POLYPUBLIE

Polymérisation par plasma à pression atmosphérique : caractérisation des dépôts et leurs applications en biotechnologies

Pierre-Luc Girard-Lauriault

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

Date	2009
Type	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis Thèse de doctorat/Ph.D. thesis
URL de PolyPublie PolyPublie URL	https://publications.polymtl.ca/8283/
Conditions d'utilisation Terms of use	© Tous droits réservés / All rights reserved
Référence Citation	Girard-Lauriault, P.-L. (2009). Polymérisation par plasma à pression atmosphérique : caractérisation des dépôts et leurs applications en biotechnologies [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/8283/

Détails de la thèse
Thesis details

Directeurs de recherche Advisors	Michael R. Wertheimer, & Patrick Desjardins
Programme Program	Non spécifié

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal
https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

POLYMÉRISATION PAR PLASMA À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE: CARACTÉRISATION DES DÉPÔTS ET LEURS APPLICATIONS EN BIOTECHNOLOGIES

PIERRE-LUC GIRARD-LAURIAULT
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIÆ DOCTOR
(GÉNIE PHYSIQUE)
MARS 2009

© Pierre-Luc Girard-Lauriault, 2009.

Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-49416-5
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-49416-5

NOTICE:
The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:
L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

POLYMÉRISATION PAR PLASMA À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE: CARACTÉRISATION DES DÉPÔTS ET LEURS APPLICATIONS EN BIOTECHNOLOGIES

présentée par: GIRARD-LAURIAULT Pierre-Luc

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiæ Doctor

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

M. MARTINU Ludvik, Ph.D., président

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

M. DESJARDINS Patrick, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

Mme. SANTATO Clara, Ph.D., membre

M. MANTOVANI Diego, Ph.D., membre

À mes parents, Judith et Serge,

À Marie-Julie.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus sincère reconnaissance au Professeur Michel R. Wertheimer. Au fil des ans, sa supervison bienveillante, sa rigueur et son expertise m'ont permis de mener à bien ce projet d'envergure que représente un doctorat. Je tiens aussi à le remercier pour la liberté qu'il m'a laissé, tout en étant toujours diponible pour des discussions riches, et pour les encouragements parfois bien nécessaires qu'il n'a pas hésité à me transmettre. Je veux lui témoigner ma gratitude pour les nombreuses expériences qu'il m'a permis de vivre en tant que jeune chercheur. Le Professeur Wertheimer a été pour moi un précieux guide.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Patrick Desjardins qui a codirigé ce projet. Ses conseils judicieux, son soutien constant et son regard critique et constructif ont non seulement contribué à bien définir les orientations de cette recherche, mais aussi à me faire évoluer en tant que chercheur.

Merci à Fackson Mwale et à son équipe, Alain Petit, Hong T. Wang, Mihaela Iordanova et Caroline Demers, qui m'ont initié aux techniques de culture cellulaire en plus d'avoir rendu possible une bonne partie de ce projet.

Merci à Sophie Lerouge et ses étudiantes Annie Major et Cindy Charbonneau pour leur précieuse collaboration, qui a donné du relief à ce projet.

Merci à Wolfgang E.S. Unger et Andreas Lippitz pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et m'avoir permis de réaliser d"importantes expériences en NEXAFS.

Merci à Mario Jolicoeur et à son équipe pour les collaborations fructueuses.

Merci à Suzie Poulin pour m'avoir initié aux rudiments, et même plus, de l'XPS, et pour m'avoir fait confiance en m'encourageant à travailler avec l'équipe du LASM. Je la remercie aussi pour sa grande générosité et pour son amitié.

Merci à Yves Drolet, François Barette et Gilles Jalbert pour le support technique qu'ils m'ont accordé tout au long de ce projet.

Merci à Florina Truica-Marasescu pour avoir collaboré aux travaux de cette thèse, pour ses conseils et pour son amitié.

Merci à Jean-Michel Lamarre pour son amitié, pour les discussions, pour ses précieuses corrections et aussi, pour son inimitable sens de l'humour.

Merci infiniment à ma copine Marie-Julie, pour son support constant et essentiel, pour le bonheur au quotidien et aussi, pour le temps qu'elle a consacré à la relecture des passages en français de cette thèse.

Merci à mes autres coétudians et amis, Stéphane Larouche, Bill Baloukas, Étienne Bousser, Juan-Carlos Ruiz, Nicolas Viau, Richard Vernhes et Luke MacQueen, pour leur amitié, leurs conseils, leur générosité et pour avoir animé mon quotidien au courant des dernières années.

RÉSUMÉ

Des surfaces polymères contenant de l'azote (N) chimiquement lié peuvent être utilisées à diverses fins, entre autres pour des applications biomédicales. Nous présentons ici un système de décharge à barrière diélectrique (DBD) pour déposer des polymères plasma riches en azote, désignés PP:N, en utilisant des mélanges de trois différents hydrocarbures précurseurs (méthane, éthylène et acétylène) en forte dilution dans l'azote, généralement quelques parties par mille. En guise de préparation aux études d'interactions cellules-surfaces qui suivront, la première partie de cette recherche se concentre sur l'analyse chimique des PP:N en portant une attention particulière à l'analyse (semi)-quantitative des groupements fonctionnels. Nous avons combiné plusieurs méthodes d'analyses afin d'obtenir les meilleures caractérisations chimiques et structurales possibles de ces trois familles de PP:N, dont la spectroscopie des photoélectrons X (XPS), la spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (NEXAFS), la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR), la goniométrie d'angle de contact (CAG), ainsi que l'analyse élémentaire (EA). Des concentrations d'azote élevées et variables ont été mesurées par XPS et EA (entre 6% et 25 % par EA et entre 10% et 40% par XPS, qui ne détecte pas l'hydrogène). La dérivatisation chimique à l'aide de 4-trifluoro-méthyl-benzaldéhyde (TFBA) nous a permis d'estimer les concentrations d'amines primaires, probablement les fonctionnalités les plus pertinentes, qui constituent entre 5% et 20% de l'azote total. Par la mise en commun des techniques complémentaires ci-haut mentionées, nous avons pu déterminer la formule chimique complète, le degré d'insaturation ainsi que d'autres fonctionnalités importantes comprises dans la structure chimique des PP:N. Nous croyons que plusieurs de ces analyses sont sans précédent dans la littérature sur les polymères plasma hydrocarbures, par exemple, la mesure de la composition totale (incluant l'hydrogène) et des insaturations. Nous avons démontré que, à l'exception des amines, les

nitriles, isonitriles et imines sont les principaux groupements fonctionnels azotés dans ces matériaux.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié les interactions de ces surfaces bien caractérisées avec des cellules vivantes. Nous avons tout d'abord démontré l'adhésion, pour le cas de dépôts de PP:N sur BOPP en surfaces continues, mais aussi en micromotifs, de trois différents types de cellules : les chondrocytes de plaques de croissance et articulaires, ainsi que les monocytes humains U937, ces derniers n'adhérant pas sur les surfaces de polymères synthétiques couramment utilisés en culture cellulaire. Dans l'objectif d'étudier plus en détail les mécanismes qui régissent l'adhésion cellulaire, nous avons effectué une série d'expériences où nous avons cultivé des monocytes U937 sur des PP:N ainsi que sur deux autres familles de films riches en azote et bien caractérisés, ces derniers déposés par plasma RF basse pression et par photochimie d'ultraviolets lointains (couches « PVP:N »). Nous avons d'abord démontré qu'il existe des conditions bien définies (conditions dites « critiques ») de chimie de surface nécessaires pour induire l'adhésion cellulaire. En comparant les compositions de nos diverses couches à ces conditions « critiques », nous avons pu démontrer le rôle prépondérant des amines primaires dans les mécanismes d'adhésion cellulaire. Dans un tout dernier aspect de cette recherche, nous avons effectué l'analyse quantitative de l'expression génétique de cellules U937 adhérées sur des PP:N et PVP:N durant un maximum de 24h, ceci par la technique d'amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire (RT-PCR). Nous avons observé que l'adhésion des U937 aux surfaces de PP:N et PVP:N a induit l'expression transitoire de cytokines, marqueurs de l'activation des macrophages, en plus de l'expression soutenue de PPARγ et de ICAM-I, tous deux impliqués dans l'adhésion et la rétention des monocytes.

Mots clés : biomatériaux ; décharge à barrière diélectrique (DBD) ; dépôt ; polymérisation par plasma ; ESCA/XPS ; NEXAFS ; FTIR ; amines primaires ; adhésion cellulaire ; expression génétique.

ABSTRACT

Nitrogen (N)-containing polymer surfaces are attractive in numerous technological contexts, for example in biomedical applications. Here, we have used an atmospheric-pressure dielectric barrier discharge (DBD) apparatus to deposit novel families of N-rich plasma polymers, designated PP:N, using mixtures of three different hydrocarbon precursors (methane, ethylene, and acetylene) in nitrogen at varying respective gas flow ratios, typically parts per thousand. In preparation for subsequent cell-surface interaction studies, the first part of this research focuses on the chemical mapping of those materials, with specific attention to (semi)-quantitative analyses of functional groups. Well-established and some lesser-known analytical techniques have been combined to provide the best possible chemical and structural characterisations of these three families of PP:N thin films ; namely, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), contact angle goniometry (CAG), and elemental analysis (EA). High, « tunable » total nitrogen content was measured by both XPS and EA (between 6% and 25% by EA, or between 10% and 40% by XPS, which cannot detect hydrogen). Chemical derivatisation with 4-trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA) enabled measurements of primary amine concentrations, the functionality of greatest bio-technological interest, which were found to account for 5 % to 20 % of the total bound nitrogen. By combining the above-mentioned complementary methods, we were further able to determine the complete chemical formulae, the degrees of unsaturation, and other major chemical functionalities in PP:N film structures. Several of these features are believed to be without precedents in the literature on hydrocarbon plasma polymers, for example measurements of absolute compositions (including hydrogen), and of unsaturation. It was shown that besides amines, nitriles, isonitriles and imines are the main nitrogenated functional groups in those materials.

In a second part of this work, we have studied the interraction of these well-characterised surfaces with living cells. We have first demonstrated the adhesion, on both uniformly coated and micro-patterned PP:N deposits on BOPP, of three diffrent cell types, namely, growth plate and articular chondrocytes, as well as U937 monocytes, the latter of which do not adhere at all to synthetic polymers used in tissue culture. In an effort to gain insight into cell adhesion mechanisms, we conducted a series of experiments where we cultured U937 monocytes on PP:N, as well as on two other families of chemically well-caracterised N-rich thin films, the latter deposited by low pressure RF plasma and by vacuum ultra-violet (VUV) photo-polymerisation (« PVP:N » films). It was first shown that there exist sharply-defined (« critical ») surface-chemical conditions that are necessary to induce cell adhesion. By comparing the extensively-characterised film chemistries at the « critical » conditions, we have clearly demonstrated the dominant role of primary amines in the cell adhesion mechanism. In the final aspect of this work, quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) experiments were conducted using U937 cells that had been made to adhere on PP:N and PVP:N materials for up to 24h. We have shown that the adhesion of U937 monocytes to PP:N and PVP:N surfaces induced a transient expression of cytokines, markers of macrophage activation, as well as a sustained expression of PPARγ and ICAM-I, implicated in the adhesion and retention of monocytes.

Keywords : biomaterials ; dielectric barrier discharges (DBD) ; deposition ; plasma polymerisation ; ESCA/XPS ; NEXAFS ; FTIR ; primary amines ; cell adhesion ; gene expression.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iv

REMERCIEMENTS v

RÉSUMÉ vii

ABSTRACT x

TABLE DES MATIÈRES xii

LISTE DES FIGURES xvii

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES xxi

LISTE DES TABLEAUX xxxi

LISTE DES ANNEXES xxxiii

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 LES PLASMAS, LES POLYMÈRES PLASMA ET LEURS APPLICATIONS BIOMÉDICALES 12

1.1 Physico-chimie des plasmas et de la polymérisation par plasma . . 12

1.1.1 Décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique . 18

1.1.2 La physico-chimie des décharges à barrière diélectrique . . . 20

1.1.3 Bases de la polymérisation par plasma 23

1.1.3.1 Mécanismes et cinétique de la polymérisation par plasma 25

1.1.3.2 Choix des « monomères » précurseurs 26

1.1.4 Particularités de la polymérisation par plasma à pression atmosphérique 30
1.2 Les fonctionnalisations de surfaces polymériques par plasma et procédés analogues 32
1.2.1 Plasma à basse pression 33
1.2.2 Plasma à pression atmosphérique (« DBD » et « APGD ») 36
1.2.3 Photochimie d'ultraviolet lointain (« VUV ») 38
1.3 Applications biomédicales des polymères plasma 39
1.4 Applications biomédicales des PP:N 44
1.4.1 Applications des PP:N en orthopédie 44
1.4.2 Applications des PP:N aux thérapies endovasculaires 46

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE 48
2.1 Dépôts de couches minces riches en azote 48
2.1.1 Dépôts par plasma à pression atmosphérique 49
2.1.2 Autres méthodes 51
2.1.3 Préparation de couches minces avec motifs micrométriques . 52
2.2 Stratégie de caractérisation des matériaux 53
2.2.1 Caractérisation spécifique à la surface 63
2.2.1.1 Spectroscopie des photoélectrons-X (XPS) 63
2.2.1.1.1 Dérivation chimique pour la quantification des groupements fonctionnels 76
2.2.1.2 Spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (NEXAFS) . 79
2.2.1.3 Goniométrie d'angle de contact (CAG) 83
2.2.1.4 Microscopie à force atomique (AFM) 87
2.2.2 Autres caractérisations des matériaux 89

2.2.2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) 89
2.2.2.2 Analyse élémentaire 99
2.3 Cultures cellulaires 102
2.3.1 Test d'adhésion cellulaire 103
2.3.2 Analyse de l'expression génétique par amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire (RT-PCR) 103

CHAPITRE 3 DÉPÔT ET CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE POLYMÈRES PLASMA RICHES EN AZOTE DÉPOSÉS PAR DÉCHARGE À BARRIÈRE DIÉLECTRIQUE À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE 108
3.1 Article 1 : Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned Nitrogen-rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering 110
3.1.1 Introduction 111
3.1.2 Experimental Methodology 112
3.1.2.1 Deposition of PPE:N and Micropatterning 112
3.1.2.2 Materials Characterisation 115
3.1.2.3 Cell Culture 116
3.1.3 Results and Discussion 117
3.1.3.1 Material Characteristics 117
3.1.3.2 Cell Culture 122
3.1.4 Conclusion 127
3.2 Article 2 : Chemical Characterisation of Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films Deposited in Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure 128
3.2.1 Introduction 129
3.2.2 Experimental Methodology 130

3.2.2.1 Deposition of PP:N Coatings 130
3.2.2.2 Characterisation Studies 132
3.2.2.2.1 XPS and Chemical Derivatisation 133
3.2.2.2.2 NEXAFS Spectroscopy 134
3.2.2.2.3 Elemental Analyses (EA) 134
3.2.2.2.4 Infrared Spectroscopy 136
3.2.3 Results and Discussion 139
3.2.3.1 Elemental Compositions 139
3.2.3.2 Chemical Functionalities 142
3.2.3.2.1 XPS and Chemical Derivatisation 142
3.2.3.2.2 NEXAFS Spectroscopy 144
3.2.3.2.3 Infrared Spectroscopy 150
3.2.3.3 Stability of PP:N Coatings 154
3.2.4 General Discussion and Conclusions 159

CHAPITRE 4 ADHÉSION DE MONOCYTES HUMAINS U937 SUR DES COUCHES MINCES ORGANIQUES RICHES EN AZOTE : ÉTUDE DES MÉCANISMES D'ADHÉSION CELLULAIRE 164

Article 3 : Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-rich Organic Thin Films : Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion 165

4.1 Introduction 166
4.2 Materials and Methods 169
4.2.1 Deposition of H-PPY:N Coatings 169
4.2.2 Deposition of L-PPE:N Coatings 170
4.2.3 Deposition of VUV-PY:N Coatings 172
4.2.4 Chemical Characterisation 173
4.2.5 Cell culture and real-time RT-PCR 174
4.3 Results and Discussion 177

4.3.1 Chemical Characteristics of the Films 177
4.3.2 Critical Adhesion Conditions 182
4.3.3 RT-PCR studies 183
4.3.3.1 Expression of cytokine related genes 185
4.3.3.2 Expression of PPAR-γ and ICAM-I 185
4.3.3.3 Expression of Transcription Factors PU.1 and Egr-1 187
4.4 General Discussion and Conclusions 190
4.5 Acknowledgements 191

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES. 192

BIBLIOGRAPHIE 203

ANNEXES 231

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 Différentes configurations des décharges à barrière diélectrique. 19

FIGURE 1.2 Formation d'un « streamer ». 21

FIGURE 1.3 Concept général de formation des polymères plasma. 25

FIGURE 1.4 Structure modèle d'un polymère plasma d'éthylène. 29

FIGURE 1.5 Adhésion cellulaire sur un substrat. 41

FIGURE 1.6 Schéma représentant les différentes avenues de développement de polymères plasma appliquées aux biomatériaux. . . 43

FIGURE 1.7 Analyse RT-PCR du collagène X (marqueur « ostéoblaste » indésirable) exprimé par des MSC en culture sur nos polymères plasma contenant différentes concentrations d'azote en surface. 46

FIGURE 2.1 Schéma du système de dépôt DBD. 49

FIGURE 2.2 Photomicrographies des masques et des dépôts en motifs micrométriques. 54

FIGURE 2.3 Photoémission (XPS) et processus de relaxation subséquents se produisant lors de l'expérience XPS. 66

FIGURE 2.4 Schéma d'un instrument XPS. 68

FIGURE 2.5 Spectre XPS du poly(phenoxyphosphazene) excité par une radiation AlKα monochromatisée. 71

FIGURE 2.6 Spectre du pic de photoélectron C 1s du poly(actetylacetoxyethyl methacrylate). 73

FIGURE 2.7 Représentation schématique de l'absorption X présentant les mécanismes de génération du spectre NEXAFS. 81

FIGURE 2.8 Montage expérimental pour le NEXAFS et sa ligne de faisceau. Synchrotron BESSY II à Berlin, Allemagne. 83

FIGURE 2.9 Schéma simplifié d'un instrument AFM. 88

FIGURE 2.10 Schéma simplifié d'un spectromètre IR à transformée de Fourier. 93
FIGURE 2.11 Réflections totales internes du faisceau en spectroscopie ATR-FTIR. 94
FIGURE 2.12 Schéma de la cellule IR liquide. 99
FIGURE 2.13 Schéma du montage d'analyse et description du procédé d'analyse élémentaire par combustion. 100
FIGURE 2.14 Le processus de transcription et de réplication en RT-PCR. 105
FIGURE 3.1 Schematic diagram of the DBD plasma deposition system. . 114
FIGURE 3.2 Dependence of [N] in PPE:N films on the C_2H_4 monomer flow rate. 119
FIGURE 3.3 ATR-FTIR spectrum of a 29.5% [N] PPE:N film. 120
FIGURE 3.4 High resolution N1s XPS spectrum of a 29.5% [N] PPE:N film. 121
FIGURE 3.5 Surface energy variation with [N] in PPE:N films. 121
FIGURE 3.6 PPE:N thin film micropatterning 122
FIGURE 3.7 Cell culture and micropatterning on BOPP substrates : Cell adherence to PPE:N coatings on partially-masked BOPP surfaces. 124
FIGURE 3.8 Adhesion of U937 macrophages and of growth plate chondrocytes to PPE:N films of varying [N]. 125
FIGURE 3.9 Concentrations of nitrogen, [N] in at.%, determined by XPS, versus gas flow ratio, X, for the three PP:N families : PPM:N, PPE:N, and PPA:N. 140
FIGURE 3.10 Concentrations (in at.%) of all constituent elements of PP:N films, as determined by Elemental Analysis (« EA »), versus the gas flow ratio, X. 141
FIGURE 3.11 The unsaturation parameter, I, versus gas flow ratio, X, for the three PP:N families : PPM:N, PPE:N, and PPA:N. . . . 143

FIGURE 3.12 Contribution of primary amines to the total nitrogen content, $[NH_2]/[N]$, the so-called « amine selectivity », and the total amine content, $[NH_2]$, based on XPS analyses, both versus gas flow ratio, X. 144

FIGURE 3.13 Carbon K-edge NEXAFS spectra of : reference polymers, PEI and PAN ; PPM:N ; PPE:N ; and PPA:N samples. 146

FIGURE 3.14 Nitrogen K-edge NEXAFS spectra of : reference polymers, PEI and PAN ; PPM:N ; PPE:N ; and PPA:N samples. . . . 147

FIGURE 3.15 Selected integrated NEXAFS resonance areas for different PP:N films, versus gas flow ratios, X. 149

FIGURE 3.16 Transmission infrared spectra from KBr pellet samples : PPM:N ; PPE:N ; PPA:N. 152

FIGURE 3.17 Deconvolution of peaks in the IR absorption band assigned to nitriles / isonitriles, centred near 2200 cm^{-1}. 154

FIGURE 3.18 Absorbance peak areas under the IR absorption band near 2200 cm^{-1} versus concentrations of nitile, [CN], and isonitrile groups, [NC], for the case of reference materials, PAN and TOSMIC, respectively. 155

FIGURE 3.19 Relative (semi-quantitative) concentrations of nitrileand isonitrile groups, versus gas flow ratio, X, for the three PP:N families : PPM:N , PPE:N and PPA:N 155

FIGURE 3.20 Time-evolutions of the compositions of three selected PP:N samples. 158

FIGURE 3.21 Composite plot of IR and NEXAFS data : IR data corresponding to relative concentrations of nitrile groups in samples from the three PP:N families, versus X, are superimposed on the corresponding integrated NEXAFS resonance areas . . . 161

FIGURE 4.1 Schematic views of PVP:N deposition systems used. 171

FIGURE 4.2 Concentrations of chemically-bonded nitrogen, [N], in at.-%, as determined by XPS. 179
FIGURE 4.3 Contributions of primary amines to the total nitrogen content, $[NH_2]/[N]$ (in %), the so-called « amine selectivity » and the total amine content per 100 atoms measured by XPS, $[NH_2]$ (in %) 181
FIGURE 4.4 Optical micrographs demonstrating the effect of $[N]_{crit}$ on the adhesion of U937 monocyte cells. 182
FIGURE 4.5 Quantification of $[N]_{crit}$ in the adhesion experiments involving U937 cells. 184
FIGURE 4.6 Expression of cytokines in U937 monocytes. 186
FIGURE 4.7 Expression of PPARγ and ICAM-I in U937 monocytes. . . . 188
FIGURE 4.8 Expression of PU.1 and Egr-1 in U937 monocytes. 189

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES

Acronymes

AAA	Anévrismes aortiques abdominaux
ADN	Acide désoxyribonucléique, Deoxyribonucleic Acid (DNA)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire, Complementary Deoxyribonucleic Acid (cDNA)
AES	Spectroscopie par émission Auger, Auger Emission Spectroscopy
AFM	Microscopie à force atomique, Atomic Force Microscopy
APGD	Décharge homogène à pression atmosphérique, Atmospheric Pressure Glow Discharge
ARN	Acide ribonucléique, Ribonucleic Acid (RNA)
ARNm	Acide ribonucléique messager, Messenger Ribonucleic acid (mRNA)
ARXPS	XPS résolue angulairement, Angle-resolved XPS
ATR	Rélection totale atténuée, Attenuated Total Reflectance
CAG	Goniométrie d'angle de contact, Contact Angle Goniometry
CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)
DBD	Décharge à barrière diélectrique, Dielectric Barrier Discharge
DMEM	Milieu de Eagle modifiée par Dulbecco, Dulbecco's Modified Eagle medium
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
DTGS	Sulphate de triglycine deutéré, Deuterated Triglycine Sulphate
EA	Analyse élémentaire, Elemental Analysis
ECM	Matrice extra-cellulaire, Extracellular Matrix

EELS	Spectroscopie de pertes d'énergie des électrons, Electron Energy Loss Spectroscopy
ESCA	Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique, Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
FBS	Sérum de veau foetal, Foetal Bovine Serum
FQRNT	Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FY	Rendement de fluorescence, Fluorescence Yield
GPC	Chromatographie d'exclusion stérique sur gel, Gel permeation chromatography
HV	Haut voltage, High Voltage
IR	Infrarouge
IRSC	Instituts de recherche en santé du Canada, Canadian Institutes of Health Research (CIHR)
LMWOM	Matériaux oxydés de faible poids moléculaire, Low Molecular Weight Oxidized Materials
LUMO	Orbitale antiliante libre de plus basse énergie, Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MSC	Cellules souches mésenchymateuses, Mesenchymal Stem Cells
NEXAFS	Spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X, Near-Edge X-ray Absorption Fine Structure
PBP	Plasma basse pression
PCR	Amplification en chaîne par polymérase, Polymerase Chain Reaction
PEY	Rendement électronique partiel, Partial Electron Yield

RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire, Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
RT-PCR	Amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TEY	Rendement électronique total, Total Electron Yield
ToF-SIMS	Spectrométrie de masse d'ions secondaires en temps de vol, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy
UPS	Spectroscopie des photoélectrons ultraviolets, Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy
UV	Ultraviolet
UV-C	Ultraviolet-C
VASE	Ellipsomètre spectroscopique à angle variable, Variable-Angle Spectroscopic Ellipsometer
VUV	Ultraviolet lointain, Vacuum Ultraviolet
XPS	Spectroscopie des photoélectrons X, X-Ray Photoelectron Spectroscopy
XRF	Fluorescence X, X-Ray Fluorescence

Symboles

A	Absorbance
B	Nombre de liens dans la formule chimique à 100 atomes.
c	Concentration de l'analyte
d	Distance interélectrode
d	Épaisseur de la couche
e	Charge électronique

E_b	Énergie de liaison
E_c	Champ électrique généré par les charges accumulées
E_{ext}	Champ électrique appliqué
E_k	Énergie cinétique
E_p	Énergie d'un photon
E_{ref}	Efficacité de transcription PCR du gène de référence
E_{target}	Efficacité de transcription PCR du gène visé
E_{vide}	Énergie d'un électron dans le vide
eV	Électron-volt
F_x	Débit du gaz x
FSR_{ij}	Facteur de sensibilité relative d'une orbitale j d'un élément i
h	Heure
h	Constance de Planck
I	Degré d'insaturation
I_{ij}	L'aire sous le pic d'une orbitale j d'un élément i
k_b	Constante de Boltzmann
l	Parcours optique
m_e	Masse de l'électron
m_i	Masse d'un ion
$M_{w,1N}$	Masse moléculaire de l'unité contenant 1 atome d'azote
n	Indice de réfraction
n_e	Densité électronique
n_e	Densité des neutres
n_i	Densité ionique
n_i	La concentration en surface de l'élément i
p	Pression

P	Puissance
r	Rayon
r_g	Rayon des espèces gazeuses neutres
R	Ratio des gaz précurseurs (à basse pression)
s	Seconde
sccm	Centimètre cube standard par minute, Standard Cubic Centimeter per Minute
slm	Litre standard par minute, Standard Liter per Minute
T_e	Température électronique
T_m	Température de dénaturation
V_{eff}	Tension effective
W_x	Masse de l'espèce x
X	Ratio des gaz précurseurs (à pression atmosphérique)
z	Profondeur d'analyse
[E]	Concentration de l'espèce E

γ	Énergie de surface
γ^d	Composante dispersive de l'énergie de surface
γ^p	Composante polaire de l'énergie de surface
γ_l	Énergie de surface d'un liquide
γ_{lv}	Énergie d'interface liquide - vapeur
γ_s	Énergie de surface d'un solide
γ_{sl}	Énergie d'interface solide - liquide
γ_{sv}	Énergie d'interface solide - vapeur
γ_l^d	Composante dispersive de l'énergie de surface d'un liquide
γ_s^d	Composante dispersive de l'énergie de surface d'un solide

γ_l^p	Composante polaire de l'énergie de surface d'un liquide
γ_s^p	Composante polaire de l'énergie de surface d'un solide
ΔCP	Différence des points de croisements
ΔE_b	Déplacement chimique en XPS
ϵ	Coefficient d'absorption molaire
ϵ_o	Permitivité du vide
θ	Angle de collection des électrons dans l'analyseur
θ	Angle de contact
λ_D	Longueur de Debye
λ_e	Libre parcours moyen des électrons
λ_g	Libre parcours moyen des espèces gazeuses neutres
λ_{ij}	Libre parcours moyen inélastique des électrons dans l'orbitale j d'un élément i
ν	Fréquence
ρ_{KBr}	Densité du bromure de potassion
σ_{ij}	Section efficace de photoionisation de l'orbitale j d'un élément i
ϕ	Fonction de travail du spectromètre

Formules et abréviations chimiques

BOPP	Poly(propylène) étiré bi-axialement, Biaxially Oriented Poly(propylene)
DACH	Diaminocyclohexane
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
PAN	Poly(acrylonitrile)

PE	Poly(éthylène)
PET	Poly(éthylènetéréphtalate)
PFBA	Pentafluoro benzaldéhyde
PP	Poly(propylène)
PS	Poly(styrène)
PTFE	Poly(tétrafluoroéthylène)
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
TFBA	Trifluoro benzaldéhyde
TOSMIC	Toluènesulfonylmethylisocyanure

-C=C-	Alkenyl
-C≡N	Nitrile
-C=N-	Imine
-COOH	Acide carboxylique
-N≡C	Isonitrile
$-NH_2$	Amines primaires
-OH	Alcool

C_xH_y	Hydrocarbure
CH_4	Méthane
C_2H_2	Acétylène
C_2H_4	Éthylène
KBr	Bromure de potassium
N_2	Azote moléculaire
O_2	Oxygène moléculaire

Gènes

ALP	Alkaline phosphatase
BSP	Sialoprotéine osseuse, Bone Sialoprotein
Erg-1	Facteur de transcription Erg-1
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1, Intercellular Adhesion Molecule-1
IL-1β	Interleukin-1-β
OC	Ostéocalcine, Osteocalcine
PPARγ	Facteur activé de prolifération des peroxysomes-γ, Peroxisome Proliferators-Activated Receptor-γ
PU.1	Facteur de transcription PU.1
TNF-α	Facteur nécrosant des tumeurs-α, Tumour Necrosis Factor-α,

Acronymes utilisés pour les matériaux étudiés dans cette thèse

Dans l'ensemble de la thèse

PP:N	Polymère plasma riche en azote déposé à pression atmosphérique

Dans l'article 1

PPE:N	Polymère plasma riche en azote déposé à pression atmosphérique à partir d'éthylène

Dans l'article 2

H-PPE:N	Idem à PPE:N

L-PPE:N Polymères plasma riches en azote déposés à basse pression à partir d'éthylène

PP:N Polymères plasma riches en azote désposés à pression atmosphérique

PPA:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir d'acétylène

PPE:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir de méthane

PPM:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir d'éthylène

Dans l'article 3

PVP:N Couches minces organiques riche en azote déposées par plasma ou par photochimie d'ultraviolet lointain

H-PPY:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique

L-PPY:N Polymères plasma riches en azote déposés à basse pression

VUV-PY:N Couches minces organiques déposées par photochimie d'ultraviolet lointain

PPE:N Polymères plasma riches en azote déposés à basse ou à pression atmosphérique à partir d'éthylène

H-PPA:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir d'acétylène

H-PPE:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir de méthane

H-PPM:N Polymères plasma riches en azote déposés à pression atmosphérique à partir d'éthylène

L-PPE:N	Polymères plasma riches en azote déposés à basse pression à partir d'éthylène
VUV-PE:N	Couches minces organiques déposées par photochimie d'ultraviolet lointain à partir d'éthylène
VUV-PM:N	Couches minces organiques déposées par photochimie d'ultraviolet lointain à partir de méthane

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 Publications de l'auteur reliées aux travaux présentés dans cette thèse. 6

TABLEAU 1.1 Énergies de liaison et enthalpies de formation de radicaux libres. 14

TABLEAU 1.2 Comparaison des caractéristiques des DBD et des décharges RF à basse pression. 24

TABLEAU 2.1 Comparaison des techniques de dépôt de couches minces riches en azote (PP:N et UV-P:N). 53

TABLEAU 2.2 Groupements fonctionnels azotés pouvant potentiellement être présents dans les PP:N. 55

TABLEAU 2.3 Groupements fonctionnels contenant de l'azote et de l'oxygène, pouvant potentiellement paraître en faibles concentrations dans les PP:N 57

TABLEAU 2.4 Groupements fonctionnels contenant de l'oxygène, pouvant aussi potentiellement paraître en faibles concentrations dans les PP:N 59

TABLEAU 2.5 Groupements fonctionnels contenant seulement du carbone et de l'hydrogène pouvant potentiellement être présents dans les PP:N. 61

TABLEAU 2.6 Principales techniques de caractérisation de la surface des matériaux et leur profondeur de sonde respective 64

TABLEAU 2.7 Agents de dérivation chimique et les groupements fonctionnels qu'ils quantifient. 77

TABLEAU 2.8 Tensions de surface totales (γ_l), dispersives (γ_l^d) et polaires (γ_l^p) utilisées pour déterminer l'énergie de surface des PP:N. 86

TABLEAU 2.9 Positions des bandes IR correspondant aux groupements fonctionnels azotés constituant potentiellement les PP:N. 91
TABLEAU 3.1 Solubility of PP:N deposits in common organic solvents. . . 156
TABLEAU 4.1 Primer sequences and sizes of PCR products for LightCycler™ experiments 177

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I SUPPRESSION OF GENES RELATED TO HYPERTROPHY AND OSTEOGENESIS IN COMMITTED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED ON NOVEL NITROGEN-RICH PLASMA POLYMER COATINGS . . 231

ANNEXE II NITROGEN-RICH COATINGS FOR PROMOTING HEALING AROUND STENT-GRAFTS AFTER ENDOVASCULAR ANEURYSM REPAIR 241

INTRODUCTION

On rapporte que le célèbre physicien et prix Nobel Wolfgang Pauli a affirmé que « Le matériau massif est l'oeuvre de Dieu, mais la surface, celle du Diable », illustrant ainsi la grande complexité de cette entité et de son étude. La surface de tout matériau possède des propriétés qui diffèrent grandement de celles du reste du matériau massif ; étant l'extrême limite d'un matériau, les atomes ou les molécules qui la constituent ne sont pas symétriquement entourés d'autres atomes ou molécules identiques, puiqu'ils sont partiellement exposés à un milieu ambiant. L'équilibre thermodynamique qui s'y établit force donc un arrangement différent de celui du matériau massif. Cette fraction particulière du matériau, bien qu'elle constitue une partie infime de sa masse totale, sera déterminante pour certaines de ses propriétés et pour les applications qui impliquent un contact avec un autre matériau.

