamètre. Des films de PET non traités ont été utilisés comme contrôle négatif ; les plaques de culture *tissue culture polystyrene* (TCP), fournies par Corning, ont servi de contrôle positif. L'expérience a également été menée sur des plaques de culture commerciales Primaria™.

3.3.1 Culture cellulaire et adhésion sur les surfaces

Les cellules HUVEC ont été cultivées dans un milieu de culture (EGM2, *Endothelial Cell Growth Medium-2*, Lonza, Canada) en présence de 2 % v/v de sérum de veau fœtal (FBS ; Mediatech, Montréal, QC). Leur comportement étant très sensible au nombre de passages subis (Klein 1995; Pu et al. 2002), seules des cellules de passage 3 ou 4 ont été utilisées.

Les différents échantillons testés sont placés au fond des puits de plaques 48-puits, sous la forme de disques de 1 cm de diamètre. Les plaques Primaria™ n'étant pas disponibles en format 48-puits, des plaques 24-puits ont été utilisées dans les mêmes conditions ; afin de conserver un contrôle, des plaques TCP 24-puits ont également été incluses dans l'expérience. Tous les puits sont remplis d'éthanol pendant 5 min afin de stériliser les surfaces, puis rincés avec de l'eau

stérile. Après séchage, un cylindre de clonage en verre (aire interne : 0,5 cm²) est posé sur chaque échantillon, afin de contraindre l'aire initiale d'adhésion des cellules, identique pour toutes les surfaces, et limiter le mouvement des échantillons.

Les cellules sont alors déposées dans ces cylindres, sous forme d'une suspension cellulaire de concentration 75 000 cellules/mL, à raison de 15000 cellules par puits (200 µL de suspension). Après 4h d'incubation à 37°C et 5 % CO₂, les cylindres de clonage sont retirés et les surfaces rincées avec du PBS pour éliminer les cellules n'ayant pas adhéré. Les surfaces sont alors immergées dans le milieu de culture (500 µL/puits) et remises à incuber à 37°C et 5 % CO₂. Le milieu de culture est renouvelé dans chaque puits tous les 2 à 3 jours.

3.3.2 Caractérisation de l'adhésion et de la croissance

L'adhésion et la croissance des cellules au cours du temps sont examinées après 24h d'adhésion, puis à 4 jours et 7 jours. Chaque condition est testée dans 4 puits différents, et répétée au moins 3 fois. Deux techniques de caractérisation ont été utilisées, soit une méthode colorimétrique (Alamar Blue) et une visualisation directe des cellules par coloration par violet de cristal, tel que décrit ci-dessous.

3.3.2.1 Alamar Blue

L'Alamar Blue est une méthode de coloration (resazurin Cell Viability Assay Kit, Burlington, ON) basée sur la fluorescence de la résazurine (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). Il s'agit d'un produit bleu, non fluorescent et non toxique, mais dont la forme réduite (résorufine), obtenue par métabolisation, est rose et émet de la lumière par fluorescence. Cette propriété est utilisée comme indicateur de l'activité métabolique des cellules, directement proportionnelle à la fluorescence (O'Brien et al. 2000).

La solution d'Alamar Blue utilisée est préparée à partir d'une solution de résazurine diluée dans du milieu complet (10 % v/v). Pour chaque *time-point* (24h, 4 jours, 7 jours), les échantillons sont rincés avec du PBS, puis immergés dans 500 µL de la solution d'Alamar Blue. Après 4h d'incubation (37°C, 5 % CO₂), la solution est transférée dans une plaque 96-puits pour la lecture de la fluorescence, et les échantillons sont à nouveau immergés dans le PBS. Ces manipulations

sont toutes effectuées dans le noir afin d'éviter de déclencher la fluorescence du produit. Enfin, la fluorescence, proportionnelle à l'activité cellulaire, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm, et 590 nm en émission.

3.3.2.2 Coloration des cellules et observation au microscope

Une fois le transfert des solutions d'Alamar Blue effectué, les cellules sont fixées et colorées par un colorant histologique, le cristal violet (méthyl violet 10B) ; elles peuvent alors être observées au microscope. Ces observations ont été réalisées principalement dans le but de confirmer la corrélation entre le nombre de cellules ayant adhéré à la surface, et l'activité métabolique mesurée par la méthode d'Alamar Blue.

3.3.3 Analyse statistique

Les résultats sont affichés sous la forme *moyenne \pm écart-type*. Une analyse statistique des résultats a été effectuée par le test ANOVA à un facteur contrôlé via le logiciel *Statgraphics* (Statgraphic centurion, Statpoint Technologies, Warrenton, VA), suivi d'une analyse Tukey dans le cas d'une comparaison multiple. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison de deux groupes seulement. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

Ce chapitre, qui rassemble les résultats obtenus au cours du projet de maîtrise, est divisé en deux parties, correspondant aux tests de caractérisation d'une part, et de biocompatibilité d'autre part. La première partie concerne donc la caractérisation des surfaces et des revêtements fabriqués et/ou utilisés pour ce projet : certaines caractéristiques physiques des revêtements L-PPE:O,N, ainsi que les propriétés chimiques de toutes les surfaces considérées, y sont détaillées. La seconde partie compare les résultats d'adhésion et de croissance cellulaires sur les différents types de surfaces, selon leur nature et leur composition chimique. Cette distinction permettra de porter un éclairage sur l'efficacité relative des différentes chimies de surface, précisé dans la section Discussion.

4.1 Caractérisation des surfaces

4.1.1 Étude des revêtements plasma L-PPE:O,N

Contrairement aux revêtements L-PPE:N et L-PPE:O qui sont utilisés depuis longtemps dans notre laboratoire et dont la plupart des propriétés sont maîtrisées, les dépôts L-PPE:O,N ont été peu étudiés pour l'instant. Bien que leur optimisation ne soit pas l'objet de cette étude, il est important de s'assurer que le revêtement L-PPE:O,N étudié soit déposé avec une épaisseur similaire aux autres revêtements plasma et qu'il ait une faible solubilité en milieu aqueux. Pour cela, trois dépôts L-PPE:O,N de composition différente ont été utilisés au cours de cette étude, en faisant varier le ratio R ($R = F_{N_2O}/F_{C_2H_4}$, respectivement égal à 0.3, 0.6 et 1) des flux de gaz en présence.

4.1.1.1 Épaisseur des dépôts

Le taux de déposition r (en nm/min) de chacun des revêtements L-PPE:O,N a été obtenu en mesurant, par ellipsométrie, l'épaisseur d'un dépôt de 8 minutes ; l'épaisseur des revêtements est supposée proportionnelle à leur durée. Les dépôts ont été réalisés sur des gaufres de silicium, dont les propriétés optiques (substrat opaque, d'indice optique bien connu) sont plus adaptées que des films de PET. Un unique échantillon ($n=1$) a été analysé par type de dépôt, pour des raisons

pratiques et de coût. Le L-PPE:N a également été analysé afin de valider le modèle numérique utilisé ; quant au L-PPE:O, les valeurs considérées sont celles obtenues par J.C. Ruiz sur le même système (Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015). Les valeurs d'épaisseur obtenues, ainsi que les taux de déposition correspondants, sont rassemblés dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Taux de déposition des revêtements plasma obtenus par ellipsométrie (n=1). Celui du L-PPE:O est tiré de (Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015).

Revêtement	R	Durée du dépôt (min)	Épaisseur (nm)	r (nm/min)
L-PPE:O	0,15	-	-	17
L-PPE:N	0,75	8	80	10
L-PPE:O,N	0,3	8	359	45
	0,6	8	295	37
	1	8	267	33

Les mesures par ellipsométrie montrent des épaisseurs de dépôt de l'ordre de 300 nm en 8 min pour le L-PPE:O,N, avec des valeurs plus faibles pour un R croissant. En effet, lorsque R augmente, la proportion d'éthylène diminue dans la chambre. Or, il s'agit du précurseur qui forme la base du revêtement polymérique en construction, ce qui explique que le dépôt se forme moins rapidement.

L'analyse du L-PPE:N donne une épaisseur de 80 nm pour un dépôt de 8 min, ce qui est dans la gamme d'épaisseur attendue (entre 80 et 100 nm) pour notre système plasma et tend à valider la méthode. Une grande précision n'est pas attendue de ce test, d'une part du fait de l'utilisation d'un modèle mathématique, et d'autre part car il s'agit seulement de créer des revêtements dont l'épaisseur est du même ordre de grandeur ; pour cette raison également, une seule mesure pour chaque dépôt a semblé suffisante ici. Le plus faible taux de déposition du L-PPE:N (resp. L-PPE:O) s'explique par le fait que l'ammoniac (resp. dioxygène) libère beaucoup d'hydrogène (resp. oxygène) atomique qui donne lieu à une compétition « gravure / dépôt » dans le plasma, phénomène qui ne se manifeste pas ou peu lorsque le deuxième réactif est N_2O .

Les revêtements L-PPE:O,N de 100 nm d'épaisseur environ, utilisés plus loin dans cette étude, seront donc réalisés par des dépôts de 3 min, dans les mêmes conditions que le L-PPE:N et le L-PPE:O ($P = 10$ W, $p = 600$ mTorr).

4.1.1.2 Solubilité des dépôts

Comme expliqué dans la section Méthodes, la solubilité des dépôts L-PPE:O,N est mesurée après immersion partielle dans de l'eau déionisée. La stabilité physique des revêtements est estimée en mesurant, par profilométrie, l'épaisseur des zones immergée (e_{AB}) et non immergée (e_{AC}). Pour chacun de ces dépôts, le pourcentage de perte d'épaisseur moyen, ainsi que l'écart-type sur les mesures, est illustré sur la Figure 4.1. Pour faciliter les mesures, des revêtements relativement épais ont été utilisés (dépôts de 30 min, soit plus de 1 μm d'épaisseur).

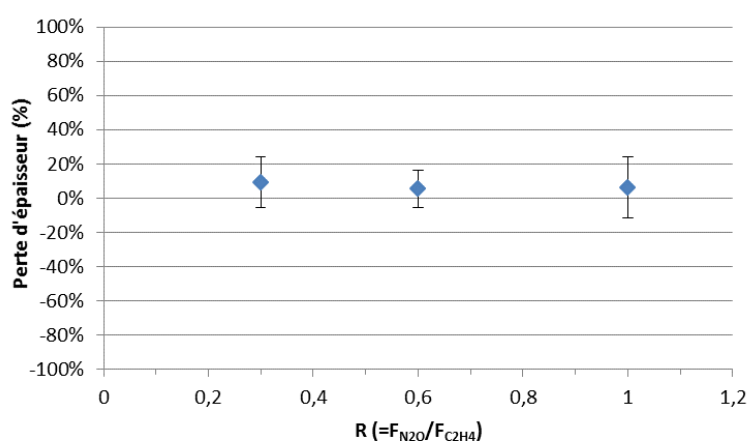


Figure 4.1 : Perte d'épaisseur de dépôts L-PPE:O,N après 24h d'immersion dans l'eau

Les valeurs de perte d'épaisseur rencontrées sont assez variables, avec parfois une valeur négative (donc un gain d'épaisseur) due au gonflement du revêtement, mais toutes proches de zéro. L'immersion dans l'eau de ces trois dépôts, réalisés avec des proportions de gaz différentes, a donc eu un effet limité.

Toutefois, on peut noter que pour les échantillons de L-PPE:O,N déposés avec $R = 1$, les profils obtenus après immersion étaient caractéristiques d'une surface très irrégulière, qui a rendu les mesures plus difficiles. On peut donc estimer que, malgré un résultat numérique moyen satisfaisant, ces dépôts ont souffert de l'immersion dans l'eau (la surface n'étant pas irrégulière sur les dépôts non immergés) et ne seront pas utilisables pour la culture cellulaire, qui implique une longue immersion en milieu aqueux. Les dépôts réalisés avec $R = 0,3$ et $R = 0,6$ semblent, eux, pouvoir être utilisés en milieu aqueux de manière prolongée.

La stabilité des autres polymères plasma a déjà été vérifiée, et il a été montré que le L-PPE:N déposé à $R = 0,75$ (Lerouge et al. 2015, sect. 3.1) et le L-PPE:O à $R = 0.15$ (Ruiz, Girard-Lauriault, et Wertheimer 2015, fig. 8) sont peu affectés par une immersion prolongée dans l'eau.

4.1.2 Composition chimique des surfaces

Les différentes surfaces utilisées au cours du projet ont été caractérisées chimiquement, notamment afin d'identifier et de quantifier les groupements chimiques fonctionnels d'intérêt pour la culture cellulaire.

4.1.2.1 Surfaces aminées

Dans le cas des surfaces azotées, on s'intéresse notamment à la quantité d'azote en présence à la surface, [N], et en particulier aux groupements amines primaires $[-NH_2]$. Les échantillons ont été caractérisés par XPS, et la méthode de dérivation chimique par TFBA a été utilisée pour quantifier les amines primaires. La méthode colorimétrique Orange II a également été considérée.

4.1.2.1.1 XPS

Les survols des surfaces aminées L-PPE:N, PETf et Parylène diX AM effectués par XPS sont illustrés sur la Figure 4.2, et leurs compositions chimiques relatives, déduites de ces spectres et de ceux obtenus après dérivation par le TFBA, sont détaillées dans le Tableau 4.2. Rappelons que, l'hydrogène n'étant pas détecté par XPS, ces valeurs sont relatives ; les données sont donc exprimées sous forme de ratio (pourcentage atomique). A titre d'information, les films de PET ($n=2$) ont montré une concentration $[C] = 72.4 \%$ et $[O] = 27.6 \%$ (Valeurs « théoriques » pour le PET : $[C] = 71,4 \%$ et $[O] = 28,6 \%$).

Tableau 4.2 : Composition chimique de diverses surfaces azotées obtenues par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal, n étant le nombre d'échantillons analysés.

	[C] (%)	[N] (%)	[O] (%)	$[NH_2]$ (%)	$[N]/[C]$ (%)	$[O]/[C]$ (%)	$[NH_2]/[C]$ (%)
Parylène (n=6)	93,5 \pm 0,4	5,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,4	5,9 \pm 0,6	5,7 \pm 0,1	1,2 \pm 0,4	6,3 \pm 0,7
L-PPE:N (n=14)	80,2 \pm 2,9	15,3 \pm 1,5	4,5 \pm 2,0	6,7 \pm 1,0	19,1 \pm 2,4	5,6 \pm 2,7	8,4 \pm 1,2
PETf (n=16)	63,1 \pm 1,0	11,6 \pm 1,6	25,2 \pm 0,9	3,1 \pm 1,1	18,4 \pm 2,7	40,0 \pm 1,1	5,1 \pm 1,6

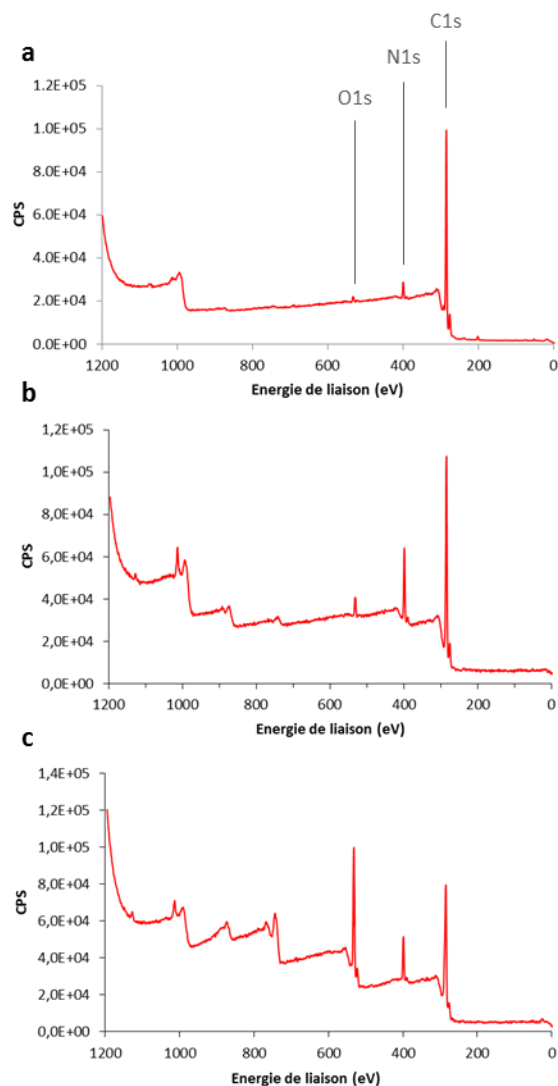


Figure 4.2 : Exemples de survol XPS des surfaces aminées Parylène diX AM (a), L-PPE:N (b) et PETf (c)

Les revêtements L-PPE:N affichent une haute concentration en amines primaires $[\text{NH}_2] = 6,7 \%$, avec $[\text{N}]/[\text{C}] \approx 19,1\%$ et $[\text{NH}_2]/[\text{C}] \approx 8,4\%$, ce qui correspond aux valeurs déjà publiées par l'équipe (Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010; St-Georges-Robillard et al. 2012).

Pour le Parylène diX AM, le rapport $[\text{N}]/[\text{C}]$ théorique est de $5,9 \%$ (St-Georges-Robillard et al. 2012), avec $[\text{NH}_2] = [\text{N}]$, tous les atomes d'azote présents dans le revêtement étant théoriquement impliqués dans des groupements amines primaires. Le rapport mesuré est de $5,7 \%$, soit très légèrement inférieur, ce qui s'explique par le vieillissement du film dès son exposition à l'air

libre. En effet, on détecte la présence d'oxygène sur les échantillons étudiés, à hauteur de 1,1 % environ. La dérivation donne une concentration d'amines primaires $[\text{NH}_2] = 5,9 \pm 0,6 \%$, soit $[\text{NH}_2]/[\text{C}] \approx 6,3 \%$, une valeur faiblement supérieure à celle attendue (en théorie $[\text{NH}_2]/[\text{C}] = 5,9 \%$) : il est donc possible que la méthode de dérivation par TFBA surestime légèrement la quantité d'amines primaires, comme l'ont récemment suggéré certains auteurs (Klages, Khosravi, et Hinze 2013), mais dans le cas du Parylène diX AM les molécules de TFBA n'ont pas pu réagir avec d'autres groupements azotés que les amines primaires. Il est donc plus probable que cet écart soit lié aux variations expérimentales (cf. écart-type). D'autre part, on peut souligner le fait que la dérivation chimique est systématiquement effectuée un jour plus tôt que l'analyse par XPS, donc à un stade de vieillissement moins avancé.