Plusieurs champs de recherche sont axés sur la modification sélective des propriétés de surface d'un matériau ayant des propriétés de masse désirables (mécaniques, par exemple) mais dont la surface n'est pas adéquate pour une application visée. Les polymères synthétiques, qui sont solides, durables, résistants à la corrosion et relativement peu coûteux et qui sont, par conséquent, utilisés pour diverses applications, en sont un bon exemple. Cependant, ils ont une faible énergie de surface et sont donc peu « mouillables », ce qui limite l'adhésion de divers recouvrements (par exemple une peinture) ainsi que leur biocompatibilité en contact avec des cellules vivantes. Il existe plusieurs techniques permettant de modifier la surface de ces matériaux polymères sans altérer leurs autres caractéristiques de masse désirables [1]. Ces techniques impliquent le traitement de la surface à l'aide d'un réactif chimique en phase liquide, d'un faisceau ionique, d'une radiation ionisante, d'une flamme ou d'un plasma, ou encore le dépôt d'une couche mince fonctionnelle recouvrant la surface du polymère d'une nouvelle surface, organique ou non, ayant des propriété-

tés désirables. Ces dépôts sont fréquemment créés à l'aide de techniques plasma, car ces dernières peuvent aisément produire des surfaces dont les propriétés sont distinctes et indépendantes de celles de la surface originale.

Les matériaux polymères sont largement utilisés en biotechnologies, pour des applications allant du simple substrat de culture cellulaire jusqu'à des dispositifs complexes et coûteux visant à être implantés dans le corps humain pour de longues périodes, tels les implants vasculaires ou orthopédiques. Les polymères utilisés pour ces applications ont généralement des surfaces réfractaires à l'adhésion et à la prolifération cellulaire, ce qui est, dans la plupart des cas, une caractéristique indésirable. Une modification de la surface de ces matériaux, spécifique à l'application visée, peut nettement améliorer la performance d'un tel dispositif. La plupart du matériel de culture cellulaire disponible commercialement est d'ailleurs modifié à l'aide d'un traitement « corona » et même par plasma à basse pression, comme c'est le cas pour « Primaria^{TM} » qui est un polystyrène à la surface duquel des fonctions azotées et oxygénées sont incorporées [2].

La présente recherche s'inscrit dans cette lignée d'applications biomédicales et vise le développement de nouveaux matériaux organiques en couches minces, déposés par plasma à pression atmosphérique. Elle fait suite à plusieurs travaux antérieurs, conduits dans nos laboratoires [3–8], alors que d'autres sont effectués en parallèle [9–13]. Par contre, nos travaux se distinguent par la méthode utilisée pour y arriver : modifications de surface et dépôts par des techniques plasma à basse ou haute pression ou encore par photochimie à l'aide de photons ultraviolets lointains (VUV) ; toutes ces recherches ont le même objectif, soit l'amélioration des propriétés de surface (« mouillabilité », groupements fonctionnels) de matériaux polymères, surtout pour des applications biomédicales.

Les modifications de surfaces des polymères solides pour les applications biomédi-

cales passent généralement par l'incorporation de groupements fonctionnels désirables à la surface. En effet, les interactions entre les cellules vivantes et les surfaces passent par l'intermédiaire de protéines qui iront se lier, physiquement ou chimiquement, à la surface via certains groupements fonctionnels, tel que cela se produit *in vivo*. Plusieurs travaux ont démontré l'importance de certains groupements fonctionnels spécifiques, contenant généralement des atomes d'azote ou d'oxygène (et capables de faire des ponts hydrogène), pour stimuler l'adhésion ou la différenciation de cellules [14–20]. Dans plusieurs cas, il a été prouvé que les fonctions azotées, probablement des amines primaires, avaient la plus forte influence sur les processus cellulaires.

L'incorporation de fonctions azotées à la surface d'un substrat polymère pour accroître sa biocompatibilité peut se faire par les techniques mentionnées dans les paragraphes précédents. Certains auteurs ont déjà rapporté l'incorporation d'azote à la surface par l'exposition à un plasma froid d'ammoniac (NH_3) ou d'azote (N_2) [3, 4, 21–32]. La simple modification de surface est fréquemment la solution la moins compliquée à un problème technologique impliquant une chimie ou une énergie de surface « inadéquate » ; cependant, elle est sujette à un « vieillissement » assez rapide, à une concentration de fonctionnalités chimiques incorporées limitée et la nature de la modification dépend fortement du type de surface initiale. D'autres auteurs ont exploré le dépôt de couches minces de polymères plasma, souvent déposé à partir de « monomères » précurseurs, par exemple l'allylamine, qui contiennent déjà les fonctions azotées désirées [33–46]. Une autre approche est la « copolymérisation » d'un « monomère », par exemple l'éthylène (C_2H_4), avec NH_3 ou N_2 [9, 47, 48], méthode que nous avons adopté dans cette recherche. Selon les conditions de dépôt, il est possible de conserver en partie la structure du « monomère » utilisé et ainsi d'exercer un certain contrôle sur la nature des fonctions chimiques incorporées dans le polymère plasma. Ces couches minces ont généralement une

structure fortement réticulée, ce qui limite le problème du vieillisement, attribué à une « disparition » des groupes polaires en dessous de la surface par « réptation » des macromolécules. Les polymères plasma (ainsi que les modifications de surfaces), la physico-chimie qui dirige leur dépôt, ainsi que les applications biomédicales seront présentés en détails dans le chapire 1.

Dans le cadre des recherches menées par notre équipe, nous avons initié quelques collaborations avec des laboratoires oeuvrant directement dans le secteur bio-médical dans diverses problématiques. Celles-ci seront décrites en détail à la section 1.3 et elles impliquent des objectifs orientés vers l'amélioration de thérapies médicales (orthopédiques et cardio-vasculaires). Les premières problématiques nous ont été présentées par le groupe du professeur Mwale de l'Université McGill, travaillant de concert avec des chirurgiens orthopédistes : les substrats de culture disponibles commercialement ne permettent pas de cultiver certains types de cellules (monocytes humains U937, chondrocytes de plaques de croissance et de cartilage articulaire, cellules souches mésenchymateuses) adéquatement pour leurs types de recherches. En effet, puisque la surface du polystyrène (ex. « Primaria » [2]) utilisée pour la culture cellulaire est très différente de leurs environnements *in vivo*, ces cellules réagissent aussi différemment et il est donc impossible de les étudier de manière adéquate. La conception d'une surface à la chimie adéquate est une solution potentielle pour résoudre ces problèmes. Le deuxième type de problématique sur laquelle nous avons travaillé nous a été apportée par le groupe de la professeure Lerouge du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), groupe qui travaille dans le domaine des thérapies cardio-vasculaires. Par exemple, des implants endovasculaires, faits de Dacron® ou de Teflon® sont utilisés, entre autres, pour canaliser le flux sanguin à travers des anévrismes aortiques abdominaux (« AAA ») et ainsi réduire la pression exercée sur ceux-ci et empêcher leur rupture. Les matériaux constituant ces implants (dits « stent-grafts ») sont cependant réfractaires à l'adhésion cellulaire

et favorisent l'apoptose des cellules en contact avec eux, ce qui a pour conséquence d'empêcher la guérison autour de l'implant. Une modification de la chimie de la surface extérieure des « stent-grafts » est proposée pour régler ce problème. Bien que notre objectif soit de créer des matériaux versatiles pouvant servir à résoudre plusieurs problématiques, ces deux types de défis spécifiques nous ont aidé à orienter notre recherche. La collaboration a été particulièrement intensive et polyvalente avec le groupe du professeur Mwale et plusieurs expériences conjointes figurent dans cette thèse. L'ensemble des nombreuses publications scientifiques découlant des travaux présentés dans cette thèse est présenté dans le tableau 1.

Objectifs spécifiques de la recherche

La recherche présentée dans cette thèse s'articule autour de quatre objectifs principaux, dont trois spécifiques et un objectif plus général et étudié largement en parallèle de cette thèse (le dernier de la liste qui suit) :

1) Le développement d'une méthode de dépôt de couches minces fonctionnelles riches en azote et en amines primaires, par une technique novatrice (plasma à pression atmosphérique). Ces nouvelles couches s'avèreront un ajout significatif à la banque de matériaux analogues déjà existants.

2) La caractérisation exhaustive de ces couches minces grâce à l'utilisation conjointe de plusieurs techniques de caractérisation, certaines étant fréquemment utilisés dans le domaine, alors que d'autres sont nouvelles ou spécialement adaptées aux couches minces. L'accent est mis sur l'analyse quantitative ou semi-quantitative des groupements fonctionnels, qui sont les médiateurs proposés des interactions cellules-surfaces.

3) L'utilisation de ces matériaux chimiquement bien caractérisés pour comprendre

TABLEAU 1 Publications de l'auteur reliées aux travaux présentés dans cette thèse.

	Titre	Auteurs	Revue, année	Dans cette thèse
1	Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering*	P.-L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. Demers, P. Desjardins and M.R. Wertheimer	Plasma Processes and Polymers, 2005	Section 3.1 [49]
2	Chemical Characterisation of Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films Deposited in Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure*	P.-L. Girard-Lauriault, P. Desjardins, W.E.S. Unger, A. Lippitz and M.R. Wertheimer	Plasma Processes and Polymers, 2008	Section 3.2 [50]
3	Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-rich Organic Thin Films : Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion*	P.-L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H.T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale and M.R. Wertheimer	Macromolecular Bioscience, accepté	Chapitre 4 [51]
4	Suppression of Genes Related to Hypertrophy and Osteogenesis in Committed Human Mesenchymal Stem Cells Cultured on Novel Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings	F. Mwale, P.-L. Girard-Lauriault, H.T. Wang, S. Lerouge, J. Antoniou and M.R. Wertheimer	Tissue Engineering, 2006	Annexe I [52]
5	Nitrogen-Rich Coatings for Promoting Healing Around Stent-Grafts After Endovascular Aneurysm Repair	S. Lerouge, A. Major, P.-L. Girard-Lauriault, M.-A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M.R. Wertheimer and M.-J. Hebert	Biomaterials, 2007	Annexe II [53]
6	The Effect of Novel Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings on The Phenotypic Profile of Notochordal Cells	F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, C.J. Hunter, J.A. Ouellet, M.R. Wertheimer, and J. Antoniou	Biomedical Engineering Online, 2007	[54]
7	Nitrogen-rich Plasma Polymers (« PPE:N ») : Comparison of Films Deposited in Atmospheric- and Low-Pressure Plasmas	F. Truica-Marasescu, P.-L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W.E.S. Unger and M.R. Wertheimer	Thin Solid Films, 2008	[10]
8	PPE:N : A New Material Promoting Cell Adhesion and Specific Recombinant Protein Production	A. Gigout, S. Levasseur, P.-L. Girard-Lauriault, M.D. Buschmann, M.R. Wertheimer and M. Jolicoeur	Macromolecular Bioscience, accepté	[55]
9	The Expression of Potential Markers of Nucleus Pulposus Phenotypes In Human Mesenchymal Stem Cells From Osteoarthritis Patients on Novel Nitrogen-Rich Plasma Polymer Surfaces	F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, M.R. Wertheimer and J. Antoniou	Journal of Stem Cells, 2008	[56]
10	The potential of N-rich plasma-polymerized ethylene (PPE :N) films for regulating the phenotype of the nucleus pulposus.	F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, J.A. Ouellet, M.R. Wertheimer and J. Antoniou	The Open Orthopaedics Journal, 2008	[57]

les interactions cellules-surfaces, en particulier du rôle possible de groupements fonctionnels spécifiques.

4) La mise en commun de ces résultats pour la préparation de substrats optimisés pour le génie tissulaire.

Le déroulement chronologique idéal de cette recherche serait de compléter les objectifs dans l'ordre où ils sont énoncés ci-haut, la préparation efficace de substrats optimisés se faisant préférentiellement à la suite d'une bonne compréhension des mécanismes régissant les interactions cellules-surfaces. Cependant, notre curiosité, ainsi que l'impératif de faire avancer rapidement l'ensemble de la recherche, nous ont convaincus d'effectuer plusieurs de ces travaux en parallèle. Plusieurs travaux parallèles sur les propriétés bioactives des PP:N ont donc étés publiés avant la caractérisation chimique et l'étude sur les mécanismes d'interactions cellules-surfaces. Ces travaux n'ont donc pas pu bénéficier des importantes conclusions de cette dernière étude. Il serait certainement intéressant d'analyser de nouveau nos plus « anciens » résultats, à la lumière de notre connaissance approfondie du phénomène d'adhésion.

Description et organisation de la recherche

Les modifications de surfaces polymères sont, depuis assez longtemps, effectuées à l'aide de technologies plasmas basse et haute pression ; par contre, les dépôts de couches minces par plasma n'ont, jusqu'a récemment, impliqué que des techniques à pression réduite. En effet, le dépôt à basse pression est généralement plus versatile et le contrôle des paramètres expérimentaux est plus aisé qu'à pression atmosphérique, qui demande une tension élevée, un faible espace interélectrode et ne se prête pas aisément à l'utilisation de divers mélanges gazeux (voir les détails dans le

chapitre 1). Par contre, le dépôt de couches minces par plasma à pression atmosphérique, qui comporte l'avantage économique évident d'éliminer les systèmes à vide, s'est récemment révélés capables de fournir plusieurs types de couches organiques et organosiliciées. Cependant, les études actuellement disponibles utilisent des systèmes de dépôts dont le design est calqué sur les systèmes plasmas à basse pression et comprend souvent des pompes. Ces types de système offrent malheureusement peu des avantages potentiels des plasmas à pression atmosphérique.

Notre laboratoire avait déjà développé un système de traitement par plasma à pression atmosphérique [4], système qui comprend une électrode cylindrique à haute tension sous laquelle peut être déplacé un échantillon plat fixé sur l'électrode à la masse. Ceci simule les traitements en continu utilisés dans les réacteurs « corona » industriels [4, 5]. Nous avons entrepris de modifier cet appareillage pour permettre le dépôt de couches minces riches en azote. Puisque notre recherche est fortement dirigée vers des applications, nous avons décidé d'accorder une grande importance au choix des conditions expérimentales pour permettre un transfert aisé de la technologie vers une plus grande échelle. En plus de la configuration d'électrodes comparable à celle utilisée dans les sytèmes de traitements en continu, nous avons fait le choix d'un mélange gazeux précurseur selon des considérations de coûts et d'innocuité. En effet, notre approche pour produire des dépôts organiques azotés consistait à utiliser la « décharge à barrière diélectrique » (DBD) à pression atmosphérique à l'aide d'un hydrocarbure simple en grande dilution dans un écoulement d'azote. Nos efforts pour le développement de cette technique novatrice sont présentés à la section 3.1 (premier article). Nous y décrivons le développement de nos couches minces organiques très riches en azote, ci-après nommées « PP:N » (pour « polymère plasma riche en azote »), couches ayant une énergie de surface élevée, déposées à partir de mélanges d'éthylène (C_2H_4) et d'N_2 à l'aide de l'appareillage mentionné ci-haut. Nous avons fait la caractérisation chimique de ces couches par

spectroscopie des photoélectrons X (XPS), en utilisant aussi des techniques de dérivation chimique, ainsi que par spectroscopie infra-rouge (FTIR). Nous avons aussi développé une méthode pour déposer ces couches minces en motifs micrométriques, ce qui est souhaitable pour certaines applications. Dans la deuxième partie de cet article, nous étudions les propriétés bioactives de nos nouveaux matériaux « PP:N ». Nous illustrons l'adhésion de plusieurs types de cellules d'intérêt en orthopédie, dont, par exemple, les monocytes humaines U937, cellules précurseurs des macrophages qui sont les médiateurs de la réponse immunitaire, et généralement réfractaires à l'adhésion sur les matériaux synthétiques, sur les dépôts « PP:N » uniformes ou en micromotifs. Nous observons que les PP:N favorisent rapidement l'adhésion de tous les types de cellules étudiés. En cultivant les divers types de cellules sur des surfaces PP:N comprenant différentes concentrations d'azote, [N], nous trouvons que l'adhésion cellulaire n'a lieu que si [N] dépasse une concentration critique, nommée $[N]_{crit}$, valeur précise et parfaitement reproductible.

Le premier article rapporte donc la découverte du nouveau matériau en couches minces, PP:N, et son potentiel certain pour les applications biomédicales. Cependant, la nature précise des groupements fonctionnels chimiques présents à la surface reste inconnue. Or, les PP:N sont constitués d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote assemblés dans le de façon qui ne permet d'anticiper les groupements fonctionnels présents dans leur structure. Ces polymères plasma peuvent donc contenir toute fonction chimique azotée envisageable, tel qu'il sera détaillé à la section 2.2. Les techniques de caractérisation communément utilisées ne permettent pas de facilement résoudre la nature chimique des PP:N. Cependant, puisque les interactions cellules-surface semblent impliquer des groupements fonctionnels particuliers, la bonne connaissance de la chimie de surface s'avère essentielle. Le deuxième volet de cette thèse, présenté à la section 3.2, en plus d'ajouter de nouveaux candidats PP:N (préparés à partir de méthane et acéty-

lène, en plus du C_2H_4), explore donc une sélection de techniques de caractérisation complémentaires, certaines bien connues et d'autres novatrices, pour élucider la structure chimique de ces PP:N. Afin d'obtenir cette information quantitative ou semi-quantitative sur des groupements fonctionnels dans les PP:N, les techniques suivantes sont utilisées : spectroscopie des photoélectrons X (XPS) avec ou sans dérivation chimique, analyse élémentaire (EA), spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) et spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (NEXAFS). L'ensemble de ces techniques de caractérisation sont décrites en détails au chapitre 2. Plusieurs astuces ont dû être développées afin d'effectuer l'analyse quantitative des amines primaires et l'analyse semi-quantitative des imines, nitriles et alkényls présents dans les PP:N. Cette partie de notre travail constitue la caractérisation chimique la plus complète d'un plasma polymère azoté rapporté jusqu'à maintenant.

La caractérisation structurelle des PP:N est préalable au troisième et dernier volet de cette recherche, qui vise une compréhension des mécanismes régissant l'adhésion de cellules, tout particulièrement de monocytes U937 sur des surfaces avec [N] $\geq [N]_{crit}$. Ces travaux sont présentés au chapitre 4. Pour cette partie de l'étude, nous utilisons une série de différents « PP:N » bien caractérisés, mis au point par d'autres collègues de ce laboratoire à l'aide de différentes méthodes : En plus des PP:N « haute pression » décrits ci-haut, nous utilisons des couches déposées à basse pression par plasma (PBP) et par photochimie d'ultraviolet lointain (VUV). Chacun de ces types de couches azotées comporte ses propres particularités structurales, déterminées à l'aide des méthodes décrites au deuxième article. À l'aide de cette banque de matériaux bien caractérisés, nous revisitons « $[N]_{crit}$ » en termes de concentrations critiques de groupements fonctionnels spécifiques, ceux impliqués dans l'adhésion des U937 sur les PP:N. Dans une seconde partie de cette étude, nous mesurons l'expression de gènes sélectionnées, potentiellement impliqués dans

les mécanismes d'adhésion de monocytes U937, en utilisant la technique d'analyse de l'expression génétique par amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire (RT-PCR). Ceci nous permet de tirer plusieurs conclusions sur les voies génétiques stimulées pendant l'adhésion.

CHAPITRE 1

LES PLASMAS, LES POLYMÈRES PLASMA ET LEURS APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Au cours de ce chapitre, nous présenterons l'état actuel des connaissances sur les polymères plasmas dans la perspective de leur utilisation pour des applications biomédicales. Tout d'abord, nous effectuerons un survol rapide de la physico-chimie des plasmas en général, en expliquant les particularités des décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique, spécifiquement étudiées au cours de cette thèse. Nous discuterons ensuite du dépôt de couches organiques, en détaillant les mécanismes régissant la polymérisation plasma. Nous ferons ensuite une revue des travaux rapportant le dépôt de couches organiques, mais aussi des modifications de surfaces, effectuées par plasma à basse et haute pression ainsi que par photochimie d'ultraviolet lointain et qui sont représentatifs des derniers développements du domaine. Nous conclurons ce chapitre par une revue des applications biomédicales des polymères plasma et autres modifications de surfaces. Nous y détaillerons particulièrement les applications explorées dans le cadre élargie de cette thèse (voir tableau 1).

1.1 Physico-chimie des plasmas et de la polymérisation par plasma

Un plasma est un gaz ionisé électriquement neutre pouvant conduire un courant électrique. On y réfère souvent comme « le 4^{ieme} état de la matière ». Le terme « plasma » a été utilisé pour la première fois par Irving Langmuir en 1929 [58] pour expliquer le comportement des gaz dans une décharge électrique, le terme

provenant du grec πλάσμα (« façonné »). La définition actuellement acceptée d'un plasma s'applique cependant à une multitude de phénomènes, parfois très différents. À un extrême, on retrouve le coeur en fusion des étoiles qui sont des plasmas extrêmement denses et chauds et à l'autre, le vide intergalactique, qui contient très peu de particules et à une faible température. Entre les deux se trouvent toutes sortes de plasmas naturels : aurores boréales, flammes, éclairs, etc ; ou générés par l'homme pour répondre à un besoin technologique : tube fluorescent, arc électrique pour soudure, torche à plasma pour la coupe de matériaux, système plasma pour dépôts de couches minces, etc. Il y a plusieurs méthodes pour générer des plasmas, mais ils sont généralement issus d'une variante de l'un ou l'autre des mécanismes suivants : radiation d'énergie élevée, champ électrique élevé ou température élevée.

Les plasmas peuvent être séparés en deux grandes classes : les plasmas chauds, qui sont à une température très élevée, fortement ionisés et au quasi-équilibre thermodynamique et les plasmas froids, souvent près de la température ambiante, faiblement ionisés et hors-équilibre. Si on se réfère seulement aux plasmas générés par l'homme, la première catégorie renferme, entre autres, les arcs au plasma, les plasmas pour la fabrication de nano-poudres, ainsi que les plasmas générés par les réactions thermonucléaires. La seconde catégorie rassemble les décharges AC et DC utilisées pour la gravure, la modification de surfaces et le dépôt de couches minces (incluant les décharges à pression atmosphérique ainsi que les tubes fluorescents). Les plasmas utilisés dans les travaux présentés dans cette thèse sont exclusivement du second type et sont restreints aux décharges capacitives initiées par un champ électrique alternatif audio- ou radiofréquentiel.

Un plasma froid peut être généré par un champ électrique suffisamment fort pour permettre l'ionisation des atomes et des molécules présents dans le gaz, par l'accélération d'électrons libres se trouvant dans l'environnement. Le champ électrique transfert de l'énergie sélectivement aux espèces chargées (les électrons et les ions)

TABLEAU 1.1 Énergies de liaison et enthalpies de formation de radicaux libres [59, 60].

Énergies de liaison		Enthalpies de formation des radicaux libres	
Espèce	Énergie (eV)	Espèce	Énergie (eV)
C-H	4,30	$CH\cdot$	6,1
C-C	3,61	$CH_2\cdot$	4,4
C-O	3,74	$CH_3\cdot$	1,5
C-N	3,71	$HC{=}C\cdot$	5,8
C=O	7,78	$HC{=}CH_2\cdot$	3,1
C=N	9,26	$NH\cdot$	3,6
O-O	1,52	$NH_2\cdot$	1,9
N-H	4,04	$C_6H_5\cdot$	3,4
C≡C	8,65		
C≡N	9,19		

qui sont largement minoritaires dans ces types de plasma ; ceci a pour effet qu'ils ne transfèrent que très peu d'énergie aux autres particules (neutres) dans le plasma. Il en découle donc une situation où les électrons ont une énergie cinétique de quelques eV (correspondant à une température > 10000 K) tandis que les particules « lourdes » (ions et neutres) composant le plasma se maintiennent autour de la température ambiante. L'énergie des électrons « chauds » est suffisante pour briser des liaisons covalentes et créer des radicaux de molécules (organiques) et ainsi initier des réactions chimiques (voir tableau 1.1) ; ceci a pour conséquence que ce type de plasma peut être utilisé pour plusieurs applications d'intérêt ici, dont la modification de surfaces polymères ainsi que la polymérisation par plasma de monomères organiques. Malgré la présence d'espèces hautement énergétiques, la faible température moyenne du gaz permet le traitement de matériaux ayant une faible température de fusion, par exemple, les polymères organiques.

La suite de cette section consiste en une description sommaire des principaux paramètres des plasmas, que nous utiliserons plus tard pour comparer nos plasmas froids

à basse pression et à pression atmosphérique ; une description beacuoup plus détaillée peut être consultée dans les ouvrages de Hippler et de Liebermann [61, 62], entre autres. Les plasmas utilisés dans les laboratoires se caractérisent généralement par les paramètres suivants : température, densité, distribution de l'énergie électronique, libre parcours moyen, longueur de Debye et potentiel de la gaine.

Les températures du plasma : La température correspond à l'énergie cinétique moyenne de particules dans le plasma. Dans un plasma « froid », seuls les électrons et les ions sont accélérés par le champ électrique, et seulement les électrons sont « chauds » (en raison de leur très faible masse). Lorsque la température du gaz est importante, des matériaux en contact avec le plasma sont susceptibles d'être altérés thermiquement.

La densité du plasma : Les densités électronique, n_e, et ionique, n_i, sont quasi-égales et ont typiquement une valeur de 10^9 cm^{-3} à 10^{12} cm^{-3} dans le cas des plasmas à basse pression et jusqu'a 10^{15} cm^{-3} dans les décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique. Le degré d'ionisation des plasmas froids est donc généralement assez faible avec $n_e = n_i = 10^{-4}\ n_g$, où n_g est la densité du gaz neutre.

Distribution de l'énergie électronique : La distribution (« Maxwell-Bolzmann ») de l'énergie électronique nous informe sur les principales réactions qui auront lieu entre les espèces présentes dans le plasma. Les plasmas froids ont généralement une énergie électronique moyenne comprise entre 0,5 et 10 eV, avec une faible portion d'électrons à plus hautes énergies, $\geq$ 15 eV. Par comparaison, l'énergie thermique à la température ambiante vaut 0,025 eV.

Libre parcours moyen : Ceci correspond à la distance que peut parcourir chaque type de particule dans le plasma avant d'entrer en collision avec une autre espèce. Le libre parcours moyen des espèces gazeuses neutres dans le plasma, λ_g, est la

même que celui dans un gaz ordinaire et il est dérivé par la théorie cinétique des gaz :

$$\lambda_g = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}\pi n_g r_g^2} \right), \tag{1.1}$$

où r_g est le rayon des espèces neutres dans le gaz. Le libre parcours moyen électronique, λ_e, est donné par une équation similaire :

$$\lambda_e = \left(\frac{1}{\pi n_g r_g^2} \right). \tag{1.2}$$

Les électrons étant beaucoup plus petits que les neutres, ils n'interagissent donc que peu entre eux ; leur rayon est aussi négligeable par rapport à celui des neutres, ce qui explique pourquoi il ne se retrouve pas dans l'équation 1.2.

La longueur de Debye : Une des caractéristiques fondamentales d'un plasma macroscopique est son électroneutralité. Cependant, cela n'est vrai qu'a « grande échelle », puisqu'à une échelle microscopique $n_e \neq n_i$ et les particules chargées génèrent des champs électriques locaux. À partir d'une certaine longueur, le nombre de particules est suffisant pour contrebalancer leur champ électric respectif. Ceci correspond à un un écran effectif au champ électrique et permet d'établir de la condition d'électroneutralité. La longueur à partir de laquelle le phénomène d'écran est observé et pour laquelle le plasma est considéré électriquement neutre est appelée longueur de Debye, λ_D, et elle est donnée par l'équation suivante :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_b T_e}{n_e e^2}}, \tag{1.3}$$

où ϵ_0 est la permitivité du vide, k_b la constante de Boltzmann, T_e la température électronique et e la charge de l'électron. Pour qu'un plasma puisse exister dans un environnement de dimensions restreintes, il faut que ces dimensions soient de plusieurs fois λ_D. Dans un plasma froid à basse pression, la longueur de Debye est un indicateur permettant d'évaluer la faisabilité d'un traitement plasma à l'intérieur d'une cavité. Il est intéressant de noter que λ_D diminue avec n_e croissante ; cette dernière valeur étant généralement beaucoup plus élevée pour les plasmas froids à pression atmosphérique que pour ceux à basse pression, il en découle que les plasmas à pression atmosphérique sont plus efficaces pour le traitement de petites cavités.

Potentiel de la gaine : Les particules chargées et neutres contenues dans le plasma entrent en collision avec les parois du réacteur qui confine la décharge plasma. Puisque les électrons se déplacent beaucoup plus rapidement que les ions, ils atteignent les surfaces plus rapidement et y créent ainsi un potentiel négatif. La région du plasma jouxtant une surface est donc positivement chargée sur une longueur correspondant à plusieurs fois λ_D. Cette région est reconnue comme la « gaine » du plasma et son potentiel naturel est donné par l'équation suivante pour des surfaces planes [63] :

$$V_s = \frac{kT_e}{2e} \ln\left(\frac{m_e}{2.3m_i}\right), \tag{1.4}$$

où m_e est la masse de l'électron et m_i la masse des ions présents dans le plasma. La gaine est donc une région où les ions positifs qui migrent vers la surface peuvent être accélérés par le champ électrique présent, ce qui crée un bombardement ionique sur la surface, bombardement ayant la capacité additionnelle de la modifier. Le potentiel de la gaine peut être augmenté de façon contrôlée pour augmenter l'intensité de ce bombardement ionique. Il est à noter que le bombardement ne sera

efficace que si la pression est assez faible, pour que les ions puissent traverser la gaine sans trop de collisions avec d'autres espèces.

1.1.1 Décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique

La majorité des recherches publiées jusqu'à présent sur les modifications de surfaces polymériques (gravure, fonctionnalisation et dépôts de couches minces) a été faite à l'aide de systèmes plasma radiofréquentiels, RF, (décharge initiée par un champ électrique élevé) à basse pression, en large partie grâce à la grande disponibilité de ce procédé [59, 61, 63]. Cependant, ce type de décharge implique un appareillage assez complexe et coûteux, ce qui réserve normalement son utilisation aux applications à valeur ajoutée élevée. Dans plusieurs situations, il est cependant envisageable d'utiliser des plasmas à pression atmosphérique, qui, bien qu'expérimentalement moins versatiles, contiennent un mélange d'espèces actives similaires et sont à priori beaucoup moins coûteux et plus faciles à ajouter à un système de traitement en continu. Les plasmas à pression atmosphérique utilisés dans les applications technologiques sont principalement de deux types : Un premier comprend les décharges « couronne » (anglais : « corona »), où le champ élevé nécessaire à l'initiation de la décharge est généré par la géométrie (pointes, lames) d'électrodes métalliques. Le second type sont les décharges à barrière diélectrique (DBD), qui comprennent un ou plusieurs matériaux diélectriques entres les électrodes (dont une sur laquelle sera appliquée une tension élevée pour initier la rupture électrique du gaz) afin d'empêcher la formation d'un arc électrique [64]. Nous traiterons de ce dernier type dans les paragraphes subséquents, puisque c'est aussi celui qui sera impliqué dans la majorité de cette thèse.

Les DBD ont été présentées pour la première fois par W. von Siemens, qui les a utilisées pour la production d'ozone [65]. Il a été démontré plus tard que ces

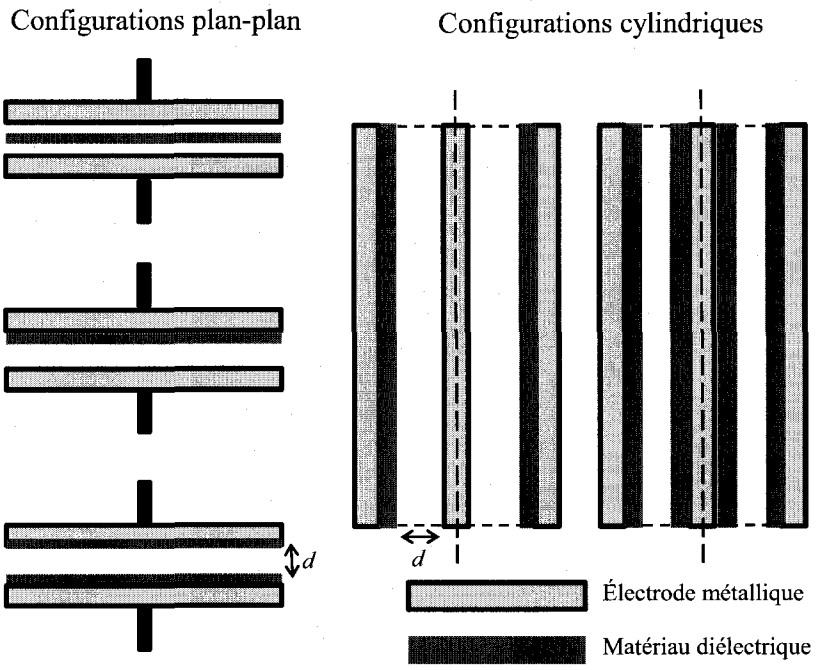


FIGURE 1.1 Différentes configurations des décharges à barrière diélectrique [59].

décharges, générées entre deux électrodes planes, parallèles et recouvertes d'un diélectrique, étaient en fait formées d'une multitude de micro-filaments, constituant autant de canaux de décharges plasma [66]. Ces micro-décharges, ayant un diamètre maximum d'environ 100 μm et une durée de vie d'environ 10 ns, sont distribuées statistiquement sur la surface des électrodes. Il existe plusieurs configurations pour le positionnement du diélectrique entre les électrodes, dont les principales sont présentées à la figure 1.1. Dépendemment de l'application, l'espace inter-électrode, d, peut varier entre 100 μm et plusieurs centimètres et la fréquence d'excitation, f, de 50 Hz à quelques gigahertz. Dans le cas des traitements et dépôts sur films polymères, d est généralement maintenue autour de quelques mm, alors que f varie entre quelques dizaines de Hz à $\sim$100 kHz.