La concentration en amines primaires obtenue dans les mêmes conditions expérimentales pour les échantillons de PET fonctionnalisés par plasma d'ammoniac (PETf) est plus faible ($3,1 \pm 1,1$). Il est cependant important de se rappeler qu'il s'agit d'un traitement par plasma et non d'un revêtement, comme l'indique la haute teneur en atomes d'oxygène, présents dans les groupements téréphtalates du substrat PET. La technique d'analyse par XPS à angle résolu, décrite dans la section 3.2.2.1, a donc été utilisée afin d'analyser certains échantillons sur une épaisseur plus réduite. Le Tableau 4.3 montre la composition chimique en surface du PETf à différents angles d'analyse, i.e. sur des épaisseurs différentes. Ce procédé étant long (et par conséquent, plus dispendieux), seuls 4 échantillons ont été considérés pour cette étude, ce qui explique la différence des résultats obtenus en angle normal avec ceux exposés dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.3 : Composition chimique du PETf par XPS à différents angles d'analyse (n=4)

Angle d'analyse (°)	0	45	70	80
[C] (%)	$62,7 \pm 1,6$	$61,6 \pm 1,3$	$60,3 \pm 1,8$	$60,6 \pm 2,0$
[N] (%)	$11,9 \pm 1,2$	$14,3 \pm 1,4$	$17,1 \pm 1,9$	$16,8 \pm 1,6$
[O] (%)	$25,4 \pm 0,7$	$24,1 \pm 0,6$	$22,6 \pm 0,7$	$22,7 \pm 0,7$
$[\text{NH}_2]$ (%)	$4,2 \pm 0,8$	$5,1 \pm 1,0$	$7,5 \pm 1,4$	$8,9 \pm 1,2$

Lorsqu'on augmente l'angle d'analyse par rapport à la normale (i.e. qu'on réduit l'épaisseur analysée), les valeurs de [N] et [NH₂] augmentent, ce qui montre que la fonctionnalisation se fait de manière beaucoup plus intense à la surface immédiate du substrat, et que l'analyse par XPS effectuée perpendiculairement à l'échantillon est plus profonde que l'épaisseur sur laquelle le substrat est réellement transformé. Ainsi, bien qu'on ait mesuré une concentration en amines primaires faible sur une épaisseur de 10 nanomètres environ, elle est particulièrement élevée sur les premiers nanomètres, atteignant 7,5 % pour un angle de 70° (environ 2,6 nm) et 9 % pour 80° (environ 1,3 nm). Bien entendu, ces dernières valeurs (près de la surface) ont plus d'importance dans le contexte de la culture cellulaire puisque ce sont les premières couches atomiques qui déterminent les protéines adsorbées et donc l'attachement cellulaire.

Enfin, la composition chimique du PET revêtu de polyallylamine (PAAm) a été déterminée pour des échantillons traités avec différents pH de réaction. La variation du pourcentage d'amines primaires en fonction du pH lors de la réaction d'aminolyse, mesuré par la méthode TFBA, est illustrée sur la Figure 4.3.

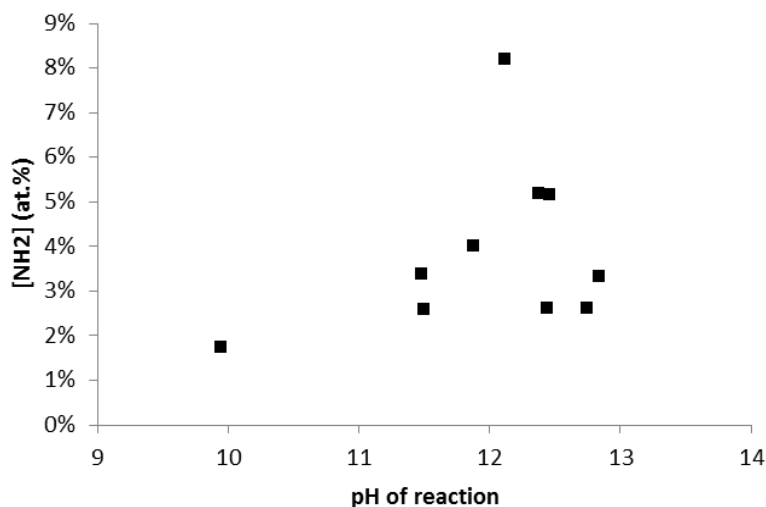


Figure 4.3 : Quantification d'amines primaires par la méthode TFBA sur des films de PET fonctionnalisés par PAAm à divers pH

Tel qu'attendu (Noel et al. 2013), pour un pH de réaction "peu élevé" la quantité d'amines primaires en surface est assez faible ; mais elle montre une forte croissance pour un pH plus basique, avec une concentration en NH_2 atteignant 8 %, et des concentrations plus faibles lorsque le pH se rapproche de 13. Ce dernier comportement est inattendu : en effet, Noël et al. (Noel et al. 2013) avaient observé une croissance continue de $[\text{NH}_2]$ avec le pH de réaction.

On remarquera que l'on obtient des variations importantes sur une gamme de pH très réduite, aussi la précision des résultats obtenus est limitée par la fiabilité du pH-mètre utilisé : la réitération de ces analyses après un calibrage différent du pH-mètre a fourni les mêmes résultats (pic de concentration en amines primaires), mais légèrement décalés sur l'axe des abscisses.

4.1.2.1.2 Orange II

On a cherché à confirmer les résultats obtenus par XPS, témoignant du degré de fonctionnalisation des différentes surfaces aminées, par la méthode Orange II. Celle-ci avait notamment été utilisée par Noel et al. pour mesurer la densité surfacique d'amines sur des échantillons traités par aminolyse (Noel et al. 2011).

Le Tableau 4.4 résume les concentrations surfaciques en molécules d'Orange II (en pmol/mm^2) liées aux groupements amines, mesurées pour des échantillons de L-PPE:N, PETf et Parylène diX AM.

Tableau 4.4 : Densités surfaciques de molécules d'Orange II adsorbées à la surface des revêtements aminés L-PPE:N, PETf et Parylène diX AM. Les valeurs de $[\text{NH}_2]$ mesurées par TFBA (analyse XPS en angle normal, cf. Tableau 4.2) ont été ajoutées pour comparaison.

Type de surface	[Orange II] (pmol/mm^2)	$[\text{NH}_2]$ (%)
L-PPE:N	$211,5 \pm 21,6$	$6,7 \pm 1,0$
PETf	$3,5 \pm 0,9$	$3,1 \pm 1,1$
Parylène diX AM	$30,5 \pm 6,4$	$5,9 \pm 0,6$

Les valeurs de densité surfacique mesurées sur ces surfaces aminées sont très différentes, avec des ordres de grandeur distincts, ce qui contraste fortement avec les résultats obtenus par XPS,

répétés dans le Tableau 4.4 pour faciliter la comparaison. Le L-PPE:N, notamment, affiche une très haute concentration surfacique en amines, tandis que le PETf montre une densité surfacique extrêmement faible.

La Figure 4.4 illustre la quantité de molécules d'orange II adsorbées à la surface d'échantillons traités par le PAAm, en fonction du pH de réaction. On observe globalement un plateau pour des pH inférieurs à 11,5, puis une croissance subite pour des pH plus élevés. Ces tendances ont été dessinées sur le graphique pour plus de clarté. Elles correspondent aux résultats obtenus par Noel et al. avec la même méthode de quantification, mais diffèrent de celles présentées plus haut, où la méthode TFBA montrait une décroissance rapide après un fort pic de concentration en amines primaires.

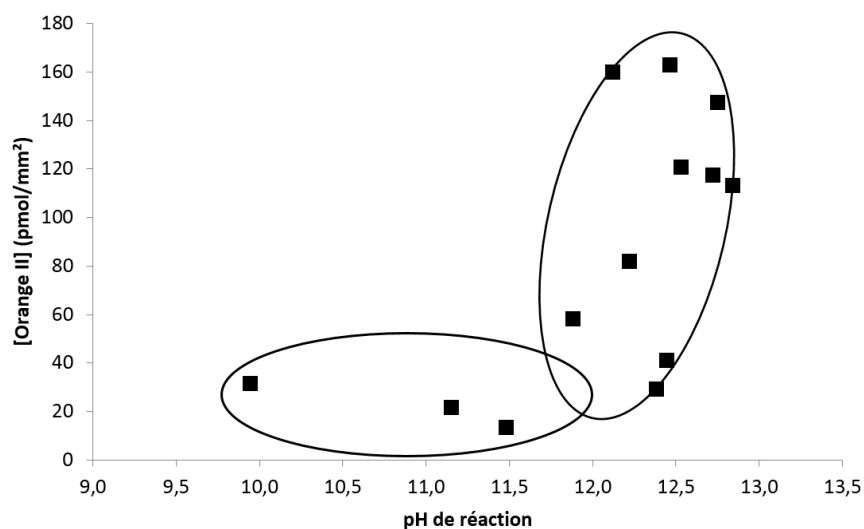


Figure 4.4 : Concentration surfacique de molécules d'orange II adsorbées à la surface de films de PET, traités par le PAAm à différents pH de réaction

4.1.2.1.3 Étude des effets de volume sur la caractérisation des surfaces aminées

Deux facteurs peuvent expliquer cette différence de résultats obtenus entre XPS et coloration Orange II. Le premier est la non spécificité, le second est un effet de volume.

La méthode de dérivation par TFBA permet de marquer spécifiquement les amines primaires par des atomes de fluor, détectés ensuite par XPS. Le procédé colorimétrique par Orange II, au cours duquel les molécules colorantes sont adsorbées sur les amines chargées positivement, puis

quantifiées par spectrophotométrie après désorption, n'est pas spécifique aux amines *primaires*, bien qu'elle puisse être utilisée comme telle dans certains cas (Noel et al. 2011). Toutefois, cette différence de spécificité ne peut expliquer les écarts considérables observés entre les résultats obtenus par chacune de ces techniques, qui les rendent difficiles à corréler : par exemple, l'analyse des échantillons de PETf, traités par plasma et possédant par conséquent une chimie de surface complexe et variée, montre une quantité très faible de groupements amines selon la méthode Orange II ($3,5 \text{ pmol/mm}^2$ contre plus de 200 pmol/mm^2 pour le L-PPE:N), tandis que la dérivation par TFBA indique une concentration importante de fonctions amines primaires (sans même compter les autres groupements amines), voire très élevée (jusqu'à 9 %) à sa surface immédiate.

L'autre facteur potentiel est un « effet de volume » dans la mesure des concentrations *surfiques* en amines, lié à la diffusion éventuelle de l'orange II. Pour mettre en évidence ce phénomène, nous avons appliqué la méthode Orange II à des dépôts L-PPE:N d'épaisseurs différentes. Le résultat est illustré sur la Figure 4.5.

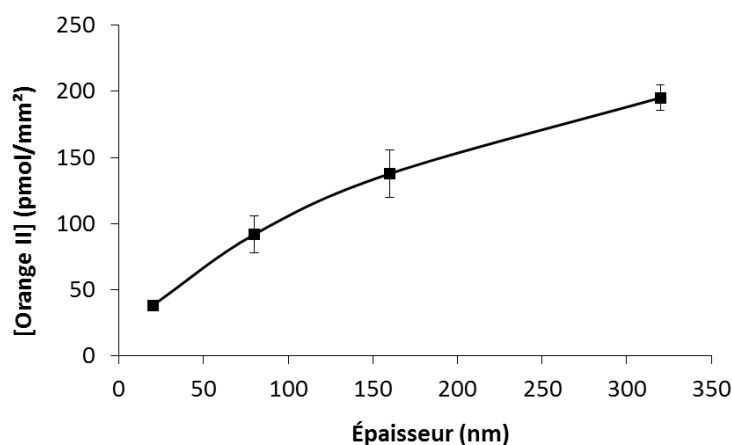


Figure 4.5 : Densité « surfacique » de molécules Orange II liées à des fonctions amines, pour des revêtements L-PPE:N d'épaisseurs variées, mais fabriqués sous conditions identiques.

On observe que, bien que la chimie du revêtement soit la même quelle que soit l'épaisseur des dépôts (vérifié par XPS, non montré ici), la méthode Orange II fournit des valeurs plus élevées lorsque l'épaisseur augmente.

Ainsi, contrairement aux mesures XPS qui se font sur de faibles épaisseurs en surface de l'échantillon, peu différentes d'un échantillon à l'autre pour un angle d'analyse fixe, la méthode

colorimétrique dépend largement de la diffusion des molécules d'Orange II dans le revêtement et/ou le substrat : par diffusion, les molécules peuvent infiltrer un revêtement et se lier à d'éventuels groupements amines à l'intérieur de celui-ci. Le terme de densité *surfactive* est donc trompeur, ou pour le moins ambigu.

Les revêtements L-PPE:N possèdent, du fait de leur procédé de fabrication, des groupements aminés dans toute l'épaisseur du dépôt, que les molécules d'Orange II peuvent atteindre par diffusion à travers le « volume libre » du dépôt macromoléculaire, bien que de façon plus réduite sur des grandes épaisseurs (il y a probablement un gradient de diffusion conformément à la loi de Fick). Cela explique la valeur extrêmement faible obtenue par Orange II sur les échantillons de PETf : bien qu'une quantité importante d'amines aient été créées par fonctionnalisation par plasma, ces groupements ne sont présents qu'à la surface immédiate des échantillons (voir Tableau 4.3). D'une part la diffusion de l'orange II dans le PET est moins probable étant donné la forte densité des chaînes et l'hydrophobicité du matériau, et d'autre part même s'il y a diffusion dans le substrat, les molécules d'Orange II n'ont eu aucune fonction amine avec laquelle réagir, ce qui n'est pas le cas des autres échantillons comme le L-PPE:N et le Parylène diX AM.

La méthode colorimétrique est donc biaisée par l'influence de l'épaisseur du revêtement fonctionnalisé, ainsi que par sa structure : un revêtement très dense, réticulé ou hydrophobe ne permettrait pas une diffusion aussi importante qu'une couche de faible densité ou hydrophile par exemple. Par conséquent, la méthode Orange II n'est pas adaptée à la comparaison d'échantillons d'épaisseurs ou de natures différentes.

Des disparités ont également été observées entre les résultats de l'orange II et la dérivation par TFBA lors de l'analyse d'échantillons de PET fonctionnalisés par le PAAm à différents pH de réaction (notons que dans le cas du PAAm, toutes les amines sont supposées primaires, donc les molécules d'Orange II réagissent spécifiquement à ces groupements). En effet, la méthode Orange II montre une croissance continue de $[NH_2]$ pour des pH supérieurs à 12 (cf. Figure 4.4), ce qui confirme les résultats obtenus par Noel et al. pour du PVAm greffé sur des fibres de PET et également analysé par Orange II (Noel et al. 2013) ; tandis que la méthode TFBA indique une croissance suivie d'une décroissance pour des pH plus élevés (cf. Figure 4.3). Pourtant, cette fois,

il s'agit d'échantillons semblables, pour lesquels une différence d'épaisseur ne paraît pas pouvoir expliquer les disparités rencontrées à pH élevé. Pour mieux comprendre ces différences, les échantillons ont été analysés par AFM, qui a révélé un changement dans la topographie de surface, en fonction du pH de réaction (Figure 4.6) : les échantillons obtenus à « faible » pH (inférieur à 12,5) présentent une surface lisse, de rugosité proche de 1 nm, mais celle-ci augmente pour des pH supérieurs, et les clichés (Figure 4.6D) montrent clairement un relief beaucoup plus marqué.

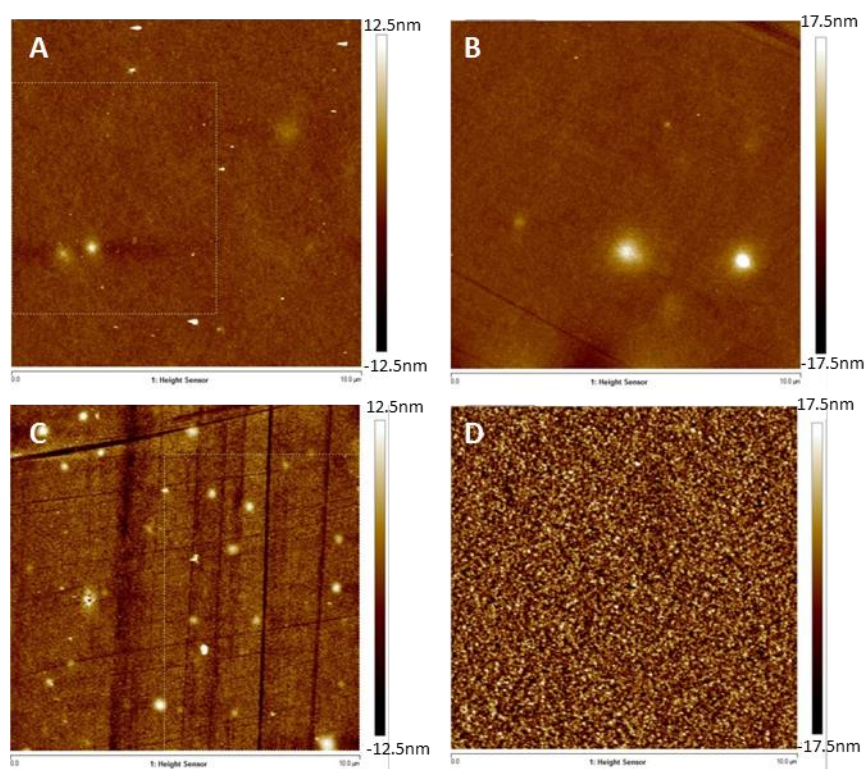


Figure 4.6 : Clichés AFM d'échantillons de PAAM obtenus à différents pH de réaction. A : pH = 11.5, $R_q = 1.3$ nm ; B : pH = 12.0, $R_q = 1.0$ nm ; C : pH = 12.6, $R_q = 2.2$ nm ; D : pH = 12.8, $R_q = 5.9$ nm

Cette différence de topographie, possiblement due à la réaction compétitive d'hydrolyse par les ions OH^- , pourrait expliquer les différences observées entre les deux méthodes de quantification d'amines primaires, bien que le mécanisme qui y mène soit peu certain : il est possible que cette réaction d'hydrolyse endommage le revêtement, d'où une décroissance du nombre de fonctions aminées détectées par la méthode TFBA, mais ces dommages faciliteraient la diffusion des molécules d'Orange II au sein de la couche de PAAM restante, d'où une croissance du nombre de groupements amines détectés par Orange II. Pour cette raison, seuls les échantillons de PAAM

obtenus à pH = 12,5 ont été considérés par la suite, car à ce pH de réaction les échantillons obtenus ont une assez haute concentration en amines primaires, mais la surface est encore peu endommagée.

4.1.2.2 Surfaces oxygénées

Deux types de surfaces oxygénées ont été utilisés au cours de ce projet : les revêtements L-PPE:O, polymérisés par plasma en présence de dioxygène ; et les surfaces commerciales de culture *Tissue Culture Polystyrene* (TCP, Falcon™), fournies par Corning, à base de polystyrène traité par plasma (Bryhan et al. 2003). La composition en éléments chimiques de ces surfaces, obtenue par analyse XPS en angle normal, est résumée dans le Tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Composition chimique des surfaces oxygénées obtenue par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal ($n \geq 4$)

Type de surface	[C] (%)	[O] (%)
L-PPE:O	65,5 \pm 1,0	34,5 \pm 1,0
TCP	83,8 \pm 0,8	16,2 \pm 0,8

Le L-PPE:O présente une concentration en oxygène, [O], beaucoup plus importante que le TCP, suggérant que la méthode de polymérisation par plasma permet d'incorporer davantage d'oxygène, et donc de créer davantage de groupements fonctionnels.

Comme pour le PETf, le TCP a également été analysé à différents angles de détection, donc sur des épaisseurs plus faibles. Le Tableau 4.6 montre que la composition en oxygène augmente lorsque l'épaisseur analysée est réduite (environ 16 % d'oxygène mesuré en angle normal ; 22 % sur les tout premiers nanomètres), ce qui indique que le TCP est davantage fonctionnalisé à sa surface immédiate, dû au procédé de fabrication utilisé, tout comme le PETf. Le L-PPE:O étant un revêtement homogène d'épaisseur supérieure à 10 nm, la profondeur d'analyse n'a pas d'effet sur les mesures, aussi la technique ARXPS n'a pas été effectuée pour ces revêtements.

Tableau 4.6 : Composition chimique du TCP par XPS à différents angles d'analyse ($n \geq 2$)

Angle d'analyse	[C] (%)	[O] (%)
0°	83,9 ± 0,8	16,2 ± 0,8
45°	82,8 ± 1,7	17,2 ± 1,7
70°	78,3 ± 0,8	21,8 ± 0,8
80°	78,2 ± 0,9	21,9 ± 0,9

D'autre part, l'analyse en haute résolution du pic correspondant à l'orbitale C1s a été effectuée pour ces deux types de surfaces, TCP et L-PPE:O (Figure 4.7), et leur déconvolution a permis d'avoir un aperçu des groupements chimiques en présence, résumés dans le Tableau 4.7.