Bien que la plupart des DBD sont de type filamentaire, il est aussi possible, dans

des conditions très particulières (fréquence, nature du gaz, etc.) d'obtenir des DBD homogènes ou « diffuses » à la pression atmosphérique. Ces décharges homogènes à haute pression ont été rapportées pour la première fois, pour le cas de décharges dans l'air et dans l'hélium, par von Engel *et al.* en 1933 [67]. Cette découverte a cependant eu un intérêt limité puisque les décharges de ces auteurs devaient être initiées à basse pression et elles étaient relativement instables. R. Bartnikas démontra plus tard l'existence de régimes différents du mode filamentaire, qu'il nomma modes « luminescent » et « pseudo-luminescent » ; tout d'abord dans l'hélium en 1968 [68], et ensuite dans l'azote, en 1971 [69]. L'idée de pouvoir créer une décharge homogène à pression atmosphérique a généré beaucoup d'intérêt et plusieurs chercheurs, dont Okazaki, Massines et Wertheimer ont travaillé à la compréhension du phénomène et à son développement pour des applications technologiques [70–73]. Le caractère homogène de ce type de décharge offre un certain avantage sur les DBD filamentaires pour quelques applications impliquant le traitement de polymères [4, 21, 72, 74] et le dépôt de couches minces [75, 76]. Ces décharges homogènes à pression atmosphérique, appellées APGD pour « atmospheric pressure glow discharge », ne sont cependant possibles que dans des domaines relativement restreints de conditions expérimentales. Elles ne se prêtent donc pas à toutes les applications, comme c'est le cas pour les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse, où le mélange gazeux précurseur ne permettait pas le maintien d'une décharge parfaitement homogène. Ceci n'est cependant pas un problème pour le type d'applications que nous visons, puisqu'elles ne requièrent pas une surface absolument lisse.

1.1.2 La physico-chimie des décharges à barrière diélectrique

La mécanismes gérant la formation d'une décharge à barrière diélectrique sont similaires à ceux établis pour la rupture du gaz entre des électrodes métalliques planes et parallèles à basse pression [77]. Le mécanisme proposé par Townsend [78]

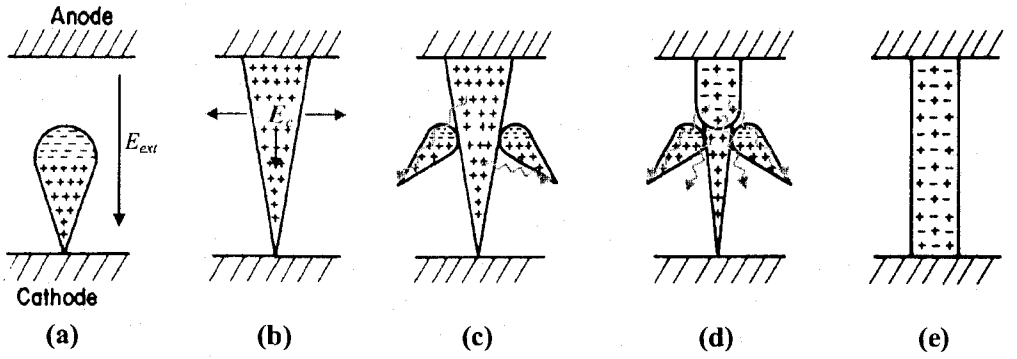


FIGURE 1.2 Formation d'un « streamer » : (a) avalanche électronique initiale, (b) formation d'une concentration de charge positive, (c) convergence des avalanches secondaires vers la concentration de charge positive, (d) propagation d'un streamer de l'anode vers la cathode, (e) établissement d'un canal de décharge. [79]

décrit l'initiation de la décharge à une pression près de 100 kPa. Dans des conditions normales, tout gaz contient une certaine proportion d'électrons libres issus de l'ionisation induite par le rayonnement cosmique ou la radioactivité terrestre. Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur ce gaz, les électrons libres sont accélérés en direction de l'anode et acquièrent rapidement une énergie cinétique élevée. Ces électrons pourront entrer en collision avec des molécules présentes dans le gaz et induire leur ionisation, créant ainsi de nouvelles paires électron/ion, processus qui se répétera de manière exponentielle si le champ est assez élevé. Les électrons étant beaucoup plus mobiles que les ions, il en résulte une avalanche électronique, se déplaçant de la cathode vers l'anode, tel que schématisé à la figure 1.2a. Pour la théorie classique s'appliquant principalement aux plasmas à basse pression, les ions qui se déplacent vers la cathode vont engendrer l'émission d'électrons secondaires qui, en nombre suffisant, vont permettre de soutenir une décharge homogène (Glow discharge) sur toute la surface de l'électrode.

Cependant, lorsque le produit pression-distance interélectrodes (pd) est élevé, > 10 Torr.cm, (ce qui correspond à une distance interélectrodes de 100 μm à la pression atmosphérique) un mode de claquage par « streamer » est beaucoup plus probable

[71]. La figure 1.2 présente les détails du mécanisme élaboré par Loeb et Meek [79]. Lorsque le produit *pd* est élevé, la densité de charge positive générée par l'avalanche électronique devient, elle aussi, plus élevée (en raison de l'augmentation du nombre d'ionisations par une haute densité de molécules ou par une distance plus grande parcourue par la colonne). Cette concentration de charges positives, qui atteint son maximum juste avant que la colonne n'atteigne l'anode, crée un champ électrique, E_c, qui vient s'ajouter au champ appliqué via le potentiel aux électrodes, E_{ext} et qui comporte, en plus, une composante radiale (Figure 1.2b). Parallèlement, les processus électroniques hautement énergétiques produiront l'émission de photons, certains de haute énergie (ultraviolets). Ces derniers induiront l'ionisation de molécules dans le volume du gaz autour de l'avalanche. Les électrons issus de ces nouvelles ionisations parallèles seront attirés vers l'avalanche principale par le champ E_c, créant ainsi des avalanches secondaires (1.2c). Les avalanches secondaires convergent vers l'avalange principale, augmentant ainsi sa charge d'espace. La vague d'ionisation se propage ainsi de l'anode (où la charge d'espace est la plus forte) vers la cathode par incorporation d'avalanches secondaires, et le déplacement de ce « streamer » se fait à une vitesse d'environ 10^7 à 10^8 cm/s (Figure 1.2d). Une fois la propagation du streamer complétée, un canal de gaz ionisé conducteur, un plasma, est établi entre les deux électrodes (Figure 1.2e). Si les deux électrodes sont métalliques, ce canal de décharge se transformera rapidement en arc électrique, un plasma chaud attribuable au courant élevé qui chauffe le gaz par effet Joule. Par contre, si un ou plusieurs diélectriques ont été positionnés entre les électrodes, les charges qui s'accumulent rapidement et localement sur la surface des isolants établiront un champ électrique opposé au champ appliqué et, à l'intérieur de quelques dizaines de nanosecondes, provoquera l'extinction du canal de décharge. Conséquemment, le courant qui passe à travers le canal de décharge est faible et restreint l'élévation de la température global du gaz à quelques degrés seulement.

Dans une décharge DBD, un grand nombre « streamers » se forment, distribués sur la surface des électrodes. Lors de l'augmentation de la tension à l'électrode, des petites non-uniformités à la surface des électrodes feront en sorte que le champ électrique sera plus élevé à certains endroits qu'à d'autres. C'est à ces endroits que la rupture du gaz se produira en préférence et que se formeront les premiers « streamers ». La durée de vie d'un streamer étant très courte, celui-ci sera disparu bien avant que le potentiel alternatif n'ait varié significativement. Cependant, la densité de charge résiduelle sur le diélectrique empêchera la formation d'un nouveau « streamer » au même endroit dans le même demi-cycle du champ électrique. Le diélectrique, en permettant l'accumulation de charges, favorise donc la distribution des « streamers » et une certaine homogénéité de la décharge. Lors de l'inverson de la polarité, l'accumulation de charges sur la surface du diélectrique favorisera la formation de « streamers » aux même endroits que durant le demi-cycle précédent. Cet « effet de mémoire » favorise la non-uniformité de la décharge, qui reste cependant suffisamment homogène pour effectuer des traitements (e.g. déposer des couches minces) suffisamment uniformes pour plusieurs applications. Les principaux paramètres physiques des DBD, comparés à ceux d'un plasma à basse pression similaire, sont présentés au tableau 1.2.

1.1.3 Bases de la polymérisation par plasma

La polymérisation par plasma réfère à la formation d'un matériau, typiquement en couche mince, constitué de macromolécules organiques fortement réticulées, à l'aide d'une technique plasma. Durant ce procédé, de petites molécules précurseures (« monomères ») en phase gazeuse sont condensées en molécules au poids moléculaire élevé (« polymères ») via des interactions avec des espèces hautement énergétiques (électrons chauds, ions, radicaux, photons) contenues dans un plasma. Les mécanismes ayant lieu lors de la polymérisation par plasma, de même que la na-

TABLEAU 1.2 Comparaison des caractéristiques des DBD et des décharges RF à basse pression (adapté de Denes *et al.* [59]).

Caractéristique	DBD	Décharge RF à basse pression
Durée	1-10 ns	quasi-constant
Rayon du filament	100 μm	-
Courant de pointe	0,1 A	-
Densité de courant	100-1000 A/cm^2	10-1000 μA/cm^2
Pression	$\sim$ 100 kPa	1-1000 Pa
Charge totale	0,1 - 1 nC	-
Densité électronique	10^{14}-10^{15} cm^{-3}	10^{9}-10^{12} cm^{-3}
Énergie électronique (moyenne)	1-10 eV	0,5-20 eV
Température du gaz	$\pm$ ambiante	$\pm$ ambiante
Fréquence	50 Hz - 100 kHz	40 kHz - 100 MHz
Potentiel de la gaine	Peu significatif	10 - 300 V

ture des matériaux issus de ces procédés, sont très différents de ceux que décrivent la polymérisation classique. La polymérisation classique, impliquant typiquement des processus ioniques ou radicalaires, est généralement sélective et prévisible et elle génère un matériau contenant une unité de répétition bien définie (le « mer »). La polymérisation par plasma, par contre, implique des mécanismes de fragmentation et de recombinaision radicalaire hautement aléatoires, de sorte que le matériau issu de ce procédé contient une large distribution de groupements chimiques assemblés dans un réseau faiblement ordonné. Bien qu'il existe certaines analogies physico-chimiques et terminologiques entre les polymères et leurs contreparties déposées par plasma, il s'agit bien de deux classes de matériaux très différents, qui ont chacun leurs propriétés et leurs applications propres et qui ne sont généralememnt pas interchangeables ou équivalents.

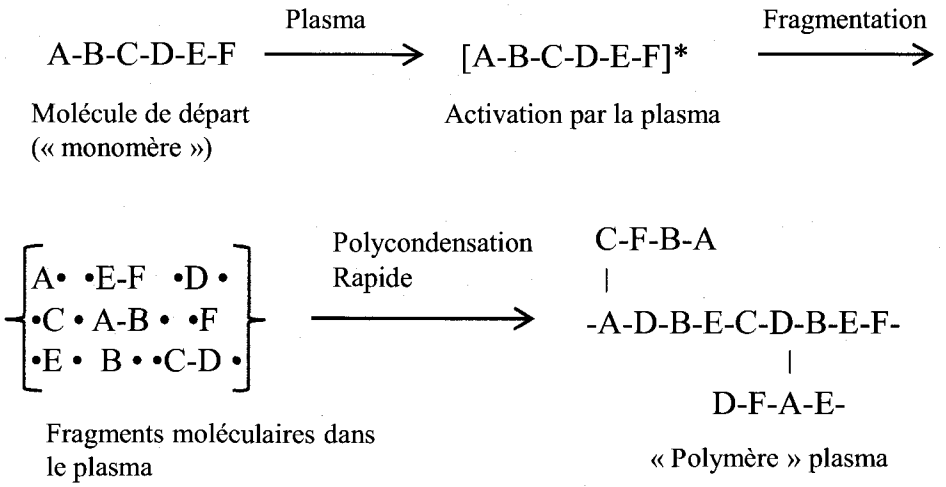


FIGURE 1.3 Concept général la formation des polymères plasma.

1.1.3.1 Mécanismes et cinétique de la polymérisation par plasma

La formation d'un polymère plasma peut être décrite, de manière simplifiée, par les quelques étapes présentées à la figure 1.3. Les molécules organiques précurseures (« monomères ») introduites dans la décharge plasma sont rapidement activées par des collisions avec des électrons chauds et/ou par d'autres espèces excitées présentes dans le plasma (photons, ions, radicaux). Il se produit alors la dissociation des ces monomères en fragments de diverses tailles, pouvant aller jusqu'aux atomes individuels. La nature de ces fragments dépendra des conditions plasma, qui pourront être choisies plus ou moins disruptives, dépendamment des caractéristiques visées pour le polymère plasma. Puisque les énergies des liens dans la molécule (voir tableau 1.1) sont significativement plus faibles que les énergies d'ionisation des molécules (> 10 eV) et que l'énergie cinétique de la très grande majorité des espèces dans le plasma est < 10 eV, le mécanisme de fragmentation le plus probable est la dissociation par bris de liens chimiques. Les espèces résultant de ce mécanisme sont donc principalement des radicaux neutres de diverses tailles. Ces

radicaux se combinent entre eux ou encore avec des espèces neutres (formation de liaisons covalentes) au gré des collisions aléatoires dans le plasma, pour former des fragments de masses moléculaires plus élevées, qui se déposeront éventuellement sur les surfaces en contact avec le plasma. La croissance des macromolécules se fait donc par une suite de combinaisons non spécifiques (et aussi de fragmentations) de toutes les espèces organiques présentes dans le plasma. Ce mécanime correspond à une polymérisation par polycondensation rapide, tel que décrit par Yasuda [60]. Étant donné la densité élevée de radicaux libres impliqués dans ce processus, il restera inévitablement une certaine concentration de radicaux liées (aussi appelés « liaisons pendantes ») dans la structure, ce qui permettra la formation de liaisons covalentes avec les autres fragments déjà déposés à la surface. Le matériau résultant sera donc une macromolécule, généralement fortement réticulée, et il contiendra un certain résidu de radicaux libres dans sa structure. Ces radicaux pourront réagir avec l'oxygène atmosphérique une fois le matériau exposé à l'air, induisant ainsi une transformation temporelle de la composition en surface. Ce phénomène, souvent problématique, est appelé « vieillissement » et fait l'objet de nombreuses études [4, 80, 81].

1.1.3.2 Choix des « monomères » précurseurs

Contrairement à la polymérisation classique, la polymérisation par plasma ne nécéssite pas un précurseur organique possédant une structure particulière, comme la présence d'une liaison double ou d'un groupement fonctionnel réactif. La principale condition est plutôt la capacité de vaporisation du monomère (sa tension de vapeur élevée), ce qui inclut tous les gaz et beaucoup de liquides organiques. Le choix de précurseur se fait donc en considérant les éléments chimiques et, dans certaines conditions, les groupements fonctionnels présents dans le précurseur en fonction de ceux désirés dans le polymère plasma. Par exemple, si l'on désire une

couche contenant des groupements amines, on pourra utiliser comme précurseur l'allyl amine, monomère contenant déjà la fonction désirée. Il faut cependant être conscient que la fragmentation dans le plasma pourra détruire la structure du monomère et que seule une faible partie des groupements fonctionnels initiaux désirés seront conservés, le reste étant distribué dans d'autres groupements fonctionnels. Il est possible d'augmenter la rétention de la structure du monomère initial par un choix judicieux des paramètres expérimentaux, surtout dans le cas des plasmas à basse pression. Par exemple, en utilisant un plasma pulsé plutôt que continu, il est possible de limiter la fragmentation des liens covalents du « monomère » précurseur au minimum [20, 38, 82, 83]. Ce faisant, on risque cependant de limiter la taille des fragments moléculaires et ainsi d'obtenir des macromolécules de faible poids moléculaire (« oligomères »), ce qui peut entrainer la formation d'un film semi-liquide plutôt que solide ou encore, un film soluble.

Une autre option - qui est préconisée dans nos laboratoires - est d'utiliser un mélange de précurseurs comportant des sources distinctes de chacun des éléments chimiques. En prenant le même exemple d'incorporation de fonctions azotées, on pourra donc choisir un mélange d'une source d'azote, comme l'azote moléculaire ou l'ammoniac et d'une source de carbone, comme par exemple l'éthylène ou le méthane. Cette approche, bien que moins spécifique à un groupement fonctionnel particulier, comporte par contre certains avantages, le premier étant qu'il est possible d'ajuster la concentration des espèces désirées dans le polymère plasma en variant l'abondance relative des gaz précurseurs dans la décharche. Aussi, il est possible de choisir des précurseurs moins coûteux et peu toxiques, ce qui est particulièrement important dans le cas de décharges à pression atmosphérique.

Structure des polymères plasmas

Les mécanismes exacts impliqués dans le dépôt des polymères plasma sont peu spécifiques et difficilement prévisibles. En effet, les processus énergétiques et aléatoires qui dirigent la formation des polymères plasma laissent peu de place pour des prédictions ou une modélisation théorique efficaces. Bien que le chercheur expérimenté puisse « prévoir » le type de polymère plasma obtenu dans certaines conditions expérimentales, il lui faudra toujours recourir à une caractérisation exhaustive du matériau pour en connaître la nature chimique précise. Cette tâche n'est généralement pas aisée puisque la large distribution d'espèces chimiques laisse souvent planer l'ambiguïté sur l'interprétation des caractérisations effectuées.

La structure du produit d'une polymérisation classique est généralement très proche de celle du monomère précurseur. Ceci n'est clairement pas le cas pour une polymérisation par plasma. La polymérisation classique de l'éthylène résulte en de longues chaînes alliphatiques, qui peuvent être linéaires, ne contenant ni insaturation, ni cycle ou tout autres groupements fonctionnels. Par contre, la polymérisation par plasma du même « monomère » résulte en un matériau réticulé et hyperbranché, contenant des insaturations et même des cycles aromatiques, ainsi que des liaisons pendantes. De plus, une fois exposée à l'air ambiant, sa surface incorpore de l'oxygène provenant de l'atmosphère sous forme de groupements fonctionnels oxygénés (et donc polaires pour la plupart). La figure 1.4 présente un modèle d'un polymère plasma d'éthylène tel que décrit par Tibbitt *et al.* en se basant sur plusieurs types de caractérisations, dont RMN et IR [84].

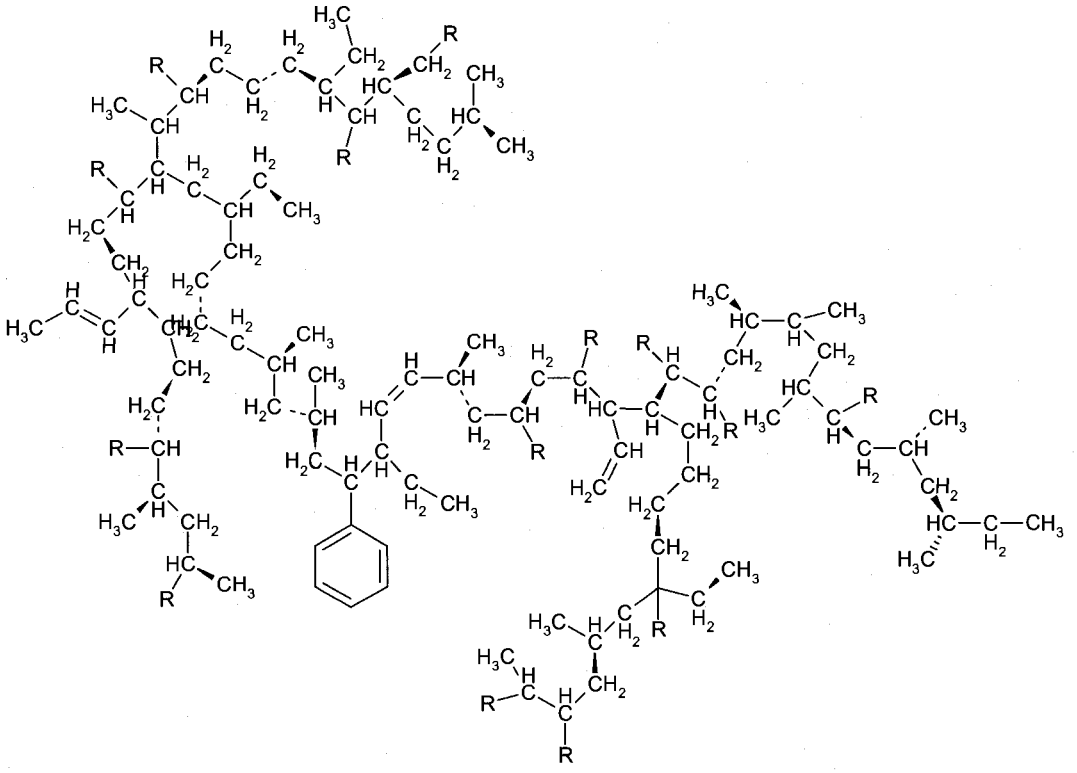


FIGURE 1.4 Structure modèle d'un polymère plasma d'éthylène [84].

1.1.4 Particularités de la polymérisation par plasma à pression atmosphérique

La majeure partie de la théorie disponible sur la polymérisation par plasma a été élaborée pour des systèmes à basse pression. Il existe relativement peu d'études comparant directement les techniques plasma à basse pression et à pression atmosphérique ; la plupart des études se sont attardées aux modifications de surfaces polymères [22, 85, 86] plutôt qu'aux dépôts de couches minces [10, 87]. Aussi, ces travaux ont seulement étudié le résultat à la surface sans évaluer les mécanismes physico-chimiques ayant lieu dans le plasma. Malgré les différences fondamentales, les décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique sont analogues sur plusieurs points aux plasmas froids radiofréquenciels à basse pression. Nous présentons au tableau 1.2 une tentative de comparaison des caractéristiques de ces deux types de décharges. Les deux similitudes les plus marquantes sont les températures du gaz et électronique. La faible valeur de température permet d'assurer que les polymères ne subissent pas de transformations physiques attribuables à un échauffement excessif. Quant à l'énergie (température) électronique, c'est un paramètre fondamental puisqu'il est le principal déterminant de la nature des espèces générées dans le plasma ainsi que des mécanismes de fragmentation des gaz précurseurs. Cette similitude dans l'énergie électronique permet de prévoir la génération de matériaux similaires par les deux méthodes.

Les plasmas DBD et les décharges RF à basse pression diffèrent tout de même sur un bon nombre de points : Les décharges utilisées pour les dépôts de couches minces à pression atmosphérique doivent obligatoirement être soutenues dans un gaz non-réactif (He) ou faiblement réactif (N_2), qui constituera la plus grande proportion du mélange gazeux. Ce gaz devra généralement être utilisé à haut débit pour assurer une bonne pureté dans la zone de décharge. À basse pression, le flux gazeux peut

être constitué de divers mélanges gazeux, où les gaz sont en concentrations similaires [9]. La densité électronique dans les DBD est généralement de quelques ordres de grandeur plus élevée que dans leur contrepartie à basse pression. La concentration d'espèces réactives beaucoup plus grande influence directement la cinétique du dépôt, qui sera généralement plus rapide à pression atmosphérique. Cet effet est contrebalancé par la faible durée de vie des « streamers », qui correspond à environ 10^{-4} du cycle d'excitation, contrairement aux plasmas à basse pression qui sont, à moins qu'un signal pulsé ne soit utilisé, allumés en quasi-permanence. Aussi, les surfaces soumises à un traitement DBD ne sont pas soumises au bombardement ionique comme c'est le cas à basse pression, car la gaine est négligeable, tout comme le libre parcours moyen des ions. Le bombardement ionique favorise la libération d'hydrogène à la surface polymère et tend à transformer une surface organique en une surface de carbone amorphe [88]. Enfin, bien que les plasmas à basse pression aient tendance à émettre d'intenses flux de photons ultraviolets, rayonnement responsable pour une forte contribution photochimique, ceci est nettement moins le cas pour les plasmas à pression atmosphérique (exception : les gaz nobles) [64].

Malgré ces différences fondamentales, les quelques études présentant une comparaison entre les techniques DBD et plasma RF à basse pression sont toutes arrivées à la conclusion que la nature des modifications ou des couches minces déposées étaient similaires. Bien que les mécanismes de modification de surfaces polymères par plasma soient différents de ceux ayant lieu lors de la polymérisation par plasma, il convient de présenter les deux dans cette section, étant donné le faible nombre d'études sur le sujet. Sarra-Bournet *et al.* [22] ont étudié l'incorporation d'amines primaires à la surface d'un poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE), utilisé dans des applications biomédicales, par trois techniques différentes, en utilisant des mélanges gazeux NH_3-N_2 et H_2-N_2 : plasma RF à basse pression, par DBD ainsi que par APGD. Ils ont constaté que les trois techniques permettaient de générer une chi-

mie de surface qualitativement similaire (incorporation de groupements fonctionnels azotées, remplacement du fluor de surface par l'hydrogène), mais avec des sélectivités différentes pour l'incorporation d'amines primaires. Ils ont aussi démontré que la technique APGD créait moins de dommages à la surface que les deux autres techniques étudiées. Choi *et al.* [85] ont étudié l'incorporation d'oxygène à la surface de matériaux polymériques par DBD et plasma basse pression. Ils ont déterminé une incorporation de groupements fonctionnels similaires, mais ont trouvé que la technique à pression atmosphérique induisait une plus faible gravure de la surface, effet qu'ils attribuent à l'absence de bombardement ionique. Dernièrement, Truica-Marasescu [10] *et al.* ont comparé la chimie de couches minces organiques riches en azote préparées par plasma à basse pression et par DBD (les dernières étant les couches présentées dans le cadre de cette thèse). Il a été déterminé que les deux techniques permettaient de déposer des couches minces chimiquement et physiquement qualitativement semblables (couches hydrocarbures azotées), mais avec des sélectivités différentes pour les groupements fonctionnels chimiques. Aussi, Fracassi [87] a présenté une comparaison entre des fluoropolymères plasma déposés par plasma basse pression et par DBD. Encore une fois, il a été déterminé que les techniques donnaient des couches avec une chimie de surface similaire, avec un léger avantage pour les couches déposées par DBD en ce qui a trait à l'incorporation de fluor en surface.

1.2 Les fonctionnalisations de surfaces polymériques par plasma et procédés analogues

Les modifications de surface par plasma peuvent être utilisées pour altérer les propriétés physico-chimiques de surface d'un polymère dans l'objectif de rendre cette surface adaptée à une application particulière. Les travaux rapportés dans cette

thèse présentent une technique innovatrice pour effectuer ces modifications de surface, soit à l'aide d'une décharge à barrière diélectrique à pression atmosphérique. La présente section se veut un survol de la littérature récente sur le sujet général de l'incorporation de groupements fonctionnels chimiques à la surface. L'accent est mis principalement sur l'incorporation de fonctions chimiques azotées, puiqu'il s'agit de l'orientation de la recherche présentée dans cette thèse.

Les voies traditionnelles pour incorporer des groupements fonctionnels à une surface polymérique passent généralement via une chimie en phase liquide impliquant des oxydants puissants, tels l'acide sulphurique, l'acide nitrique ou des permenganates [89]. Malheureusement, ces techniques impliquent la manipulation de produits toxiques et nuisibles pour l'environnement et ces réactifs peuvent considérablement altérer la surface des matériaux polymériques. Actuellement, l'utilisation d'une technique plasma est plutôt préconisée, puisqu'elle permet de palier en bonne partie à ces problèmes. Nous avons regroupé dans les sous-sections 1.2.1, 1.2.2 et 1.2.3 les différents types de modifications selon la technique utilisée pour les effectuer, en faisant une distinction entre les techniques de fonctionnalisation de la surface du polymère et les techniques impliquant la polymérisation par plasma.

1.2.1 Plasma à basse pression

Le plasma RF à basse pression est un outil versatile pour l'introduction de groupements fonctionnels à la surface. Il existe quatre voies principales d'incorporation de tels groupements à la surface d'un matériau polymérique en utilisant une technique plasma [15]. Une première approche est l'utilisation d'un plasma réactif généré dans un gaz non polymérisable, permettant de greffer des fonctions chimiques à la surface. Une deuxième approche est la polymérisation par plasma d'un gaz ou d'un mélange gazeux contenant les groupements fonctionnels désirés ou des atomes pouvant

les former. Deux autres approches, qui ne seront pas détaillées dans cette section pour éviter de l'alourdir, impliquent le greffage covalent de molécules organiques contenant les groupements fonctionnels désirés par (i) réticulation à la surface à l'aide d'un plasma de gaz inerte [90] et (ii) réaction d'une surface fonctionnalisée par plasma avec une molécule organique via des groupements fonctionnels amine primaire [91].

Les modifications de surfaces : La manière la plus simple d'introduire des groupements fonctionnels azotés dans une surface est de l'exposer à un plasma de NH_3 [3, 22–25, 31, 32] en mélange avec de l'H_2 [26, 27] ou de l'Ar [28], ou à une combinaison d'N_2 et d'H_2 [23, 25, 26, 29], ou encore à de l'N_2 seul [25, 30]. La réussite du traitement plasma est généralement vérifiée par XPS, qui permet de mesurer la quantité d'azote totale incorporée à la surface. Certains auteurs ont utilisé l'XPS haute résolution pour tenter de quantifier les groupements fontionnels azotés, mais la plupart des auteurs s'entendent généralement sur le fait qu'une quantification fiable, en particulier les amines primaires, doit être faite par dérivation chimique, ou autre méthode [15, 27]. Il a été déterminé par Favia *et al.* [27] que l'incorporation d'amines primaires sur une surface polymérique est favorisée par un temps de traitement « court », une puissance élevée et une proportion élevé de H_2 dans le mélange gazeux. L'observation sur le temps de traitement court a aussi été rapportée par Meyer-Plath [25], au moin pour le cas de polyoléfines. Par contre, ces mêmes auteurs ont aussi trouvé qu'un temps de traitement « long », à une faible puissance et une plus faible proportion de H_2 favorisait une concentration d'azote élevée à la surface. Des traitements en deux étapes, utilisant avantageusement ces deux effets ont été étudiés. Meyer-Plath *et al.* [26] ont aussi étudié l'efficacité d'un plasma pulsé pour l'incorporation d'amines primaires à la surface de polymères. Ils ont déterminé que des sélectivités très élevées (près de 100%) pour les amines primaires, pouvaient être atteintes à des temps de traitement totaux très courts (~ms), mais

malheureusement avec le résultat d'une quantité totale d'azote et d'amines plutôt faible (typiquement [N]$\sim$10%, [NH_2]$\sim$2%). Aussi, il a été rapporté que la surface du polystyrène, matériau d'une grande importance en biotechnologies puisqu'il constitue la majeure partie du matériel de culture cellulaire, ne se prête pas très bien à la fonctionnalisation par plasma. Il a été montré que l'exposition d'une surface à un plasma de N_2 est peu efficace et peu sélective [25], probablement en raison de la haute densité de systèmes π qui influencent l'interaction entre les espèces dans le plasma et la surface de manière défavorable.

Les modifications de surface par plasma sont cependant sujettes à quelques inconvénients bien connus. Tout d'abord, la quantité d'azote incorporée en surface, [N], est relativement limitée. Une partie de l'azote est d'ailleurs sous forme d'espèces oxydées de faible poids moléculaire (LMWOM), qui disparaissent de la surface après un lavage à l'eau [5]. Aussi, puisque la modification n'affecte que les premiers nanomètres de la surface, les groupements polaires ont tendance à rapidement s'enfouir via des mécanismes de « reptation » de chaînes et ne sont donc plus disponibles à la surface ; ce phénomène est appelé recouvrement hydrophobe [5].

Les dépôts de polymères plasma : Des groupements fonctionnels azotés peuvent être introduits sur une surface par voie de polymérisation plasma d'une couche mince organique qui recouvre complètement la surface originale, définissant ainsi une chimie de surface complètement nouvelle. Deux voies principales existent pour ce type d'approche. La première est l'utilisation d'un « monomère » contenant un groupement amine primaire comme l'allylamine [33, 35–39, 41–44], le diaminocyclohexane (DACH) [29, 45, 92, 93], le 1,3-diaminopropylamine [40], l'heptlyamine [41, 94], l'éthylènediamine [46, 95], le butylamine [42], le propargylamine [96], le 1-amino-2-propanol [97] et le propylamine [96]. La seconde voie, qui est aussi celle explorée dans cette thèse, est l'utilisation d'un mélange d'un gaz polymérisable contenant du carbone, comme par exemple l'éthylène, C_2H_4, en mélange avec une

source d'azote, comme l'N_2 ou l'NH_3 [9, 47, 48].

Le choix du « monomère » et des conditions plasma peut évidemment influencer [N] ainsi que la sélectivité pour les groupements fonctionnels spécifiques, par exemple -NH_2. La densité d'amines incorporés dans un polymère plasma, [NH_2], est directement liée à son importance relative dans la structure du monomère selon l'ordre suivant DAHC > allylamine > heptylamine [29, 94]. Les « monomères » insaturés, comme l'allylamine, présentent cependant des taux de dépôt plus élevés en favorisant l'efficacité des mécanismes de polymérisation radicalaires [15]. Il a été démontré que, contrairement à ce qui a été observé dans le cas des modifications de surfaces, une puissance plasma élevée est défavorable à l'incorporation d'azote et donne plutôt un polymère plasma de type hydrocarbure [15]. Aussi, l'azote incorporée dans ces conditions est plutôt sous forme de groupements fonctionnels insaturés [37]. Les densités d'amines mesurées à la surface de polymères plasma d'allylamine et de DACH sont supérieures à celles qu'il est possible d'atteindre par une modification à l'aide d'un plasma de NH_3 ou de N_2/H_2. Les densités d'azote et d'amines en surface sont cependant les plus élevées dans le cas de polymères plasma préparés à partir d'un mélange NH_3/C_2H_4, en plus d'être complètement modulable sur une large gamme de concentrations [9].

1.2.2 Plasma à pression atmosphérique (« DBD » et « APGD »)

Divers types de traitements par plasma à pression atmosphérique sont utilisés pour fonctionnaliser la surface de polymères organiques [1, 98]. Les traitements de type « corona » dans l'air sont utilisés depuis quelques décennies pour augmenter l'hydrophilicité de surfaces polymères hydrophobes pour plusieurs applications [4, 81]. La littérature existante sur les plasmas à pression atmosphérique n'est pas encore aussi abondante et diversifiée que celle sur les plasma à basse pression pour le type

de traitements décrits dans cette section. Cependant, les nombreux avantages des techniques à pression atmosphérique encouragent de plus en plus d'auteurs à explorer cette voie. Nous présentons, dans cette section, les récents efforts sur l'utilisation des DBD pour l'incorporation de fonctionnalités chimiques azotées à la surface de matériaux polymériques.

Les modifications de surface : Plusieurs auteurs ont exploré les DBD pour l'incorporation de fonctions azotées bioactives à la surface de matériaux polymériques. D'autres auteurs ont exploré l'utilisation d'une décharge filamentaire, dans le N_2 pure [22, 72, 99] ou dans l'air [100]. Certains ont exploré les décharges homogènes (APGD) dans des mélanges gazeux similaires soit l'azote [4–6, 101] ou les mélanges N_2/H_2 [21, 22, 101] et NH_3/H_2 [22, 101].

Les travaux publiés par Guimond *et al.* [4–6] ont démontré qu'un traitement APGD dans l'azote peut incorporer jusqu'a 18% d'azote à la surface de polyoléfines, ce qui est bien supérieure aux décharges « couronne » dans l'air. Sarra-Bournet *et al.* ont comparé les traitements de surface par DBD, APGD, et plasma RF à basse pression. Ils ont déterminé que les traitements DBD filamentaires présentent des taux d'incorporation d'azote ainsi que des dégradations de surfaces similaires à ceux effectués par plasma RF à basse pression [22]. Les traitements effectués à l'aide de décharges homogènes APGD incorporaient généralement un peu moins d'azote, mais ont démontré une plus grande sélectivité pour les amines primaires [22]. De plus, ce type de traitement de surface a induit moins de dégradation de surface, sous forme de formation de produits oxydés de faible poids moléculaire en surface (LMWOM) [4–6].

Les dépôts de polymères plasma : Encore considérée comme marginale il y a quelques années, l'utilisation des DBD pour le dépôt de couches minces fonctionnelles est de plus en plus envisagée et étudiée. Un indicateur clair de cette tendance, est le

développement de systèmes de dépôts par DBD pour des applications industrielles [102, 103]. Un système de dépôt disponible commercialement a été développé par Dow Corning [102]. Celui-ci permet la polymérisation plasma de précurseurs organiques liquides dans une DBD d'hélium, et ce, en mode continu dans une configuration « rouleau à rouleau ». Bien que quelques contributions récentes rapportent le dépôt de couches fonctionnelles organiques par des techniques DBD [104, 105], cette voie est encore relativement peu explorée pour le dépôt de polymères plasma contenant des fonctions chimiques azotées. En 2004, Gessner *et al.* ont rapporté le dépôt de couches organiques à partir d'allylamine et de DACH sans donner trop de détails sur la nature des couches [106]. Ensuite, Heyse *et al.* ont présenté la polymérisation par plasma DBD d'une vingtaine de « monomères » organiques, dont plusieurs contiennent des fonctions chimiques azotées [107]. Ces deux contributions utilisent des monomères organiques contenant les fonctions chimiques désirées, ce qui s'apparente partiellement aux techniques typiquements utilisée dans la majorité des dépôts faits à l'aide de systèmes plasma à basse pression.

1.2.3 Photochimie d'ultraviolet lointain (« VUV »)

Une dernière approche émergente pour la fonctionnalisation de surfaces polymériques (ou le dépôt de couches minces) est son irradiation par des photons UV/VUV en présence de gaz, à faible pression, qui pourra être photodissocié par la radiation incidente. Les mécanismes par lesquels ces modifications ont lieu sont partiellement analogues à ceux des traitements par plasma à basse pression. Cependant, l'utilisation de photons UV « monochromatiques » comme initiateurs des réactions chimiques, contrairement aux électrons chauds distribués sur une large bande d'énergie (« Maxwellienne ») dans le cas des traitements plasma, permet d'espérer une plus grande spécificité de produits pour les procédés UV/VUV. L'utilisation la plus commune de ce type de procédé a longtemps été l'irradiation par « UV-C »,

provenant d'une lampe au mercure (surtout 253,7 nm), de la surface polymérique en présence d'air ou d'oxygène, pour incorporer des fonctions oxygénées à la surface [108]. Par contre, ce type de lampe possède une faible intensité UV et l'énergie de la radiation n'est pas dans la plage d'absorption optimale pour les molécules impliquées. Pour palier à cela, l'utilisation de lampes VUV basées sur l'émission d'une DBD dans un gaz noble (Ar, He, Xe, Kr, etc.) a été préconisée, et son efficacité a été démontrée [64, 109, 110]. Récemment, des lampes VUV ont été utilisées par Truica-Marasescu et Wertheimer pour irradier des polyoléfines dans une atmosphère d'ammoniac à basse pression, afin d'introduire efficacement (jusqu'à 25 % d'azote en surface) et sélectivement des fonctions azotées, principalement des amines primaires, à leurs surfaces [7, 13, 111–113]. Les mêmes méthodes ont ensuite été utilisées pour déposer des couches minces organiques à partir de mélanges d'ammoniac et d'éthylène à basse pression [11, 13]. Ces couches minces, matériaux analogues aux polymères plasma, ont présenté des sélectivités très élevées (jusqu'à 75 %) pour les amines primaires. Cette capacité à produire des couches minces quasi-monofonctionnelles (sans formation d'oligomères) stables est assez unique et hautement désirable, évidemment.

1.3 Applications biomédicales des polymères plasma

Les interactions entre les cellules vivantes et des biomatériaux (par exemple, polymères) ont lieu via des réactions physico-chimiques entre les cellules, les biomolécules (protéines, etc) et les groupements fonctionnels présents à la surface du biomatériau. La surface de polymères organiques est généralement assez inerte, dépourvue de groupements fonctionnels chimiques libres ; ceci est parfois bénéfique, mais généralement problématique. Comme déjà décrit, les techniques de modification par plasma permettent d'incorporer des groupements fonctionnels pouvant

influencer les processus cellulaires tels l'adhésion, la migration et la différentiation. Dans la présente section, nous présentons d'abord une courte explication des mécanismes classiques d'adhésion des cellules aux surfaces et, ensuite, un survol d'applications biomédicales, principalement des polymères plasma fonctionnalisés. Nous décrirons ensuite spécifiquement deux projets auxquels l'auteur a collaboré, en parallèle avec la présente recherche.

Les mécanismes d'adhésion cellulaire à la surface des biomatériaux : Lorsqu'un biomatériau est immergé dans un milieu contenant des protéines en suspension (sérum de culture, plasma sanguin, etc.), ces dernières viendront rapidement s'adsorber, physiquement ou chimiquement, à sa surface. L'adhésion se fera de manière compétitive, ce qui signifie que les protéines ayant une forte affinité avec la surface la recouvreront préférentiellement [93]. Les interactions entre les cellules et les surfaces recouvertes de protéines passent par l'intermédiaire de récepteurs, appelés intégrines, qui se situent sur la membrane cellulaire. Ces intégrines peuvent reconnaître des protéines d'adhésion, telles que la fibronectine, sur une surface et stimuler les processus d'adhésion cellulaire. Cette phase où la cellule « reconnaît » la surface est généralement suivie d'une phase d'étalement et de production d'une matrice extra-cellulaire (ECM). Ce processus est schématisé à la figure 1.5 extrait du livre de Ratner *et al.* [114] qui en contient une description détaillée.

Alternativement, certains types de cellules pourront adhérer sur une surface dépourvue de protéines (en culture dans un médium sans protéines). Ce type d'adhésion débute généralement par des interactions favorables (souvent électrostatiques ; charges en surfaces) où la cellule entrera en contact direct avec la surface. La cellule pourra ensuite s'étaler et sécréter sa propre ECM, créant ainsi un environnement favorable à la cellule et une adhésion accrue sur la surface.

Polymères plasma bioactifs : La modification d'une surface pour fins biotechno-

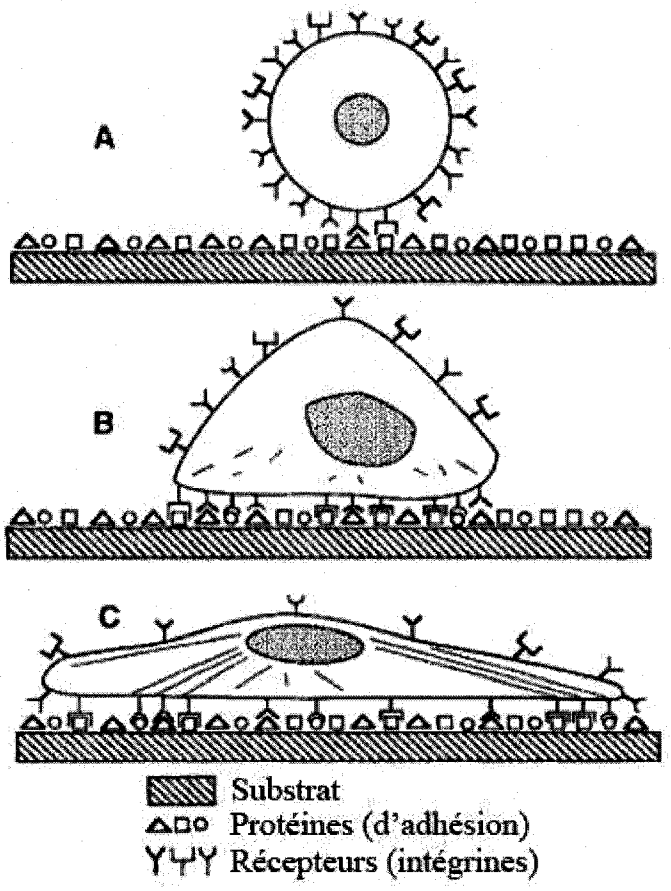


FIGURE 1.5 Adhésion cellulaire sur un substrat. Contact initial (A). Formation de liens entre les récepteurs et les protéines d'adhésion (B). Réorganisation et étalement (C). Adapté de Ratner *et al.* [114].

logiques peut engendrer soit l'augmentation de son affinité pour des cellules (i.e. favorisant l'adhésion cellulaire), soit l'effet contraire, la répulsion des cellules. Les principaux types d'applications envisagés sont schématisés à la figure 1.6, inspirée d'un récent article de synthèse de Förch *et. al.* [14].

Rappellons que la création de couches bioactives se fait par l'incorporation de groupements fonctionnels pouvant réagir avec les biomolécules. Il s'agit, le plus souvent de groupements contenant de l'azote ou de l'oxygène, tels les amines primaires (-NH_2), les acides carboxyliques (-COOH) ou encore les alcools (-OH)[14]. Le cas de surfaces azotées a été détaillé à la section 1.2, mais celles contenant de l'oxygène sont préparées par des méthodes analogues ; les différentes manières d'obtenir ces types de surfaces ont aussi été présentées dans un excellent article de synthèse par Siow *et al.* [15]. Voici quelques exemples d'applications : Barry *et al.* [115] ont déposé un polymère plasma d'allylamine sur des stuctures 3D (« scaffold » ou « charpentes ») en poly(acide lactique), polymère biodégradable mais réfractaire à l'adhésion cellulaire, et y ont fait adhérer des fibroblastes 3T3. Haddow *et al.* [116] ont préparé des polymères plasma d'acide acrylique qu'ils ont colonisé avec des kératinocytes pour fabriquer un bandage « vivant » favorisant la guérison de plaies persistantes. D'autres auteurs ont étudié l'utilisation de polymères plasma pour favoriser l'adhésion de biomolécules à la surface de matériaux visant à être implantés et ainsi diminuer la réponse immunitaire et augmenter leur biocompatibilité [117]. Aussi, les amines primaires peuvent être utilisés pour immobiliser une sonde d'ADN [20]. À l'opposé, il est parfois souhaitable de rendre une surface fortement réfractaire à l'adhésion cellulaire, par exemple « l'antifouling » (prévenant l'accumulation de biomolécules et de microorganismes), pour applications antimicrobiennes, ou pour améliorer la biocompatibilité d'un implant. Ce type de couche contient des groupements hydrophobes qui diminueront l'affinité de la surface avec les biomolécules organiques, souvent polaires. Le plus souvent, il s'agira de polymères plasma fluori-

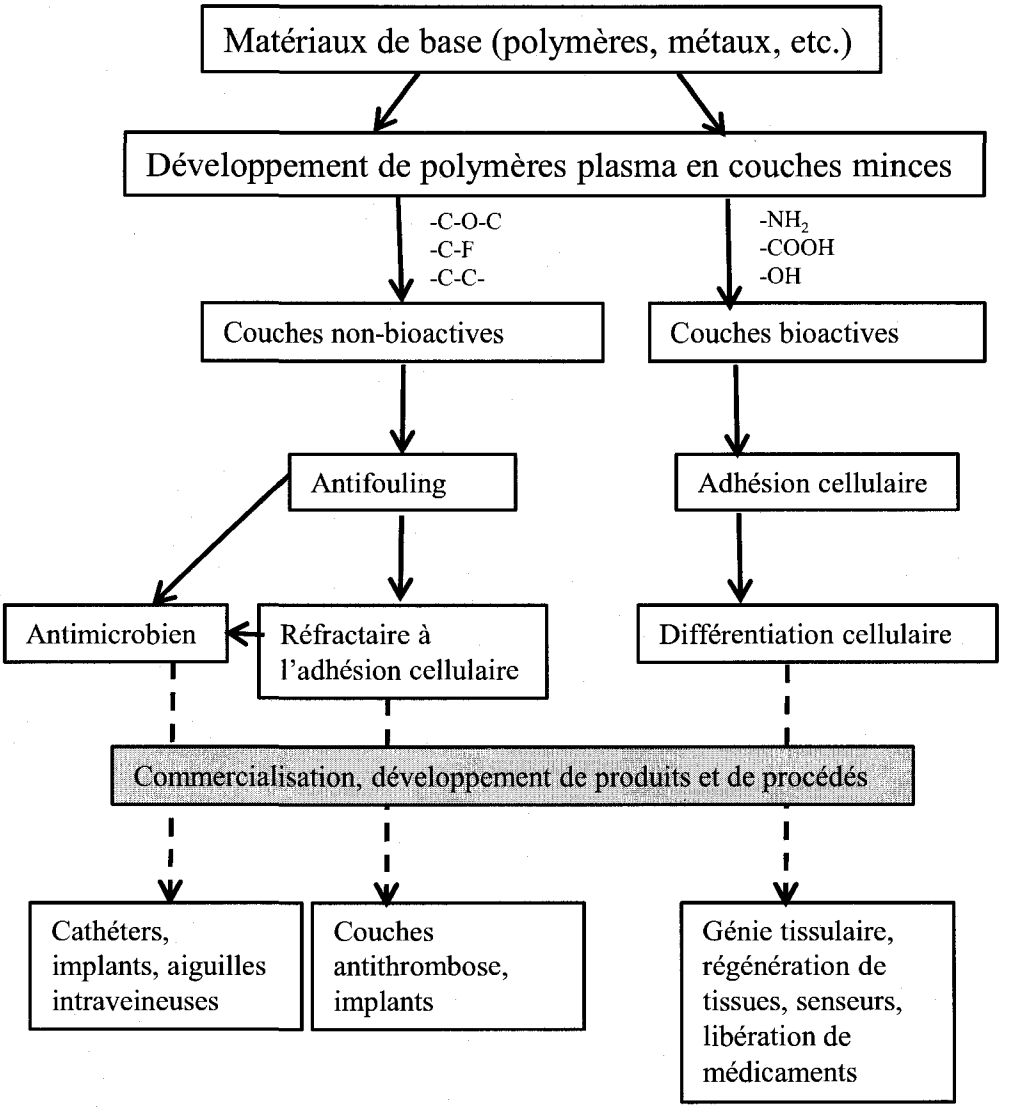


FIGURE 1.6 Schéma représentant les différentes avenues de développement de polymères plasma appliquées aux biomatériaux [14].

nés ou ayant des groupements ether (poly(oxyde d'éthylène)), ou encore simplement de type hydrocarbure. Un exemple d'application antibactérienne a été présenté par Favia *et al.* qui ont développé une couche réfractaire à l'adhésion cellulaire ayant des propriétés antimicrobiennes via l'incorporation de particules d'argent dans le dépôt [118]. Un autre exemple intéressant est un fluoropolymère plasma (Touzin *et al.* [119]) pour servir de couche protectrice anticorrosion pour des stents en acier inoxidable implantés dans le corps humain.

1.4 Applications biomédicales des PP:N

1.4.1 Applications des PP:N en orthopédie

Les pathologies dégénératives des cartilages de la colonne vertébrale et des jointures affectent environ 70% de notre population après un certain age [120]. Les traitements actuels, impliquant souvent des greffes de cartilage sont, jusqu'à présent, inadéquats : Deux types de greffes sont possibles ; « allogènes » et « autogènes », mais les deux comportent leurs lots de problèmes. Les greffes « autogènes » infligent un traumatisme additionnel au patient (par la récolte de cartilage sain ailleurs dans son corps), tandis que les greffes « allogènes » comportent des risques de transmission de maladies infectieuses comme le VIH ; en plus, le risque de rejet par le système immunitaire est élevé. Le traitement idéal serait la culture *in vitro* de tissus de cartilage, mais les techniques actuelles ne le permettent pas, car il y a normalement perte du phénotype des cellules lors de la culture. L'élaboration d'un substrat de culture permettant la conservation du phénotype serait une avancée majeure dans ce domaine.

Il est connu que les polymères plasma riches en azote favorisent l'adhésion cellulaire [15]. Cependant, il est aussi possible que les groupements fonctionnels bioac-

tifs qu'ils contiennent puissent influencer la différenciation des cellules. Une étude a donc été élaborée (présentée dans l'annexe I) où des cellules souches mésenchymateuses (MSC), type de cellule pluripotente, ont été cultivées sur des surfaces de polymères plasma riches en fonctions azotées ainsi que sur du matériel de culture standard. Tout au long de cette étude, d'une durée de 14 jours, l'expression de certains gènes sélectionnés, marqués de la chondrogénèse (indicateur de la différenciation en cellules précurseures de cartilage) et aussi de l'ostéogénèse (indicateur de la différenciation en cellules du tissus osseux) a été mesurée. Il a été observé que, tout au long des 14 jours de la durée de l'étude, les gènes collagène X, alkaline phosphatase (ALP), sialoprotéine osseuse (BSP) et osteocalcine (OC) (marqueurs de l'ostéogénèse) ont été supprimés à divers degrés (en relation à leur expression pour des cellules en culture sur du matériel standard), alors que l'expression des gènes collagène I et aggrecan (marqueurs la chondrogénèse) n'a pas été affectée par la culture sur ces polymères plasma. Un exemple du résultat de cette expérience est présenté à la figure 1.7. Ces résultats, en plus de permettre d'espérer le développement d'une thérapie efficace basée sur ce nouveau matériau de culture cellulaire, démontre qu'en plus de stimuler l'adhésion cellulaire, sa chimie de surface peut influencer la différenciation des cellules souches.

Une seconde problèmatique distincte mais aussi reliée au domaine de l'orthopédie, a été parallèlement étudiée. Lorsque le cartilage des articulations de la hanche est trop dégradé, la thérapie généralement proposée consiste à remplacer l'articulation par une prothèse en matériaux synthétiques, métal et polymère. Lors de son utilisation, la friction induit la libération de petites particules du métal et du polymère dans le corps du patient, particules qui peuvent stimuler une réponse immunitaire qui peut aboutir au relâchement de la prothèse. La réponse immunitaire passe par l'entremise des monocytes/macrophages (les « gendarmes » du corps humain) qui adhèrent aux surfaces *in vivo*; les mécanismes impliqués sont cependant mal com-

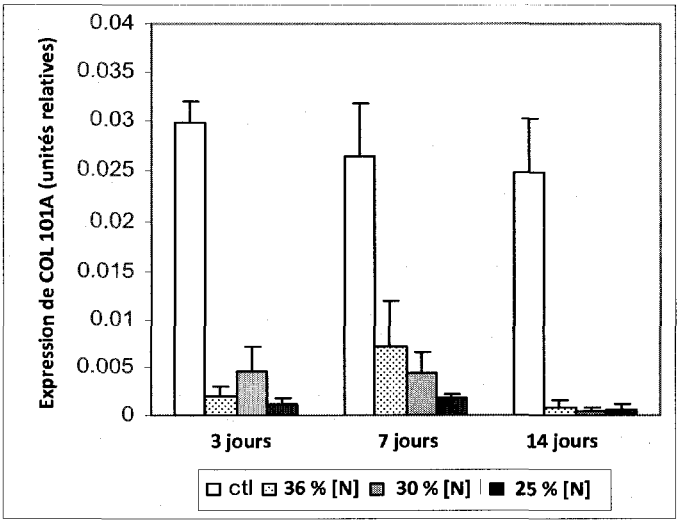


FIGURE 1.7 Analyse RT-PCR du collagène X exprimé par des MSC en culture sur des polymères plasma contenant différentes concentration d'azote, [N].(Annexe I).

pris. Malheureusement, ces cellules ne reproduisent pas ce comportement d'adhésion lorsque mises en culture sur un matériau de culture standard (par exemple, le polystyrène avec un traitement de surface) et leur étude *in vitro* requière donc le développement de surfaces synthétiques permettant l'adhésion. Les polymères plasma riches en azote, qui semblent reproduire partiellement la chimie de surface *in vivo*, ont démontré qu'ils pouvaient induire l'adhésion de ce type de cellule et ainsi permettre leur études *in vitro*, voir section 3.1 ainsi que le chapite 4.

1.4.2 Applications des PP:N aux thérapies endovasculaires

Les traitements d'anévrismes par des méthodes minimalement invasives sont prometteurs et permettent d'éviter des chirurgies ouvertes risquées et coûteuses. On traite actuellement les anévrismes de l'artère aortique abdominale, (AAA, une dilatation pathologique de l'artère qui peut rompre et causer une hémorragie fatale

dans 60% des cas), en implantant une prothèse (dite « stent graft ») qui permet de détourner le flot sanguin et d'éliminer la pression sur la paroi artérielle affaiblie. Les défaillances sont, par contre, fréquentes dans ce type d'implant, car ce dernier peut se déplacer et crée alors une fuite qui ramène la pression sur la paroi. Cette défaillance est principalement créée par la non-adhésion des cellules artérielles (fibroblastes et cellules musculaires lisses) au matériau synthétique de la prothèse (Dacron® ou Teflon™), le contact favoriant potentiellement l'apoptose cellulaire. Pour palier à ce problème, la prothèse pourrait éventuellement être revêtue d'une couche mince de polymère plasma qui favoriserait l'adhésion et la rétention des cellules en surface.

Pour évaluer le potentiel de nos couches minces riches en azote, une étude a été conduite afin d'évaluer l'adhésion, la migration, la résistance à l'apoptose de cellules musculaires lisses vasculaires, ainsi que de fibroblastes adhérés sur ces revêtements, toujours en comparaison avec poly(éthylènetéréphtalate) (PET, « Dacron® ») et le poly(fluoroéthylène) (PTFE, Teflon™) vierge. Un article découlant de cette recherche est présenté à l'annexe II. Cette étude a démontré que les deux types de cellules étudiées adhéraient en plus grand nombre sur nos surfaces de polymères plasma que sur celles des polymères vierges. Il a aussi été déterminé que les cellules migraient plus rapidement, pour coloniser une zone nouvellement accessible de la surface riche en azote. En plus, les cellules adhérées sur ce matériau fonctionnel ont aussi exprimé une résistance accrue à l'apoptose. Les fibroblastes ont, quant à eux, exprimé fortement la protéine α-actine, indicateur d'un phénotype contractile, favorable à la guérison *in vivo*. L'ensemble de tous ces résultats indique qu'un polymère plasma riche en azote qui recouvre un implant vasculaire pourrait favoriser sa biocompatibilité, ainsi que la guérison, donc limiter la fréquence de défaillances des « stent-grafts ».

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

Le présent chapitre recueille la description des différentes méthodes de dépôt de couches minces organiques, ainsi que les techniques employées pour les caractériser au cours de cette thèse. Nous avons accordé beaucoup d'importance au développement de techniques novatrices pour l'analyse quantitative et semi-quantitative de groupements fonctionnels chimiques. Étant donné l'importance attribuée aux techniques de caractérisation dans cette étude, chacune d'elles est décrite avec suffisament de détails pour permettre de bien comprendre son utilisation et ses particularités. Puisque les conditions expérimentales sont rapportées dans les chapitres 3 et 4, correspondant aux articles publiés, [49–51], nous ne rapporterons ici que les détails expérimentaux additionnels pertinents.

2.1 Dépôts de couches minces riches en azote

Tel que mentionné précédemment, plusieurs études font état des propriétés bioactives désirables des surfaces organiques contenant de l'azote, voir, par exemple [3, 14–20]. Un des objectifs principaux de cette étude est le développement d'une nouvelle technique de dépôt à pression atmosphérique pour répondre à ce défi technologique. Cette technique ainsi que la méthodologie employée pour le dépôt en motifs micrométriques sont détaillées dans les sous-sections 2.1.1 et 2.1.3 ci-dessous. D'autres techniques analogues ont aussi été utilisées au cours de notre étude, mais puisque l'auteur de cette thèse n'a pas participé directement aux développements des méthodologies de dépôt, nous nous contenterons ici d'en faire une courte des-

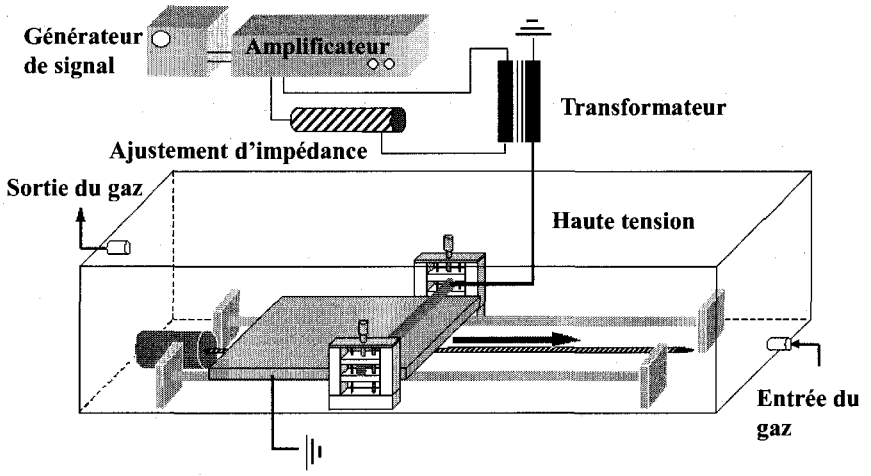


FIGURE 2.1 Schéma du système de dépôt DBD.

cription comparative.

2.1.1 Dépôts par plasma à pression atmosphérique

La plupart des systèmes plasma à pression atmosphérique utilisés en recherche sont de configuration plan/plan, tel qu'inspiré par le design des sytèmes plasma à basse pression [72, 99]. Plusieurs sont aussi dotés de systèmes à vide qui permettent d'évacuer la chambre de dépôt préalablement à l'introduction du mélange gazeux désiré, assurant ainsi l'absence d'impuretés dans le zone de décharge. Ces conditions, bien qu'utiles pour la recherche fondamentale, ne comportent pas d'avantage réel sur l'utilisation de plasma à basse pression pour les applications technologiques. Lors de cette étude, nous avons choisi d'utiliser un système de dépôt dont la configuration est inspirée des systèmes « corona » utilisés commercialement pour le traitement de films polymères, où le film est déplacé sous une électrode haute tension, parfois cylindrique.

Le système de dépôt utilisé lors de cette étude a été élaboré à partir d'un système de traitement de surfaces par plasma à pression atmosphérique préalablement dévelop-

pée par Guimond et al. [4, 6] dans notre laboratoire. Ce système plasma (figure 2.1) est composé d'une électrode cylindrique à haute tension, recouverte d'une mince couche de céramique isolante, et d'une électrode plane à la masse. Le tout est inclus à l'intérieur d'une boîte en plexiglass étanche. Le matériau sur lequel les PP:N sont déposés, généralement un film polymérique mince, est disposé sur une plaque de verre qui sert aussi de diélectrique, et l'ensemble est placé entre les deux électrodes ; la distance inter-électrodes est maintenue à 1 mm. L'électrode plane à la masse est déplacée sous l'électrode à haute tension pour simuler un traitement en continu. Le système original a été modifié par l'addition d'une chambre de mélange pour les gaz précurseurs et par l'utilisation d'une source de tension commerciale accompagnée d'un transformateur (Enercon Industries, modèle LM2727-03) plutôt que l'ancienne source basée sur un amplificateur audio qui n'était pas assez puissant pour notre application (surchauffes fréquentes dans les conditions de dépôts DBD). La tension appliquée entre les électrodes est de 18kV crête à crête ; en tenant compte de la chute de tension dans les diélectriques solides (diélectriques recouvrant l'électrode haute tension et la plaque de verre) la tension effective, V_{eff}, appliquée sur le gaz dans l'espace inter-électrodes est plutôt de 8,9 kV crête à crête. Les gaz précurseurs au dépôt, soit une dilution d'un hydrocarbure léger tel que du méthane, de l'éthylène ou de l'acétylène dans l'azote en proportion variant entre 0.05 et 0.7 % (contrôlés à l'aide de débimètres de masses MKS Instruments) sont introduits dans la zone de décharge qui initie la polymérisation plasma. Un diffuseur de gaz (non présenté à la figure 2.1) est utilisé pour assurer un degré de pureté élevé dans la zone de décharge. Les conditions expérimentales spécifiques et détaillées sont présentées aux sections 3.1.2.1, 3.2.2.1 et 4.2.1.

Les technologies utilisant le plasma à pression atmosphérique, bien que toujours émergentes, ont déjà démontré un potentiel certain pour les applications commerciales [98, 102, 103, 107, 121]. Cependant, le manque d'offre d'équipement spécialisé

pour cette technologie est, encore aujourd'hui, un frein important à son développement. Il existe en effet peu de sources permettant de produire un signal de tension et de fréquence variable et bien contrôlé dans les gammes d'opération des plasmas à pression atmosphérique. Dans notre cas, nous nous sommes résolus à utiliser une des plus petites sources « corona » commerciales, telle que décrite au paragraphe précédent. Cette source ne permet malheureusement pas de faire varier la tension et la féquence appliquées, mais ces deux valeurs ont été mesurées constantes pour toutes les expériences rapportées dans cette thèse. Bien que les conditions d'opération soient dans la gamme appropriée pour nos applications, l'absence de contrôle sur ces deux paramètres a rendu impossible « l'optimisation » complète des paramètres expérimentaux. Cependant, nous ne croyons pas que ceci ait été un obstacle majeur au bon déroulement de ce travail, pour la raison suivante : Étant donné que les résultats préliminaires de caractérisation et de culture cellulaire étaient satisfaisants avec les couches déposées à l'aide de la source « corona » d'Enercon, nous avons décidé d'orienter la recherche vers le développement de techniques de caractérisation qui permettent de déterminer les caractéristiques désirables à optimiser. Tout récemment, de nouvelles sources qui permettent un bon contrôle sur la tension et la fréquence dans la gamme utile pour les dépôts par DBD ont été commercialisées [122, 123].