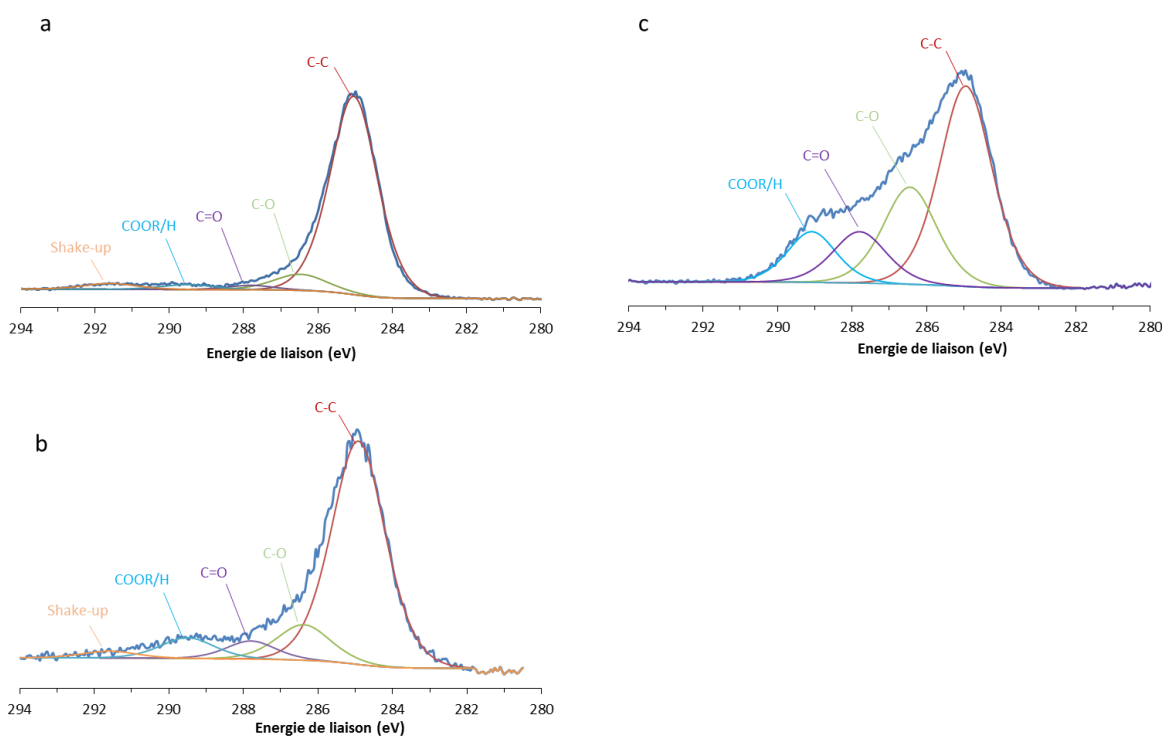


Figure 4.7 : Pics C1s du TCP analysé par XPS à angle normal (a) et rasant (b), et du L-PPE:O à angle normal (c)

Tableau 4.7 : Déconvolution du pic C1s pour les surfaces L-PPE:O et TCP (n=4)

		C-C/C-H (at.%)	C-O (at.%)	C=O (at.%)	COOR/H (at.%)	Shake-up (at.%)
L-PPE:O	Angle normal	50,5 ± 1,4	24,9 ± 0,9	12,7 ± 0,9	11,7 ± 1,0	-
TCP	Angle normal	85,3 ± 1,5	7,5 ± 1,2	2,1 ± 0,5	2,3 ± 0,3	2,9 ± 0,4
	Angle rasant	72,3 ± 1,9	13,3 ± 2,6	5,9 ± 1,0	6,3 ± 0,7	2,2 ± 0,5

La déconvolution du pic de carbone pour le L-PPE:O reflète la composition élémentaire du revêtement, avec de hautes concentrations en groupements oxygénés. On observe notamment une très forte présence de liaisons simples C-O (25%), mais également des concentrations importantes en groupements carbonyles (C=O), et carboxyles (COOH) ou ester (COOR). L'analyse des surfaces TCP reflète une fonctionnalisation moins importante que le L-PPE:O, mais accrue à sa surface immédiate, avec une répartition des groupements fonctionnels très proche de celle observée pour le L-PPE:O (concentrations assez importantes en groupements carbonyles, carboxyles et esters, mais présence majoritaire de liaisons simples C-O).

Une déconvolution des pics O1s a également été tentée (résultats non montrés) afin de vérifier et préciser ces résultats, mais elle s'est avérée peu concluante : les difficultés rencontrées pour effectuer la déconvolution, liées à la forme et la symétrie des pics O1s obtenus, ne permettent pas d'en faire une analyse fiable.

4.1.2.3 Surfaces hybrides

Les revêtements polymérisés par plasma L-PPE:O,N, ainsi que les surfaces commerciales de culture cellulaire Primaria™ (polystyrène traité par plasma), sont des surfaces dites « hybrides », dans le sens où elles sont fonctionnalisées à la fois par l'oxygène et l'azote. Comme les surfaces oxygénées, elles ont été analysées par XPS pour déterminer leur composition chimique et identifier leurs principaux groupements fonctionnels.

En premier lieu, les trois revêtements L-PPE:O,N, déposés avec des ratios de débits de gaz R différents (respectivement 0.3, 0.6, et 1), ont été analysés. Concernant le Primaria™, les surfaces examinées provenaient de deux types de produits différents : on distinguera le fond des puits de plaques de culture cellulaire 24-puits, et le fond de boîtes de Pétri ; ces produits répondant tous deux à l'appellation Primaria™. La composition atomique de ces surfaces est donnée dans le Tableau 4.8.

Tableau 4.8 : Composition chimique des surfaces hybrides obtenue par XPS (moyenne \pm écart-type) en angle normal ($n \geq 3$)

Échantillon		[C] (%)	[N] (%)	[O] (%)	[N]/[C] (%)	[O]/[C] (%)
L-PPE:ON	R=0,3	89,1 \pm 1,0	3,5 \pm 0,6	7,3 \pm 0,5	4,0 \pm 0,7	8,2 \pm 0,6
	R=0,6	82,9 \pm 0,7	5,6 \pm 0,5	11,4 \pm 0,6	6,8 \pm 0,7	13,7 \pm 0,8
	R=1	77,4 \pm 0,3	7,8 \pm 0,1	14,8 \pm 0,2	10,1 \pm 0,1	19,1 \pm 0,4
Primaria™	Pétri	83,1 \pm 1,9	4,9 \pm 0,4	11,8 \pm 1,6	5,9 \pm 0,6	14,3 \pm 2,3
	Plaquette 24-puits	75,6 \pm 0,9	9,1 \pm 0,4	15,3 \pm 1,2	12,1 \pm 0,5	20,2 \pm 0,8

De façon prévisible, la composition des revêtements L-PPE:O,N varie en fonction des ratios de gaz en présence lors de la polymérisation : les dépôts réalisés avec une proportion plus importante de protoxyde d'azote possèdent davantage d'atomes d'azote et d'oxygène. En particulier, les revêtements déposés avec $R = 1$ atteignent $[N] = 7,8 \%$ et $[O] = 14,8 \%$, tandis que pour $R = 0,3$, ces concentrations sont réduites de moitié ($[N] = 3,5 \%$ et $[O] = 7,3 \%$). Une haute fonctionnalisation est importante pour permettre l'adhésion de cellules sur une surface (a priori une concentration élevée de groupements fonctionnels fournit davantage de points d'ancrage aux protéines d'adhésion, mais aucune donnée quantitative n'existe à ce sujet, pour ce type de surfaces) ; toutefois, on a vu précédemment (section 4.1.1.2) que pour $R = 1$ les dépôts L-PPE:O,N s'abîment lors d'une immersion prolongée dans l'eau. Ainsi, pour la suite du projet, nous considérerons les revêtements déposés avec un ratio $R = 0,6$, qui constitue un bon compromis entre une présence importante d'azote et d'oxygène ($[N] = 5,6 \%$ et $[O] = 11,4 \%$), et une faible solubilité.

Étonnamment, les surfaces Primaria™ n'affichent pas la même composition selon le produit analysé : pour les boîtes de pétri, la concentration d'azote est proche de 5 %, tandis qu'elle est de 9 % environ dans les plaques multi-puits ; un écart similaire est observé pour les concentrations en oxygène. De telles différences sont inattendues pour des produits qui portent la même appellation. Elles font toutefois écho aux résultats trouvés dans la littérature, où la concentration en azote mesurée varie de 4.5 % (Fricke et al. 2012) à 13.2 % (Ertel, Ratner, et Horbett 1990). Pour des raisons pratiques et de clarté, seules les plaques 24-puits sont considérées dans la suite de ce mémoire.

Comme le TCP, le Primaria™ est issu du traitement de surface par plasma d'un substrat en polystyrène ; l'analyse de ces surfaces par XPS à angle résolu a été réalisée, et les résultats en sont exposés dans le Tableau 4.9.

Tableau 4.9 : Composition chimique du Primaria™ par XPS à différents angles d'analyse (n=6)

Angle d'analyse	0°	45°	70°	80°
[C] (%)	75,6 ± 0,9	71,7 ± 2,4	67,1 ± 0,8	67,7 ± 0,6
[N] (%)	9,1 ± 0,4	11,7 ± 1,1	14,4 ± 0,0	14,6 ± 1,4
[O] (%)	15,3 ± 1,2	16,6 ± 1,2	18,5 ± 0,8	17,7 ± 0,8

Pour des angles de détection plus rasants, on mesure une concentration plus importante en azote et en oxygène (bien que la différence soit plus ténue pour ce dernier), ce qui illustre encore une fois une fonctionnalisation accrue à la surface immédiate des échantillons. On peut également remarquer, comme pour le TCP, que les concentrations mesurées à des angles de 70° (i.e. sur une profondeur de 3 nm environ) et 80° (autour de 1,5 nm) sont très proches, suggérant une composition homogène sur les 3 premiers nanomètres.

Une analyse XPS à haute résolution des pics C1s des surfaces considérées a également été réalisée (Figure 4.8). Le Tableau 4.10 rassemble les résultats des déconvolutions de ces pics, qui permettent d'estimer la répartition des groupements chimiques à la surface des échantillons.

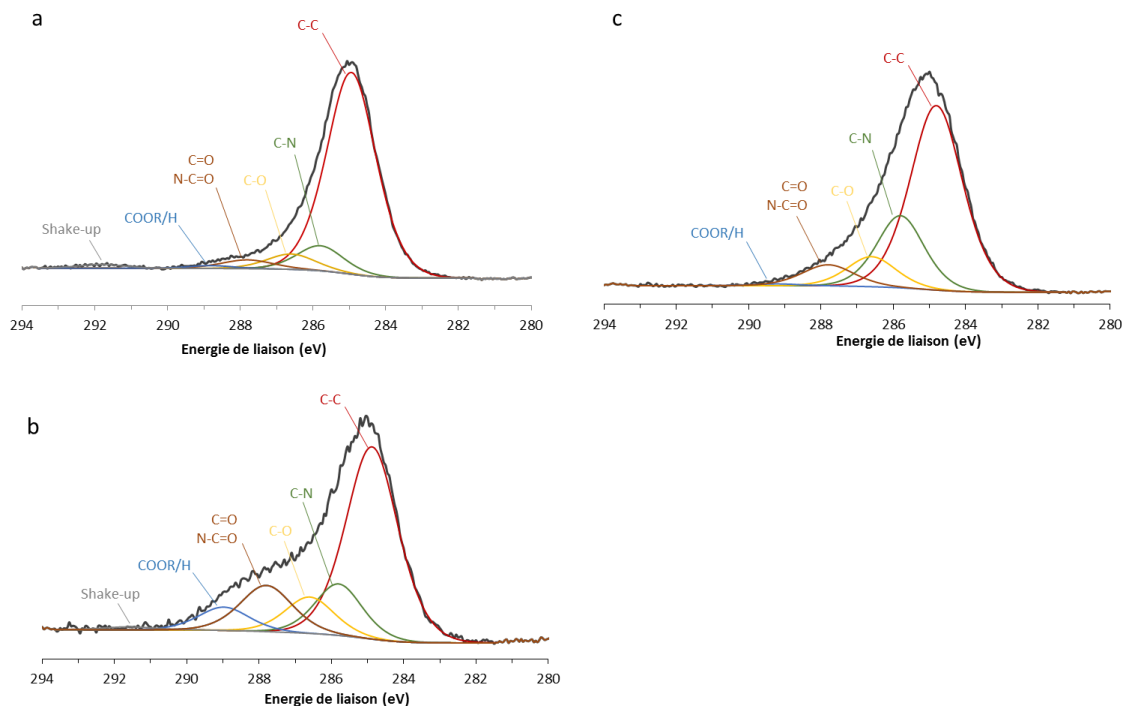


Figure 4.8 : Pics C1s du Primaria analysé par XPS à angle normal (a) et rasant (b), et du L-PPE:O,N à angle normal (c)

Tableau 4.10 : Déconvolution du pic C1s pour les surfaces L-PPE:O,N et Primaria ($n \geq 4$)

	Angle d'analyse	C-C/C-H (at.%)	C-N (at.%)	C-O (at.%)	N-C=O/ C=O (at%)	COOR/H (at.%)	Shake-up (at.%)
L-PPE:O,N	Normal	$62,3 \pm 3,5$	$21,3 \pm 2,2$	$8,9 \pm 1,2$	$6,4 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,5$	-
Primaria™	Normal	$72,8 \pm 2,5$	$8,1 \pm 1,4$	$6,4 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,2$
	Rasant	$52,3 \pm 2,1$	$17,4 \pm 2,2$	$9,2 \pm 0,4$	$12,9 \pm 1,5$	$7,4 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,1$

La déconvolution du pic C1s du L-PPE:O,N montre une présence importante de liaisons simples C-N ; mais ce résultat est à considérer avec précaution du fait de la proximité en énergie des liaisons C-N et C-O. En revanche, il apparaît très clairement que les groupements carboxyles et ester sont presque absents (1 %) dans ces revêtements : il semble que les liaisons doubles C=O soient impliquées uniquement dans des fonctions carbonyles ou amides.

L'analyse en haute résolution du Primaria™ montre une fonctionnalisation plus variée, notamment à sa surface immédiate (angle de détection rasant), avec une présence plus importante

de fonctions carboxyles ou ester (près de 7.5 %), ainsi que de groupements carbonyles ou amides (13 %). La fonctionnalisation accrue plus près de la surface est également illustrée par une baisse des concentrations en liaisons C-C lors de l'analyse en angle rasant, ainsi qu'un shake-up (caractéristique des cycles aromatiques, en l'occurrence propres au polystyrène) très réduit.

Enfin, la dérivation de ces surfaces par le TFBA a montré une concentration en amines primaires plutôt faible pour le L-PPE:O,N ($1,6 \pm 0,2$ %), et plus encore pour le Primaria™ (< 1 %, par analyse en angle normal *et* en angle rasant) malgré une présence importante de ces groupements selon le fabricant (cf. Figure 2.3).

4.1.3 Greffage du sulfate de chondroïtine

Les surfaces aminées, décrites plus haut dans ce mémoire, ont pu être utilisées comme support pour le sulfate de chondroïtine (CS). Les revêtements bioactifs ainsi obtenus ont été étudiés du point de vue du comportement cellulaire, dont les résultats sont détaillés plus loin (section 4.2.4). Au cours de ces expériences, la capacité des surfaces aminées à greffer ces molécules bioactives a été étudiée par des analyses XPS d'une part, et par coloration par la toluidine bleue O (TBO) d'autre part.

4.1.3.1 XPS

Le Tableau 4.11 donne le pourcentage des différents éléments présents à la surface d'un échantillon de L-PPE:N sur lequel des molécules de CS ont été greffées, puis analysé par un survol XPS (illustré par la Figure 4.9).

Tableau 4.11 : Composition des revêtements L-PPE:N, avant et après greffage de CS ($n \geq 2$)

	[C] (%)	[N] (%)	[O] (%)	[S] (%)	Autres (%)
L-PPE:N	$80,2 \pm 2,9$	$15,3 \pm 1,5$	$4,5 \pm 2,0$	-	-
L-PPE:N + CS	$67,1 \pm 1,3$	$12,4 \pm 0,8$	$18,3 \pm 1,4$	$0,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,6$

On constate la présence d'atomes de sodium (pic Na1s, 1070 eV), de phosphore (pic P2p, 132,8 eV) et de soufre (pic S2p, 167,7 eV) : les deux premiers sont sans doute des traces de la solution de rinçage (tampon phosphate salin), tandis que le soufre correspond aux groupements -SO_3^- du CS, et pourrait être utilisé pour quantifier les molécules greffées à la surface. Toutefois, les concentrations en soufre mesurées sont très faibles (autour de 0,5 %), et la résolution du XPS ne permet pas de quantifier avec précision des atomes en aussi faible concentration. Cette technique permet donc seulement de déterminer, de manière qualitative, la présence – ou l'absence – de CS à la surface des échantillons.

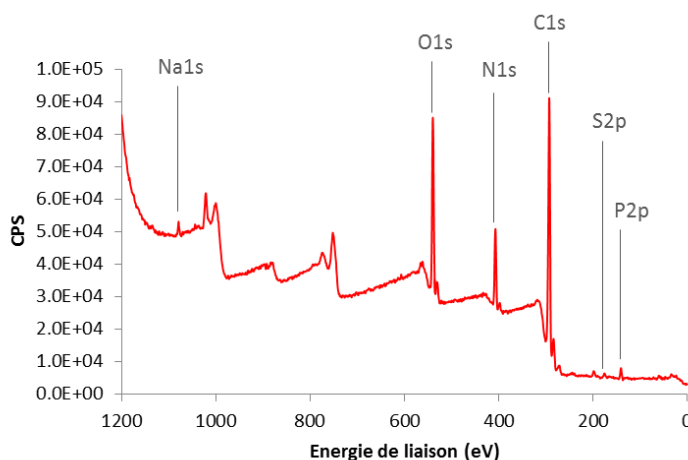


Figure 4.9 : Survol XPS d'un échantillon de L-PPE:N après greffage de CS

4.1.3.2 TBO

Comme les molécules de TBO tendent à réagir avec des groupements chargés négativement, elles peuvent être utilisées pour quantifier les groupements fonctionnels des molécules de CS, et ainsi estimer l'efficacité du greffage sur différentes surfaces aminées. Pour chacune d'elles, la quantité de molécules de TBO ayant réagi (en pmol/mm²) a été calculée et est indiquée sur la Figure 4.10. Les quantités mesurées sur les surfaces en l'absence de CS, utilisées comme contrôle afin de s'assurer que les molécules de TBO ne réagissent pas avec le substrat ou le revêtement azoté, sont négligeables.

La Figure 4.10 montre une quantité de TBO comprise entre 15 et 100 pmol/mm² selon les différents échantillons testés, le Parylène étant la surface qui a le moins adsorbé de TBO, tandis que les surfaces de polyallylamine présentent les valeurs les plus élevées.

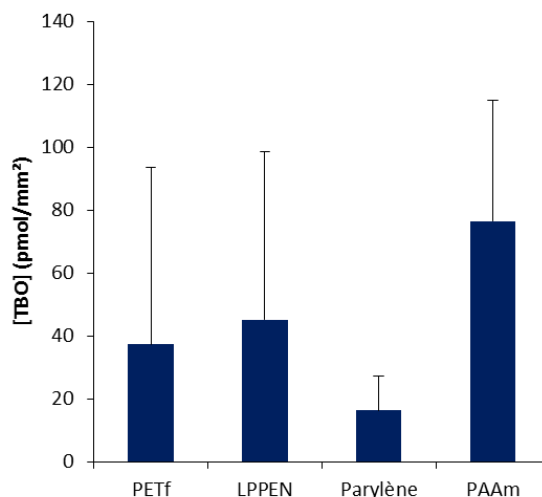


Figure 4.10 : Concentration surfacique de TBO sur des surfaces aminées après greffage de CS (n > 30)

Toutefois, les résultats obtenus sur ces différentes surfaces montrent une variabilité extrêmement forte. Les concentrations rencontrées au cours des expériences se sont révélées être très peu consistantes, ce qui remet en question cette méthode colorimétrique de quantification, ou la répétabilité du greffage de CS.

Seul le Parylène diX AM a montré une variabilité moins importante, avec des valeurs de concentration de TBO systématiquement inférieures aux autres surfaces, semblant indiquer un greffage peu efficace du CS malgré une importante concentration en amines primaires.

4.2 Adhésion et croissance des HUVEC sur les surfaces

Des cellules HUVEC ont été cultivées sur différentes surfaces, aminées, oxygénées ou hybrides, industrielles ou préparées en laboratoire. Leur capacité à adhérer sur ces surfaces, et à s'y multiplier, a été comparée afin de déterminer, d'une part, si ces surfaces constituent bien un progrès significatif par rapport au polytéréphtalate d'éthylène, et d'autre part, si certaines d'entre elles se montrent particulièrement favorables à l'adhésion et la croissance cellulaires.

4.2.1 Surfaces aminées

La Figure 4.11 montre l'activité métabolique, obtenue par fluorescence, des cellules HUVEC après 24h, 4 jours et 7 jours de culture sur les surfaces aminées Parylène diX AM, L-PPE:N, PETf et PAAm ($\text{pH}_{\text{réaction}} = 12,5$).

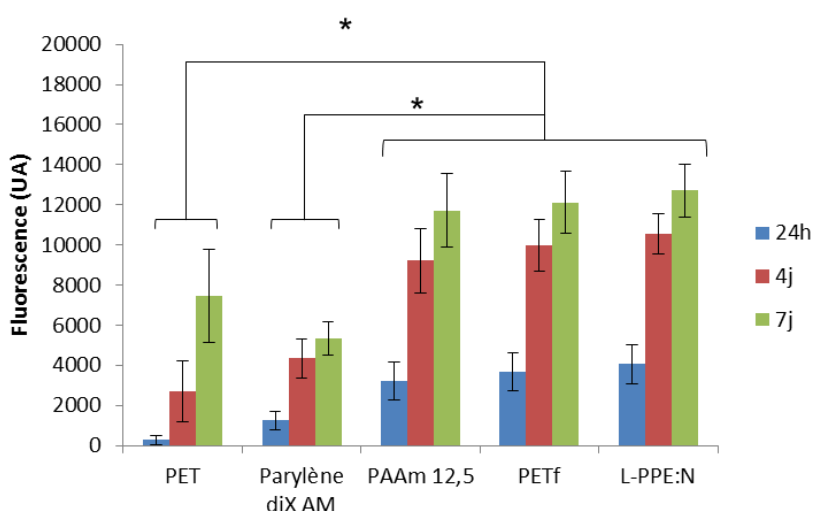


Figure 4.11 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces aminées après 24h, 4j et 7j de culture ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, on ne trouve pas de différence significative ($p > 0.05$) entre le PAAm, le PETf et le L-PPE:N, mais ceux-ci sont statistiquement différents du PET et du Parylène diX AM (* $p < 0.05$).

Le graphe montre une très bonne adhésion cellulaire, ainsi qu'une bonne croissance, sur les surfaces L-PPE:N, PETf et PAAm, ce qui a été confirmé par l'observation des cellules colorées par cristal violet au microscope (Figure 4.12). La prolifération des cellules entre le 4e et le 7e jour semble limitée : en réalité cela est dû au fait que les cellules atteignent la confluence sur ces surfaces, et n'ont plus la place de se multiplier. Les valeurs mesurées à 7 jours sont donc biaisées

et ne peuvent pas être prises en compte pour ces types de surfaces. Par ailleurs, aussi bien à 24h qu'à 4 jours, les valeurs de fluorescence sur ces trois types de surfaces sont très proches, indiquant une capacité similaire à permettre l'adhésion et la croissance cellulaires en dépit de leur nature et leur composition chimique différentes.

Ces surfaces constituent toutes une nette amélioration par rapport au PET non traité, qui montre une adhésion cellulaire extrêmement faible sur les 24 premières heures, et une activité encore faible après 4 jours.

En revanche, sur le Parylène diX AM, les cellules n'ont pas aussi bien adhéré, malgré une forte concentration en amines primaires, et ont peu proliféré à la surface. On observe notamment une activité cellulaire peu changée entre 4 jours et 7 jours de culture, bien que la confluence n'ait pas été atteinte, et une répartition inhomogène des cellules.

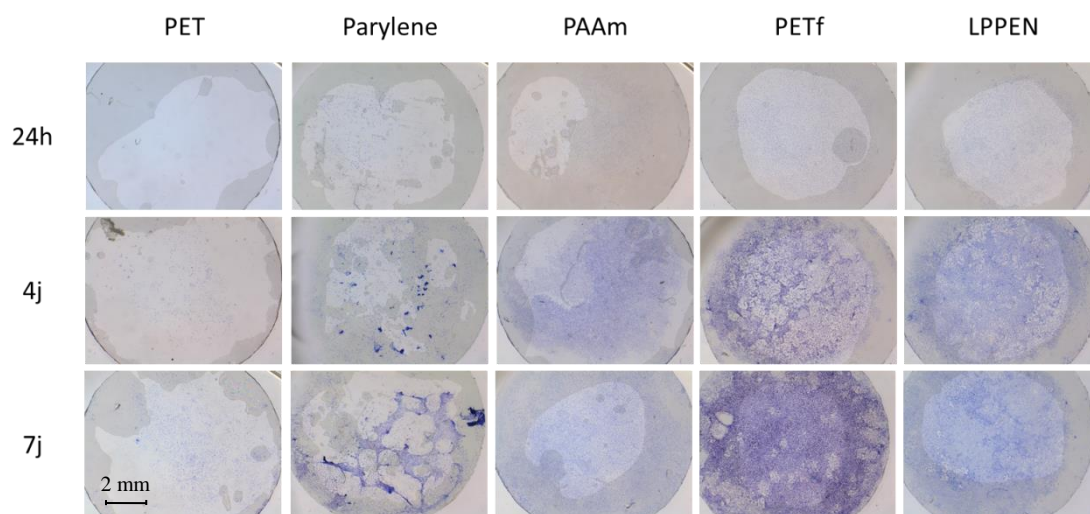


Figure 4.12 : Adhésion et croissance des HUVECs sur des surfaces aminées, observées au microscope optique après coloration au cristal violet. Les taches pâles en arrière-plan sont dues au séchage inhomogène du substrat après rinçage

4.2.2 Surfaces oxygénées

Sur la Figure 4.13, les résultats de la culture cellulaire sur les surfaces oxygénées L-PPE:O et TCP sont comparés au PET et au revêtement L-PPE:N.

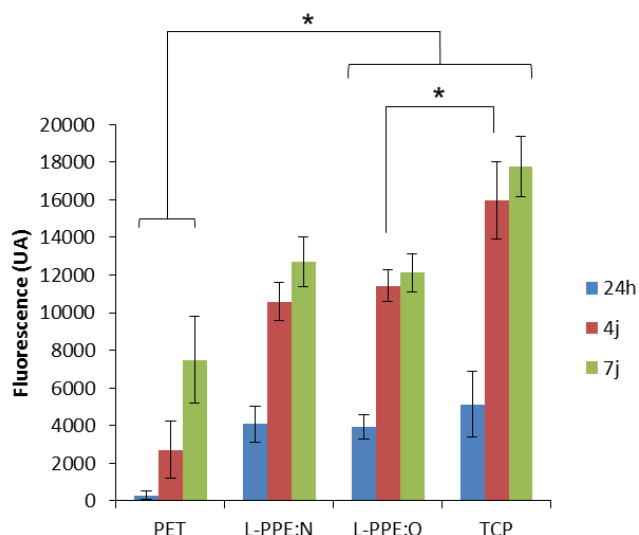


Figure 4.13 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces oxygénées (TCP, L-PPE:O) après 24h, 4j et 7j de culture, comparée au PET et au L-PPE:N ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, les résultats sur PET sont statistiquement inférieurs (* $p < 0.05$) aux autres surfaces. Une différence significative (* $p < 0.05$) entre le TCP et les revêtements L-PPE:O et L-PPE:N a été trouvée après 4 et 7 jours de culture, mais pas à 24h. Aucune différence significative n'a été trouvée entre le L-PPE:N et le L-PPE:O.

Sur le L-PPE:O, la fluorescence à 24h montre que les cellules ont aussi bien adhéré que sur le L-PPE:N (aucune différence statistiquement significative), malgré leur composition chimique radicalement différente. De plus, l'activité cellulaire sur ces deux revêtements plasma après 4 jours de culture est très proche, ce qui suggère une efficacité similaire de ces deux types de fonctionnalisation pour la culture cellulaire HUVEC, et bien meilleure que le PET.

L'adhésion cellulaire semble être encore meilleure sur les surfaces commerciales TCP, bien qu'il n'y ait pas de différence statistiquement significative entre le TCP et le L-PPE:O à 24h d'incubation. En revanche, la croissance semble largement supérieure pour le TCP, comparé aux autres surfaces. Cependant, cet écart est peu fiable car il a pu être créé, ou au moins amplifié, par un défaut dans le procédé de culture cellulaire : comme il a été mentionné précédemment

(section 3.3.1), les surfaces créées en laboratoire sont découpées en disques de 1 cm de diamètre et déposées au fond des puits de culture cellulaire (plaques 48-puits) ; or, pour le TCP qui constitue déjà le fond du puits de culture, les cellules sont cultivées directement dans le puits de manière classique. Les puits étant légèrement plus grands que les disques, les cellules exposées au TCP ont davantage d'espace pour se multiplier, ce qui peut biaiser les mesures de fluorescence à 4 jours et 7 jours (on assume qu'à 24h, les cellules ne sont pas influencées par le manque d'espace). Ainsi, on ne peut pas affirmer qu'il y a une différence d'efficacité flagrante entre le L-PPE:O et le TCP, même si ce dernier semble être le meilleur support pour la prolifération cellulaire.

4.2.3 Surfaces hybrides

L'adhésion et la croissance cellulaires sur la surface hybride L-PPE:O,N sont comparées aux résultats obtenus sur les autres revêtements plasma sur la Figure 4.14.

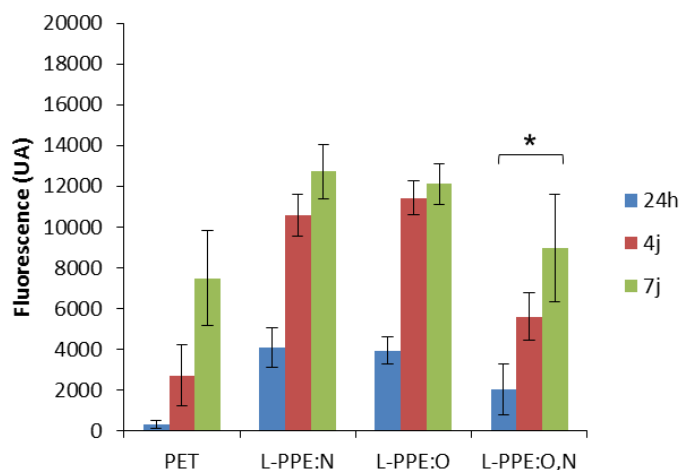


Figure 4.14 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur le dépôt L-PPE:O,N après 24h, 4j et 7j de culture, comparée au PET et aux revêtements L-PPE:N et L-PPE:O ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, les résultats sur le L-PPE:O,N sont statistiquement inférieurs (* $p < 0.05$) à ceux obtenus sur L-PPE:N et L-PPE:O, mais statistiquement supérieurs (* $p < 0.05$) au PET.

On observe tout d'abord des écart-types assez élevés pour le L-PPE:O,N, caractéristiques d'une mauvaise répétabilité des mesures malgré une composition chimique plutôt consistante (cf. écart-

types dans le Tableau 4.8). L'analyse par fluorescence montre que cette surface hybride a de meilleures propriétés relatives à la culture cellulaire que les films de PET, notamment à 24h et à 4 jours, mais qui restent inférieures aux autres revêtements plasma. En particulier, après 4 jours de culture l'activité cellulaire est moitié moindre sur le L-PPE:O,N comparé au L-PPE:N et L-PPE:O.

Les surfaces commerciales Primaria™ n'étant pas disponibles en plaques 48-puits, les cultures ont été effectuées dans des plaques 24-puits où les cellules disposent de plus de place pour proliférer, aussi la comparaison n'est pas possible avec les surfaces analysées jusqu'ici. On ne peut donc les comparer qu'avec des plaques TCP, existant également au format 24-puits (Figure 4.15).

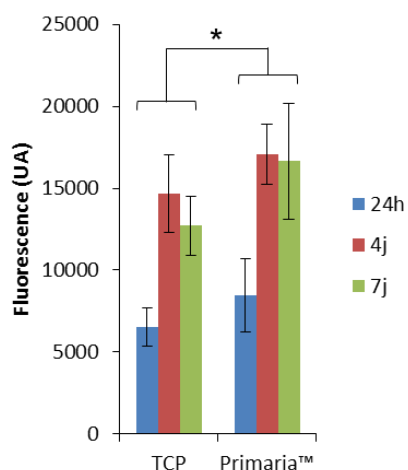


Figure 4.15 : Activité métabolique des cellules HUVEC dans des plaques 24-puits de type TCP et Primaria™ après 24h, 4j et 7j de culture ($n \geq 8$). En comparant les temps correspondants, les résultats sur le Primaria™ sont significativement supérieurs à ceux obtenus sur le TCP (* $p < 0.05$).

On peut voir sur la Figure 4.15 que les cellules semblent adhérer et croître rapidement sur les deux types de surfaces commerciales, mais on observe une diminution de la fluorescence à 7 jours ; celle-ci peut s'expliquer par une confluence atteinte rapidement, provoquant par la suite un décollement des cellules, ou peut-être une consommation trop rapide du milieu nutritif. Là encore, il paraît donc nécessaire de ne pas considérer les résultats à 7 jours comme pertinents.

Les valeurs de fluorescence à 24h et 4 jours confirment que le Primaria™ est un excellent support pour la culture cellulaire : l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales

semblent y être encore plus favorisées que sur le TCP. Ceci confirmerait les résultats publiés par Steele par exemple (Steele et al. 1995).

4.2.4 Effets du sulfate de chondroïtine

Enfin, des cellules HUVEC ont été cultivées sur des surfaces aminées sur lesquelles du sulfate de chondroïtine (CS) a été greffé chimiquement. Là encore, l'activité métabolique des cellules a été mesurée après 24h, 4j et 7j de culture (Figure 4.16).

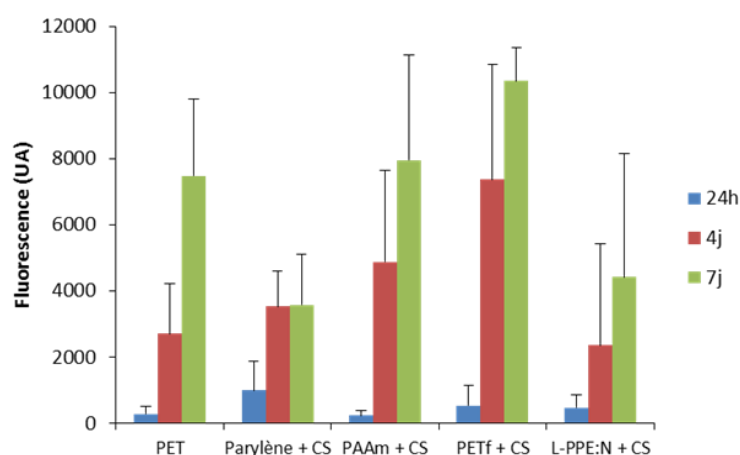


Figure 4.16 : Activité métabolique des cellules HUVEC sur des surfaces aminées après greffage de CS, au bout de 24h, 4j et 7j de culture ($n \geq 8$).

Les résultats se sont révélés très variables, avec des écart-types souvent supérieurs aux moyennes, notamment à 24h et 4j. Cette information, ajoutée à la variabilité obtenue lors de la tentative de quantification du CS par TBO (section 4.1.3.2), semble indiquer que le greffage de CS n'est pas reproductible, ce qui affecte les résultats. Ainsi, peu de différences significatives ont pu être mises en évidence entre les différentes surfaces.

On peut toutefois noter que l'adhésion des cellules à 24h sur les surfaces greffées par le CS est très inférieure à celle obtenue sur les surfaces aminées sans CS : sur le PETf par exemple, l'adhésion cellulaire à 24h est presque 13 fois supérieure au PET non traité, tandis qu'après greffage de CS ce facteur est inférieur à 2. Cette faible adhésion est compensée par une forte

croissance observée après 4 jours et 7 jours de culture, notamment sur les échantillons de PAAM et PETf.

Enfin, le Parylène diX AM montre une adhésion un peu meilleure que les autres surfaces, ce qui correspond à un greffage de CS moins efficace, relevé par TBO (section 4.1.3.2). En revanche, la prolifération des cellules y est limitée, comme sur le Parylène diX AM seul.

CHAPITRE 5 DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS

Différentes surfaces organiques fonctionnalisées ont été considérées au cours de ce projet. Leurs compositions chimiques respectives, ainsi que leur capacité à favoriser la prolifération cellulaire de HUVEC, ont été analysées et comparées. Ce chapitre établit un bilan des analyses effectuées et des résultats obtenus : des considérations sur la profondeur d'analyse des surfaces sont discutées ; la chimie de surface des différents revêtements considérés est résumée et mise en relation avec le comportement cellulaire observé, avec une attention particulière portée sur les surfaces hybrides de type Primaria™ ; on commentera également le greffage de sulfate de chondroïtine. Enfin, les limitations de ce projet et des méthodes employées seront présentées.

5.1 Synthèse et discussion des principaux résultats

5.1.1 Méthodes de caractérisation et profondeur d'analyse

Ce mémoire a mis en lumière l'ambiguïté liée à l'utilisation du terme *densité surfacique*, illustrée par la méthode colorimétrique Orange II appliquée à des revêtements d'épaisseurs différentes (voir section 4.1.2.1.3). Comme les protéines d'adhésion interagissent avec la surface d'un substrat, il est pertinent de vouloir quantifier les groupements chimiques par unité de surface ; toutefois, la quantification se fait nécessairement sur une certaine profondeur à la surface du revêtement. Les mesures par XPS à angle normal, par exemple, donnent la composition des 10 premiers nanomètres de la surface de l'échantillon environ, tandis qu'en angle rasant seuls les tous premiers nanomètres sont considérés (voir Annexe). Les échantillons de PETf n'affichent pas la même composition selon l'angle utilisé : en angle rasant, la concentration en amines primaires mesurée est plus élevée que celle du L-PPE:N par exemple, mais elle est plus basse si l'on considère les mesures en angle normal, car seule la surface immédiate du PETf est hautement fonctionnalisée, contrairement au L-PPE:N. Alors, quelle mesure doit être prise en compte ? Est-ce celle qui ne considère que les atomes les plus proches possibles de la surface ? Sur quelle épaisseur se mesure la « vraie » densité surfacique ? Tout dépend, bien sûr, de l'application des échantillons considérés : en l'occurrence, l'épaisseur pertinente est celle dont les

propriétés ont une influence sur l'adhésion cellulaire, i.e. l'épaisseur sur laquelle les protéines d'adhésion peuvent créer un lien entre le matériau et les cellules. En effet, on rappelle que l'adhésion des cellules s'effectue indirectement, via une couche de protéines adsorbées à la surface du matériau (notamment les fibronectines et vitronectines a priori, dont le rôle central dans l'adhésion des cellules endothéliales a déjà été démontré (Dekker et al. 1991; J. G. Steele et al. 1995)). Les échantillons de PETf ont montré une excellente affinité avec les cellules, malgré l'absence de groupements fonctionnels en-dessous des tous premiers nanomètres de profondeur, ce qui confirme que la présence de groupements fonctionnels à une profondeur supérieure à quelques nanomètres n'a que peu – ou pas – d'influence sur le comportement cellulaire. La composition chimique « pertinente » ne concerne donc que les premiers nanomètres à la surface des échantillons.