2.1.2 Autres méthodes

Au chapitre 4 nous présentons une étude sur l'interaction entre les surfaces organiques de type polymère plasma et les monocytes U937. Dans le cadre de cette étude, nous utilisons divers types de couches minces organiques à la chimie de surface bien caractérisée pour déterminer l'implication de certains groupements fonctionnels azotés dans les interactions cellules-surfaces. En plus d'utiliser les couches minces organiques déposées par plasma à pression atmosphérique développées dans

le cadre de cette thèse, nous avons utilisé deux autres types de matériaux analogues, un déposé par plasma radio fréquenciel à basse pression et l'autre déposé par photochimie d'ultraviolet lointain (VUV) comportant une chimie de surface différente mais aussi bien caractérisée. Ces deux techniques de dépôt ont été développées et optimisées par Truica-Marasescu et al. dans notre laboratoire [9, 11]. Dans les deux cas, l'utilisation d'amoniac comme source d'azote, au lieu de l'azote moléculaire utilisé dans les couches déposées à pression atmosphérique, permet d'espérer une sélectivité accrue pour les amines primaires, dont la structure est proche de celle de l'amoniac ; il s'agit d'une stratégie utilisée aussi par d'autres auteurs [47, 124]. La technique de dépôt à l'aide de photons VUV permet aussi d'espérer une sélectivité supérieure à la technique basse pression. En effet, il est raisonnable de supposer que les groupements fonctionnels chimiques issus d'une « polymérisation » initiée par des photons mono-énergétiques seront moins distribués que ceux issus de bris de liens initiés par des électrons « chauds », dont l'énergie correspond à une distribution de type Maxwell-Boltzmann étalé sur plusieurs ordres de grandeur. Une comparaison des trois techniques de dépôt est présentée dans le tableau 2.1. Les conditions expérimentales de dépôt des couches préparées par plasma à basse pression et par photochimie VUV sont présentées respectivement aux sections 4.2.2 et 4.2.3.

2.1.3 Préparation de couches minces avec motifs micrométriques

Le dépôt de couches minces en motifs micrométriques est fait suivant la méthodologie de dépôt décrite à la section 2.1.1. Cependant, le film polymérique sur lequel sera effectué le dépôt est recouvert par un masque en Kapton® dans lequel un motif micrométrique a été gravé par ablation laser. Le Kapton® a été choisi puisque la décharge DBD est incompatible avec les matériaus conducteurs et car ce type de polymères (polyimide) est reconnu pour être relativement stable au plasma [125].

TABLEAU 2.1 Comparaison des techniques de dépôt de couches minces riches en azote (PP:N et UV-P:N).

Technique	Pression	Source	Gaz précurseurs	Commentaires
Décharge à barrière diélectrique (DBD)	1 atm (100 kPa)	10 kHz, 18 kV	N_2 et CH_4, C_2H_4 ou C_2H_2	- Capacité de dépôt sur grandes surfaces - Économique (pas de système à vide) - Sélectivité plus faible
Plasma à basse pression	80 Pa	13,56 MHz, RF	NH_3 et C_2H_4	- Bien documenté -Possibilité de dépôt sur des objets 3D -Meilleure sélectivité
Photochimie d'ultra-violet lointain	13.3 Pa	Photons « Mono-énergétiques » lampes : (a) KrL (126.3nm) ou (b) XeL (147.0 nm)	NH_3 et CH_4 ou C_2H_4	- Nouveau (pas de précédents) -Mécanismes de réactions bien contrôlés → sélectivité optimale

Les masques, une série de trous circulaires de diamètres compris entre 30 et 100 μm positionnés à intervalles réguliers (entre 60 et 200 μm), ont étés fabriqués à l'aide d'un laser excimère couplé à un système de positionnement précis sur des surfaces d'aire variant entre 1 et 4 cm^2. Une photo d'un masque en Kapton® est présentée à la figure 2.2A alors que la figure 2.2B montre une photo, prise dans des conditions identiques, du dépôt en motifs micrométriques. Le principal défi présenté par cette procédure est d'assurer le contact intime entre le masque et le film polymérique sur lequel est effectué le dépôt en micromotifs. La procédure expérimentale détaillée peut être consultée à la section 3.1.2.1.

2.2 Stratégie de caractérisation des matériaux

Étant donné la nature physico-chimique complexe des polymères plasma [60], qui présentent un agencement aléatoire et fortement réticulé d'atomes, leur caractérisation est loin d'être triviale, particulièrement dans les cas où il n'y a aucune rétention de la structure des gaz précurseurs. Dans le cas des DBD avec mélanges N_2 - C_xH_y,

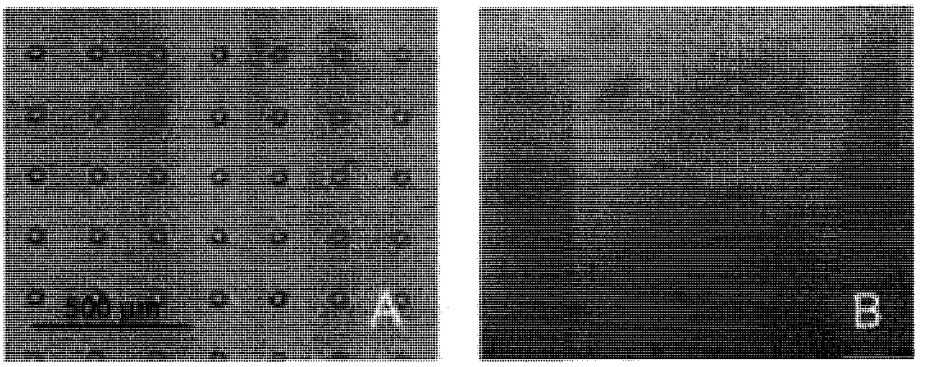
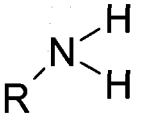
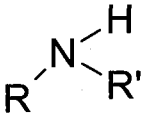
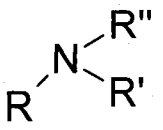


FIGURE 2.2 Photomicrographies des masques et des dépôts en motifs micrométriques. Masque en Kapton® comportant des trous de 30 μm à tout les 200 μm (A). Surface de verre sur laquelle une couche de PP:N a été déposée à travers ce masque (B). Les deux images sont à la même échelle.

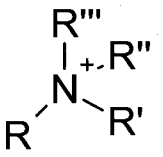
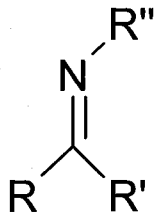
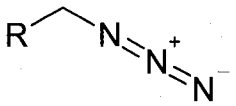
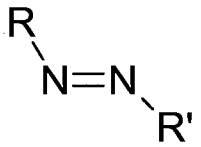
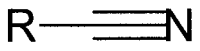
les fonctionnalités chimiques azotées sont toutes générées à partir d'azote moléculaire dont il est difficile de prévoir la cinétique de combinaison avec les autres espèces contenues dans la décharge. La caractérisation complète du matériau, essentielle pour bien comprendre ses interactions avec le vivant, nécessite donc l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires qui, une fois mises en commun, permettent de réaliser la quantification des groupements fonctionnels chimiques contenus dans le matériau. La présente section se veut un survol de la stratégie et des techniques de caractérisation utilisées pour résoudre la nature chimique des PP:N. Un recensement quasi-exhaustif des groupements fonctionnels qui pourraient être présents dans les PP:N est présenté dans les tableaux 2.2, 2.3, 2.4 et 2.5. En principe, il faudra considérer tous ces groupements fonctionnels lors de la caractérisation du matériau. En plus des groupements fonctionnels azotées, nous avons inclus ici des groupements contenant de l'azote et de l'oxygène, ainsi que de l'oxygène seul. Bien qu'une DBD effectuée dans des conditons contrôlées puisse produire des couches hydrocarbures ne contenant que de l'azote comme hétéroatomes, son exposition à l'air ambiant modifiera la chimie de surface. En effet, à la pression atmosphérique, il ne faudra que quelques nanosecondes pour que tous les sites de la surfaces soient visités par une molécule d'oxygène pouvant réagir, entre autres, avec des radicaux

résiduels présents à la surface et ainsi former des groupements fonctionnels oxydés. La chimie de surface qui sera caractérisée dans cette étude n'est donc pas exclusivement le produit du dépôt par plasma, mais est plutôt le produit de ces deux effets qui resteront indissociables. Tout ceci dit, on peut néanmoins assurer que [O] aura une faible valeur par rapport à [N] et que, par conséquent, les fonctionnalités azotée joueront le rôle dominant. Lors de cette étude, l'accent est mis sur l'analyse quantitative et semi-quantitative des groupements fonctionnels chimiques ainsi produits, car ce sont eux qui déterminent les propriétés bioactives du matériau.

TABLEAU 2.2 Groupements fonctionnels azotés pouvant potentiellement être présents dans les PP:N.

Nom	Structure	Commentaire
Amine primaire		Groupement fonctionnel bioactif
Amine secondaire		Moins actif que les amines primaires
Amine tertiaire		Atome d'azote peu accessible due à l'encombrement stérique

Suite à la page suivante...

Nom	Structure	Commentaire
Amine Quaternaire (ion amonium)		Groupement fonctionnel chargé positivement (interaction électrostatiques)
Imines		R' et R" peuvent aussi être des atomes d'hydrogène
Azide		Groupement fonctionnel instable
Azo		———
Nitrile		Groupement fonctionnel important dans les PP:N

Suite à la page suivante...

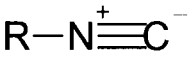
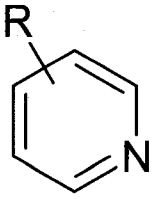
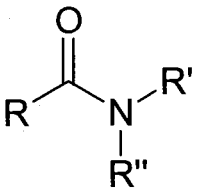
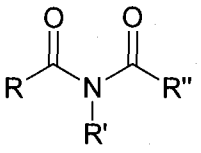
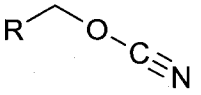
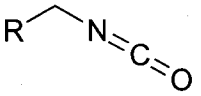
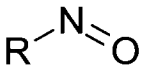
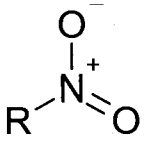
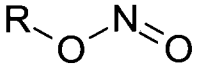
Nom	Structure	Commentaire
Isonitrile		Groupement fonctionnel important dans les PP:N
Pyridine		———

TABLEAU 2.3 Groupements fonctionnels contenant de l'azote et de l'oxygène, pouvant potentiellement paraître en faibles concentrations dans les PP:N

Nom	Structure	Commentaire
Amide		Oxydation des amines, hydratation des nitriles, R' et R" peuvent aussi être des atomes d'hydrogène

Suite à la page suivante...

Nom	Structure	Commentaire
Imide		Peu probable en raison de la faible quantité d'oxygène dans les PP:N
Cyanate		———
Isocyanate		———
Nitroso		Un des produits d'oxydation des amines
Nitro		Un des produits d'oxydation des amines
Nitrite		Peu probable en raison de la faible quantité d'oxygène dans les PP:N

Suite à la page suivante...

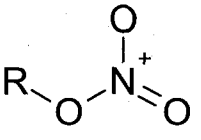
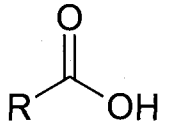
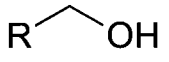
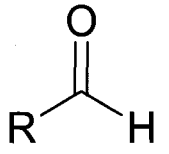
Nom	Structure	Commentaire
Nitrate		Peu probable en raison de la faible quantité d'oxygène dans les PP:N

TABLEAU 2.4 Groupements fonctionnels contenant de l'oxygène, pouvant aussi potentiellement paraître en faibles concentrations dans les PP:N

Nom	Structure	Commentaire
Acide		Groupement bioactif
Alcool		———
Aldéhyde		Groupement fonctionnel instable - oxydation en acide carboxylique

Suite à la page suivante...

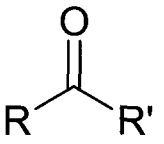
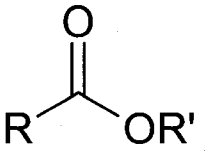
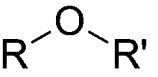
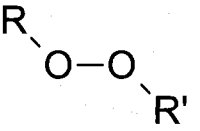
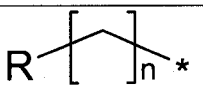
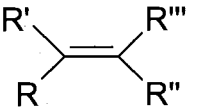
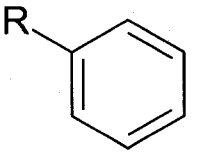
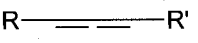
Nom	Structure	Commentaire
Cétone		———
Ester		———
Ether		———
Peroxy		Groupement fonctionnel instable

TABLEAU 2.5 Groupements fonctionnels contenant seulement du carbone et de l'hydrogène pouvant potentiellement être présents dans les PP:N.

Nom	Structure	Commentaire
Alkyl		Structure carbonée de base
Alkenyl		———
Alkynyl		———
Phenyl		———
Allene		Détecté dans les PPA :N (IR)

La technique XPS est à la base de la stratégie de caractérisation. Elle permet d'obtenir les concentrations élémentaires à la surface sans toutefois livrer la concentration d'hydrogène, indétectable par cette technique. La concentration d'azote du matériau est la référence de base permettant la comparaison des PP:N les uns avec les autres, car elle est simple à obtenir et la plus étudiée. De plus, il a été démontré que les fonctions azotées pouvaient influencer certains processus cellulaires [14–17, 49, 51]. La littérature actuelle sur les polymères plasma ne présente pas de caractérisation permettant d'obtenir la concentration d'hydrogène ni, conséquemment, la formule chimique du matériau. Ce problème a été résolu, pour la première

fois, par l'utilisation de l'analyse élémentaire par combustion totale, technique qui sera détaillée à la section 2.2.2.2.

Les concentrations élémentaires à la surface sont un indicateur, somme toute relativement grossier, de la nature du matériau déposé. Il convient donc que d'autres techniques soient utilisées pour obtenir de l'information spécifique aux groupements chimiques en surface. La spectroscopie XPS à haute résolution est la technique la plus répandue dans la littérature sur les polymères plasma, car elle est simple et généralement assez efficace. Elle permet normalement d'obtenir les concentrations d'espèces chimiques présentes à la surface du matériau. Cependant, les PP:N comportent une concentration d'azote très élevée ainsi qu'une concentration d'oxygène parfois non-négligeable, ce qui rend l'attribution spécifique des espèces impossible sans apport d'informations qualitatives et quantitatives par d'autres techniques.

Nous devons donc, pour la quantification des groupements fonctionnels, recourir à d'autres techniques et astuces qui demeurent assez peu nombreuses dans la littérature actuelle. Les techniques utilisées (XPS avec dérivation, NEXAFS, FTIR) seront détaillées dans les sections 2.2.1 et 2.2.2. Brièvement, les amines primaires, espèce d'intérêt majeur et difficilement identifiable par les techniques spectroscopiques, sont identifiées par dérivation chimique sélective [27]. La quantification se fait par le biais de la technique XPS. La spectroscopie infrarouge permet d'obtenir de l'information semi-quantitative sur les nitriles et isonitriles [126, 127] ainsi que des informations qualitatives sur les amines, amides et imines. Aussi, certains échantillons choisis sont caractérisés par Spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (Near-edge X-ray absorption fine structure, NEXAFS), technique de pointe nécessitant l'utilisation de la radiation synchrotron. Cette technique est particulièrement sensible aux espèces insaturées comme les imines, les nitriles et les oléfines (voir section 2.2.1.2). L'utilisation de matériaux standards aidera à l'analyse quantitative et semi-quantitative des grou-

pements fonctionnels.

2.2.1 Caractérisation spécifique à la surface

Très peu de techniques permettent de discriminer la dernière couche d'atomes, qui contient une quantité infime de matière et offre donc une signature très faible comparativement au reste du matériau en couche mince et du substrat. Il existe cependant plusieurs techniques qui offrent divers degrés de contrôle sur la profondeur de sonde de l'échantillon. Le tableau 2.6 répertorie les principales.

La présente section présente la description des techniques de caractérisation qui ont étés utilisées dans notre étude et qui sont spécifiques à la surface dans une optique d'applications biomédicales. Les techniques d'infrarouge ont été reléguées à la prochaine section puisque leur profondeur de sonde est souvent supérieure à l'épaisseur d'une couche mince typique.

2.2.1.1 Spectroscopie des photoélectrons-X (XPS)

La spectroscopie des photoélectrons X (XPS), aussi connue sous l'acronyme ESCA (Electron spectroscopy for chemical analysis, qui se traduit en français par spectroscopie électronique pour l'analyse chimique) est une technique d'analyse chimique spécifique à la surface. Cette technique très versatile permet de faire l'analyse quantitative des éléments chimiques (à l'exception de l'hydrogène et de l'hélium) contenus à la surface de pratiquement tous les matériaux compatibles avec des conditions de vide poussé. Dans la plupart des cas, il est aussi possible d'obtenir de l'information, parfois quantitative, spécifique aux liaisons chimiques dans le matériau analysé. Depuis l'apparition d'analyseurs XPS disponibles commercialement, c'est-à-dire depuis près de 40 ans, la technique n'a cessé de connaître des améliorations

TABLEAU 2.6 Principales techniques de caractérisation de la surface des matériaux et leur profondeur de sonde respective

Technique	Profondeur de sonde	Information obtenue
XPS	1-10 nm	Analyse élémentaire, compositions élémentaires et liaisons chimiques
NEXAFS	1-10 nm	Analyse chimique, groupements insaturés
Goniométrie par angle de contact	première monocouche	Angle de contact, énergie de surface
ToF-SIMS	une monocouche	Information chimique, ions atomiques et moléculaires
ATR-FTIR	1-10 μm	Vibrations, groupements fonctionnels
FTIR photoacoustique	20 μm	Vibrations, groupements fonctionnels
Spectroscopie de pertes d'énergie des électrons (EELS)	0.1 nm	Semblable à FTIR
Spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford	0.5 nm	Composition élémentaire
Ellipsométrie	0.1 nm	Propriétés optiques, Φ et Δ
Spectroscopie Raman	2 μm	Vibrations, rotations (complémentaire à FTIR)
AFM	dernière monocouche	Topographie de surface

motivées par sa grande utilité. En fait, la technique XPS est maintenant la technique la plus utilisée en science des surfaces [128]. Cette section présente la théorie et les considérations générales en XPS. Les conditions expérimentales spécifiques peuvent être consultées dans les articles aux sections 3.1.2.2, 3.2.2.2 et 4.2.4.

Les bases et l'instrumentation de l'XPS Plusieurs grands scientifiques, dont Hertz, Rutherford, Bohr, Einstein, Auger et de Broglie ont, par leurs découvertes, contribué à jeter les bases de ce qui est devenu la technique de caractérisation que nous utilisons aujourd'hui. Ce n'est cependant que dans les années 40, à la suite de développements dans la spectroscopie par rayons β à l'Université d'Uppsala, que Kai Siegbahn a construit un appareil capable de mesurer l'énergie cinétique des électrons. Vers la fin des années 60, après plusieurs années de développement, il a publié un livre qui décrit la technique telle qu'elle est utilisée aujourd'hui [129]. Des instruments XPS commerciaux ont fait leur apparition vers 1969-70 mais ce n'est qu'en 1972, avec l'arrivée des premiers systèmes à ultra-vide, que le plein potentiel de la technique pour l'analyse de surfaces a été réalisé.

La théorie de l'XPS est décrite en détails dans plusieurs ouvrages, dont ceux de D. Briggs [130, 131]. Nous nous contenterons donc ici de décrire les principaux aspects et particularités de la technique dans une perspective globale. La figure 2.3 schématise les mécanismes d'émission des photoélectrons. Lorsqu'un photon d'énergie $E_p = h\nu$ interagit avec un atome, un électron peut être éjecté à la suite de l'absorption de l'énergie du photon par cet électron. L'atome alors chargé positivement subira ensuite un réarrangement pour combler l'orbitale de basse énergie laissée vacante par le photoélectron. Cette transition, où un électron d'une couche supérieure sera transféré vers une orbitale de plus basse énergie, sera accompagnée soit de l'émission d'un photon, soit d'un électron Auger qui transportera l'énergie ainsi libérée.

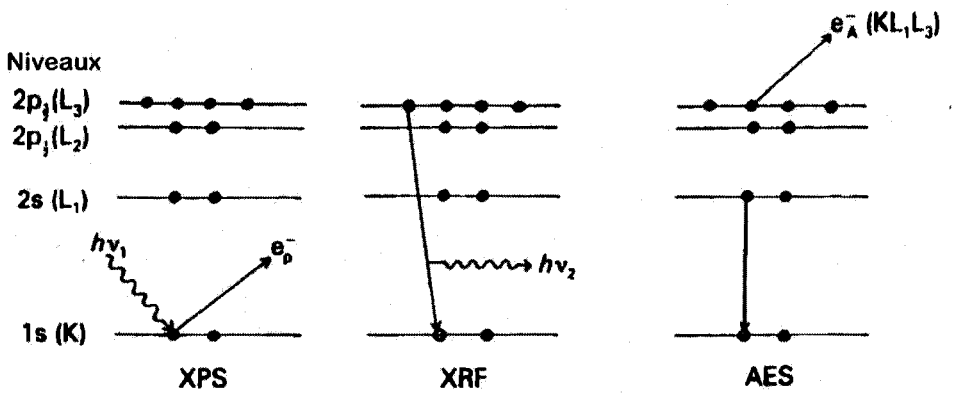


FIGURE 2.3 Photoémission (XPS) et processus de relaxation subséquents (fluorescence X (XRF) et émission Auger (AES)) se produisant lors de l'expérience XPS [130].

De ces trois mécanismes, c'est l'émission des photoélectrons qui permet l'analyse chimique en XPS. L'énergie cinétique d'un photoélectron, E_k, dépend de l'énergie de liaison de l'électron dans l'atome, E_b, de l'énergie de la radiation incidente, $h\nu$, et de la fonction de travail du spectromètre, ϕ telle que décrite par la relation 2.1 posée par Rutherford en 1914 (il avait cependant omis le terme de la fonction de travail).

$$E_k = h\nu - E_b - \phi \tag{2.1}$$

À la lecture de cette équation, il est aisé de comprendre que si on arrive à mesurer l'énergie cinétique d'un photoélectron émis à la suite de l'irradiation d'un échantillon par une source de photons d'énergie connue, il sera possible de déduire l'énergie de liaison de l'électron dans l'atome avant l'ionisation. Cette énergie étant caractéristique de l'atome duquel il origine, il sera possible de déterminer sa nature. De plus, l'intensité du signal photoélectronique est liée à la concentration de l'élément chimique dont il provient par la relation suivante :

$$I_{ij} = K.\sigma_{ij}.n_i.\lambda_{ij}.\cos\theta \tag{2.2}$$

où I_{ij} est l'aire sous le pic d'une orbitale j d'un élément i, K est une constante liée à l'appareil, σ_{ij} est la section efficace de photoionisation de l'orbitale j de l'élément i, n_i la concentration en surface de l'élément i, λ_{ij} est le libre parcours moyen inélastique des électrons de l'orbitale j de l'élément i et θ est l'angle de collection des électrons par l'analyseur. Lorsque l'on compare I_{ij} pour plusieurs éléments issus d'une même mesure, les valeurs de K et de θ sont les mêmes et n'ont donc pas besoin d'être considérées. Les valeurs de λ_{ij} varient avec la racine carrée de l'énergie cinétique et sont aisément déterminées et les valeurs de σ_{ij} ont été déterminées pour chaque élément [132, 133]. Ces valeurs sont généralement combinées dans le facteur de sensibilité relative, FSR_{ij}, disponible pour chaque élément i (souvent pour plusieurs orbitales du même élément) et la quantité relative de deux éléments a et b, n_a et n_b, à la surface peut être déterminée à partir de l'intensité de leur pic de photoélectrons par l'équation suivante :

$$\frac{n_a}{n_b} = \frac{I_a}{I_b}.\frac{FSR_b}{FSR_a} \tag{2.3}$$

L'XPS permet donc, en plus d'identifier les éléments présents à la surface d'un échantillon (à l'exception de l'hydrogène et de l'hélium pour lesquels σ_{ij} est trop faible ou non-existante, cas de H), de faire l'analyse quantitative relative des éléments détectés.

La réalisation de l'expérience XPS nécessite un appareillage relativement complexe dont les composantes essentieles sont présentés à la figure 2.4. Quelques aspects du montage méritent d'être détaillées :

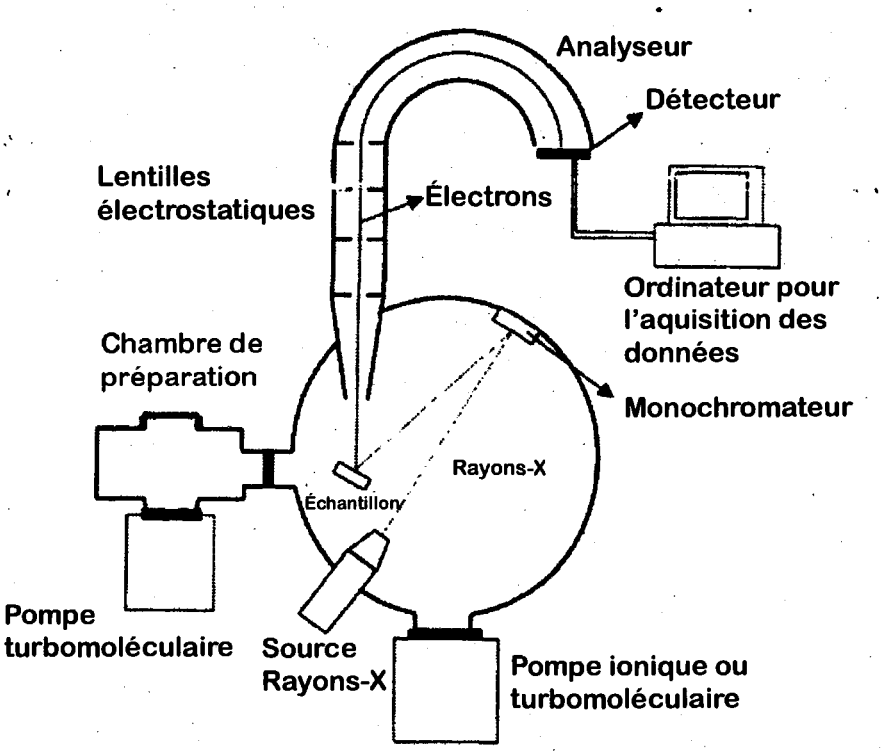


FIGURE 2.4 Schéma d'un instrument XPS [128].

- *Le système à vide* : Les électrons ne peuvent évidemment pas traverser un gaz à pression atmosphérique. L'instrument XPS doit donc être pompé pour permettre les analyses. Le vide des appareils XPS est cependant beaucoup plus poussé ($\sim 10^{-9}$ Torr) que le vide requis pour permettre aux électrons de se déplacer ($\sim 10^{-5}$ Torr) : L'utilisation d'équipement ultra-vide permet d'assurer l'intégrité de la surface à analyser pendant la mesure. À une pression de $\sim 10^{-9}$ Torr, il faudra environ 45 minutes pour que tous les sites de la surface soient visités par une molécule d'oxygène, alors qu'à $\sim 10^{-5}$ Torr il ne faudra qu'environ 30 secondes. Le système à vide qui, dans des conditions idéales, peut atteindre une pression de $\sim 10^{-11}$ Torr, est constitué de divers types de pompes opérant toutes dans leur régime propre.

- *La source de rayons X* : Dans une source conventionelle, des électrons sont émis par un filament chauffé et sont accélérés par une haute tension (10-15 kV) contre une anode cible. Les collisions électroniques avec l'anode auront plusieurs effets, dont un sera d'induire des transitions électroniques dans les atomes de la cible qui conduiront à l'émission de photons de fluorescence X caractéristiques de l'élément constituant l'anode (voir Fig.2.3). Les radiations les plus utilisées pour générer les photoélectrons ($h\nu$ dans l'équation 2.1) sont les radiations Kα du magnésium (1253.6 eV) et de l'aluminium (1486.6 eV). Ces raies d'émission de fluorescence sont en fait une raie double dont les largeurs sont respectivement de 0.7 et 0.85 eV pour le magnésium et l'aluminium. Les systèmes modernes sont équipés de monochromateurs qui permettent de réduire la largeur inhérente de la raie d'excitation à 0.4 eV, mais tout en sacrifiant de l'intensité.

- *L'analyseur d'énergie électronique* : C'est la partie de l'instrument XPS qui permet de mesurer l'énergie cinétique des photoélectrons émis par l'échantillon (le E_k de l'équation 2.1). Les analyseurs d'énergie les plus communs consistent en deux hémisphères concentriques comportant des fentes d'entrée et de sortie. Une différence de potentiel est appliquée entre les deux hémisphères, pour que seuls les photo-

électrons ayant l'énergie désirée puissent rejoindre la fente de sortie sans entrer en collision avec les parois de l'analyseur.

Le spectre XPS La figure 2.5 présente un spectre XPS typique, comportant les caractéristiques spectrales les plus communes à ce type de spectroscopie. Pour une lecture aisée des spectres, l'axe des abscisses est généralement donné en énergie de liaison telle que calculée à partir de l'équation 2.2. L'axe des ordonnées, quant à lui, possède des unités en « comptes » ou en « comptes/s » qui représentent le nombre de photoélectrons comptés au détecteur. Cette mesure n'a aucune valeur quantitative, mais sert plutôt d'indicateur à l'expérimentateur car sa reproductibilité indique le bon fonctionnement de l'appareil. Les structures spectrales observées peuvent être attribuées à trois phénomènes : la photoémission due aux niveaux de coeur, la photoémission due à la bande de valence et l'émission Auger. Dans tous les cas, pour être observés, ces phénomènes doivent impliquer des transitions dont l'énergie est comprise entre quelques eV (section efficace suffisante pour des photons de 1kV) et un peu moins que l'énergie de la radiation incidente (1253.5 eV pour Mg ou 1486.6 eV pour Al).

- *Les niveaux de coeur* : Sur la figure 2.5, les pics notés 1s, 2s et 2p correspondent à l'émission de photoélectrons provenant de ces orbitales pour les éléments indiqués. Les pics ont un profil issu d'une combinaison Gaussienne et Lorentzienne, distributions attribuées respectivement à l'électronique de détection et à l'effet photoélectrique. C'est à partir de l'aire relative de ces pics qu'est effectuée l'analyse quantitive relative en XPS. Il est à noter que les pics provenant d'orbitales différentes d'un même atome n'ont pas la même hauteur (aire). Ceci est attribuable aux différentes valeurs de sections efficaces des orbitales correspondantes.

- *La bande de valence* : Les électrons dans les bandes de valence, soit délocalisés, soit

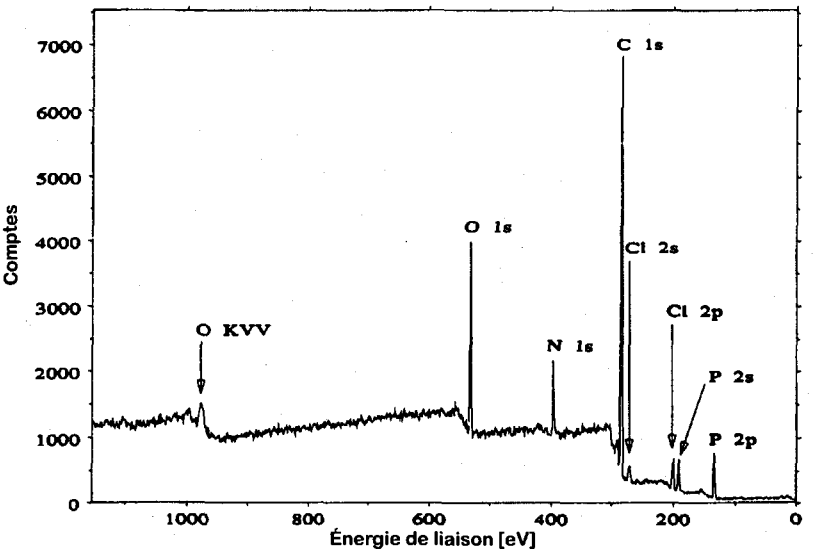


FIGURE 2.5 Spectre XPS du poly(phenoxyphosphazene) excité par une radiation AlKα monochromatisée [134].

dans une orbitale de liaison, dont l'énergie de liaison est de quelques eV (entre 0 et 20 eV), peuvent aussi engendrer des pics de photoélectrons. L'échelle sur la figure 2.5 ne permet pas de voir les électrons de la bande de valence puisque ceux-ci sont de faible intensité. La spectroscopie des photoélectrons UV (UPS) généralement effectuée sur le même appareillage que l'XPS, mais avec une source différente, permet d'étudier ces photoélectrons plus efficacement.

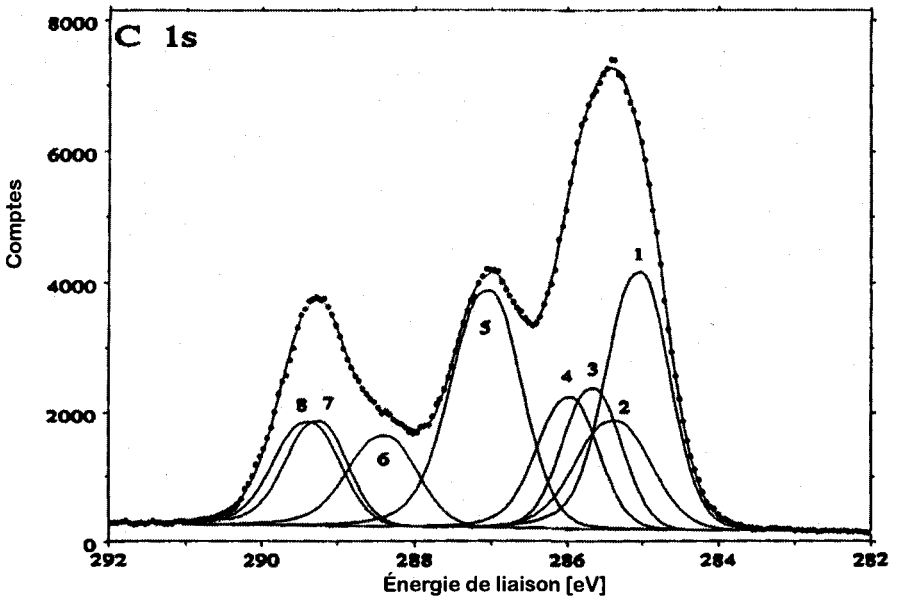
- *Les électrons Auger* : Le pic O KVV sur la figure 2.5 correspond au pic d'électrons Auger émis par l'oxygène. Les pics Auger présentent peu d'intérêt en XPS et ils peuvent souvent créer de la confusion avec les pics issus des photoélectrons. Ils peuvent cependant aider à l'identification d'un élément et sont aisément différenciés des pics de photoélectrons par la comparaison de deux spectres pris avec des sources X différentes : les pics de photoélectrons seront toujours à la même énergie de liaison alors que l'energie des pics Auger varie avec l'énergie des photons incidents.