La méthode de quantification par AR-XPS, en angle rasant, semble donc la plus adéquate pour déterminer la composition chimique de la surface telle qu'elle est « perçue » par les cellules via l'adsorption des protéines, notamment dans le cas d'échantillons fonctionnalisés uniquement à la surface immédiate (PETf, TCP, Primaria™). L'analyse par XPS en angle normal est, elle, suffisante pour les dépôts d'épaisseur plus importante, comme le L-PPE:N ou le Parylène diX AM, dont la chimie est supposée homogène dans tout le revêtement. En revanche, il est clair que la méthode colorimétrique Orange II n'est pas appropriée pour caractériser ou comparer la surface immédiate des échantillons, car les amines quantifiées ainsi sont celles qui sont accessibles aux molécules d'orange II par diffusion dans l'éventuel volume libre du revêtement, et non seulement celles qui sont en surface, accessibles aux protéines d'adhésion.

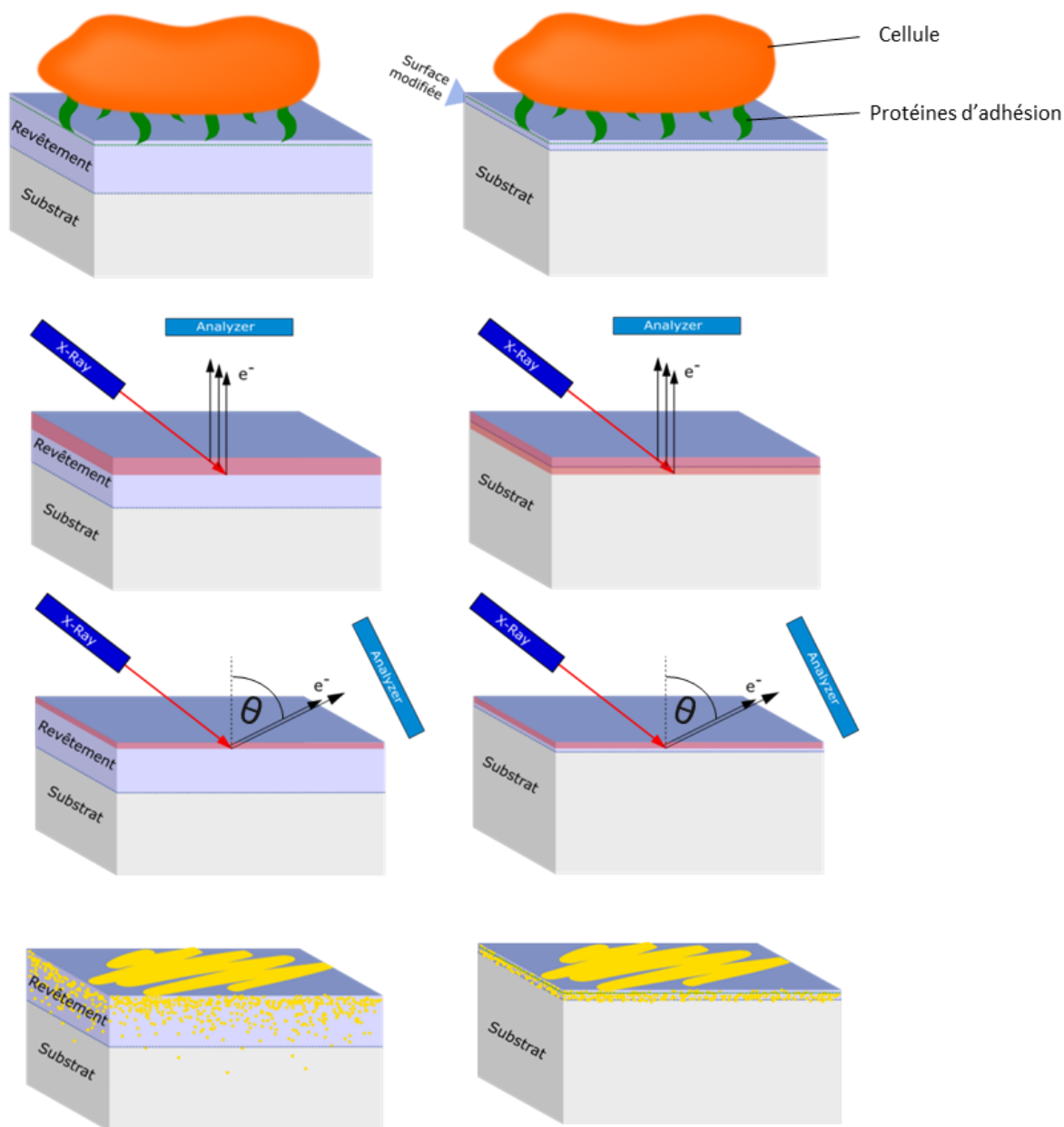


Figure 5.1 : Illustration de la profondeur d'analyse par XPS, ARXPS et Orange II, sur des revêtements déposés sur un substrat (à gauche) et substrats modifiés en surface (à droite).

5.1.2 Surfaces aminées

Dans le cas des surfaces aminées, les analyses XPS ont été associées à la dérivation par TFBA pour déterminer leurs compositions chimiques et leur teneur en amines primaires. Le haut du Tableau 5.1 résume la composition des surfaces aminées, d'épaisseurs et de compositions variées,

fabriquées en laboratoire selon divers procédés et utilisées comme support de l'adhésion de cellules endothéliales. Les films de PET recouverts du polymère aminé PAAm par une réaction d'aminolyse à pH = 12,5 ont une concentration en azote assez faible, mais avec une excellente sélectivité en amines primaires ($[\text{NH}_2]/[\text{N}]$ proche de 95 %) ; le Parylène diX AM présente la même sélectivité, avec une concentration en amines primaires encore accrue (près de 6%). Les surfaces obtenues par plasma ont une sélectivité beaucoup moins élevée compte tenu de la complexité de la chimie engendrée par le gaz ionisé ; toutefois, les procédés n'en sont pas moins efficaces, et reproductibles. En effet, les revêtements L-PPE:N sont déposés avec 15 % d'azote, pour un total de 6,7 % d'amines primaires, une concentration plus élevée encore que dans le Parylène diX AM, avec une structure très réticulée. Les échantillons de PETf, obtenus par un traitement par plasma d'ammoniac, ne sont fonctionnalisés qu'en surface du substrat, si bien que même l'analyse par XPS classique donne des valeurs de concentration en amines primaires assez faibles ; en revanche, l'analyse par XPS à angle résolu (ARXPS) a permis de montrer une fonctionnalisation très importante à la surface immédiate des échantillons, avec jusqu'à 9 % d'amines primaires sur le premier nanomètre d'épaisseur.

Tableau 5.1 : Bilan des compositions élémentaires et en amines primaires les principales surfaces considérées au cours de ce projet

	[C] (%)	[N] (%)	[O] (%)	[NH ₂] (%)
L-PPE:N	80,2 ± 2,9	15,3 ± 1,5	4,5 ± 2,0	6,7 ± 1,0
PETf*	60,6 ± 2,0	16,8 ± 1,6	22,7 ± 0,7	8,9 ± 1,2
PAAm	72,9 ± 2,5	3,7 ± 0,9	23,4 ± 1,7	3,5 ± 1,1
Parylène diX AM	93,5 ± 0,4	5,3 ± 0,1	1,1 ± 0,4	5,9 ± 0,6
TCP*	78,2 ± 0,9	-	21,9 ± 0,9	-
L-PPE:O	65,5 ± 1,0	-	34,5 ± 1,0	-
PrimariaTM*	67,7 ± 0,6	14,6 ± 1,4	17,7 ± 0,8	< 1%
L-PPE:O,N	82,9 ± 0,7	5,6 ± 0,5	11,4 ± 0,6	1,5 ± 0,2

*Les échantillons munis d'un astérisque ont été analysés par AR-XPS : les résultats affichés ont été obtenus avec un angle rasant de 80° par rapport à la normale

Des cellules endothéliales HUVEC ont été cultivées sur ces surfaces, et leur capacité à adhérer et croître sur ces supports a été mesurée par leur activité métabolique. Des résultats très similaires ont été obtenus sur les surfaces aminées L-PPE:N, PETf et PAAm malgré leurs différences de composition, de structure, d'épaisseur. La supériorité de ces surfaces par rapport au PET non traité confirme l'affinité des protéines d'adhésion avec les fonctions amines primaires. La similitude des résultats sur les surfaces aminées suggère l'existence d'un seuil de concentration en amines primaires, déjà observée dans le cas de monocytes (Girard-Lauriault et al. 2009), au-delà duquel la quantité de NH_2 a peu d'influence sur l'adhésion et la croissance des cellules endothéliales. De plus, la présence ou l'absence de fonctions azotées autres que les amines primaires ne semble pas affecter les performances des revêtements en termes de prolifération cellulaire, étant donné la différence de sélectivité ($[\text{NH}_2]/[\text{N}]$) entre les surfaces. Ceci contredit l'affirmation de Siow et al. (Siow et al. 2006) selon laquelle les groupes amides sont responsables de la bioactivité. Enfin, l'efficacité du PETf montre clairement et confirme qu'une fonctionnalisation de surface est suffisante, et que les cellules sont peu influencées par la chimie sous-jacente.

Cependant, il est important de rappeler que l'analyse de la composition et les essais cellulaires ont été effectués au maximum 3 jours après la préparation des surfaces. Or les phénomènes de vieillissement (oxydation, recouvrement hydrophobe) des surfaces fonctionnalisées pourraient altérer certains résultats sur des surfaces plus « vieilles ». Par manque de temps, notre étude n'a pas pu explorer en détails cet aspect, pourtant important. Néanmoins, ceci ne semble pas être un obstacle majeur dans le cas des produits commerciaux (TCP et PrimariaTM), comme nous avons pu le constater : leurs performances ont été comparables à celles des meilleures couches fonctionnelles produites au laboratoire, même longtemps après leur fabrication.

En revanche, le Parylène diX AM, qui présente une importante concentration en amines primaires, s'est avéré être un support de mauvaise qualité pour les cellules endothéliales, avec notamment une croissance cellulaire très réduite. Un comportement cellulaire discordant avait également été obtenu sur le Parylène diX AM avec des monocytes : l'adhésion des cellules n'était pas régulée par un seuil critique contrairement aux autres surfaces, et elles finissaient par se détacher ou mourir au lieu de proliférer (St-Georges-Robillard 2012) ; la cause n'avait pas été trouvée malgré une analyse du vieillissement et de la charge de surface des échantillons. D'après les résultats obtenus sur nos autres surfaces aminées, on peut affirmer que cette incapacité à

permettre la formation d'une couche confluyente de cellules endothéliales n'est pas due à une concentration trop faible en amines primaires, ou à une sélectivité trop élevée. Il est possible qu'elle soit due à une différence d'hydrophobicité ; il serait intéressant de mesurer et comparer l'énergie de surface des revêtements considérés dans ce projet, et notamment leur composante polaire, afin de vérifier cet aspect. Une autre piste pourrait être l'étude de l'affinité des protéines avec ces surfaces : il est possible que l'adsorption compétitive ne tourne pas en faveur des protéines d'adhésion sur le Parylène diX AM, et une telle étude donnerait des informations sur les causes de ce comportement.

Les surfaces L-PPE:N, PETf et PAAm peuvent donc être utilisées avec une excellente (et similaire) capacité à favoriser l'endothélialisation d'un substrat polymérique ; toutefois leurs procédés de fabrication sont très différents, et chaque technique présente des avantages et inconvénients. Le PAAm, par exemple, est greffé sur le PET par une réaction lente et à « haute » température (24h à 70°C), et la surface de l'échantillon obtenu est très influencée par de faibles variations du pH de réaction. Le PETf possède une surface immédiate hautement fonctionnalisée, mais sujette au recouvrement hydrophobe : une étude du vieillissement permettrait d'évaluer son impact sur la chimie du PETf et sa capacité à promouvoir l'adhésion cellulaire. Le L-PPE:N, dont le vieillissement a déjà été étudié (Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010), présente l'avantage d'être applicable à une grande variété de substrats, et pas seulement au PET ; mais sa fabrication à basse pression (tout comme le PETf) peut être un problème pour la commercialisation du produit fini. Des revêtements « H-PPE:N » ont été fabriqués à pression atmosphérique dans le laboratoire de Pr. Wertheimer, mais ont prouvé être moins stables (Ruiz, St-Georges-Robillard, et al. 2010), notamment après immersion : ils ne constituent donc qu'un piètre substitut au L-PPE:N.

5.1.3 Surfaces oxygénées

Parallèlement, deux types de surfaces oxygénées ont été étudiés : les surfaces commerciales TCP de Corning, à base de polystyrène traité par plasma, et les revêtements L-PPE:O polymérisés par plasma dans nos laboratoires à partir d'un mélange gazeux d'éthylène et d'oxygène (dilué dans

l'argon) selon un rapport $R = 0,15$. La composition chimique du TCP a été mesurée par XPS à angle résolu ($[O] = 17,2\%$ pour un angle d'analyse de 45° , ce qui correspond à la littérature (Shen et Horbett 2001)), avec une concentration en oxygène allant jusqu'à 22% pour les angles les plus rasants, soit sur des épaisseurs inférieures à 3 nm . Rappelons que les valeurs en surface sont les plus significatives, parce que les cellules « perçoivent » seulement cette région. Cette zone très proche de la surface est largement occupée par des groupements fonctionnels oxygénés, avec environ 6% de groupements carbonyles et autant de carboxyles ou d'esters, pour environ $13,3\%$ de liaisons simples C-O (Tableau 5.2), qui peuvent notamment correspondre à des fonctions hydroxyles ou des groupements C-O-C. Les revêtements L-PPE:O ont une concentration en oxygène deux fois plus élevée (près de 35%), et donc davantage de groupements fonctionnels. Il est intéressant de constater que leur répartition (autour de 12% pour les fonctions carbonyles et carboxyles/ester ; près de 25% de liaisons C-O) est très semblable à celle observée à la surface des échantillons de TCP : cette proportionnalité laisse penser que nos dépôts réalisés en laboratoire ont une chimie proche de celle des surfaces TCP, bien qu'à une concentration en oxygène supérieure, et bien sûr sans les cycles aromatiques propres au polystyrène. Une des conséquences de cette plus grande concentration en groupements oxygénés, pourrait être une charge de surface (négative) plus importante, bien que cela n'ait pas été vérifié.

Les résultats des tests cellulaires réalisés sur les revêtements L-PPE:O se sont révélés être très semblables aux revêtements L-PPE:N (ainsi que les surfaces PETf et PAAm), aussi bien concernant l'adhésion que la croissance des HUVEC. Cela indique que l'efficacité des groupements oxygénés (-OH, C=O, COOH) pour favoriser la prolifération cellulaire est similaire à celle des amines primaires : aucune différence significative n'a permis d'établir la supériorité d'un type de fonctionnalisation sur un autre, ce qui va à l'encontre des travaux de Lee et al. (Lee et al. 1994), selon lesquels les groupements carboxyles notamment ont une efficacité bien moindre que les amines primaires pour l'adhésion de cellules CHO, issues d'ovaires de hamsters de Chine. L'efficacité similaire des surfaces oxygénées et aminées, respectivement chargées négativement et positivement, montre également que la charge de surface n'est pas un facteur aussi déterminant que l'on s'y attendait (Naujoks et Stemmer 2004; Baek et al. 2010). Notons toutefois que les surfaces oxygénées ont l'avantage d'être moins sujettes au vieillissement par oxydation, ce qui permet une meilleure conservation des propriétés chimiques sur le long terme.

Les surfaces commerciales oxygénées TCP se sont montrées au moins aussi efficaces que le L-PPE:O, bien que la croissance des cellules soit difficile à comparer pour des raisons pratiques (taille des échantillons). Quoi qu'il en soit, la fonctionnalisation plus réduite du TCP par rapport au L-PPE:O n'affecte pas ses propriétés pour la culture de cellules. Cette observation suggère que, comme pour les surfaces aminées, il n'est pas utile d'augmenter encore la concentration de fonctions oxygénées pour améliorer l'adhésion cellulaire, possiblement à cause d'un effet stérique qui empêcherait les protéines d'adhésion de se greffer sur des sites « actifs » trop rapprochés.

Tableau 5.2 : Bilan des déconvolutions de pics C1s pour les surfaces oxygénées et hybrides

	C-C/C-H (at.%)	C-N (at.%)	C-O (at.%)	N-C=O/ C=O (at.%)	COOR/H (at.%)	Shake-up (at.%)
L-PPE:O	50,5 ± 1,4	-	24,9 ± 0,9	12,7 ± 0,9	11,7 ± 1,0	-
TCP*	72,3 ± 1,9	-	13,3 ± 2,6	5,9 ± 1,0	6,3 ± 0,7	2,2 ± 0,5
L-PPE:O,N	62,3 ± 3,5	21,3 ± 2,2	8,9 ± 1,2	6,4 ± 0,7	1,0 ± 0,5	-
Primaria™*	52,3 ± 2,1	17,4 ± 2,2	9,2 ± 0,4	12,9 ± 1,5	7,4 ± 0,9	0,8 ± 0,1

*Les échantillons munis d'un astérisque ont été analysés par AR-XPS : les résultats affichés ont été obtenus avec un angle rasant de 80° par rapport à la normale.

5.1.4 Surfaces hybrides

L'étude des surfaces mixtes (azote + oxygène) visait à montrer, expliquer et reproduire l'amélioration de l'adhésion cellulaire, non pas par l'accroissement de la concentration en groupements fonctionnels, mais par la combinaison de groupements oxygénés et azotés afin d'obtenir un effet de synergie, suggéré par l'efficacité des surfaces commerciales Primaria™ dans la littérature (Steele et al. 1995; Shen et Horbett 2001).

L'analyse de ces surfaces par XPS a donné des résultats surprenants, avec des différences de composition chimique importantes entre les plaques multi-puits Primaria™ et les boîtes de Pétri de la même appellation : en analyse à angle normal, ces dernières affichent une concentration en azote [N] = 4,9 % et en oxygène [O] = 11,8 %, ce qui correspond aux mesures publiées par

Fricke et al. (Fricke et al. 2012), tandis que ces concentrations sont plus élevées pour les plaques multi-puits ($[N] = 9,1 \%$, $[O] = 15,3 \%$). Celles-ci ont également été mesurées avec des angles plus rasants, et ont montré des compositions proches de celles trouvées par d'autres laboratoires à des angles similaires (cf. Tableau 2.2). L'ambiguïté de la littérature concernant la composition des surfaces Primaria™ peut donc être expliquée par des différences de composition entre des produits portant la même appellation, avec une fonctionnalisation accrue pour les plaques 24-puits. Ces écarts sont probablement dus à des différences dans le procédé de fabrication, plutôt qu'à un vieillissement qui aurait été caractérisé par une augmentation de $[O]$ avec la diminution de $[N]$.