Rapport des concentrations élémentaires Quelques conventions existent pour l'expression des données XPS. Comme l'XPS est une technique d'analyse élémentaire relative, il n'est pas possible de rapporter les résultats en termes de concentrations absolues. Pour les matériaux organiques, plusieurs scientifiques rapportent les concentrations élémentaires comme un rapport à la concentration de carbone (ex. N/C ou O/C). Puisque la quantité de carbone est généralement beaucoup plus grande que celle d'oxygène ou d'azote, elle est considérée comme une référence relativement stable, un standard interne. Dans tous les cas, il est souhaitable que la valeur rapportée corresponde à une réalité physique, soit l'importance relative des différents éléments à la surface du matériau analysé.

Les PP:N peuvent être déposés sur une large plage de concentration d'azote incorporée et la quantité d'azote maximale possible est très élevée. Dans ce cas spécifique, le rapport au carbone ne représente plus bien la réalité physique qui est l'importance relative des éléments à la surface. En effet, puisque la concentration d'azote peut atteindre 40% en surface et qu'une partie significative du carbone de surface a été remplacée par de l'azote, la quantité de carbone ne peut plus être considérée comme une valeur de référence. Les atomes de carbone, d'azote et d'oxygène ayant des rayons covalents similiaires, il est pertinent de considérer tous les éléments présents à la surface lors du calcul de l'importance relative de chacun. L'équation suivante est celle que nous utilisons pour calculer l'importance relative à la surface d'un élément E par rapport au total des éléments détectés à la surface : le carbone, C, l'azote, N, et l'oxygène.

$$[E] = \frac{E}{N + O + C} \times 100\% \tag{2.4}$$

Nous croyons que cette manière de calculer les concentrations relatives en XPS est plus représentative de la distribution des éléments chimiques sur les sites de surface.



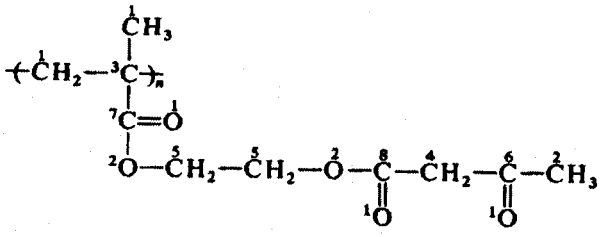


FIGURE 2.6 Spectre du pic de photoélectron C 1s du poly(actetylacetoxyethyl methacrylate). Les composantes réfèrent aux atomes de carbone numérotés dans la formule de l'unité de répétition [130].

Le spectre XPS haute résolution Les énergies de liaison des électrons dans les niveaux de coeur sont une des caractéristiques spécifiques des éléments. Cependant, l'environnement chimique d'un atome peut faire varier de manière subtile l'énergie de liaison des électrons dans les niveaux de coeur. Les électrons de valence ont un effet d'écrantage électronique sur les électrons de coeur ; dans le cas où les électrons de valence mobiles sont délocalisés par un atome ou un groupement électronégatif avoisinant, ils font varier le champ électrique au niveau des orbitales de coeur, ce qui a pour conséquence de faire varier de quelques eV ou d'une fraction d'eV l'énergie de liaison des électrons de coeur. Cet effet est appelé déplacement chimique, ΔE_b.

Il est possible de tirer avantage de ce phénomène en faisant l'analyse d'un spectre à haute résolution d'un pic de photoélectron de manière à séparer les différents sous-pics correspondants à un même atome dans des environnements chimiques différents. Le ΔE_b des différents sous-pics est caractéristique de l'environnement chimique de l'atome et permet d'en faire l'analyse quantitative. La figure 2.6 est un exemple d'une synthèse de courbes sur un pic de photoélectron issue de l'orbitale 1s des atomes de carbone d'un polymère organique. L'analyse quantitive relative des espèces carbonées ayant des environnements chimiques différents est ici possible.

La profondeur d'analyse La sensibilité à la surface de la technique XPS n'est pas attribuable à la profondeur de pénétration de la radiation X d'excitation, qui est de plusieurs micromètres, mais plutôt à la capacité des photoélectrons produits à s'extraire de la surface de l'échantillon pour être détectés. Sur leur trajet d'extraction, les électrons subissent des collisions inélastiques qui réduisent leur énergie cinétique. Ils sont aussi influencés par les charges positives dans le matériau et par le potentiel de surface. L'atténuation du photoélectron par les collisions inélastiques obéit à la loi de Beer-Lambert. L'intensité d'un signal de photoélectron, I_z provenant d'une certaine profondeur, z, est donnée par la l'équation suivante :

$$I_z = I_0 \exp\left(\frac{-z}{\lambda}.\sin(\theta)\right) \tag{2.5}$$

où I_0 est l'intensité des photoélectrons à la profondeur z, θ l'angle existant entre la normale à l'échantillon et le détecteur et λ le libre parcours moyen inélastique. Cette dernière valeur correspond à la distance que peut parcourir un électron entre deux collisions et dépend principalement de l'énergie cinétique du photoélectron et de la nature du matériau traversé. Seah et Dench ont dérivé une équation empirique pour le libre parcours moyen inélastique dans l'aluminium λ_{Al} [135] :

$$\lambda_{Al} = \left(\frac{10^3}{\rho}\right)(AE_k^{-2} + BE_k^{0.5}) \tag{2.6}$$

où ρ est la densité du matériau duquel s'échappent les photoélectrons. La profondeur de sonde est généralement assimilée à la profondeur de laquelle proviennent 95% des photoélectrons et correspond à environ 3λ à incidence normale ($\theta = 0$).

Il est intéressant de noter que selon l'équation 2.5, il est possible de moduler la profondeur de sonde de la technique en faisant varier θ. C'est le principe à la base de l'XPS résolu en angle, ARXPS, que nous ne détaillerons pas ici, mais qui est largement expliqué ailleurs [136–138]. Une autre manière d'envisager une modulation de la profondeur de sonde serait de faire varier λ en changeant l'énergie cinétique des photoélectrons. Cette technique nécessite un contrôle sur l'énergie de la radiation X incidente, ce qui est impossible dans la plupart des laboratoires, mais qui est rendue possible grâce à la radiation synchrotron. Cette technique prometteuse n'en est qu'à ces balbutiements, mais quelques publications sont déjà disponibles à ce sujet [139, 140].

Analyse XPS des polymères plasmas L'analyse des polymères plasma comporte quelques particularités desquelles l'utilisateur doit être conscient pour s'assurer de la validité de ses mesures. Les polymères plasma ayant, bien entendu, une structure organique sont, comme tous les autres matériaux organiques, sensibles à la photodégradation par les rayons X. Les photons énergétiques peuvent briser les liens covalents entre les atomes et créer une dégradation chimique du matériau. Cette dégradation étant proportionelle à l'intensité et à la dose de rayons X absorbés par le matériau, plusieurs précautions doivent être prises pour s'assurer que ce dernier conserve son intégrité durant la mesure. Par exemple, l'intensité du faisceau de rayons X peut être abaissée et la durée de la mesure doit absolument être

contrainte pour préserver l'intégrité du matériau. De plus, les polymères plasma sont généralement des isolants électriques, ce qui implique que les photoélectrons éjectés ne sont pas localement remplacés et que le matériau devient électriquement chargé. Cette charge cause un déplacement de tous les pics XPS et une correction doit être appliquée au spectre en utilisant un pic dont la position est connue comme référence. On prend généralement, au début et à la fin d'une mesure XPS sur un matériau organique, un spectre rapide du pic photoélectronique de l'orbitale 1s de l'atome de carbone. En vérifiant la superposition parfaite des deux spectres, il est possible de s'assurer que le matériau ne se soit pas dégradé durant la mesure et que l'effet de charge demeure constant.

Comme il a déjà été énoncé à la section 2.2, les PP:N sont des matériaux complexes qui peuvent potentiellement contenir une multitude de groupements fonctionnels différents. L'XPS à haute résolution ne permet pas de distinguer tous ces groupements fonctionnels aisément, car plusieurs ne sont pas répertoriés dans la littérature, ce qui rend la synthèse de courbes sur les spectres haute résolution des PP:N imprécises et peu fiable. Pour effectuer l'analyse des groupements fonctionnels chimiques, d'autres techniques devront donc être employées.

2.2.1.1.1 Dérivation chimique pour la quantification des groupements fonctionnels À la section précédente, il a été montré que la large distribution de groupements fonctionnels dans les PP:N rend leur quantification par XPS haute résolution pratiquement impossible. L'information chimique à la surface est pourtant d'importance majeure pour la compréhension des propriétés bioactives des PP:N. Une solution alternative pour l'analyse quantitative des groupements fonctionnels à la surface est l'utilisation de marqueurs chimiques pouvant réagir sélectivement avec des groupements fonctionnels spécifiques. Ces marqueurs chimiques sont choisis selon deux critères : ils doivent être aisément quantifiables, c'est-à-dire contenir

TABLEAU 2.7 Agents de dérivation chimique et les groupements fonctionnels qu'ils quantifient.

Nom	Groupement cible	Incompatibilités	Réf.
Trifluorométhyl benzaldéhyde (TFBA)	Amines primaires	Aucune	[27, 45, 49, 51]
Pentafluorobenzaldéhyde (PFBA)	Amines primaires	Aucune	[46]
Chlorobenzaldéhyde	Amines primaires	Aucune	[141]
Anhydride Trifluoroacétique (TFAA)	Alcools, amines secondaires	Amines primaires	[45, 141]
Bleu de Toluidine O	Acides carboxyliques	Aucune	[142]
2,2,2-trifluoroéthanol	Acides carboxyliques	Aucune	[141]

un groupement chimique qui offre un signal distinct du matériau à analyser, et ils doivent réagir sélectivement et complètement avec le groupement fonctionnel à quantifier, c'est-à-dire avec seulement un des groupements fonctionnels contenus dans le matériau. Cette dernière condition n'est jamais absolue et doit être vérifiée pour chaque matériau analysé. Le tableau 2.7 recense les principaux agents de dérivation chimique répertoriés dans la littérature.

Nous ne détaillerons que le procédé impliquant le trifluorométhylbenzaldéhyde (TFBA) puisque c'est le seul agent que nous ayons utilisé pour la présente recherche. Nous l'avons choisi car il a un point d'ébulition plus faible que le PFBA et qu'il offre une plus grande sensibilité que le chlorobenzaldéhyde (3 fluors au lieu d'un seul chlore). La plupart des autres agents de dérivation fonctionnent sur un principe analogue. Le TFBA contient un groupement chimique aldéhyde (voir tableau 2.4) qui a la capacité de réagir sélectivement et rapidement avec les amines primaires (en discriminant les amines secondaires et les autres groupements fonctionnels) pour former un groupement imine (voir tableau 2.2). Le TFBA est une

petite molécule avec une tension de vapeur élevée à pression atmosphérique, ce qui permet de conduire la réaction à l'interface gaz-solide plutôt que liquide-solide. Les réactions en phase vapeur sont préférables à celles impliquant des liquides, qui pourraient modifier la surface dérivée. Finalement, la molécule de TFBA contient du fluor, élément non présent dans les PP:N et facilement détectable et quantifiable par XPS. Trois atomes de fluor détectés correspondront donc à une amine primaire à la surface.

Bien que les sections 3.1.2.2, 3.2.2.2.1 et 4.2.4 présentent les conditions expérimentales, il est pertinent de détailler ici les subtilités des calculs effectués pour obtenir les quantités d'amines primaires. La dérivation chimique altère la surface du matériau analysé en changeant les rapports des éléments chimiques à la surface. En plus d'ajouter trois atomes de fluor, le TFBA ajoute huit atomes de carbone et deux atomes d'oxygène par molécule greffée, ce qui a pour conséquence de diminuer l'importance relative de l'azote par rapport aux autres éléments dans le spectre après dérivation. Il y a plusieurs manières de traiter ce problème [143], mais nous ne détaillerons ici que celle utilisée pour la présente recherche.

La détermination de la quantité d'amines primaires en surface est faite à partir de deux spectres XPS : d'abord, celui de l'échantillon avant dérivation, d'où on tire les concentrations relatives à la surface, calculées selon l'équation 2.4, du carbone, $[C]_{nd}$, de l'azote, $[N]_{nd}$, et de l'oxygène, $[O]_{nd}$; ensuite, le spectre après dérivation qui livre la même information sur le carbone, $[C]_d$, l'azote, $[N]_d$, l'oxygène, $[O]_d$ et le fluor $[F]_d$[1]. Dans le spectre XPS après dérivation, les concentrations relatives du carbone et de l'oxygène sont altérées par l'agent de dérivation. Par contre, la quantité d'azote et sa distribution en groupements fonctionnels restent inchangées. Étant certain que pour chaque trois atomes de fluor détectés à la surface, l'atome

[1] « nd » = non-dérivé ; « d » = dérivé

d'azote dans l'amine primaire correspondant est aussi détecté, il est possible de calculer la sélectivité pour les amines primaires rapportée en pourcentage, $[NH_2]/[N]$, à partir de l'équation suivante :

$$\frac{[NH_2]}{[N]} = \frac{[F]_d}{3.[N]_d} \times 100\% \tag{2.7}$$

Le pourcentage de l'azote total correspondant aux amines primaires étant connu, nous pouvons calculer la quantité totale d'amines primaires en pourcentage des atomes à la surface, $[NH_2]$, ou en rapport au carbone total $[NH_2]/[C]$ par les équations suivantes :

$$[NH_2] = \frac{[NH_2]}{[N]} \times [N]_{nd} \times 100\% \tag{2.8}$$

$$\frac{[NH_2]}{[C]} = \frac{[NH_2]}{[N]} \times \frac{[N]_d}{[C]_d} \times 100\% \tag{2.9}$$

Bien que le rapport $[NH_2]/[C]$ soit le plus utilisé dans la littérature, nous avons préféré, pour cette recherche, la quantification sous la forme $[NH_2]$, pour les raisons énoncées à la sous-section « Rapport des concentrations élémentaires » de la section 2.2.1.1.

2.2.1.2 Spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (NEXAFS)

La spectroscopie de la structure fine autour des discontinuités d'absorption des rayons X (NEXAFS) est une spectroscopie d'absorption (bien qu'elle soit souvent

mesurée indirectement, tel qu'expliqué plus loin) comme le sont les spectroscopies infrarouge (IR), ultraviolet-visible (UV-VIS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN), où l'on mesure l'absorption d'un rayonnement incident en fonction de sa longueur d'onde. Cependant, contrairement aux spectroscopies IR, UV-VIS et RMN, où la source du rayonnement incident est simple et relativement peu coûteuse (céramiques émettant dans l'IR, filaments incandescents ou émetteurs radio fréquentiels), les rayons X émis sur une large bande de longueur d'onde utilisée en NEXAFS sont extraits des radiations émises par un synchrotron [144]. Les structures d'absorption étudiées en NEXAFS découlent des orbitales moléculaires antiliantes présentes dans le matériau et sont particulièrement intenses dans le cas des orbitales antiliantes π, désignées ci-après par π^*. Cette technique permet donc d'obtenir de l'information sur les groupements fonctionnels insaturés (contenant des liens doubles, triples) [144–147].

Structures du spectre d'absorption des rayons X Les spectres d'absorption des rayons X comportent des discontinuités (structures primaires du spectre) lorsque l'énergie des photons incidents, $h\nu$, correspond à l'énergie de liaison d'un électron dans une orbitale de coeur, E_b, d'un élément présent dans le matériau analysé. À $h\nu \geq E_b$ les photons X traversant le matériau génèrent des photoélectrons et une absorption (conséquence de l'augmentation de la section efficace d'absorption qui est directement liée au coefficient d'absorption) plus élevée est mesurée. Cependant, à des énergies juste en dessous de E_b l'absorption des photons X peut aussi avoir lieu, mais plutôt que d'être libéré de l'atome comme photoélectron, l'électron du niveau de coeur sera promu dans l'orbitale antiliante libre de plus basse énergie (LUMO) (voir figure 2.7). Les LUMOs des composés insaturés sont des états liés dont l'énergie est plus faible que celle du vide, E_{vide} ; leurs structures spectrales correspondantes, des pics étroits situés à une énergie plus faible que E_b, sont nommés résonances π^*. La position de ces pics dans la structure fine est caractéristique

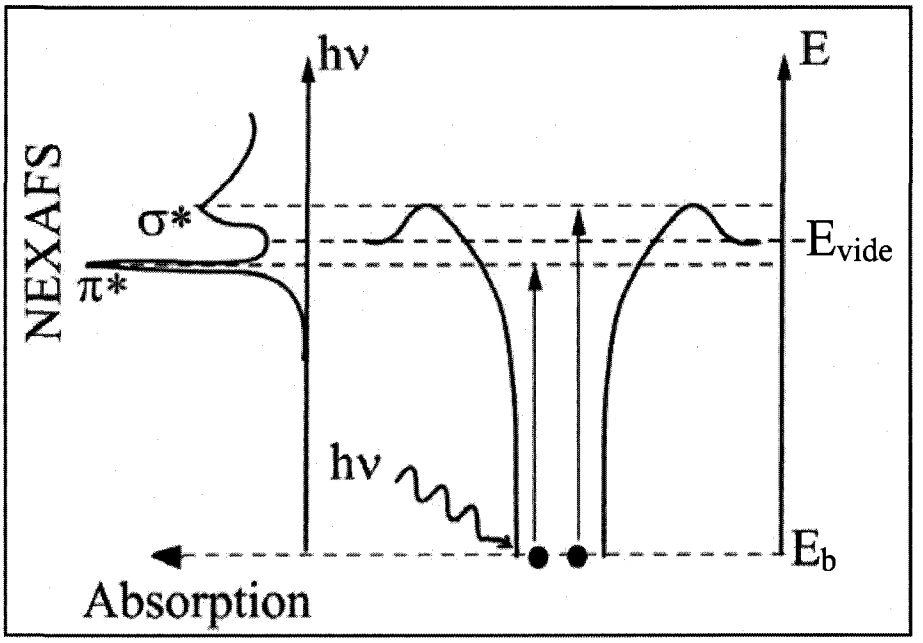


FIGURE 2.7 Représentation schématique de l'absorption X présentant les mécanismes de génération du spectre NEXAFS [148].

des groupements fonctionnels comportant les orbitales π^* et leur intensité à leur concentration dans le matériau.

Les transitions des électrons du niveau de coeur vers les orbitales σ antiliantes, situées à un niveau énergique plus élevé que E_{vide}, sont aussi possibles et donneront lieu à des pics larges à des énergies supérieures à E_b. Leur analyse est cependant plus incertaine pour le type de matériau impliqué dans cette recherche et ils ne seront donc pas étudiés en détail.

La relaxation des trous créés par les photoélectrons et les électrons promus aux orbitales LUMO se fera par les mécanismes décrits dans la figure 2.3. Le processus de relaxation favorisé est la génération d'électrons Auger lors du remplissage de l'orbitale de coeur libre par un électron de la bande de valence (qui pourra être le même électron que celui initialement promu lors du processus d'absorption). La quantité d'électrons Auger émise durant ce processus est directement proportio-

nelle à la section efficace d'absorption des rayons X associés. Ce dernier point est important car il souligne qu'il est possible de substituer la mesure de l'absorption des rayons X par le compte des électrons Auger (et autres processus électroniques secondaires subséquents) pour l'obtention du spectre NEXAFS.

L'expérience NEXAFS Il y a plusieurs modes d'expérimentation possibles pour la spectroscopie d'absorption des rayons X. En mode direct, le flux de photons transmis à travers un échantillon est mesuré et comparé au flux initial. Cependant, cette méthode est restreinte aux échantillons ayant des densités optiques en dessous de la limite d'absorption totale, c'est-à-dire des films polymériques peu épais (<250 μm).

Il est aussi possible d'utiliser les mécanismes de relaxation suivant l'absorption X pour obtenir un spectre NEXAFS. La fluorescence X est à la base des expériences de rendement de fluorescence (FY) où les photons fluorescents émanant de la surface sont mesurés en fonction de $h\nu$. L'émission d'électrons Auger et la cascade de processus électroniques secondaires subséquents pourront aussi être utilisées pour reconstruire le spectre d'absorption X, tel que décrit à la section précédente. En fonction de l'expérience et de ses objectifs spécifiques, on choisira de détecter tous les électrons provenant de la surface (rendement électronique total, TEY) où seulement ceux ayant une énergie supérieure à un certain seuil (rendement électronique partiel, PEY). En XPS, les électrons libérés de la surface proviendront d'une profondeur maximale dépendant de leur libre parcours moyen inélastique (λ, voir équation 2.6), ce qui signifie que les modes de détection électronique de la spectroscopie NEXAFS sont, eux aussi, sensibles à la surface du matériau analysé.

Dans toutes les expériences rapportées ici, le mode TEY a été utilisé. Les électrons libérés de la surface ont été détectés sans mécanisme de discrimination par un

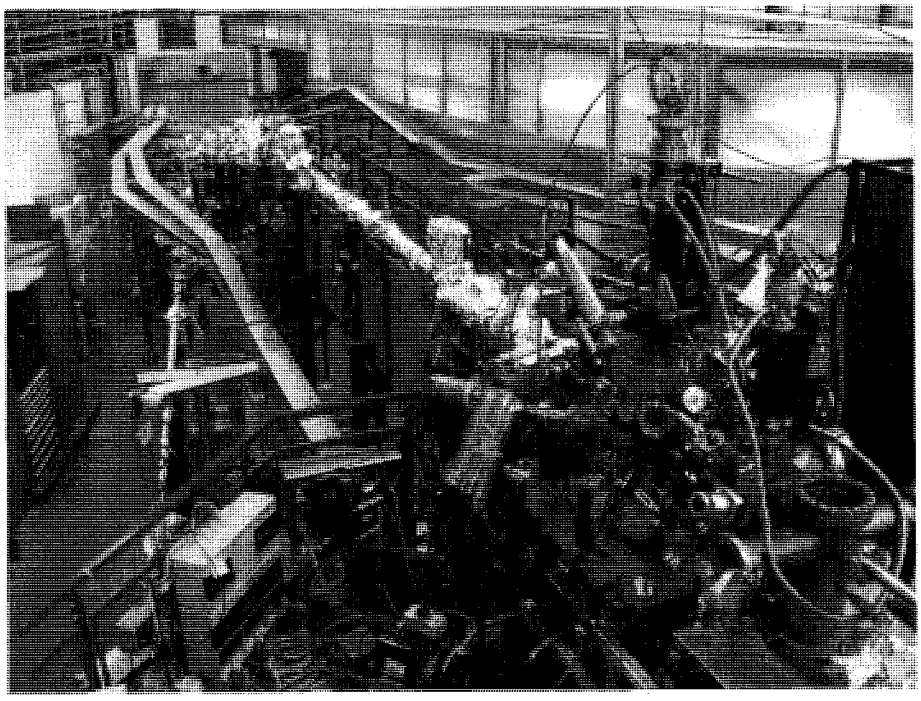


FIGURE 2.8 Montage expérimental pour le NEXAFS et sa ligne de faisceau. Synchrotron BESSY II à Berlin, Allemagne.

détecteur à plaques « channeltron ». Les expériences ont été réalisées sur la ligne de faisceaux HE-SGM du synchrotron BESSY II. Une photo du montage expérimental est présentée à la figure 2.8. Les conditions expérimentales détaillées peuvent être consultées à la section 3.2.2.2.2.

2.2.1.3 Goniométrie d'angle de contact (CAG)

L'angle de contact qui s'établit entre une surface solide microscopiquement lisse et un liquide dépend directement de la nature chimique et physique des deux surfaces formant l'interface. Pour le solide, seule la première monocouche présentée au liquide importe pour la formation de l'équilibre de contact. L'angle de contact est donc extrêmement sensible aux changements de surface du matériau. La technique décrite dans la présente section est donc pertinente dans une optique d'applications

biotechnologiques où seule la nature de la première monocouche de la surface est réellement significative. Bien que cette technique soit la plus sensible à la surface de toutes celles employées dans cette étude, les informations obtenues sont peu spécifiques à la nature chimique de la surface, ce qui lui confère un impact somme toute limité.

Le goniomètre d'angle de contact permet de mesurer l'angle de contact, θ, entre une goutte de liquide et une surface solide. Cette valeur, qui est une mesure de l'étalement d'une goutte de liquide sur une surface, ou de sa mouillabilité, dépend des énergies de surface du liquide, γ_{lv}, du solide γ_{sv} et de l'énergie d'interface, γ_{sl}, entre le liquide et le solide, tel que décrit par l'équation de Young [149] :

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cos\theta. \tag{2.10}$$

.

Cette équation trouve cependant peu d'utilité pratique puisque seuls γ_{lv} et θ peuvent être directement déterminés expérimentalement. Il n'est donc pas possible d'utiliser directement cette équation pour obtenir γ_{sv}. Étant donné l'importance de γ_{sv} dans certains domaines, plusieurs théories ont été développées pour permettre un calcul approximatif de celle-ci. Puisque plusieurs approches sont répertoriées dans la littérature et qu'aucune ne fait consensus, nous ne présenterons ici que celle utilisée pour déterminer l'énergie de surface des PP:N. La méthode que nous décrivons a été proposée en 1969 par Owens et Wendt [150] et raffinée plus tard par Kaelble [151, 152]. Elle est basée sur deux hypothèses : la première, proposée par Fowkes [153] présente l'énergie de surface γ comme étant la somme de deux composantes indépendantes et additives, chacune étant la conséquence d'un type de force intermoléculaire. En se basant sur cette hypothèse, Owens et Wendt ont séparé l'énergie de surface en deux composantes : γ^d, représentant les forces dispersives de London

et γ^p rassemblant les autres types d'interactions, toutes considérés comme polaires (dîpole-dîpole, liaisons hydrogènes, etc.). Ce principe est résumé dans l'équation suivante :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p. \tag{2.11}$$

La deuxième hypothèse adoptée par Owens et Wendt est basée sur la « moyenne géométrique » telle que proposée par Girifalco et Good [154, 155]. Selon eux, l'énergie d'interface γ_{sl}, peut être exprimée comme la moyenne géométrique des énergies de surface des deux phases composant l'interface selon la relation suivante :

$$\gamma_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - 2\phi(\gamma_s\gamma_l)^{1/2}. \tag{2.12}$$

où γ_s est l'énergie de surface du solide, γ_l celle du liquide et ϕ est un paramètre d'interaction qui est près de 1 pour les énergies de surface faibles. À partir de cette dernière équation, Owens et Wendt ont dérivé une expression pour γ_{sl} dépendant des composantes polaires et dispersives de l'énergie de surface :

$$\gamma_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - 2(\gamma_s^d\gamma_l^d)^{1/2} - 2(\gamma_s^p\gamma_l^p)^{1/2}, \tag{2.13}$$

En incorporant cette équation dans celle de Young (Éq. 2.10) on obtient :

$$\gamma_l(1 + \cos\theta) = 2(\gamma_s^d\gamma_l^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p\gamma_l^p)^{1/2}. \tag{2.14}$$

qui peut être réorganisée sous la forme suivante :

TABLEAU 2.8 Tensions de surface totales (γ_l), dispersives (γ_l^d) et polaires (γ_l^p) utilisées pour déterminer l'énergie de surface des PP:N [151].

Liquide	γ_l (mN/m)	γ_l^d (mN/m)	γ_l^p (mN/m)
Eau	72,8	21,8	51
Éthylène glycole	48,3	29,3	19
Formamide	58,3	32,3	25
Phosphate de tricrésyl	40,9	39,2	1,7

$$\frac{\gamma_l(1+\cos\theta)}{2(\gamma_l^d)^{1/2}} = (\gamma_s^d)^{1/2} + (\gamma_s^p)^{1/2}\left(\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}\right)^{1/2}. \tag{2.15}$$

Si, à partir d'une série de liquides pour lesquels γ_l^d et γ_l^p sont bien connus, l'angle de contact θ est mesuré sur une surface solide pour laquelle γ_s est désirée; il est possible de déterminer cette valeur selon l'équation 2.15. En effet, le graphique de $\gamma_l(1+cos\theta)/2(\gamma_l^d)^{1/2}$ en fonction de $(\gamma_l^p/\gamma_l^d)^{1/2}$ résulte en une droite dont la pente sera égale à $(\gamma_s^p)^{1/2}$ et l'ordonnée à l'origine $(\gamma_s^d)^{1/2}$.

La méthode décrite par Owens, Wendt et Kaelble présentée ci-haut peut donc être utilisée pour déterminer les valeurs de γ_s^d, γ_s^p et γ_s en mesurant l'angle de contact pour une série de liquides aux énergies de surface bien connues. Le tableau 2.8 présente une série de liquides aisément purifiables et dont l'énergie de surface ainsi que les composantes polaires et dispersives sont bien connues [151].

Pour les mesures d'énergie de surface rapportées à la section 3.1, les mesures d'angle de contact ont été effectuées avec un instrument VCA Optima^{TM} (AST Products, Inc.), qui comprend une seringue et un microscope contrôlés par ordinateur. La seringue est utilisée pour délivrer des gouttelettes de volume constant (0.3 μl) alors que la caméra prend des photos des gouttelettes afin de permettre la mesure de

l'angle de contact avec la surface. Les photos sont prises rapidement à un temps constant après le dépôt de la goutte pour éviter son évaporation. Pour cette étude, nous avons utilisé les liquides suivants afin de déterminer l'énergie de surface : eau, formamide, éthylène glycol et phosphate de tricrésyl. L'angle de contact de chaque liquide a été mesuré quatre fois sur chaque surface analysée et l'incertitude résultante sur γ_s a été évaluée à $\pm$ 1 mN/m. Les valeurs d'angle de contact obtenus pour le BOPP et le LDPE sont reproductibles à l'intérieur de $\pm$ 2^o et sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs [81].

2.2.1.4 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique, AFM est une technique qui permet d'obtenir la topographie d'une surface à une échelle micro ou nanométrique. Faisant partie des microscopies-sonde à balayage, l'AFM est probablement la plus versatile et la plus utilisée de cette catégorie de techniques d'imagerie de surfaces. Les images de nos surfaces à l'échelle micro et nanométrique sont essentielles à notre étude : elles nous permettent de nous assurer que la rugosité de surface reste limitée à une faible valeur ($\sim$ 10 nm). Ceci, à son tour, est important puisque la morphologie d'une surface de chimie « constante » peut influencer son comportement vis-à-vis les cellules vivantes [156–159]. En effet, puisque notre étude vise à élucider les mécanismes d'interactions entre la chimie de surface et des cellules qui y adhèrent, nous devons nous assurer que la rugosité de surface soit suffisament faible pour qu'elle n'ait pas d'influence sur les processus cellulaires. L'image topographique de la surface permet aussi de vérifier la qualité des dépôts (d'éviter la formation de particules). Nous nous contenterons ici de décrire qualitativement la technique AFM ; une description plus détaillée peut être consultée dans quelques ouvrages qui traitent de ce sujet [160, 161].

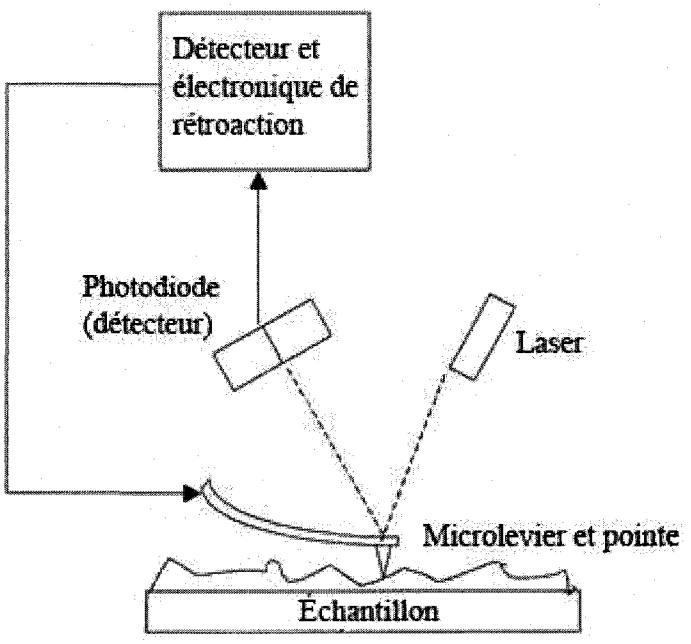


FIGURE 2.9 Schéma simplifié d'un instrument AFM.

La figure 2.9 présente le schéma d'un montage AFM typique. L'imagerie est effectuée en balayant la surface avec une sonde et en mesurant indirectement les forces d'interactions attractives et répulsives entre cette sonde et les atomes constituant la surface. La sonde est constituée d'une fine pointe à faible rayon de courbure ($\sim$ 10 nm) située à l'extrémité d'un microlevier, ce dernier ayant une longueur comprise entre 100 et 200 μm. La sonde est balayée sur la surface en utilisant deux céramiques piézoélectriques qui déplacent l'échantillon sous la pointe. Lorsque la pointe est déplacée de la surface et qu'elle rencontre une aspérité ou un trou, elle est défléchie par les forces intermoléculaires. La déflection est suivie par un laser qui est réfléchi sur la surface du microlevier vers la jonction de deux photodiodes. L'intensité lumineuse mesurée par chaque diode est un indicateur de la position du microlevier. Lorsque le microlevier est défléchi, une électronique de rétroaction rapide active un troisième piezoélectrique qui permet de varier la position du microlevier selon l'axe z et ainsi de rétablir sa position d'équilibre. La mesure de

la position z d'équilibre du microlevier pour chaque couple x,y génère une image tridimentionelle de la surface.

Les expériences rapportées dans cette étude ont été effectuées à l'aide d'un microscope AFM MultiMode de Digital Instruments en mode contact en utilisant des pointes en nitrure de silicium.

2.2.2 Autres caractérisations des matériaux

À la section précédente (2.2.1), nous avons présenté les techniques de caractérisation qui offrent, à divers degrés, la possibilité de discriminer la surface du reste de matériau massif. Puisque nous visons des applications où la chimie de surface a une grande importance, ce sont les techniques qui sont utilisées préférentiellement. Il existe cependant un nombre limité de ces techniques et elles ne peuvent fournir à elles seules une caractérisation complète du matériau. Contrairement aux techniques de modification de surface où seuls les premiers nanomètres de la surface sont altérés, les dépôts de couches minces laissent plus de latitude pour l'utilisation de techniques de caractérisation non-spécifiques à la surface. En effet, la technique de dépôts avec passes multiples utilisée au cours cette étude permet de supposer une bonne uniformité du dépôt dans la couche et une similitude certaine entre la surface et le reste du matériau massif. Toutes les techniques présentées dans cette section ont été appliquées sur des flocons de PP:N prélevés à l'aide d'une lame de rasoir à partir de dépôts faits sur de grandes surfaces (700 cm^2).

2.2.2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est utilisée dans plusieurs domaines pour élucider la nature chimique de composés, principalement organiques. Le spectre infrarouge

correspond généralement à une mesure de l'absorbance (ou de la transmittance) d'une substance, liquide, solide ou gazeuse, sur une plage de fréquences infrarouges, généralement exprimée en nombre d'ondes comprise entre 500 et 4000 cm^{-1}, correspondant à l'infrarouge moyen. L'énergie des photons dans cette plage de fréquence correspond à celle des transitions entre deux niveaux vibrationnels (et aussi, si cela est possible, rotationnels) des molécules organiques. L'excitation d'un mode de vibration dans une molécule organique se fait généralement de manière localisée, par groupements de quelques atomes, vibrant ainsi à une fréquence dépendant de la nature des atomes constituant le groupement, indépendamment du reste de la molécule. Il est important de noter qu'une transition vibrationelle par absorption de photon infrarouge sera possible si (et seulement si) elle est accompagnée d'une variation du moment dipolaire dans la molécule. La position des bandes d'absorption dans le spectre infrarouge peut donc indiquer la présence d'un groupe d'atomes dans un arrangement spécifique dans le composé soumis à l'analyse. Ces groupements d'atomes peuvent être associés aux groupements fonctionnels chimiques qu'ils constituent en partie ou en totalité et ainsi en permettre l'analyse qualitative et même quantitative si certaines conditions sont respectées. De manière concrète, un spectre infrarouge est généralement caractérisé par la position et l'intensité des bandes qui le constituent. Ces données pourront être comparées à celles contenues dans des tables répertoriant la position des bandes infrarouges correspondant aux groupements fonctionnels chimiques principaux. Ces tables sont le produit d'analyses théoriques et expérimentales. Le tableau 2.9 présente la position des bandes IR correspondant aux principaux groupements fonctionnels azotés constituant potentiellement les PP:N. Puisque la spectroscopie IR n'est pas très sensible aux fonctionnalités présentes en petites quantités, seuls les groupements azotés sont présentés ici. Bien que la spectroscopie infrarouge soit assez peu utilisée pour l'analyse quantitative, il est possible d'utiliser cette technique pour quantifier les groupements fonctionnels dans un composé, le coefficient d'absorption des grou-

TABLEAU 2.9 Positions des bandes IR correspondant aux groupements fonctionnels azotés constituant potentiellement les PP:N [163].

Position et Intensité*	Groupement fonctionnel	Assignation et remarques
3520-3320(m-f)	-NH_2 dans les amines primaires - aromatique et dans les amides	Étirement NH
2990-2850(m-f)	-CH_3 et -CH_2 dans les composés aliphatiques	Étirement CH symétrique et antisymétrique
2850-2700(m)	-CH_3 attaché à O ou N	Étirement CH
2260-2200(m-f)	-C≡N dans les nitriles	Étirement C≡N
2185-2115(f)	-N≡C dans les isonitriles	Étirement N≡C
1650-1580(m-f)	-NH_2 dans les amines primaires	Déformation NH_2
1475-1440(tf)	-CH_3, -CH_2 dans les composés aliphatiques	Vibration ciseau CH_2, déformation antisymétrique CH_3

*tf=très forte, f=forte, m=moyenne

pements fonctionnels étant le même dans des environnements chimiques similaires [162]. Il est intéressant de noter que le spectre infrarouge entre 500 et 4000 cm^{-1} est généralement unique à un composé particulier et que cette technique peut servir de technique d'identification sans équivoque des substances pures.

Le schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) typique est présenté à la figure 2.10. La source de rayonnement IR est généralement constituée d'une céramique chauffée à haute température pour maximiser son émission IR (émission du corps noir). On contrôle le rayonnement émanant de cette source pour qu'il soit parallèle et dirigé vers un interféromètre de Michelson constitué d'un miroir semi-réfléchissant (SR), d'un miroir fixe, M1 et d'un miroir mobile M2. Le miroir semi-réfléchissant, comme toute l'optique IR, est constitué d'un matériau approprié n'absorbant pas le rayonnement IR (c'est-à-dire le bromure de potas-

sium), et est recouvert de manière à réfléchir 50% de la radiation incidente. La radiation originant de la source est donc séparée en deux, une moitié allant vers le miroir M1 et l'autre vers M2. Les deux miroirs réfléchissent la radiation, qui sera ensuite recombinée au miroir semi-réfléchissant. Il pourra alors y avoir interférence des deux ondes recombinées avant qu'elles ne soient redirigées au travers de l'échantillon et détectées. Le miroir M2 est mécanisé et fait un mouvement de va-et-vient par rapport à SR, ce qui crée un patron d'interférence variant temporellement. Ce patron d'interférence (c'est-à-dire l'intensité du signal en fonction de la position du miroir M2), aussi appelé interférogramme, correspond à la transformée de Fourier du spectre IR. Cette manière d'acquérir le spectre IR, bien que théoriquement un peu plus complexe, est beaucoup plus précise, rapide et efficace que l'utilisation d'un spectromètre à monochromateur permettant de balayer les longueurs d'onde. L'acquisition d'un spectre infrarouge est toujours précédée de la prise d'un spectre de la ligne de base qui servira de référence pour mesurer l'absorbance IR. Le spectre de la ligne de base est nécessaire pour corriger la variation d'intensité de la source et l'efficacité du miroir semi-réfléchissant, qui varient en fonction de la longueur d'onde. Aussi, l'air ambiant contient certains gaz, comme la vapeur d'eau et le dioxyde de carbone, qui ont des bandes d'absorption IR. La prise d'un spectre de la ligne de base permet de minimiser leurs contributions.

La spectroscopie IR est généralement effectuée en transmission à travers un échantillon mince. Pour que la mesure soit possible, il faut que l'absorbance totale de l'échantillon ne dépasse pas une certaine limite (idéalement, plus de 1% de lumière transmise) afin qu'il soit possible de détecter adéquatement les différentes bandes, ce qui limite généralement l'épaisseur des échantillons à analyser à quelques dizaines, voire à une ou deux centaines de μm. Nous détaillerons, dans les sous-sections ci-dessous, deux techniques utilisées en transmission pour mesurer l'absorbance IR des PP:N, soit en dispersion dans un solide (KBr) et en solution dans un liquide.

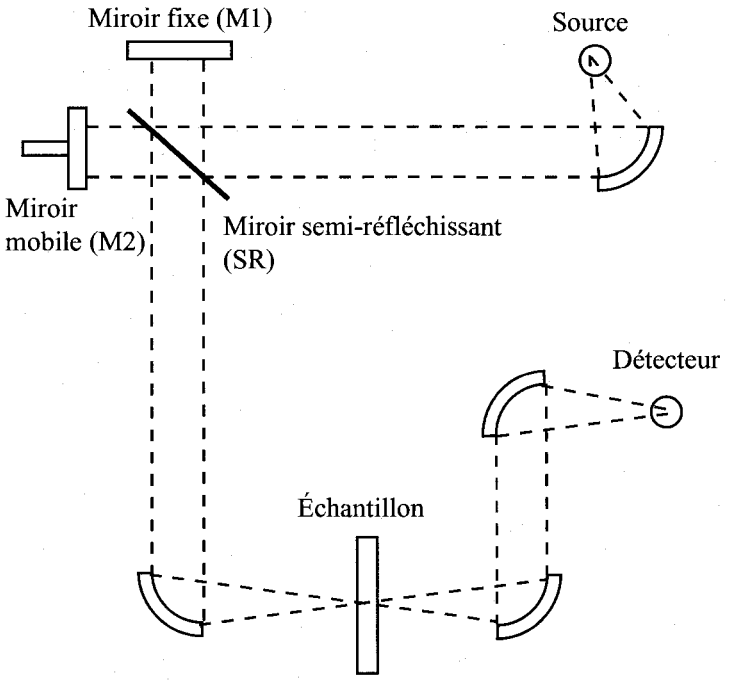


FIGURE 2.10 Schéma simplifié d'un spectromètre IR à transformée de Fourier [164].

Nous détaillererons aussi une autre technique IR fréquemment utilisée en sciences des surfaces : la spectroscopie par réflexion totale atténuée. La spectroscopie IR est généralement utilisée de manière qualitative, mais il a été possible de développer des conditions expérimentales propices à l'analyse quantitative de certains groupements fonctionnels contenus dans les PP:N.

Spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

La spectroscopie IR par réflexion totale atténuée, ATR, est, avec la technique de photoacoustique, l'une des techniques IR qui offre une bonne sensibilité à la contribution de la surface. La profondeur de sonde, environ 1 μm dans les meilleures conditions, est cependant beaucoup plus grande que l'épaisseur des couches déposées dans cette étude (autour de 100 nm). C'est pour cette raison que nous ne considérons pas la technique IR comme étant sensible à la surface des PP:N. Un

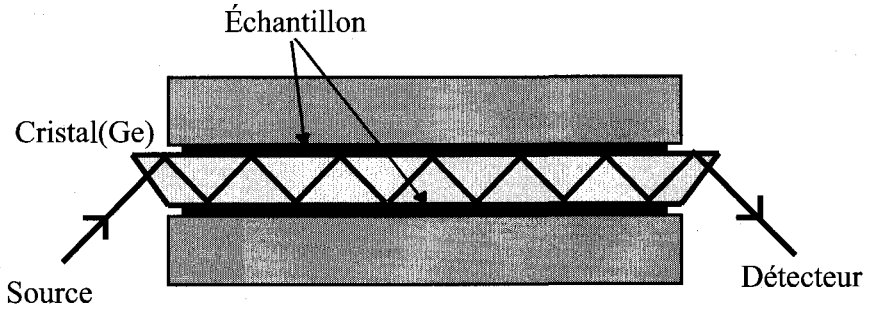


FIGURE 2.11 Réflections totales internes du faisceau en spectroscopie ATR-FTIR.

schéma représentant le montage spécifique à la spectrocopie ATR est présenté à la figure 2.11. L'expérience ATR est effectuée dans le spectromètre IR dans une configuration standard en mode transmission. Cependant, un cristal d'un matériau transparent à l'IR, par exemple le germanium, est placé dans le parcours optique du faisceau infrarouge. Le faisceau est dirigé dans le cristal, par l'utilisation d'une série de miroirs, à un angle tel que le faisceau subira des réflexions totales internes à répétition jusqu'à ce qu'il ait complètement traversé le cristal. Bien que la réflexion soit totale, une partie de la radiation incidente, appelée onde évanescente, se propage de l'autre côté de l'interface de réflexion. Si un matériau absorbant l'IR se trouve dans le chemin de l'onde évanescente, il pourra l'absorber et ainsi atténuer le faisceau IR incident de manière similaire au cas où la radiation IR aurait traversé un échantillon d'une épaisseur équivalente au parcours de l'onde évanescente dans le matériau. Il est important de noter que la décroissance en amplitude de l'onde évanescente normale à la surface du cristal est exponentielle et dépend de la longueur d'onde de la radiation. Ainsi, le spectre sera plus sensible à la couche située près de la surface qu'à la matière située plus en profondeur. De plus, la sensibilité à la surface dépendra de la longueur d'onde. Donc, la technique ATR permet de prendre le spectre IR d'un échantillon placé en contact intime avec le cristal, avec une sensibilité accrue à la surface. Cette technique est donc utilisée préférentiellement pour étudier les modifications de surface et les dépôts de couches minces puisqu'il

est généralement impossible de les étudier en mode transmission. Les mesure IR rapportées à la section 3.1 (l'article 1) ont étés effectuées avec un spectromètre IR Bio-Rad FTS-3000 Excalibur Series équipé d'un détecteur DTGS. Nous avons utilisé un cristal de germanium trapèzoïde modèle « Single Pass Trapezoid Plate » obtenu de Harrick Scientific Corporation d'Ossining, NY. La force du contact entre l'échantillon et le cristal a été contrôlée à l'aide d'une clé dynamométrique.

Analyse quantitative en Spectroscopie FTIR

La bande d'absorption correspondant aux nitriles et aux isonitriles autour de 2200 cm^{-1} se prête, à priori, bien pour l'analyse quantitative de ces deux groupements fonctionnels. Cependant, puisque la spectroscopie IR implique généralement des coefficients d'absorption élevés et puisque qu'il existe peu de matériaux liquides ou solides n'absorbant pas dans l'IR, il est généralement difficile de trouver des conditions propices pour l'analyse quantitative. Comme c'est généralement le cas dans les techniques spectroscopiques, l'analyse quantitative passe généralement par l'application de la loi de Beer-Lambert sur une mesure de l'absorbance IR à une certaine longueur d'onde, A :

$$A = \varepsilon l c \tag{2.16}$$

où ε est le coefficient d'absorption molaire, l le parcours optique à travers l'échantillon et c la concentration de l'analyte. Le principal obstacle à l'analyse quantitative provient de la difficulté à obtenir une mesure précise de l. Il existe quatre manières de prendre un spectre en transmission d'un matériau solide en IR : (i) en utilisant directement le matériau en film mince, (ii) en déposant le matériau sur un support transparent à l'IR, (iii) en dispersant le matériau dans un solide

transparent à l'IR (compressé en pastilles translucides) ou (iv) en solution dans un liquide (idéalement transparent à l'IR). Étant donné l'absorption élevée en IR, la prise du spectre directement à travers l'échantillon nécessite l'utilisation d'un film mince (généralement quelques dizaines de micromètres), ce qui rend une mesure précise de l difficile et souvent peu fiable. Le dépôt sur un substrat transparent à l'IR peut s'avérer un défi complexe puisque très peu de matériaux sont accessibles : ils sont coûteux et leur géométrie ne se plie pas facilement aux contraintes imposées par le système de dépôt à pression atmosphérique (espace interélectrodes de 1 mm). De plus, une mesure précise de l'épaisseur du dépôt peut souvent être difficile, tel que déjà mentionné ci-haut. Les deux derniers cas, (iii) et (iv), offrent cependant certaines possibilités pour l'analyse quantitative et ils seront donc expliqués plus en détail.

Spectroscopie infrarouge en dispersion dans le KBr en mode transmission La dispersion de flocons de PP:N dans une matrice de KBr offre une possibilité intéressante pour l'analyse quantitative de certaines fonctionnalités chimiques. La dispersion, formée d'une quantité précisément mesurée de PP:N, $W_{PP:N}$, et d'une quantité tenue relativement constante de KBr, W_{KBr}, est comprimée en pastilles de 13 mm de diamètre. Puisque la quantité de KBr est beaucoup plus grande que celle de PP:N, l'épaisseur de la pastille, qui correspond au parcours optique, l, est donnée par l'équation suivante :

$$l = \frac{W_{KBr}}{\rho_{KBr}.\pi.r^2} \tag{2.17}$$

où ρ_{KBr} est la densité du KBr solide comprimé , et r, le rayon de la pastille (6.5 mm). La concentration de PP:N dans la pastille, c, est donnée par la relation suivante :

$$c = \frac{W_{PP:N} \cdot \rho_{KBr}}{M_{KBr}}. \tag{2.18}$$

Le produit $c.l$ est donc donné par :

$$c.l = \frac{W_{PP:N}}{\pi . r^2}. \tag{2.19}$$

Conséquemment, l'absorbance, telle que calculée à partir de l'équation 2.16 dépend seulement de la masse du PP:N qui peut être aisément mesurée au dixième de milligramme, éliminant ainsi la condition contraignante sur la mesure précise de l. Cette technique pourra donc être employée pour l'analyse semi-quantitative des groupements fonctionnels nitriles et isonitriles dans les PP:N, en utlisant le poly(acrylonitrile) (PAN) et le toluenesulfonylmethyl isocyanide (TOSMIC) comme standards pour ces deux groupements fonctionnels, tels que détaillés à la section 3.2.2.2.4.

Un facteur important vient cependant nuire à la précision de la technique : la dispersion de la radiation IR par des imperfections dans la formation de la pastille. Une attention particulière devra donc être portée à la préparation de la dispersion de PP:N dans le KBr et à la préparation de la pastille. Heureusement, la courbe d'étalonnage, préparée à partir des matériaux standards, PAN et TOSMIC, permettra d'évaluer adéquatement la valeur de l'erreur introduite par ce facteur dépendant de l'expérimentateur. La technique en solution, (iv), a été développée pour pallier à ce problème et ainsi garantir une erreur limitée. Cependant, certains échantillons se sont révélés insolubles dans chacun des solvants envisagés et ont dû être analysés par la technique (iii) décrite dans la présente section.

Spectroscopie infrarouge en solution en mode transmission Il sera présenté plus loin, à la section 3.2.3.3, que certains solvants (organiques) peuvent solubiliser certains matériaux dans la famille des PP:N. Nous avons tiré avantage de cette propriété pour effectuer l'analyse quantitative des nitriles et des isonitriles dans ces PP:N. La préparation d'une solution, d'une concentration connue avec une assez bonne précision, est généralement aisée avec l'équipement approprié. La figure 2.12 présente le schéma d'une cellule spécifiquement conçue pour permettre l'analyse IR de liquides en permettant un bon contrôle sur le parcours optique, l. La cellule IR est constituée d'un ensemble de joints d'étanchéité et de deux fenêtres retenues ensemble par un support métallique. Une des fenêtres est perforée par deux trous, ce qui permet son remplissage à l'aide de seringues à travers une plaque métallique perforée munie de points d'attache pour les seringues. Les fenêtres sont composées de séléniure de zinc, ZnSe, matériau transparent aux photons infrarouges. Il offre une bonne stabilité aux solvants fortement polaires, ce qui n'est pas le cas de plusieurs matériaux traditionnellement utilisés dans l'optique IR. La distance entre les fenêtres, qui correspond à l, est maintenue constante par une entretoise qui permet de fixer l avec une bonne précision. Idéalement, le solvant utilisé devrait être parfaitement transparent aux IR, mais aucun des solvants permettant de solubiliser les PP:N ne répond complètement à cette condition. Plusieurs solvants sont, cependant, transparents sur une plage assez large de fréquences pour permettre l'aquisition d'un spectre dans ces régions. Le diméthylsulfoxyde, DMSO, a été utilisé pour faire l'analyse semi-quantitative des nitriles et des isonitriles dans les PP:N. Les détails de la méthodologie peuvent être consultés à la section 3.2.2.2.4.

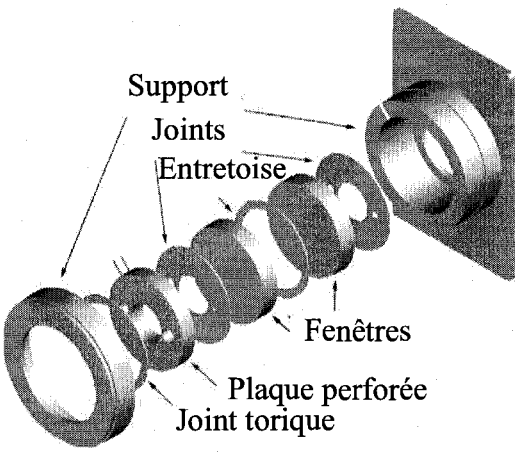


FIGURE 2.12 Schéma de la cellule IR liquide [165].

2.2.2.2 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire, EA, par combustion, bien qu'effectuée routinièrement dans plusieurs branches de la chimie et de la physique, est très peu utilisée en sciences des couches minces pour raisons de pénurie de masse. Cette technique, qui permet d'obtenir les concentrations élémentaires de C, N et H, requiert quelques milligrammes de matière, ce qui est généralement beaucoup plus que ce qui peut être produit dans un réacteur expérimental. Cependant, la configuration de notre réacteur à pression atmosphérique, qui permet des taux de dépôts élevés sur de relativement grandes surfaces (700 cm^2), a rendu possible la récupération de PP:N en flocons en quantité suffisante pour en faire l'EA. La technique d'EA comporte plusieurs caractéristiques qui la rendent particulièrement intéressante pour notre étude. Elle permet d'obtenir la concentration d'hydrogène, élément indétectable par XPS, qui est importante pour la formation de la structure organique du matériau et qui est un élément constituant des groupements fonctionnels principaux, comme les amines primaires. Puisque l'oxygène peut être obtenu par XPS et par bilan de masse, il est donc possible de dériver une formule chimique empirique pour les PP:N à par-

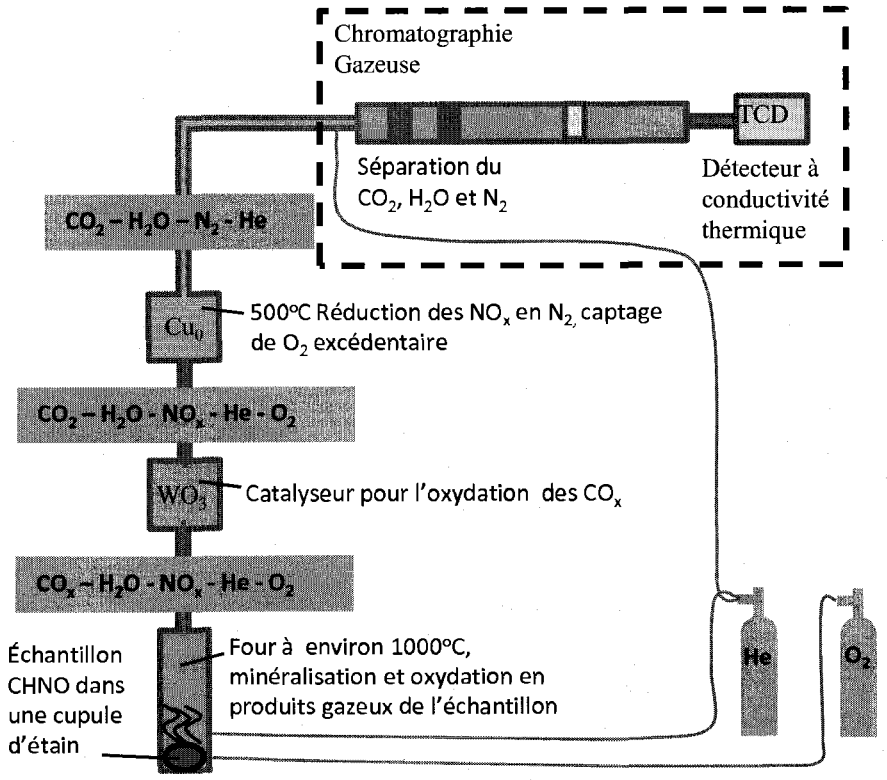


FIGURE 2.13 Schéma du montage d'analyse et description du procédé d'analyse élémentaire par combustion.

tir des mesures d'EA. Une des caractéristiques intéressantes de la mesure d'EA par combustion est qu'elle constitue une technique absolue, et non relative comme l'XPS, et qu'elle permet l'obtention d'une excellente précision sans artéfacts de mesures. L'EA, en plus d'apporter des informations chimiques uniques sur la nature des PP:N, peut servir de technique de référence pour la détermination chimique complète du matériau.

La figure 2.13 présente un schéma simplifié du fonctionnement d'un appareil d'analyse élémentaire. Les échantillons à analyser sont pesés sur une balance à haute précision et scellés dans une cupule en étain. La cupule est ensuite insérée dans l'appareil ; l'appareil Fisons EA 1108 de la compagnie Fisons Instruments s'occupe

d'introduire la cupule dans un tube à réaction en quartz chauffé dans un four à plus de 1000°C en absence d'air, car une incorporation d'azote pourrait fausser l'analyse. La température élevée dans le tube à réaction, où est introduit un mélange d'hélium et d'oxygène, provoque la combustion de l'étain et l'oxydation du composé organique contenu dans la cupule. Dans ces conditions, l'oxydation du carbone se fait principalement vers son monoxyde. Le mélange gazeux est dirigé à travers un tube contenant du trioxyde de tungstène qui favorisera l'oxydation complète du carbone avant d'être dirigé vers un autre tube contenant du cuivre élémentaire qui réduira les oxydes d'azote en azote élémentaire et fixera le reste d'oxygène moléculaire contenu dans le mélange gazeux. Finalement, le mélange d'azote, de vapeur d'eau et de dioxyde de carbone est séparé par chromatographie gazeuse et l'analyse quantitative est effectuée grâce à un détecteur à conductivité thermique (TCD). Les résultats de l'analyse sont présentés sous forme de pourcentage massique absolus, qui peuvent être aisément convertis en % atomiques si tous les éléments constituant ainsi que leur pourcentages masse sont connus.

Calcul du degré d'insaturation L'obtention de la formule chimique empirique des PP:N permet de calculer leur degré d'insaturation. Ce dernier, aussi appelé index de déficience en hydrogène, permet de prévoir le nombre d'insaturations dans la structure de la molécule ; une insaturation est soit une liaison π, soit un cycle fermé dans la structure de la molécule. Ce calcul est un outil fréquemment utilisé en chimie organique pour aider un expérimentateur à élucider la structure d'une molécule. Le degré d'insaturation, I, pour une molécule à la formule chimique connue $C_{A_C}N_{A_N}O_{A_O}H_{A_H}$ est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$I = \frac{((2A_C + A_N + 2) - A_H)}{2} \tag{2.20}$$

Cette formule est obtenue en soustrayant le nombre d'hydrogènes réels dans la molécule, A_H, au nombre que devrait contenir une molécule complètement saturée $2A_C + A_N + 2$; chaque insaturation retranchant deux atomes d'hydrogène, il faut diviser cette dernière valeur en deux. Cette formule est cependant valide pour une molécule dont la formule chimique absolue est connue. Dans le cas d'une molécule où seule la formule chimique empirique est connue et pour laquelle on peut supposer la masse moléculaire assez élevée, le terme pour la formule complètement saturée devient $2A_C + A_N$ puisque le 2, qui représente les hydrogènes terminaux de la chaîne, devient négligeable devant les deux autres termes. Le calcul détaillé du degré d'insaturation dans les PP:N peut être consulté à la section 3.2.2.2.3.

2.3 Cultures cellulaires

La détermination des propriétés bioactives des PP:N passe évidemment par la conduite d'expériences de cultures cellulaires. Deux types d'expériences disctinctes ont été effectuées au courant de cette étude. Premièrement, les tests d'adhésion cellulaire sont conduits avec trois types de cellules différentes, soit les chondrocytes de plaque de croissance et les cellules de cartilage articulaire, tous deux prélevés sur des foetus de bovins, ainsi que sur la lignée cellulaire de monocytes humains U937. Lors de ces expériences simples, nous avons observé l'adhésion ou l'absence d'adhésion sur des surfaces de PP:N continues ou en micromotifs. Lors de la deuxième série d'expériences, nous avons observé l'expression génétique des monocytes U937 adhérés sur une surface, afin de mieux comprendre les processus cellulaires activés lors de l'adhésion de ces cellules à la surface des PP:N.

2.3.1 Test d'adhésion cellulaire

La procédure de vérification de l'adhésion des cellules a été maintenue identique tout au long de cette étude : Les cellules, suspendues dans une une solution de sérum et d'antibiotiques, étaient déposées sur la surface de PP:N continue ou en micromotifs et étaient laissées pendant 1h afin d'adhérer (ou non) avant de procéder à un double rinçage avec du sérum de culture. Par la suite, l'adhésion ou la non-adhésion des cellules au substrat était vérifiée par microscopie optique et des micrographies étaient prises. Puisqu'il nous était impossible de déposer et de transporter les couches minces de PP:N dans des conditions stériles, l'utilisation d'antibiotiques pour la culture a été nécessaire. Les conditions expérimentales détaillées peuvent être consultées aux sections 3.1.3.2 et 4.2.5.

2.3.2 Analyse de l'expression génétique par amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire (RT-PCR)

La technique d'amplification en chaîne par polymérase, PCR, est largement utilisée en biologie moléculaire pour amplifier une pièce d'acide désoxyribonucléique (ADN) par un processus de réplication enzymatique *in vitro*, et ainsi pour la produire en quantité suffisante pour permettre son analyse par des techniques de spectroscopie ou d'électrophorèse. Le nom du procédé est dérivé de celui d'un de ses constituants clé : l'enzyme *ADN polymérase*. Lors du processus PCR, les molécules d'ADN sont scindées en deux brins complémentaires et chacun d'eux est utilisé comme un modèle pour reconstituer le brin double original. La répétition de ce processus permet une amplification exponentielle de la quantité d'ADN : il est possible d'amplifier quelques brins ou même un seul sur plusieurs ordres de grandeur, en créant ainsi des millions de copies de l'ADN initiale [166].

Le technique d'amplification en chaîne par polymérase de l'ADN complémentaire, RT-PCR, est une variante de la technique décrite ci-haut. Elle est utilisée pour isoler ou identifier une séquence connue d'acide ribonucléique, ARN, provenant de cellules ou de tissus. Dans notre étude, nous avons utilisé la technique RT-PCR pour amplifier et quantifier l'ARN messager (ARNm) de cellules monocytes U937 adhérées sur la surface des PP:N. L'ARNm est un acide nucléique contenant un code pour le plan détaillé d'une protéine à produire. Il est originalement transcrit de l'ADN dans le noyau de la cellule et sert à transporter l'information nécessaire à la formation des protéines aux sites où elles seront synthétisées. Durant la transcription, l'enzyme *ARN polymérase* fait une copie du gène contenu dans l'ADN sous forme d'ARNm tel qu'il est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. L'ARNm est donc le médiateur de la production des protéines à partir du code contenu dans l'ADN. La quantité d'ARNm présente dans une cellule correspond donc au degré d'expression d'un gène et fait état de l'activité cellulaire à un moment précis. La quantification de diverses séquences d'ARNm à différents moments permet donc de qualifier et de quantifier l'activité cellulaire dans le temps. Dans le cas où l'on veut étudier cet ARNm, l'expérience PCR est précédée d'une étape où l'ARNm est converti en ADN complémentaire, ADNc par l'enzyme *rétrotranscriptase* ; cette technique est nommée RT-PCR. La figure 2.14 schématise les principales étapes de la RT-PCR qui seront détaillées ci-dessous.

Rétrotranscription L'extraction de l'ARN et sa conversion en ADNc implique l'utilisation de l'enzyme *rétrotranscriptase. Rétrotranscriptase* est un enzyme qui transcrit l'ARN mono-brin en ADN double brin. Puisque la réaction de PCR requiert l'utilisation d'ADN, l'étape de rétrotranscription la précède toujours. L'opération de transcription implique normalement la synthèse de l'ARN à partir de l'ADN, la rétrotranscription est donc son procédé inverse.

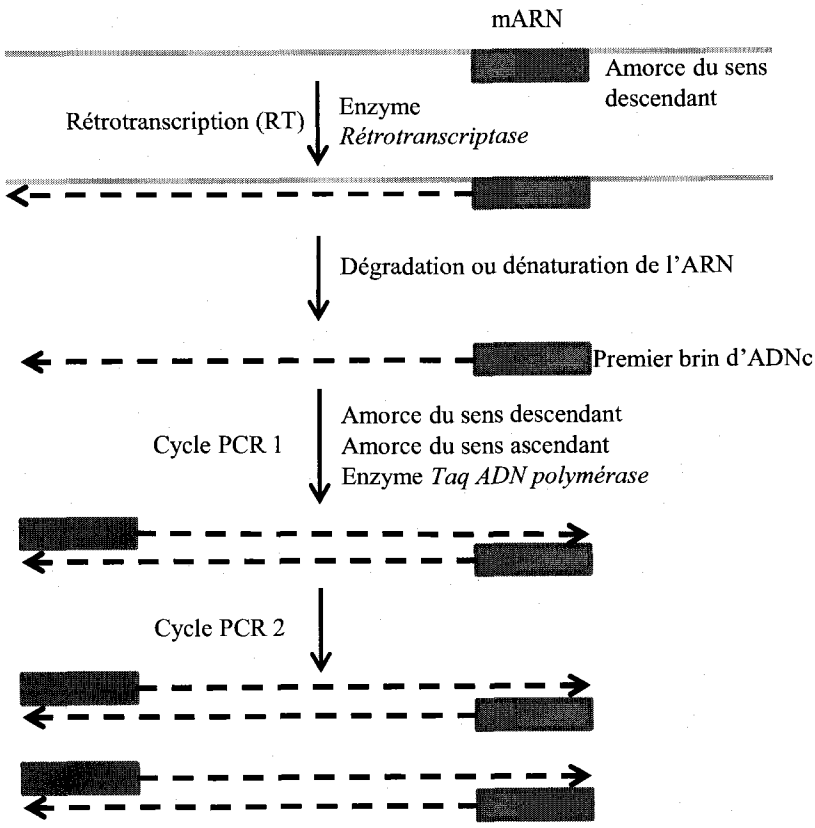


FIGURE 2.14 Le processus de transcription et de réplication en RT-PCR.