L'analyse de la surface immédiate des plaques multi-puits Primaria™, effectuée avec des angles très rasants ($> 70^\circ$) et absente de la littérature à la connaissance de l'auteur, donne des concentrations en azote (environ $14,5 \%$) et en oxygène (autour de 18%) particulièrement élevées. La déconvolution des pics C1s tirés de ces analyses (Tableau 5.2) confirment une fonctionnalisation très importante, avec une forte présence de fonctions carbonyles ou amides, ainsi que des groupements carboxyles. On détecte également une grande concentration de liaisons simples C-O et surtout C-N, mais une proportion très réduite d'amines primaires ($< 1 \%$ at.).

La culture de cellules HUVEC sur ces surfaces a montré une adhésion et une croissance cellulaires encore meilleures que sur le TCP, ce qui confirme la supériorité du Primaria™ annoncée par la littérature. Le TCP et le Primaria™ sont tous deux des substrats de polystyrène traités par plasma, qui présentent une concentration en groupements carboxyles proche ; la supériorité du Primaria™ pourrait donc être due à la présence importante de fonctions amides ou carbonyles, et/ou aux groupements amines (liaisons C-N), malgré la faible quantité d'amines primaires.

Des dépôts mixtes L-PPE:O,N, à la fois oxygénés et azotés, ont été réalisés afin d'obtenir un revêtement dont la chimie serait aussi variée, et efficace, que celle du Primaria™. Des revêtements peu solubles dans l'eau, d'une épaisseur de 100 nm environ, ont pu être déposés par polymérisation par plasma à basse pression à partir d'un mélange d'éthylène et de protoxyde d'azote ($R = 0,6$). L'analyse de ces films par XPS a confirmé l'incorporation d'atomes d'azote et d'oxygène, à hauteur de $5,6 \pm 0,5 \%$ et $11,4 \pm 0,6 \%$ respectivement, donc en concentration moins

grande que dans les plaques multi-puits de type Primaria™, mais qui témoignent tout de même d'une fonctionnalisation appréciable. La déconvolution des pics C1s obtenus sur ces revêtements (Tableau 4.10) indique que ces hétéroatomes forment surtout des liaisons simples avec les atomes de carbone, tandis qu'une fraction plus réduite est engagée dans des groupements amides ou carbonyles, mais la concentration de fonctions carboxyles et esters est quasi-nulle. Le revêtement polymérisé dans notre laboratoire présente donc une chimie assez différente du Primaria™, avec une incorporation d'hétéroatomes plus faible et des groupements chimiques plus simples.

Or, le revêtement hybride L-PPE:O,N a fourni des résultats médiocres pour l'adhésion cellulaire, ce que l'on peut expliquer par une incorporation d'atomes d'azote et d'oxygène plus réduite que pour le Primaria™, donc une concentration plus faible en groupements fonctionnels ; ou bien par une répartition différente des groupements chimiques, révélée par la déconvolution des pics C1s. En effet, il est probable que la très faible concentration en groupements carboxyles du L-PPE:O,N ait eu un impact négatif sur l'adhésion des cellules, étant donné la concentration élevée sur le TCP et Primaria™ notamment. La combinaison de liaisons simples C-N, très présentes dans les films L-PPE:O,N, avec des fonctions oxygénées autres que carboxyliques, ne semble pas suffire à créer une synergie suffisante pour surpasser l'efficacité des surfaces non-mixtes, même si la prolifération cellulaire est nettement améliorée par rapport au PET non traité. D'autre part, la présence d'amines primaires, en plus grande quantité que sur le Primaria™, ne semble pas avoir d'impact significatif sur l'adhésion cellulaire dans le cas des surfaces mixtes.

L'effet de synergie est donc dépendant de la nature et des concentrations respectives des différents groupements fonctionnels, et n'a clairement pas été reproduite efficacement avec nos revêtements L-PPE:O,N. Leur composition pourrait être optimisée en ajustant le procédé de fabrication, i.e. en faisant varier les flux de gaz injectés, la pression ou encore la puissance fournie au plasma. L'ajout d'un troisième gaz pourrait également permettre de mieux contrôler les fonctions créées : par exemple, l'utilisation du dioxyde de carbone pourrait faciliter la formation de carboxyles, et éventuellement améliorer l'efficacité du revêtement pour l'adhésion cellulaire.

V.1.4. Comparaison des surfaces aminées pour le greffage du sulfate de chondroïtine et sa bioactivité

La variabilité des résultats de quantification par TBO et de culture cellulaire, pour des surfaces aminées sur lesquelles on a greffé des molécules de sulfate de chondroïtine, montre le manque de reproductibilité du procédé de greffage. En effet, bien que la présence de molécules de CS greffées en surface ait été confirmée pour tous les échantillons, les quantités greffées se sont avérées très versatiles, ce qui a évidemment causé des répercussions sur l'adhésion des cellules : globalement, on a observé une adhésion limitée des cellules sur les substrats bioactifs (plus faible que sur les surfaces aminées mais supérieure au PET non traité), suivie d'une croissance accrue en particulier sur les échantillons de PAAm et PETf, mais la forte variabilité de ces résultats ne permet malheureusement pas d'identifier de tendances claires et de conclure sur l'efficacité des différentes surfaces considérées.

Ce constat est inattendu, car le greffage de CS sur des surfaces aminées, et notamment sur des revêtements L-PPE:N, avait déjà été effectué avec succès et de manière reproductible dans le même laboratoire, et avait mené non seulement à une faible adsorption de fibrinogènes et de plaquettes, mais avait également permis de conserver les propriétés adhésives pour les cellules endothéliales (Thalla et al. 2014).

Le procédé de greffage doit donc être revu et amélioré, étude actuellement en cours dans le laboratoire de Pr. Lerouge. Les paramètres mis en cause sont notamment la variabilité de longueur de chaîne des molécules de CS, le procédé de filtrage du CS dissous, ainsi que le rinçage des surfaces après greffage. D'autre part, un procédé différent est actuellement en cours de développement, qui permettrait d'intégrer des molécules de CS directement dans un revêtement plasma, formant ainsi un revêtement bioactif en une seule étape.

V.2. Limites du projet

Ce projet de maîtrise consistait à mener une étude objective et détaillée de différentes surfaces fonctionnalisées, et, à ce titre, présente quelques limitations.

En effet, la composition chimique des surfaces considérées a largement été obtenue par XPS, et en partie grâce à la déconvolution de pics mesurés à haute résolution ; or, la fiabilité de ces analyses est limitée car la déconvolution d'un pic en plusieurs sous-pics peut dépendre de nombreux facteurs, tels que la quantité de sous-pics identifiés, leur largeur, le modèle mathématique utilisé, etc. Par exemple, le chevauchement des sous-pics C-C, C-N et C-O dans le cas des surfaces hybrides, rend la déconvolution plus complexe – et donc moins fiable. Ainsi, bien qu'il paraisse évident que les groupements carboxyles et esters sont presque absents des revêtements L-PPE:O,N (car l'énergie de liaison propre aux groupements COOR et COOH se distingue fortement des autres), la quantité de liaisons C-N peut, elle, être surévaluée. Pour faciliter le processus d'analyse, des approximations ont été faites, comme supposer qu'un atome de carbone appartenant à un groupement carbonyle possède la même énergie que dans un groupement amide : cela permet de diminuer le nombre de pics se chevauchant et donc les erreurs liées à la déconvolution, mais entraîne une perte d'information due à l'impossibilité de distinguer les fonctions proches en énergie (les fonctions carbonyles et amides en l'occurrence). La méthode de dérivation par TFBA, bien que récemment critiquée par la littérature (Klages, Khosravi, et Hinze 2013), a permis de compléter ces analyses en quantifiant les amines primaires avec une fiabilité jugée suffisante pour l'application qui nous concerne, mais des incertitudes demeurent pour certaines fonctions.

D'autre part, le cas du Parylène diX AM, sur lequel les cellules peinent à proliférer malgré une haute teneur en amines primaires, illustre bien le fait que la chimie de surface ne suffit pas à expliquer ou prédire le comportement cellulaire, bien qu'elle y joue un rôle prépondérant. D'autres paramètres, comme l'énergie de surface, la charge et la rugosité pourraient compléter ces connaissances. Certaines surfaces fonctionnalisées ont déjà démontré une « mouillabilité » (angle de contact de l'eau) supérieure à celle du substrat non traité (Baek et al. 2010; Gigout et al. 2011) ; mais une étude plus poussée appliquée à toutes les surfaces, notamment avec plusieurs liquides afin d'évaluer l'énergie de surface et ses composantes polaires et dispersives, pourrait être utile pour expliquer davantage le comportement des cellules sur les différents échantillons (notamment le Parylène diX AM), et éventuellement aider à optimiser les revêtements L-PPE:O,N. La topographie, dont l'influence sur le comportement cellulaire a largement été

étudiée dans la littérature (Wilson et al. 2005; Katti, Vasita, et Shanmugam 2008; Lord, Foss, et Besenbacher 2010), pourrait être modifiée afin de pouvoir juger des effets relatifs de la rugosité sur l'adhésion des cellules par rapport à la chimie de surface ; et éventuellement améliorer l'adhésion cellulaire en contrôlant la topographie du substrat avant fonctionnalisation (avec un traitement par plasma d'oxygène par exemple).

Une autre limite de ce projet concerne le développement de surfaces « hybrides », similaires au PrimariaTM. En effet, le revêtement L-PPE:O,N utilisé pour la culture cellulaire a fourni des résultats décevants en termes d'adhésion et de croissance cellulaires, et dont la cause peut être imputée à une répartition des groupements chimiques peu adéquate, avec notamment une concentration presque nulle en fonctions carboxyles. Une optimisation de ces revêtements, et notamment une incorporation plus importante d'hétéroatomes, un meilleur contrôle de la chimie de surface, et des essais répétés permettraient sans doute de recréer l'effet de synergie observé pour les surfaces PrimariaTM, et par là même d'avoir une meilleure compréhension de ce phénomène. D'autre part, la stabilité de ces revêtements reste à étudier en détails : la stabilité des groupements chimiques en surface, ainsi que le vieillissement à long terme des dépôts, à l'air ou en milieu aqueux, n'ont pas été vérifiés.

Le manque de reproductibilité du procédé de greffage de CS utilisé constitue évidemment une importante limitation dans ce projet. Bien que ce même procédé ait déjà été utilisé, avec succès, pour greffer des molécules de CS sur des revêtements de L-PPE:N (Charbonneau et al. 2012; Thalla et al. 2014), notre étude a révélé que les quantités greffées peuvent varier de manière remarquable. La comparaison de surfaces aminées exposées au procédé de greffage s'est donc avérée plus délicate, et finalement a fourni peu de résultats exploitables. Comme nous l'avons mentionné, des procédés alternatifs sont actuellement développés, qui permettront possiblement de pallier à ce problème, voire même d'améliorer la rapidité de fabrication et la durabilité du revêtement bioactif. Une autre alternative pourrait être l'utilisation d'autres molécules bioactives, telles que l'héparine, connue pour ses propriétés anticoagulantes (Aksoy et al. 2008), et dont l'affinité avec plusieurs facteurs de croissance (Vulic et Shoichet 2014) pourrait permettre d'obtenir des revêtements bioactifs variés et efficaces pour des applications spécifiques.

Enfin, la comparaison des différentes surfaces lors de cette étude s'est faite au regard de leur capacité à favoriser l'adhésion et la croissance de cellules endothéliales, critères cruciaux pour

assurer l'endothélialisation de l'implant vasculaire ; cependant, d'autres critères sont aussi à prendre à considération : la capacité des cellules à survivre sur ces surfaces en milieu appauvri par exemple, mais aussi leur résistance au cisaillement, pour lequel l'affinité cellule-surface joue un rôle majeur. La prise en compte de ces critères serait un ajout important pour une comparaison exhaustive des surfaces fonctionnalisées. De la même manière, les cellules ont été cultivées majoritairement sur des films fonctionnalisés par différentes méthodes ; de tels procédés peuvent être appliqués sur des substrats de morphologie plus variée, et éventuellement permettre une meilleure endothélialisation du matériau. Par exemple, une très bonne réponse cellulaire a été obtenue sur des revêtements L-PPE:N appliqués à des substrats de PET électrofilés (Savoji et al. 2014).

CHAPITRE 6 CONCLUSION

Ce projet de maîtrise consistait à étudier des surfaces fonctionnalisées, obtenues par différents procédés, et comparer leur capacité à promouvoir l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales, cruciale pour la conception d'implants vasculaires. L'intérêt de cette étude s'est notamment porté sur la nature des groupements chimiques participant activement à une bonne adhésion cellulaire ; les amines primaires, par exemple, sont connues pour favoriser l'adhésion des cellules. Différentes surfaces riches en amines primaires ont donc été considérées : des polymères aminés comme le polyallylamine (PAAm) et le Parylène diX AM ont été déposés sur des films de PET, respectivement par greffage chimique et par CVD, avec une excellente sélectivité en amines primaires ; des procédés par plasma à basse pression ont également été utilisés, pour fonctionnaliser la surface de films de PET (PETf) ou former une couche mince organique riche en azote par polymérisation plasma (L-PPE:N). Ces derniers procédés ont notamment permis d'obtenir une très bonne densité d'amines primaires, jusqu'à 9% à la surface immédiate des échantillons de PETf. Certains groupements oxygénés sont aussi des promoteurs de l'adhésion cellulaire, raison pour laquelle certaines surfaces commerciales pour la culture cellulaire sont riches en oxygène : des surfaces développées par Corning (TCP) ont montré une concentration en oxygène proche de 22% sur les premiers nanomètres, avec une présence importante de groupements carboxyles et carbonyles (environ 6% chacun). Le procédé de polymérisation par plasma à basse pression a permis de créer un revêtement (L-PPE:O) hautement oxygéné (près de 35% d'oxygène), avec une répartition en groupements fonctionnels proportionnelle à celle du TCP. Des surfaces hybrides, à la fois oxygénées et azotées, ont également été considérées, à l'image des surfaces commerciales Primaria™, qui présentent une chimie de surface riche (9% d'azote et 15% d'oxygène sur les premiers nanomètres) et complexe ; des revêtements mixtes L-PPE:O,N, peu solubles dans l'eau, ont été synthétisés avec une incorporation d'hétéroatomes un peu moindre et une chimie moins variée que le Primaria™.

La culture de cellules endothéliales HUVEC a montré que ces surfaces constituent bien une nette amélioration par rapport au substrat de PET non traité. Les surfaces aminées L-PPE:N, PETf et PAAm, ainsi que les surfaces oxygénées L-PPE:O et TCP, ont obtenu d'excellents résultats en

termes d'adhésion et de croissance cellulaires, avec une efficacité similaire malgré leurs différences de composition, de concentrations, de profondeur, de structure, etc., ce qui nous a amené à un certain nombre de conclusions :

- (i) Du point de vue chimique, seules les premières couches atomiques à la surface du matériau, de l'ordre de quelques nanomètres, sont à considérer pour l'adhésion des cellules ; la chimie des couches sous-jacentes n'a que peu ou pas d'influence sur le comportement cellulaire.
- (ii) Dans le cas de surfaces azotées, les groupements fonctionnels autres que les amines primaires jouent un rôle mineur dans l'adhésion cellulaire.
- (iii) Les groupements aminés et oxygénés peuvent atteindre une efficacité proche pour promouvoir l'adhésion cellulaire ; par conséquent, le signe de la charge de surface n'est pas nécessairement déterminant.
- (iv) L'efficacité similaire de ces différentes surfaces suggère qu'au-delà d'un seuil de densité de « sites actifs », oxygénés ou azotés, leur quantité n'a plus d'influence sur le comportement cellulaire.
- (v) En revanche, les surfaces Primaria™ ont montré que l'adhésion cellulaire pouvait être encore accrue en combinant les groupements azotés et oxygénés sur une même surface, par un effet de synergie.

Toutefois, cet effet n'a pas pu être observé sur les revêtements L-PPE:O,N considérés dans ce projet. Il est probable que l'absence de fonctions carboxyles soit à l'origine de cet échec ; une optimisation de ces revêtements, par la modification des paramètres de dépôt ou l'utilisation de gaz différents, pourrait permettre de recréer cette synergie. D'autre part, la capacité limitée du Parylène diX AM à favoriser la prolifération cellulaire malgré sa haute teneur en amines primaires, amène à considérer l'influence d'autres paramètres, comme l'énergie de surface par exemple.

Enfin, la formation de surfaces bioactives par le greffage de molécules de sulfate de chondroïtine s'est révélé peu concluante, du fait de la variabilité du procédé utilisé. L'amélioration de ce procédé, ainsi que le développement de nouvelles méthodes pour créer des revêtements bioactifs, sont actuellement en cours.

BIBLIOGRAPHIE

- Aksoy, Eda Ayse, Vasif Hasirci, Nesrin Hasirci, Antonella Motta, Mariangela Fedel, et Claudio Migliaresi. 2008. « Plasma Protein Adsorption and Platelet Adhesion on Heparin-Immobilized Polyurethane Films ». *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 23 (6): 505- 19. doi:10.1177/0883911508097422.
- « All Nobel Prizes in Physics ». 2015. Consulté le novembre 25.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/.
- « Archive-1 Ellipsométrie | Techniques de l'Ingénieur ». 2015. Consulté le décembre 1.
<http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-mesures-mecaniques-et-dimensionnelles-tiard/archive-1/ellipsometrie-r6490/>.
- Arisaka, Yoshinori, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Yoshikatsu Akiyama, et Teruo Okano. 2013. « Switching of cell growth/detachment on heparin-functionalized thermoresponsive surface for rapid cell sheet fabrication and manipulation ». *Biomaterials* 34 (17): 4214- 22. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.056.
- « Atherosclerosis ». 2016. Consulté le janvier 7.
http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/WhyCholesterolMatters/Atherosclerosis_UCM_305564_Article.jsp#.Vo6yblK9Gol.
- Baek, Eun Jung, Jungmok You, Min Sun Kim, So-Young Lee, Seong-Je Cho, Eunkyong Kim, et Hyun Ok Kim. 2010. « Enhanced Production of Red Blood Cells in Suspension by Electrostatic Interactions with Culture Plates ». *Tissue Engineering Part C: Methods* 16 (6): 1325- 34. doi:10.1089/ten.tec.2009.0785.
- Beamson, G., et D. Briggs. 1992. « The scienta ESCA 300 database ». In *High Resolution XPS of Organic Polymers*. John Wiley & Sons New York.
- Biederman, Hynek. 2004. *Plasma polymer films*. World Scientific.
- Binnig, G., C. F. Quate, et Ch. Gerber. 1986. « Atomic Force Microscope ». *Physical Review Letters* 56 (9): 930- 33. doi:10.1103/PhysRevLett.56.930.
- Brétagne, Frédéric, Michaël Lejeune, Andri Papadopoulou-Bouraoui, Marina Hasiwa, Hubert Rauscher, Giacomo Ceccone, Pascal Colpo, et François Rossi. 2006. « Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer ». *Acta Biomaterialia* 2 (2): 165- 72. doi:10.1016/j.actbio.2005.11.002.
- Bryhan, Marie D., Paul E. Gagnon, Oliva V. LaChance, Zhong-He Shen, et Hongming Wang. 2003. Method for creating a cell growth surface on a polymeric substrate. US6617152 B2, filed 4 septembre 2001, et issued 9 septembre 2003.
<http://www.google.ca/patents/US6617152>.

- Bubert, H., S. Haiber, W. Brandl, G. Marginean, M. Heintze, et V. Brüser. 2003. « Characterization of the uppermost layer of plasma-treated carbon nanotubes ». *Diamond and Related Materials*, 13th European Conference on Diamond, Diamond-Like Materials, Carbon Nanotubes, Nitrides and Silicon Carbide, 12 (3-7): 811 - 15. doi:10.1016/S0925-9635(02)00353-9.
- Charbonneau, Cindy, Julien E. Gautrot, Marie-Josée Hébert, X. X. Zhu, et Sophie Lerouge. 2007. « Chondroitin-4-Sulfate: A Bioactive Macromolecule to Foster Vascular Healing around Stent-Grafts after Endovascular Aneurysm Repair ». *Macromolecular Bioscience* 7 (5): 746- 52. doi:10.1002/mabi.200700008.
- Charbonneau, Cindy, Benoît Liberelle, Marie-Josée Hébert, Gregory De Crescenzo, et Sophie Lerouge. 2011. « Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating ». *Biomaterials* 32 (6): 1591- 1600. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.10.055.
- Charbonneau, Cindy, Juan-Carlos Ruiz, Pauline Lequoy, Marie-Josée Hébert, Gregory De Crescenzo, Michael R. Wertheimer, et Sophie Lerouge. 2012. « Chondroitin Sulfate and Epidermal Growth Factor Immobilization after Plasma Polymerization: A Versatile Anti-Apoptotic Coating to Promote Healing Around Stent Grafts ». *Macromolecular Bioscience* 12 (6): 812- 21. doi:10.1002/mabi.201100447.
- Chatelier, Ronald C., Ximing Xie, Thomas R. Gengenbach, et Hans J. Griesser. 1995. « Effects of plasma modification conditions on surface restructuring ». *Langmuir* 11 (7): 2585- 91. doi:10.1021/la00007a043.
- Chen, Meng, Paul O. Zamora, Prantika Som, Louis A. Peña, et Shigemasa Osaki. 2003. « Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed ammonia and oxygen ». *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14 (9): 917- 35. doi:10.1163/156856203322381410.
- Chilkoti, Ashutosh, Buddy D. Ratner, et David Briggs. 1991. « Plasma-deposited polymeric films prepared from carbonyl-containing volatile precursors: XPS chemical derivatization and static SIMS surface characterization ». *Chemistry of Materials* 3 (1): 51- 61. doi:10.1021/cm00013a016.
- C L Klein, F. Bittinger. 1995. « Comparative studies on vascular endothelium in vitro: 3. Effects of cytokines on the expression of E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages ». *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 63 (2): 83- 92.
- Conrads, H., et M. Schmidt. 2000. « Plasma Generation and Plasma Sources ». *Plasma Sources Science and Technology* 9 (4): 441. doi:10.1088/0963-0252/9/4/301.
- Creighton, J. R., et P. Ho. 2001. « Introduction to chemical vapor deposition (CVD) ». *Chemical vapor deposition*, 2.

- Cueff, R, G Baud, M Benmalek, J. P Besse, J. R Butruille, et M Jacquet. 1997. « X-ray photoelectron spectroscopy studies of plasma-modified PET surface and alumina/PET interface ». *Applied Surface Science* 115 (3): 292- 98. doi:10.1016/S0169-4332(96)01089-6.
- Cumpson, Peter J. 2001. « Estimation of Inelastic Mean Free Paths for Polymers and Other Organic Materials: Use of Quantitative Structure–property Relationships ». *Surface and Interface Analysis* 31 (1): 23- 34. doi:10.1002/sia.948.
- Da Ponte, Gabriella, Eloisa Sardella, Fiorenza Fanelli, Riccardo d’Agostino, Roberto Gristina, et Pietro Favia. 2012. « Plasma Deposition of PEO-Like Coatings with Aerosol-Assisted Dielectric Barrier Discharges ». *Plasma Processes and Polymers* 9 (11-12): 1176- 83. doi:10.1002/ppap.201100201.
- Daw, R., S. Candan, A. J. Beck, A. J. Devlin, I. M. Brook, S. MacNeil, R. A. Dawson, et R. D. Short. 1998. « Plasma copolymer surfaces of acrylic acid/1,7 octadiene: Surface characterisation and the attachment of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells ». *Biomaterials* 19 (19): 1717- 25. doi:10.1016/S0142-9612(98)00080-5.
- Dekker, A., K. Reitsma, T. Beugeling, A. Bantjes, J. Feijen, et W. G. van Aken. 1991. « Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene ». *Biomaterials* 12 (2): 130- 38. doi:10.1016/0142-9612(91)90191-C.
- Deutsch, Manfred, Johann Meinhart, Teddy Fischlein, Petra Preiss, et Peter Zilla. 1999. « Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: A 9-year experience ». *Surgery* 126 (5): 847- 55. doi:10.1016/S0039-6060(99)70025-5.
- Devine, Carol, et Charles McCollum. 2004. « Heparin-bonded Dacron or polytetrafluorethylene for femoropopliteal bypass: Five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial ». *Journal of Vascular Surgery* 40 (5): 924- 31. doi:10.1016/j.jvs.2004.08.033.
- Dickie, R. A., J. S. Hammond, J. E. De Vries, et J. W. Holubka. 1982. « Surface derivatization of hydroxyl functional acrylic copolymers for characterization by x-ray photoelectron spectroscopy ». *Analytical Chemistry* 54 (12): 2045- 49. doi:10.1021/ac00249a031.
- Drabik, Martin, Jaroslav Kousal, Coralie Celma, Patrick Rupper, Hynek Biederman, et Dirk Hegemann. 2014. « Influence of deposition conditions on structure and aging of C: H: O plasma polymer films prepared from acetone/CO₂ mixtures ». *Plasma Processes and Polymers* 11 (5): 496- 508.
- « Ellipsométrie | Techniques de l’Ingénieur ». 2015. Consulté le décembre 1. <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/metrologie-optique-et-photonique-42143210/ellipsometrie-r6491/>.

- Ertel, Sylvie I., Buddy D. Ratner, et Thomas A. Horbett. 1990. « Radiofrequency Plasma Deposition of Oxygen-Containing Films on Polystyrene and Poly(ethylene Terephthalate) Substrates Improves Endothelial Cell Growth ». *Journal of Biomedical Materials Research* 24 (12): 1637- 59. doi:10.1002/jbm.820241207.
- Fauchais, Pierre. 2000. « Gaz ionisés et plasmas ». *Techniques de l'Ingénieur*.
- Favia, Pietro, Marco Vito Stendardo, et Riccardo d'Agostino. 1996. « Selective Grafting of Amine Groups on Polyethylene by Means of NH₃-H₂ RF Glow Discharges ». *Plasmas and Polymers* 1 (2): 91- 112. doi:10.1007/BF02532821.
- Feugier, P., R. A. Black, J. A. Hunt, et T. V. How. 2005. « Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress ». *Biomaterials* 26 (13): 1457- 66. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.050.
- Fishbein, Gregory A., et Michael C. Fishbein. 2009. « Arteriosclerosis: Rethinking the Current Classification ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133 (8): 1309- 16.
- Förch, R., A. N. Chifen, A. Bousquet, H. L. Khor, M. Jungblut, L.-Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E.-K. Sinner, et W. Knoll. 2007. « Recent and Expected Roles of Plasma-Polymerized Films for Biomedical Applications ». *Chemical Vapor Deposition* 13 (6-7): 280- 94. doi:10.1002/cvde.200604035.
- Foxall, Thomas L., Kurt R. Auger, Allan D. Callow, et Peter Libby. 1986. « Adult human endothelial cell coverage of small-caliber dacron and polytetrafluoroethylene vascular prostheses in vitro ». *Journal of Surgical Research* 41 (2): 158- 72. doi:10.1016/0022-4804(86)90021-1.
- Freshney, R. Ian, et R. Ian Freshney. 2005. « Biology of Cultured Cells ». In *Culture of Animal Cells*. John Wiley & Sons, Inc. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471747599.cac003/abstract>.
- Fricke, K., K. Duske, A. Quade, B. Nebe, K. Schroder, K.-D. Weltmann, et T. von Woedtke. 2012. « Comparison of Nonthermal Plasma Processes on the Surface Properties of Polystyrene and Their Impact on Cell Growth ». *IEEE Transactions on Plasma Science* 40 (11): 2970- 79. doi:10.1109/TPS.2012.2204904.
- Friedbacher, Gernot, et Henning Bubert. 2011. *Surface and Thin Film Analysis: A Compendium of Principles, Instrumentation, and Applications*. John Wiley & Sons.
- Fryer, Benjamin, Shelley Nelson, Villy Nielsen, Tina Kristensen Marwood, et Thomas Brevig. 2009. Methods, surface modified plates and compositions for cell attachment, cultivation and detachment. US20090215177 A1, filed 19 février 2009, et issued 27 août 2009. <http://www.google.com/patents/US20090215177>.

- Gazicki, M., et H. Yasuda. 1984. « An atomic aspect of plasma polymerization: the role of elemental composition of the monomer ». In *J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp.* Vol. 38. DTIC Document.
- Gengenbach, Thomas R., Ximing Xie, Ronald C. Chatelier, et Hans J. Griesser. 1994. « Evolution of the surface composition and topography of perfluorinated polymers following ammonia-plasma treatment ». *Journal of Adhesion Science and Technology* 8 (4): 305- 28. doi:10.1163/156856194X00267.
- Gerenser, L. J. 1987. « X-Ray photoemission study of plasma modified polyethylene surfaces ». *Journal of Adhesion Science and Technology* 1 (1): 303- 18. doi:10.1163/156856187X00319.
- Gigout, Anne, Juan-Carlos Ruiz, Michael R. Wertheimer, Mario Jolicoeur, et Sophie Lerouge. 2011. « Nitrogen-Rich Plasma-Polymerized Coatings on PET and PTFE Surfaces Improve Endothelial Cell Attachment and Resistance to Shear Flow ». *Macromolecular Bioscience* 11 (8): 1110- 19. doi:10.1002/mabi.201000512.
- Girardeaux, C., N. Zammateo, M. Art, B. Gillon, J. J. Pireaux, et R. Caudano. 1996. « Amination of Poly(ethylene-Terephthalate) Polymer Surface for Biochemical Applications ». *Plasmas and Polymers* 1 (4): 327- 46. doi:10.1007/BF02532829.
- Girard-Lauriault, Pierre-Luc, Paul Dietrich, Thomas Gross, et Wolfgang E. S. Unger. 2012. « Is Quantitative Chemical Derivatization XPS of Plasma Deposited Organic Coatings a Valid Analytical Procedure? » *Surface and Interface Analysis* 44 (8): 1135- 40. doi:10.1002/sia.4947.
- Girard-Lauriault, Pierre-Luc, Paul M. Dietrich, Thomas Gross, Thomas Wirth, et Wolfgang E. S. Unger. 2013. « Chemical Characterization of the Long-Term Ageing of Nitrogen-Rich Plasma Polymer Films under Various Ambient Conditions ». *Plasma Processes and Polymers* 10 (4): 388- 95. doi:10.1002/ppap.201200118.
- Girard-Lauriault, Pierre-Luc, Fackson Mwale, Mihaela Iordanova, Caroline Demers, Patrick Desjardins, et Michael R. Wertheimer. 2005. « Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering ». *Plasma Processes and Polymers* 2 (3): 263- 70. doi:10.1002/ppap.200400092.
- Girard-Lauriault, Pierre-Luc, Florina Truica-Marasescu, Alain Petit, Hong T. Wang, Patrick Desjardins, John Antoniou, Fackson Mwale, et Michael R. Wertheimer. 2009. « Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-Rich Organic Thin Films: Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion ». *Macromolecular Bioscience* 9 (9): 911- 21. doi:10.1002/mabi.200800359.
- Gorham, William F. 1966. Para-xylylene copolymers. US3288728 A, filed 18 février 1966, et issued 29 novembre 1966. <http://www.google.com/patents/US3288728>.

- Gouvernement du Canada, Agence de la santé publique du Canada. 2004. « Maladie cardiovasculaire - Maladies chroniques - Agence de la santé publique du Canada ». août 23. <http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/index-fra.php>.
- Griesser, Hans J., Ronald C. Chatelier, Thomas R. Gengenbach, Graham Johnson, et John G. Steele. 1994. « Growth of human cells on plasma polymers: Putative role of amine and amide groups ». *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 5 (6): 531-54. doi:10.1163/156856294X00194.
- Griesser, Hans Joerg, Ronald C. Chatelier, Thomas R. Gengenbach, G. Johnson, John G. Steele, et ACS Polymer Preprints. 1993. « Attachment of human cells on plasma polymers: interactions between surface properties and adhesive glycoproteins ». *Polymer Preprints(USA)* 34 (1): 657-58.
- Guex, A. G., F. M. Kocher, G. Fortunato, E. Körner, D. Hegemann, T. P. Carrel, H. T. Tevaearai, et M. N. Giraud. 2012. « Fine-tuning of substrate architecture and surface chemistry promotes muscle tissue development ». *Acta Biomaterialia* 8 (4): 1481-89. doi:10.1016/j.actbio.2011.12.033.
- Hamerli, P., Th. Weigel, Th. Groth, et D. Paul. 2003. « Enhanced tissue-compatibility of polyethylenterephthalat membranes by plasma aminofunctionalisation ». *Surface and Coatings Technology*, Proceedings of the Eight International Conference on Plasma Surface Engineering, 174-175 (septembre): 574-78. doi:10.1016/S0257-8972(03)00685-6.
- Hegemann, Dirk. 2013. « Macroscopic Investigation of Reaction Rates Yielding Plasma Polymer Deposition ». *Journal of Physics D: Applied Physics* 46 (20): 205204. doi:10.1088/0022-3727/46/20/205204.
- Hegemann, Dirk, Mohammad Mokbul Hossain, Enrico Körner, et Dawn J. Balazs. 2007. « Macroscopic Description of Plasma Polymerization ». *Plasma Processes and Polymers* 4 (3): 229-38. doi:10.1002/ppap.200600169.
- Hegemann, D., E. Körner, K. Albrecht, U. Schütz, et S. Guimond. 2010. « Growth Mechanism of Oxygen-Containing Functional Plasma Polymers ». *Plasma Processes and Polymers* 7 (11): 889-98. doi:10.1002/ppap.200900144.
- Horbett, T. A. 1996. « Proteins: structure, properties, and adsorption to surfaces ». *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*, 133-41.
- Hoshi, Ryan A., Robert Van Lith, Michele C. Jen, Josephine B. Allen, Karen A. Lapidos, et Guillermo Ameer. 2013. « The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts ». *Biomaterials* 34 (1): 30-41. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.046.
- Jaganjac, Morana, Alenka Vesel, Lidija Milkovic, Nina Recek, Metod Kolar, Neven Zarkovic, Aishah Latiff, Karin-Stana Kleinschek, et Miran Mozetic. 2014. « Oxygen-Rich Coating

- Promotes Binding of Proteins and Endothelialization of Polyethylene Terephthalate Polymers ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102 (7): 2305- 14. doi:10.1002/jbm.a.34911.
- Junkar, Ita, Alenka Vesel, Uroš Cvelbar, Miran Mozetič, et Simona Strnad. 2009. « Influence of oxygen and nitrogen plasma treatment on polyethylene terephthalate (PET) polymers ». *Vacuum*, 12th Joint Vacuum Conference, 10th European Vacuum Conference and 7th Annual Meeting of the German Vacuum Society (JVC-12/EVC-10/AMDVG-7), Balatonalmadi, Hungary, 22 - 26 September 2008. Organised by Roland Evtvvs Physical Society, Hungary in collaboration with the Vacuum Societies of Austria, Croatia, Czech Republic, Germany, Hungary, Slovakia and Slovenia, 84 (1): 83- 85. doi:10.1016/j.vacuum.2009.04.011.
- Kannan, Ruben Y., Henryk J. Salacinski, Peter E. Butler, George Hamilton, et Alexander M. Seifalian. 2005. « Current Status of Prosthetic Bypass Grafts: A Review ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 74B (1): 570- 81. doi:10.1002/jbm.b.30247.
- Katti, Dharendra S., Rajesh Vasita, et Kirubanandan Shanmugam. 2008. « Improved Biomaterials for Tissue Engineering Applications: Surface Modification of Polymers ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8 (4): 341- 53. doi:10.2174/156802608783790893.
- Keuren, Jeffrey F. W, Simone J. H Wielders, George M Willems, Marco Morra, Linda Cahalan, Patrick Cahalan, et Theo Lindhout. 2003. « Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces ». *Biomaterials* 24 (11): 1917- 24. doi:10.1016/S0142-9612(02)00620-8.
- Klages, Claus-Peter, Zohreh Khosravi, et Alena Hinze. 2013. « Some Remarks on Chemical Derivatization of Polymer Surfaces after Exposure to Nitrogen-Containing Plasmas ». *Plasma Processes and Polymers* 10 (4): 307- 12. doi:10.1002/ppap.201200142.
- Körner, Enrico, Giuseppino Fortunato, et Dirk Hegemann. 2009. « Influence of RF Plasma Reactor Setup on Carboxylated Hydrocarbon Coatings ». *Plasma Processes and Polymers* 6 (2): 119- 25. doi:10.1002/ppap.200800102.
- Lahann, Joerg. 2006. « Vapor-Based Polymer Coatings for Potential Biomedical Applications ». *Polymer International* 55 (12): 1361- 70. doi:10.1002/pi.2098.
- Lahann, Jörg, Doris Klee, et Hartwig Höcker. 1998. « Chemical Vapour Deposition Polymerization of Substituted [2.2]paracyclophanes ». *Macromolecular Rapid Communications* 19 (9): 441- 44. doi:10.1002/(SICI)1521-3927(19980901)19:9<441::AID-MARC441>3.0.CO;2-G.
- Langmuir, Irving. 1929. « The Interaction of Electron and Positive Ion Space Charges in Cathode Sheaths ». *Physical Review* 33 (6): 954- 89. doi:10.1103/PhysRev.33.954.

- Lee, Jin Ho, Hee Won Jung, In-Kyu Kang, et Hai Bang Lee. 1994. « Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups ». *Biomaterials* 15 (9): 705-11. doi:10.1016/0142-9612(94)90169-4.
- Lerouge, Sophie, Jérémie Barrette, Juan-Carlos Ruiz, Marouan Sbati, Houman Savoji, Bachir Saoudi, Matthieu Gauthier, et Michael R. Wertheimer. 2015. « Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings for Biomedical Applications: Stability, Mechanical Properties and Adhesion Under Dry and Wet Conditions ». *Plasma Processes and Polymers* 12 (9): 882-95. doi:10.1002/ppap.201400210.
- Lerouge, Sophie, Annie Major, Pierre-Luc Girault-Lauriault, Marc-André Raymond, Patrick Laplante, Gilles Soulez, Fackson Mwale, Michael R. Wertheimer, et Marie-Josée Hébert. 2007. « Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair ». *Biomaterials* 28 (6): 1209-17. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.10.033.
- Liebermann, M. A., et A. J. Lichtenberg. 2005. « Principles of Plasma Discharges and Materials Processing. A John Wiley & Sons ». Inc., 2nd Edition. Auflage.
- Liston, E. M., L. Martinu, et M. R. Wertheimer. 1993. « Plasma surface modification of polymers for improved adhesion: a critical review ». *Journal of Adhesion Science and Technology* 7 (10): 1091-1127. doi:10.1163/156856193X00600.
- Lord, Megan S., Morten Foss, et Flemming Besenbacher. 2010. « Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response ». *Nano Today* 5 (1): 66-78. doi:10.1016/j.nantod.2010.01.001.
- Lord, Megan S., Weiyun Yu, Bill Cheng, Anne Simmons, Laura Poole-Warren, et John M. Whitelock. 2009. « The modulation of platelet and endothelial cell adhesion to vascular graft materials by perlecan ». *Biomaterials* 30 (28): 4898-4906. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.063.
- Madou, Marc J. 2002. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization, Second Edition*. CRC Press.
- Mani, Gopinath, Marc D. Feldman, Devang Patel, et C. Mauli Agrawal. 2007. « Coronary stents: A materials perspective ». *Biomaterials* 28 (9): 1689-1710. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.042.
- McGee, Maria, et William D. Wagner. 2003. « Chondroitin Sulfate Anticoagulant Activity Is Linked to Water Transfer Relevance to Proteoglycan Structure in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (10): 1921-27. doi:10.1161/01.ATV.0000090673.96120.67.
- « Microscopie à force atomique (AFM) | Techniques de l'Ingénieur ». 2015. Consulté le décembre 2. <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses->

th1/mesures-tridimensionnelles-et-etats-de-surface-42409210/microscopie-a-force-atomique-afm-r1394/.

- Minko, Sergiy. 2008. « Grafting on solid surfaces: “Grafting to” and “grafting from” methods ». In *Polymer surfaces and interfaces*, 215- 34. Springer.
- Mirengi, L., P. A. Ramires, R. E. Pentassuglia, P. Rotolo, et A. Romito. 2000. « Growth of Human Endothelial Cells on Plasma-Treated Polyethyleneterephthalate Surfaces ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 11 (5): 327- 31. doi:10.1023/A:1008929902205.
- Moore, James E., et Joel L. Berry. 2002. « Fluid and Solid Mechanical Implications of Vascular Stenting ». *Annals of Biomedical Engineering* 30 (4): 498- 508. doi:10.1114/1.1458594.
- « Mortalité : liste sommaire des causes : Faits saillants ». 2016. Consulté le janvier 7. <http://www.statcan.gc.ca/pub/84f0209x/2009000/part-partie1-fra.htm>.
- Mwale, Fackson, Sonia Rampersad, Juan-Carlos Ruiz, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Alain Petit, John Antoniou, Sophie Lerouge, et Michael Wertheimer. 2011. « Amine-Rich Cell-Culture Surfaces for Research in Orthopedic Medicine ». *Plasma Medicine* 1 (2): 115- 33. doi:10.1615/PlasmaMed.2011003130.
- Mwale, Fackson, Hong T. Wang, Alain Petit, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Christopher J. Hunter, Jean A. Ouellet, Michael R. Wertheimer, et John Antoniou. 2007. « The Effect of Novel Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings on the Phenotypic Profile of Notochordal Cells ». *BioMedical Engineering OnLine* 6 (1): 33. doi:10.1186/1475-925X-6-33.
- Nakayama, Youichi, Takayuki Takahagi, Fusami Soeda, Kenji Hatada, Shoji Nagaoka, Jirou Suzuki, et Akira Ishitani. 1988. « XPS analysis of NH₃ plasma-treated polystyrene films utilizing gas phase chemical modification ». *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 26 (2): 559- 72. doi:10.1002/pola.1988.080260219.
- Naujoks, Nicola, et Andreas Stemmer. 2004. « Using local surface charges for the fabrication of protein patterns ». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1st International Meeting on Applied Physics, 249 (1-3): 69- 72. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.08.053.
- Noel, Samantha, Benoit Liberelle, Lucie Robitaille, et Gregory De Crescenzo. 2011. « Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces ». *Bioconjugate Chemistry* 22 (8): 1690- 99. doi:10.1021/bc200259c.
- Noel, Samantha, Benoît Liberelle, Alvaro Yogi, Maria J. Moreno, Martin N. Bureau, Lucie Robitaille, et Gregory De Crescenzo. 2013. « A Non-Damaging Chemical Amination Protocol for Poly(ethylene Terephthalate) – Application to the Design of Functionalized Compliant Vascular Grafts ». *Journal of Materials Chemistry B* 1 (2): 230. doi:10.1039/c2tb00082b.

- O'Brien, John, Ian Wilson, Terry Orton, et François Pognan. 2000. « Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity ». *European Journal of Biochemistry* 267 (17): 5421-26. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- O'Connor, John, et Brett A. Sexton. 2003. *Surface Analysis Methods in Materials Science*. Springer Science & Business Media.
- OKane, D. F., et K. L. Mittal. 1974. « Plasma cleaning of metal surfaces ». *J. Vac. Sci. Technol.* 11 (3): 567-69.
- Park, Joon, et R. S. Lakes. 2007. *Biomaterials: An Introduction*. Springer Science & Business Media.
- Pippig, Falko, Sanaa Sarghini, Andreas Holländer, Sabine Paulussen, et Herman Terryn. 2009. « TFAA Chemical Derivatization and XPS. Analysis of OH and NHx Polymers ». *Surface and Interface Analysis* 41 (5): 421-29. doi:10.1002/sia.3043.
- Pointu, Anne-Marie, Jérôme Perrin, et Jacques Jolly. 1997. « Plasmas froids de décharge - Applications et diagnostic ». *Techniques de l'ingénieur*.
- . 1998. « Plasmas froids de décharge - Propriétés électriques ». *Techniques de l'ingénieur*.
- Pu, F. R., R. L. Williams, T. K. Markkula, et J. A. Hunt. 2002. « Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro ». *Biomaterials* 23 (11): 2411-28. doi:10.1016/S0142-9612(01)00377-5.
- Rai, Ranjana, Marwa Tallawi, Alexandra Grigore, et Aldo R. Boccaccini. 2012. « Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review ». *Progress in Polymer Science*, Topical Issue on Biorelated polymers, 37 (8): 1051-78. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.02.001.
- Ramires, P. A., L. Mirengi, A. R. Romano, F. Palumbo, et G. Nicolardi. 2000. « Plasma-Treated PET Surfaces Improve the Biocompatibility of Human Endothelial Cells ». *Journal of Biomedical Materials Research* 51 (3): 535-39. doi:10.1002/1097-4636(20000905)51:3<535::AID-JBM31>3.0.CO;2-P.
- Ratner, Buddy D. 2011. « The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-First Century ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (5): 523-27. doi:10.1007/s12265-011-9287-x.
- Recek, Nina, Morana Jaganjac, Metod Kolar, Lidija Milkovic, Miran Mozetič, Karin Stana-Kleinschek, et Alenka Vesel. 2013. « Protein Adsorption on Various Plasma-Treated Polyethylene Terephthalate Substrates ». *Molecules* 18 (10): 12441-63. doi:10.3390/molecules181012441.
- Riviere, John C., et Sverre Myhra. 2009. *Handbook of Surface and Interface Analysis: Methods for Problem-Solving, Second Edition*. CRC Press.

- Ruiz, Juan-Carlos, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Florina Truica-Marasescu, et Michael R. Wertheimer. 2010. « Plasma- and vacuum-ultraviolet (VUV) photo-polymerisation of N- and O-rich thin films ». *Radiation Physics and Chemistry*, IONIZING RADIATION AND POLYMERS Proceedings of the 8th International Symposium on Ionizing Radiation and Polymers Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 12-17 October 2008, 79 (3): 310- 14. doi:10.1016/j.radphyschem.2009.08.009.
- Ruiz, Juan-Carlos, Pierre-Luc Girard-Lauriault, et Michael R. Wertheimer. 2015. « Fabrication, Characterization, and Comparison of Oxygen-Rich Organic Films Deposited by Plasma- and Vacuum-Ultraviolet (VUV) Photo-Polymerization ». *Plasma Processes and Polymers* 12 (3): 225- 36. doi:10.1002/ppap.201400146.
- Ruiz, Juan-Carlos, Amélie St-Georges-Robillard, Charles Thérésy, Sophie Lerouge, et Michael R. Wertheimer. 2010. « Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability ». *Plasma Processes and Polymers* 7 (9-10): 737- 53. doi:10.1002/ppap.201000042.
- Savoji, Houman, Afra Hadjizadeh, Marion Maire, Abdellah Ajji, Michael R. Wertheimer, et Sophie Lerouge. 2014. « Electrospun Nanofiber Scaffolds and Plasma Polymerization: A Promising Combination Towards Complete, Stable Endothelial Lining for Vascular Grafts ». *Macromolecular Bioscience* 14 (8): 1084- 95. doi:10.1002/mabi.201300545.
- Shen, Mingchao, et Thomas A. Horbett. 2001. « The Effects of Surface Chemistry and Adsorbed Proteins on Monocyte/macrophage Adhesion to Chemically Modified Polystyrene Surfaces ». *Journal of Biomedical Materials Research* 57 (3): 336- 45. doi:10.1002/1097-4636(20011205)57:3<336::AID-JBM1176>3.0.CO;2-E.
- Sigwart, Ulrich, Jacques Puel, Velimir Mirkovitch, Francis Joffre, et Lukas Kappenberger. 1987. « Intravascular Stents to Prevent Occlusion and Re-Stenosis after Transluminal Angioplasty ». *New England Journal of Medicine* 316 (12): 701- 6. doi:10.1056/NEJM198703193161201.
- Siow, Kim Shyong, Leanne Britcher, Sunil Kumar, et Hans J. Griesser. 2006. « Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review ». *Plasma Processes and Polymers* 3 (6-7): 392- 418. doi:10.1002/ppap.200600021.
- Smith, J. R., et D. A. Lamprou. 2014. « Polymer coatings for biomedical applications: a review ». *Transactions of the IMF* 92 (1): 9- 19. doi:10.1179/0020296713Z.000000000157.
- Smith, P. K., A. K. Mallia, et G. T. Hermanson. 1980. « Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations ». *Analytical Biochemistry* 109 (2): 466- 73. doi:10.1016/0003-2697(80)90679-X.
- Snyders, Rony, Oleg Zabeida, Christophe Roberges, Kirill I. Shingel, Marie-Pierre Faure, Ludvik Martinu, et Jolanta E. Klemberg-Sapieha. 2007. « Mechanism of adhesion between

- protein-based hydrogels and plasma treated polypropylene backing ». *Surface Science* 601 (1): 112- 22. doi:10.1016/j.susc.2006.09.011.
- Soletti, Lorenzo, Yi Hong, Jianjun Guan, John J. Stankus, Mohammed S. El-Kurdi, William R. Wagner, et David A. Vorp. 2010. « A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts ». *Acta Biomaterialia* 6 (1): 110- 22. doi:10.1016/j.actbio.2009.06.026.
- Stamm, Manfred. 2008. « Polymer surfaces and interfaces ». *Polymer Surfaces and Interfaces: Characterization, Modification and Applications*, ISBN 978-3-540-73864-0. Springer Berlin Heidelberg, 2008 1.
- Steele, J. G., G. Johnson, C. McFarland, B. A. Dalton, T. R. Gengenbach, R. C. Chatelier, P. A. Underwood, et H. J. Griesser. 1995. « Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas ». *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 6 (6): 511- 32. doi:10.1163/156856294X00473.
- Steele, John G., B. Ann Dalton, Graham Johnson, et P. Anne Underwood. 1995. « Adsorption of fibronectin and vitronectin onto PrimariaTM and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts ». *Biomaterials* 16 (14): 1057- 67. doi:10.1016/0142-9612(95)98901-P.
- St-Georges-Robillard, Amélie. 2012. « Couches minces organiques riches en amines primaires par photo-polymérisation ultraviolette : caractérisation et applications biomédicales ». Masters, École Polytechnique de Montréal. <https://publications.polymtl.ca/975/>.
- St-Georges-Robillard, Amélie, Juan-Carlos Ruiz, Alain Petit, Hong Tian Wang, Fackson Mwale, Bentsian Elkin, Christian Oehr, Sophie Lerouge, et Michael R. Wertheimer. 2012. « Adhesion of U-937 Monocytes on Different Amine-Functionalised Polymer Surfaces ». *Plasma Processes and Polymers* 9 (3): 243- 52. doi:10.1002/ppap.201100128.
- Sutherland, Ian, Enshan Sheng, Derek M. Brewis, et Richard J. Heath. 1994. « Studies of Vapour-Phase Chemical Derivatisation for XPS Analysis Using Model Polymers ». *Journal of Materials Chemistry* 4 (5): 683- 87. doi:10.1039/JM9940400683.
- Thalla, Pradeep K., Hicham Fadlallah, Benoit Liberelle, Pauline Lequoy, Gregory De Crescenzo, Yahye Merhi, et Sophie Lerouge. 2014. « Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants ». *Biomacromolecules* 15 (7): 2512- 20. doi:10.1021/bm5003762.
- Tibbitt, J. M., M. Shen, et A. T. Bell. 1976. « Structural Characterization of Plasma-Polymerized Hydrocarbons ». *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 10 (8): 1623- 48. doi:10.1080/00222337608060775.

- Tiraferri, Alberto, et Menachem Elimelech. 2012. « Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces ». *Journal of Membrane Science* 389 (février): 499- 508. doi:10.1016/j.memsci.2011.11.018.
- Truica-Marasescu, Florina, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Andreas Lippitz, Wolfgang E. S. Unger, et Michael R. Wertheimer. 2008. « Nitrogen-rich plasma polymers: Comparison of films deposited in atmospheric- and low-pressure plasmas ». *Thin Solid Films* 516 (21): 7406- 17. doi:10.1016/j.tsf.2008.02.033.
- Truica-Marasescu, Florina, et Michael R. Wertheimer. 2008. « Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Biomedical Applications ». *Plasma Processes and Polymers* 5 (1): 44- 57. doi:10.1002/ppap.200700077.
- Tušek, Lidija, Mirko Nitschke, Carsten Werner, Karin Stana-Kleinschek, et Volker Ribitsch. 2001. « Surface characterisation of NH₃ plasma treated polyamide 6 foils ». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 195 (1-3): 81- 95. doi:10.1016/S0927-7757(01)00831-7.
- Uchida, Emiko, Yoshikimi Uyama, et Yoshito Ikada. 1993. « Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film ». *Langmuir* 9 (4): 1121- 24. doi:10.1021/la00028a040.
- Vara, Dina S., Henryk J. Salacinski, Ruben Y. Kannan, Laurence Bordenave, George Hamilton, et Alexander M. Seifalian. 2005. « Cardiovascular tissue engineering: state of the art ». *Pathologie Biologie* 53 (10): 599- 612. doi:10.1016/j.patbio.2004.12.006.
- Vaz, C. M., S. van Tuijl, C. V. C. Bouten, et F. P. T. Baaijens. 2005. « Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique ». *Acta Biomaterialia* 1 (5): 575- 82. doi:10.1016/j.actbio.2005.06.006.
- Vedula, Ramakrishna, Swaroop Kaza, et Seshu B. Desu. 2000. « Chemical vapor deposition of polymers: Principles, materials, and applications ». *Chemical Vapor Deposition*, 243.
- Volpi, Nicola. 2006. *Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity*. Academic Press.
- . 2007. « Analytical Aspects of Pharmaceutical Grade Chondroitin Sulfates ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (12): 3168- 80. doi:10.1002/jps.20997.
- Vulic, Katarina, et Molly S. Shoichet. 2014. « Affinity-Based Drug Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration ». *Biomacromolecules* 15 (11): 3867- 80. doi:10.1021/bm501084u.
- Wagner, C. D., L. E. Davis, M. V. Zeller, J. A. Taylor, R. H. Raymond, et L. H. Gale. 1981. « Empirical Atomic Sensitivity Factors for Quantitative Analysis by Electron Spectroscopy for Chemical Analysis ». *Surface and Interface Analysis* 3 (5): 211- 25. doi:10.1002/sia.740030506.

- Wertheimer, Michael R., Amélie St-Georges-Robillard, Sophie Lerouge, Fackson Mwale, Bentsian Elkin, Christian Oehr, Werner Wirges, et Reimund Gerhard. 2012. « Amine-Rich Organic Thin Films for Cell Culture: Possible Electrostatic Effects in Cell–Surface Interactions ». *Japanese Journal of Applied Physics* 51 (11S): 11PJ04. doi:10.1143/JJAP.51.11PJ04.
- Williams, David F. 2008. « On the mechanisms of biocompatibility ». *Biomaterials* 29 (20): 2941–53. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- Williams, David Franklyn. 1987. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*. Vol. 4. Elsevier Science Limited.
- Wilson, Cameron J., Richard E. Clegg, David I. Leavesley, et Mark J. Pearcy. 2005. « Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review ». *Tissue Engineering* 11 (1-2): 1–18. doi:10.1089/ten.2005.11.1.
- Xue, Lian, et Howard P. Greisler. 2003. « Biomaterials in the development and future of vascular grafts ». *Journal of Vascular Surgery* 37 (2): 472–80. doi:10.1067/mva.2003.88.
- Yasuda, Hirotsugu, et Takeshi Yasuda. 2000. « The Competitive Ablation and Polymerization (CAP) Principle and the Plasma Sensitivity of Elements in Plasma Polymerization and Treatment ». *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 38 (6): 943–53. doi:10.1002/(SICI)1099-0518(20000315)38:6<943::AID-POLA3>3.0.CO;2-3.
- Yegen, Eda, Uwe Zimmermann, Wolfgang E. S Unger, et Thomas Braun. 2009. « C-F Bond Cleavage during Derivatization Reactions of Amino Groups with TFBA and PFB at Plasma-Processed Organic Surfaces? » *Plasma Processes and Polymers* 6 (1): 11–16. doi:10.1002/ppap.200800100.
- Zemljič, Lidija Fras, Simona Strnad, Olivera Šauperl, et Karin Stana-Kleinschek. 2009. « Characterization of Amino Groups for Cotton Fibers Coated with Chitosan ». *Textile Research Journal* 79 (3): 219–26. doi:10.1177/0040517508093592.

ANNEXE – ÉPAISSEUR ANALYSÉE PAR XPS

Les analyses effectuées par XPS, généralement par détection d'électrons éjectés normalement à la surface des échantillons, est estimée à 10 nm environ. Cette annexe a pour but d'apporter des précisions sur cette estimation, et de manière générale d'explicitier le calcul de l'épaisseur analysée en fonction de différents paramètres, et notamment l'angle de détection. Par soucis de simplicité, dans cette annexe nous ne considérerons que le cas d'échantillons organiques.

L'épaisseur de détection dépend de la capacité du photoélectron éjecté à traverser la couche de substrat qui le sépare de la surface. La grandeur caractéristique pour estimer cette capacité est le libre parcours moyen inélastique, et est propre au matériau considéré, pour une énergie cinétique donnée. Ainsi, les tables de Cumpson (Cumpson 2001) indiquent que le libre parcours moyen inélastique d'un électron possédant une énergie cinétique de 1 keV dans le polystyrène, est 3.2 nm. Pour un électron d'énergie cinétique différente, son libre parcours moyen inélastique efficace peut être calculé par l'équation (Cumpson 2001) :

$$\lambda_i = \lambda_i^{1keV} \times (E/keV)^{0.79}$$

Il est évident que le libre parcours moyen inélastique de l'électron, dépendant de son énergie cinétique, va être fonction de son élément d'origine (Tableau A.1). Ainsi, dans le cas d'un électron de cœur d'un atome de carbone contenu dans un échantillon de polystyrène, éjecté à la suite d'un rayonnement X émis par une source de magnésium ($h\nu = 1253.6$ eV), son énergie cinétique est d'environ 969 eV d'où un libre parcours moyen inélastique proche de 3.12 nm.

Tableau A.1: Libre parcours moyen inélastique dans le polystyrène, sous un rayonnement X ($h\nu=1253.6$ eV)

Élément	E_k (eV)	λ_i (nm)
C	968.6	3.12
N	854.6	2.83
O	721.6	2.47

Par une simple considération géométrique, on peut évaluer la distance parcourue par l'électron comme étant proportionnelle au cosinus de l'angle de détection $\cos\theta$. Enfin, s'agissant d'un parcours moyen, on peut estimer statistiquement l'épaisseur à laquelle on peut détecter les électrons éjectés :

$$d \approx 3\lambda_i \cos\theta$$

Les épaisseurs de détection dans le cas d'une analyse d'un échantillon de polystyrène par XPS sous rayonnement $K\alpha$ d'une source de magnésium, à divers angles de détection, sont rassemblées dans le Tableau A.2.

Tableau A.2 : Épaisseurs de détection dans le polystyrène ($h\nu=1253.6\text{eV}$)

d (nm)	Angle de détection (°)			
	0	45	70	80
C	9.36	6.62	3.20	1.63
N	8.48	6.00	2.90	1.47
O	7.42	5.25	2.54	1.29