Amplification en chaîne par polymérase La PCR consiste habituellement en une série de 20 à 40 changements de température répétés, appelés cycles ; chaque cycle est typiquement constitué de deux à trois paliers de températures. La température et la durée de chaque palier d'un cycle dépendent d'un ensemble de paramètres incluant la nature de l'enzyme utilisé pour la synthèse de l'ADN et la concentration de désoxynucléotide triphosphate, dNTP, dans la réaction. Les paliers de température sont détaillés ci-dessous :

Dénaturation : Cette étape est la première d'un cycle régulier et consiste au chauffage de la réaction à 94-98^{o}C durant 20-30 secondes. Cette étape cause la fonte de la matrice (contenant l'ADN à amplifier) et des amorces (qui sont complémentaires aux extrémités de l'ADN à amplifier) via le bris des ponts hydrogènes entre les bases complémentaires de l'ADN, produisant ainsi deux brins d'ADN simples à partir de chaque double brin.

Phase d'appariement des amorces : La température de la réaction est réduite autour de 50-65^{o}C durant 20-40 secondes, ce qui permet aux amorces de se lier aux brins d'ADN simples. La température d'appariement des amorces est généralement entre 3 et 5 ^{o}C en dessous de la température de dénaturation, T_m, des amorces ; cette température correspond à la température à laquelle les brins de l'ADN des amorces se dissocient. Durant cette phase, l'enzyme *polymérase* se lie à l'hybride amorce-ADN et débute la synthèse de L'ADN.

Phase d'extension et d'élongation : Durant ce palier, où la température dépendra de l'enzyme spécifique utilisé, l'enzyme *ADN polymérase* synthétise le nouveau brin d'ADN en complétant le brin existant par le dNTP complémentaire. Le temps alloué à cette phase dépend de l'enzyme utilisé et de la longueur du fragment d'ADN amplifié. En règle générale, à sa température optimale, l'*ADN polymérase* polymérisera un millier de bases azotées par minute. Dans les conditions optimales, à

chaque phase d'extension, la quantitité d'ADN double, générant ainsi une amplification exponentielle du brin d'ADN spécifique aux amorces utilisées.

Pour vérifier si la PCR a bien généré le fragment d'ADN anticipé, l'électrophorèse sur gel d'agarose est employée pour la séparation des produits de PCR. La taille des produits de PCR est déterminée par comparaison avec un standard de masse ADN, analysé par électrophorèse en parallèle aux produits de PCR. En résumé, la RT-PCR est utilisée pour amplifier un fragment spécifique d'ARN. Le brin d'ARN est préalablement rétrotranscrit en ADN complémentaire préalablement à son amplification par PCR. Après $\sim$ 30 cycles, des millions de copies de la séquence d'intérêt sont générées. Les détails expérimentaux de la technique PCR employée pour cette étude peuvent être consultés à la section 4.2.5.

CHAPITRE 3

DÉPÔT ET CARACTÉRISATION CHIMIQUE DE POLYMÈRES PLASMA RICHES EN AZOTE DÉPOSÉS PAR DÉCHARGE À BARRIÈRE DIÉLECTRIQUE À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE

Le présent chapitre recueille les deux premiers articles rapportant les résultats des travaux effectués pour cette thèse, rassemblés dans un seul chapitre puisqu'ils représentent deux volets d'un même objectif : le développement de nouveaux matériaux en couches minces pour des applications biotechnologiques et leur caractérisation. Le premier article rapporte le développement d'une nouvelle famille de matériaux en couches minces, soit les PP:N. Ces matériaux peuvent être extrêmement riches en fonctions chimiques azotées, classe qui contient plusieurs fonctionnalités chimiques ayant des propriétés biocatives. La technique que nous utilisons, soit le recours à des plasmas à pression atmophérique pour le dépôt de couches minces fonctionnelles, est aussi novatrice. L'innovation technologique se situe donc à deux niveaux : d'une part, au niveau de la technique de dépôt, comportant des avantages certains sur la plupart des techniques existantes dans plusieurs contextes et d'autre part, au niveau des matériaux déposés qui présentent des caractéristiques uniques et possiblement supérieures aux autres matériaux analogues existant. Le premier article présente aussi quelques expériences de culture cellulaire où il est démontré que les PP:N stimulent l'adhésion de plusieurs types de cellules, dont une généralement réfractaire à l'adhésion sur les substrats de culture « standards ». Il est aussi démontré que l'adhésion de ces cellules requièrent une concentration d'azote minimale à la surface, appelée $[N]_{crit}$, en dessous de laquelle les cellules n'adhèrent pas.

Les résultats présentées dans le premier article sont très encourageants pour les applications potentielles. Cependant, la nature chimique du matériau déposé, soit des atomes de carbone, d'azote, d'hydrogène et d'oxygène dans un arrangement aléatoire, reste évasive, ce qui empêche la progression des recherches visant à élucider les mécanismes par lesquels les cellules adhèrent à ces surfaces. Le second article présente donc, en plus d'élargir la gamme des types de PP:N disponibles, nos efforts pour effectuer la caractérisation chimique la plus complète possible de ces matériaux. Puisque les interactions entre les cellules et la surface de ces matériaux sont présumés dirigées par les groupements fonctionnels chimiques, nous avons adapté plusieurs techniques connues, mais nous avons aussi développé de nouvelles techniques pour l'analyse quantitative ou semi-quantitative de groupements fonctionnels chimiques. Ces derniers travaux nous ont permis de faire l'analyse quantitative des groupements fonctionnels amines et l'analyse semi-quantitative des groupements nitriles, isonitriles, imines et alkényls dans les PP:N.

3.1 Article 1 : Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned N-rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering

Pierre-Luc Girard-Lauriault[1], Fackson Mwale[2], Mihaela Iordanova[2], Caroline Demers[2], Patrick Desjardins[1] and Michael R. Wertheimer[1]

[1] Department of Engineering Physics, Ecole Polytechnique, C.P 6079 Succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3A7, Canada

[2] Lady Davis Institute for Medical Research and Department of Surgery, McGill University, 3775 Chemin de la Côte St-Catherine, Montreal, QC H3T 1E2, Canada

Published in : *Plasma Processes and Polymers.* vol 2, 2005, pages 263 to 270

Abstract

A novel atmospheric-pressure plasma-polymerised thin film material has been deposited on various substrates using a pilot scale dielectric barrier discharge (DBD) reactor. Deposition kinetics and physico-chemical characterisation data of nitrogen-rich plasma-polymerised ethylene (PPE:N) films, obtained using feed gas mixtures of N_2 ($\sim$ 10 slm) and C_2H_4 ($\sim$ 10 sccm) are described. Nitrogen concentrations, [N], in the PPE:N films up to $\sim$ 40% were determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) ; the concentrations of N- functionality of greatest interest, primary amines, were determined by chemical derivatisation with 4-trifluoromethylbenzaldehyde. The PPE:N films were further characterised by attenuated total reflectance infra-red spectroscopy (ATR-FTIR), contact angle goniometry, and atomic force microscopy (AFM). Square arrays of PPE:N « islands », for example 30 μm in diameter repeated every 200 μm, were deposited on polymers,

for example biaxially oriented polypropylene (BOPP), through specially-prepared Kapton® polyimide masks. Cell culture experiments were then conducted on these micro-patterned surfaces, using various cell types of interest in orthopaedics, for example growth plate and articular chondrocytes, or human U937 macrophages, the latter of which do not adhere to existing cell culture dishes. In all these cases the cells rapidly adhered and proliferated on the PPE:N islands, but not elsewhere on the polymer surfaces. In an effort to gain insight into cell adhesion mechanisms, adhesion of both macrophages and chondrocytes was tested against films with different [N] values. U-937 macrophages adhered to films containing 25% or more [N], but not at all to films with lower values of [N], suggesting the existence of a "critical" value, $[N]_{crit}$, necessary to induce cell adhesion.

3.1.1 Introduction

Tissue functions, *in vivo*, are modulated by a complex architecture of cells and biomolecules. The three-dimensional nature of the molecular environment influences the initiation of cell functions such as adhesion, migration, growth, protein secretion, and gene expression. However, traditional cell culture plates offer little or no control over the topology and morphology of the cellular environment. This can lead to modifications in gene expression or even to total loss of cell phenotype. For example, chondrocytes which are rounded in vivo become flattened and fibroblastic when cultured on conventional culture plates. One possible solution involves the use of nano-/micro-engineered surfaces that permit greater control of the cell environment. By creating an array of cell-adhesive islands in a non-adherent matrix, the spreading of cells may be limited [167], and ultimately control over phenotype conservation and gene expression may be achieved. It is known that most cell types do not adhere to hydrophobic polymer surfaces like polyethylene, polypropylene or polystyrene. However, hydrophilic surfaces, for example those functionalized

by plasma or VUV treatments [3], are known to promote cell adhesion. A good example is the commercial product « Primaria^{TM} », plasma nitrided polystyrene [2]. We report a promising novel material, nitrogen-rich plasma-polymerised ethylene (PPE:N), which is deposited using an atmospheric pressure dielectric barrier discharge (DBD) apparatus in this laboratory. Its characteristics, high nitrogen content and high surface energy, render it a promising candidate for the challenges described above. In this study we present the characteristics of this novel thin film material and of its adhesive properties. We demonstrate reproducible, selective adhesion of epiphyseal and growth plate chondrocytes as well as U937 macrophages on PPE:N surfaces.

The human U937 macrophage cell line is important for the study of aseptic loosening which is the most common cause of failure of total hip arthroplasty [120]. However, these macrophages are non-adherent to culture dishes, which limits the development of relevant in vitro models for the study of macrophage response to wear particles. We have also conducted micropatterning experiments with growth plate chondrocytes and macrophages and show their long term culture on both micropatterned and large-area coated surfaces. Finally, we show the critical importance of nitrogen concentration, [N], by correlating the adhesion of two different cell types on surfaces with varying [N].

3.1.2 Experimental Methodology

3.1.2.1 Deposition of PPE:N and Micropatterning

The topics of plasma chemistry and plasma polymerisation are well covered in some excellent monographs [60, 61], and will not be addressed in detail here. While much of that literature relates to low-pressure, non thermal (« cold ») plasmas, « cold »

plasmas generated at atmospheric pressure via the use of so-called dielectric barrier discharges (DBD) have gained increasing importance in recent years [64]. The plasma-polymerised PPE: *N* films discussed here are exclusively of this latter variety, although they may in principle also be produced via traditional low-pressure plasma techniques [60]. PPE:N films were deposited on several types of polymer substrates identified below; these were placed on a 2 mm thick float glass plate which served mainly as the dielectric barrier (see below). Not infrequently, however, this glass was also used as the substrate for the purpose of analyses such as X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), attenuated total reflectance infra-red spectroscopy (ATR-FTIR), contact angle goniometry, atomic force microscopy (AFM), and Dektak profilometry, on account of its flatness, smoothness, rigidity and chemical composition. All of these characterisation methods were also carried out at least once with the other substrates, to ensure that the PPE:N film properties were independent of their host surface. Biaxially oriented polypropylene (BOPP) was the main substrate material for cell-culture experiments; this 50 μm thick, isotactic polymer film, graciously provided by 3M Company, has been described elsewhere [4]. A 50 μm thick Teflon® FEP film (DuPont) was also used in some cell culture experiments, but mostly for determining PPE:N deposit thicknesses by variable angle spectroscopic ellipsometry (VASE), because this polymer's low refractive index permits accurate determinations of thickness and deposition rate [168].

Figure 3.1 depicts the atmospheric pressure DBD apparatus used for depositing the PPE:N films [4]; it comprises a grounded, planar Al electrode and a cylindrical, dielectric-coated stainless steel high voltage (HV) electrode. The former can be moved at controlled speed under the latter electrode, to simulate continuous treatment conditions. The 2 mm thick glass plate mentioned earlier is placed on the planar Al electrode and it serves as a second dielectric layer, as described in

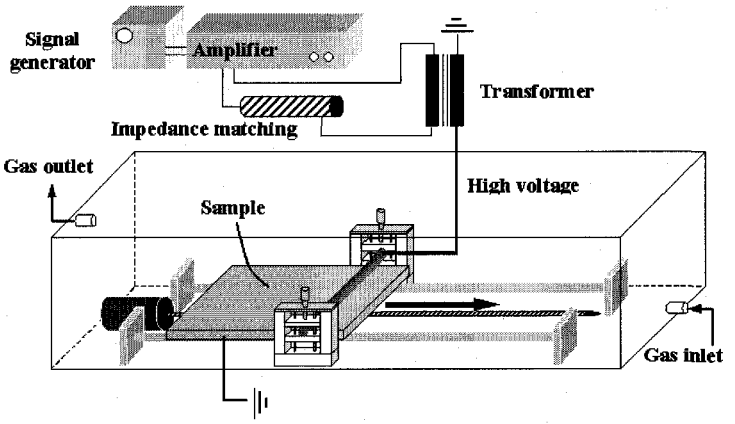


FIGURE 3.1 Schematic diagram of the DBD plasma deposition system.

detail elsewhere [4]. The precursor gas mixture is introduced into the discharge zone, an adjustable 1 mm wide gap between the HV electrode and the glass plate, using a gas diffuser (not shown on Fig. 3.1) to ensure the requisite high gas purity. Gas flow rates (N_2 - 10 standard liters/minute, slm; C_2H_4 - 5 to 60 standard cm^3/minute, sccm) are controlled by electronic mass flow controllers. The roughly 1 cm wide plasma zone is generated with a commercial power source and transformer (Enercon Industries, model LM2727-03, 450 kVA maximum output) at a typical frequency of 10 kHz and peak voltage of 18 kV. After the carefully precleaned substrate was introduced into the DBD system, the latter was purged with the precursor gas flow for approximately 10 min. The discharge was then initiated and monitored with a digital oscilloscope, the voltage and current being measured with the help of a resistive probe (Tektronix, model P6015A) and a 50 Ohm resistor, respectively. The substrate was made to move back and forth under the HV electrode at precisely controlled speed, 10 mm/s, for up to two dozen cycles, depending on the desired PPE:N film thickness. For the micropatterning experiments, special 25 μm thick Kapton® polyimide masks were placed over the substrate. These masks were fabricated with an excimer laser coupled to a precise positioning system, to create the following square arrays of circular holes (hole diameter -pitch) : 30 μm

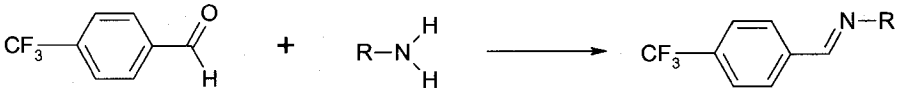
- 60 μm ; 30 μm - 200 μm ; 100 μm - 200 μm, with array areas ranging from 1 to 4 cm^2. Care was taken to assure intimate contact between the mask and substrate surface during deposition runs.

3.1.2.2 Materials Characterisation

PPE:N films were characterised by XPS at most 5h after deposition, using a VG ESCALAB 3 MkII system with nonmonochromatic Mg Kα radiation. The spectra were acquired normal to the sample surface ; in the case of high-resolution spectra, binding energies were referenced to the carbon 1s peak at 285.0 eV, to adjust for possible charging effects. Throughout this article, we will be referring to the structural characteristic of primary interest, the nitrogen concentration in the PPE:N deposits, [N]. Since hydrogen cannot be detected by XPS, [N] is given by the relationship :

$$[N] = \frac{N}{N+O+C} \times 100\% \tag{3.1}$$

N, O and C being determined from XPS broadscan spectra over the 0-1100 eV binding energy range, using a pass energy of 50 eV, as described before [3, 4]. The surface concentration of primary amines, [NH_2], the species believed to be responsible for cell adhesion [3], was determined using the method described by Favia *et al.* [27] : The selective reaction of trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA, Alfa Aesar) vapour with NH_2 groups at the surface covalently links TFBA via an imine bond, as shown in scheme (3.2),



(3.2)

whence $[NH_2]$ is deduced from fluorine concentration at the surface. Contact angle goniometry measurements were carried out with five probe liquids (water, glycerol, formamide, ethylene glycol and tricresyl phosphate) according to the method described by Owens and Kaelble [151], from which the surface free energy, γ_s, and its polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) components can readily be determined, where $\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$. Some samples were also analysed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), using the attenuated total reflectance (ATR) technique, with a spectrometer (Bio-Rad FTS-3000 Excalibur Series) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. Images of the masks, the micropatterned PPE:N surfaces and of the cell cultures were taken using an optical microscope equipped with a digital camera. Individual PPE:N dots were also imaged with an AFM microscope (MultiMode, Digital Instuments) in contact mode, using silicon nitride tips. Film thickness, d, and refractive index, n, of PPE:N films were measured using a variable-angle spectroscopic Ellipsometer (VASE, J.A. Woollam Co., Inc), and values of d were confirmed by profilometry (Dektak) measurements of steps created with the Kapton® masks.

3.1.2.3 Cell Culture

Bovine foetuses were obtained from a local abattoir immediately after slaughter. Foetal age, determined by measurement of tibial length [169], ranged from 150 to 260 days. The epiphyseal articular cartilage and growth plate chondrocyte cells from both the hypertrophic and pre-hypertrophic zones were isolated from the long bones. Cells were isolated from the tissues using collagenase type IA from Clostri-

dium histolyticum (Sigma) and hyaluronidase type V from sheep testes (Sigma), as described previously [170]. The human U937 macrophage cells were obtained from ATCC, Manassas, VA, USA. Cells were counted with a hemacytometer. For each experiment a 40 μl volume of cell suspension was carefully pipetted onto a 1 cm^2 PPE:N surface which was previously placed face-up on the flat bottom of a 24-well plate for cell culture. The cell suspensions were composed as follows : Growth plate - 106 cells in 40 μl of medium (Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), high glucose (VWR) with 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 60 μg/ml β-glycerophosphate, 5 μg/ml insulin, 5 μg/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite, 1 mg/ml bovine serum albumin and 50 μg/ml of fresh ascorbic acid) ; epiphyseal articular cartilage - 4x105 cells in 40 μl of medium (DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) and 60 μg/ml β-glycerophosphate) ; human U937 macrophages - 5×10^5 cells in 40 μl of medium (DMEM with 5% FBS). All cell types were left to adhere to the substrate surfaces in a humidified incubator at 37°C, 5% CO_2 in air for 1h before careful removal of the medium, also containing non-adherent cells, using a pipette. Fresh medium was then pipetted into the wells (1 ml in each well) and photomicrographs of the surfaces were taken. In long term studies, cells were cultured for up to 20 days, but in these cases media were changed every 2 days.

3.1.3 Results and Discussion

3.1.3.1 Material Characteristics

Elemental compositions of the PPE:N films obtained by XPS, combined with ATR-FTIR data, permitted us to semi-quantitatively determine the concentrations of functional groups at the sample surfaces. Typical elemental concentrations ranged from 17 to 36 at.% nitrogen ([N], Fig. 3.2), about 4 at.% oxygen, [O], the balance being carbon (hydrogen cannot be detected by XPS, as already mentioned). High

[N] values, as determined from eq. (1), are the main attribute of these PPE:N films, in comparison to other work previously reported in the literature; to the best of our knowledge, no earlier work has reported [N] as high as the value of 36.3% we observe here. Regarding [O], even though oxygen is excluded from the precursor gas, long-lived free radicals and other active species at the sample surface can react with oxygen and/or water vapour when the sample is exposed to the ambient atmosphere [4, 60]. The [O] value was minimised by lengthy storage of samples in feed gas mixture after the discharge had been terminated. Also, since the material described is a highly cross-linked plasma-polymer, it does not undergo the well-known « hydrophobic recovery », or aging, effect observed in plasma surface modification techniques [4], and surface elemental concentrations are considered stable over time. Coating stability was demonstrated by comparing 6 month old PPE:N coatings on BOPP with freshly made analog samples; neither XPS nor contact angle measurements showed significant differences between the two sample groups. As shown in Fig. 3.2, the value of [N] in PPE:N can be readily and reproducibly controlled by varying C_2H_4 concentration, $[C_2H_4]$, in the feed gas, higher $[C_2H_4]$ resulting in lower [N] in the deposited films. This control over PPE:N composition is an important attribute of our methodology, in that it enables controlled adhesion of different cell types simply by changing [N], as will be shown below.

ATR-FTIR spectra (Fig. 3.3) show the main functional groups in the PPE:N to be amines (their order cannot be determined by this method), nitriles and some amides. High resolution XPS of the N 1s peak (Fig. 3.4) can indicate relative concentrations of different N-species, but cannot provide quantitative information. Given the random structure of plasma polymers [60], any particular functional group can possess a broad distribution of binding energies. This assertion has been confirmed by high resolution XPS spectra taken also with a narrow monochromatic X-ray source (0.3 eV width, compared with 0.7 eV for the ESCALAB instrument); all

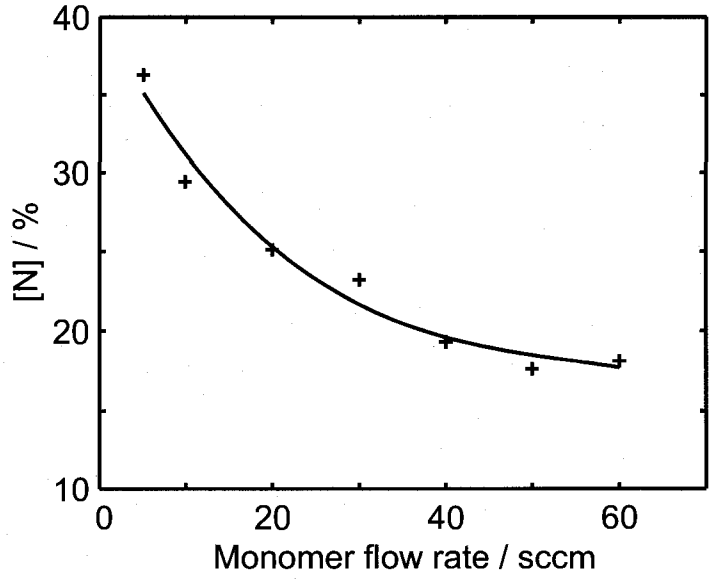


FIGURE 3.2 Dependence of [N] in PPE:N films on the C_2H_4 monomer flow rate.

spectra were similar in shape and width, which confirms that the broad convoluted peaks result from a distribution of energies rather than from polychromatic X radiation. Primary amine concentrations, $[NH_2]$, were found to vary from 5 to 10 % NH_2/N, the most abundant being at 3.5% NH_2/C, similar to literature data for plasma-modified polymer surfaces [25] ; interestingly, $[NH_2]$ does not appear to depend strongly on $[C_2H_4]$ in the precursor gas. The films' surface energy (Fig. 3.5), γ_s, indicative of their wettability by aqueous media, was found to increase with rising [N] from 27.0 mN/m (or dynes/cm) for virgin BOPP to about 58 mN/m for [N]=30%, similar to Guimond's findings for BOPP surfaces modified by DBD treatments with pure N_2 gas [4]. Here, too, the $\sim$ 30 mN/m increase is entirely due to that in the γ_s^p component, in turn, related to the creation of highly polar groups (amines, amides, etc.). In view of the above, it is not surprising that cell adhesion should manifest strong correlation with γ_s and wettability, as evidenced in section 3.1.3.2, below. The deposition rate, R, (from Dektak and ellipsometry measurements) of PPE:N films was found to vary with $[C_2H_4]$ in the precursor gas.

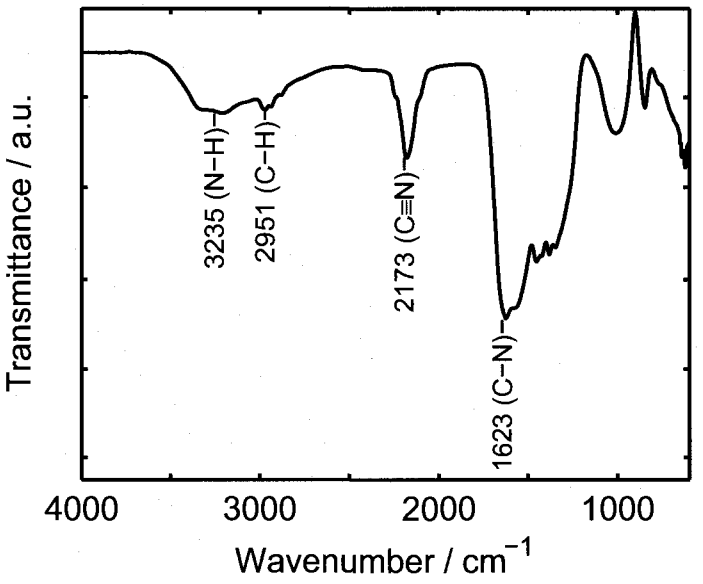


FIGURE 3.3 ATR-FTIR spectrum of a 29.5% [N] PPE:N film.

Values of R ranged from about 2 nm/s (for $[C_2H_4]$ = 5 sccm) to 9 nm/s (for $[C_2H_4]$ $\approx$ 30 sccm), comparable to the highest values found in the plasma-polymerisation literature [60]. In all conditions, R is high and not a limiting factor in this study; all cell culture experiments were carried out using 150-200 nm thick films.

Figure 3.6 A shows a photomicrograph of a "30/200" Kapton® mask; well-defined dots of deposit are visible on the substrate at the same magnification (not shown here). For the case of a 200 nm deposit on an unmasked glass surface, each dot has a height of about 150 nm, measured by Dektak and by AFM, on account of some masking by the 25 μm thick Kapton® film. An AFM image of a single dot (Fig. 3.6 B) shows the well-defined 30 μm diameter "mound"; note that for visual purposes the Z scale has been amplified 100-fold compared with the X and Y scales. The deposition is well confined by the mask, which is in good contact with the surface, since no film was deposited outside the 30 μm boundry.

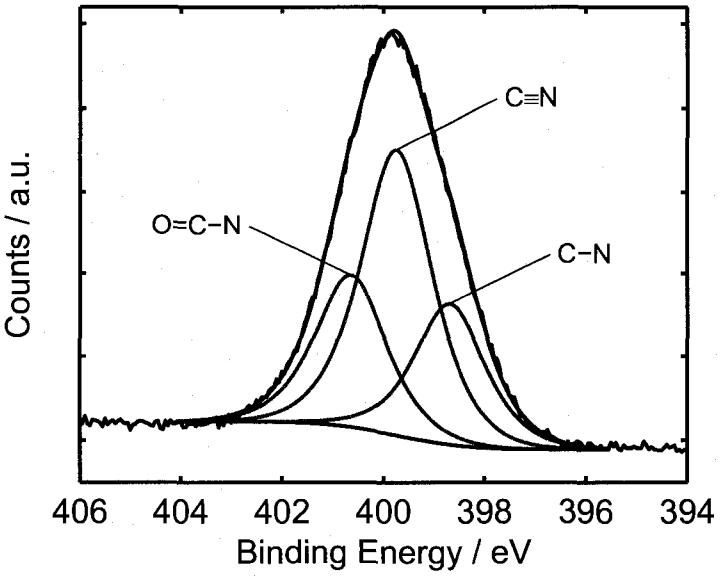


FIGURE 3.4 High resolution N1s XPS spectrum of a 29.5% [N] PPE:N film.

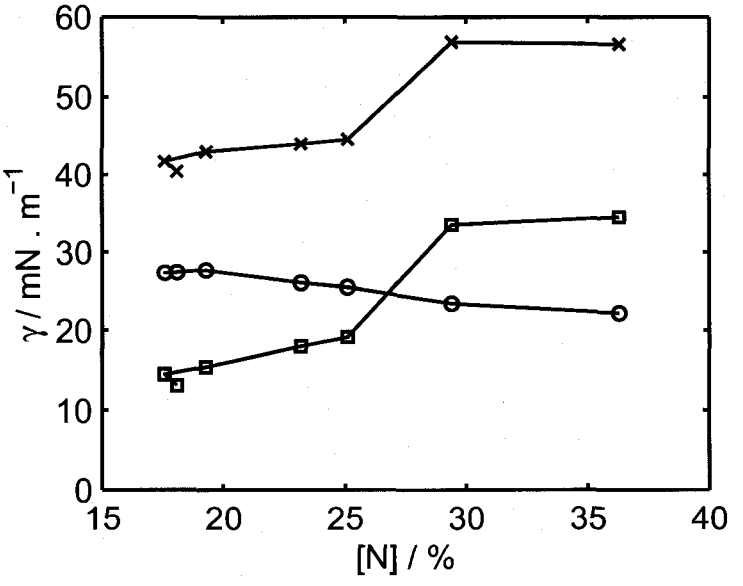


FIGURE 3.5 Surface energy (γ_s,×) variation with [N] in PPE:N films. Polar (γ_s^p,□) and dispersive (γ_s^d,○) components are also shown.

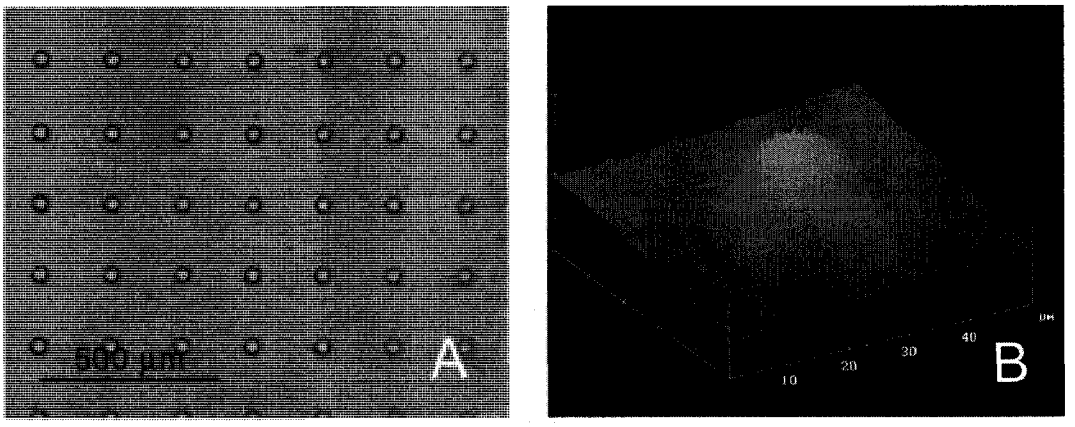


FIGURE 3.6 PPE:N thin film micropatterning : Kapton® mask - 30 μm holes every 200 μm (A) ; AFM image of a single 30 μm PPE:N dot, shaped like a « mound » (B).

3.1.3.2 Cell Culture

Many of the cell culture experiments were carried out using nominally 200 nm of PPE:N with 29.5% [N], deposited on BOPP. This choice constitutes a compromise between adequate surface energy and deposition rate values. The three cell types under study were first cultured on large-area coated BOPP surfaces which were partially masked during deposition, in order to compare adhesion on bare BOPP and on PPE:N. Figures 3.7 A , B and C, respectively, show that growth plate, articular chondrocytes and U937 macrophages selectively adhere to the PPE:N surfaces after one hour of contact with cell suspensions. It is important to note that due to the low magnification used, cells which constitute the left half of the images are not very evident. Also, for clarity reasons, the cultures of growth plate and articular chondrocytes were stained before pictures were taken (Fig. 3.7 A and B), but this was not the case for the macrophages (Fig. 3.7 C) which were photographed while still alive on the cell culture media. Photographs of stained macrophages were also taken, but are not shown here because they yielded images of lower quality and interest, while the opposite was true for the two first cell

types. For these reasons the cells appear darker than the substrate on the images of growth plate and articular chondrocytes; in the case of macrophages, the substrate appears darker. Of particular interest is the finding that the cells maintained a rounded morphology, even after adhesion (see Figs. 3.7 and 3.8). The adhesion contrast is particularly strong and noteworthy in the case of the macrophages, since these cells are non-adherent to almost all previously known cell culture surfaces [171, 172]. To investigate the viability of cells on PPE:N for extended periods of time, the following proliferation studies have been undertaken : U-937 macrophage cell suspension was left in contact with the surface for 1h before removing medium and excess cells (Fig. 3.7 D); in the presence only of culture medium, micrographs were then taken after 24 h (Fig. 3.7 E) and 48 h (Fig. 3.7 F), and cell counts were performed in each case. Clearly, cells survived and proliferated on the PPE:N surface, an important finding for future applications [171, 172]. Following these experiments, a macrophage suspension was left in contact with a micropatterned (30 μm holes, 200 μm pitch)BOPP surface for 1h (see Figures 3.7 G and H). Evidently, small groups of up to ten cells adhered readily and selectively only to the PPE:N islands, as anticipated from the results presented above. A suspension of growth plate chondrocytes was also left in contact for 1h with a different (100 μm holes, 200 μm pitch) micropatterned surface, since 30 μm holes were found to be inadequate. To test the longevity of these chondrocytes on the patterned surface, they were kept in culture for 9 days before a micrograph was taken (Fig. 3.7 I). This experiment, too, clearly shows that chondrocytes adhere selectively to micropatterns, even after many days in culture [3].

In the preceding paragraph and in Fig. 3.7 we have noted that an [N]-rich PPE:N deposit, with [N] = 29.5%, evidently constitutes a surface onto which even the most "difficult" of cell-types, e.g. human U-937 macrophages, appear to readily adhere and proliferate. In view of this fact and of our ability to vary [N] at will (see Fig.

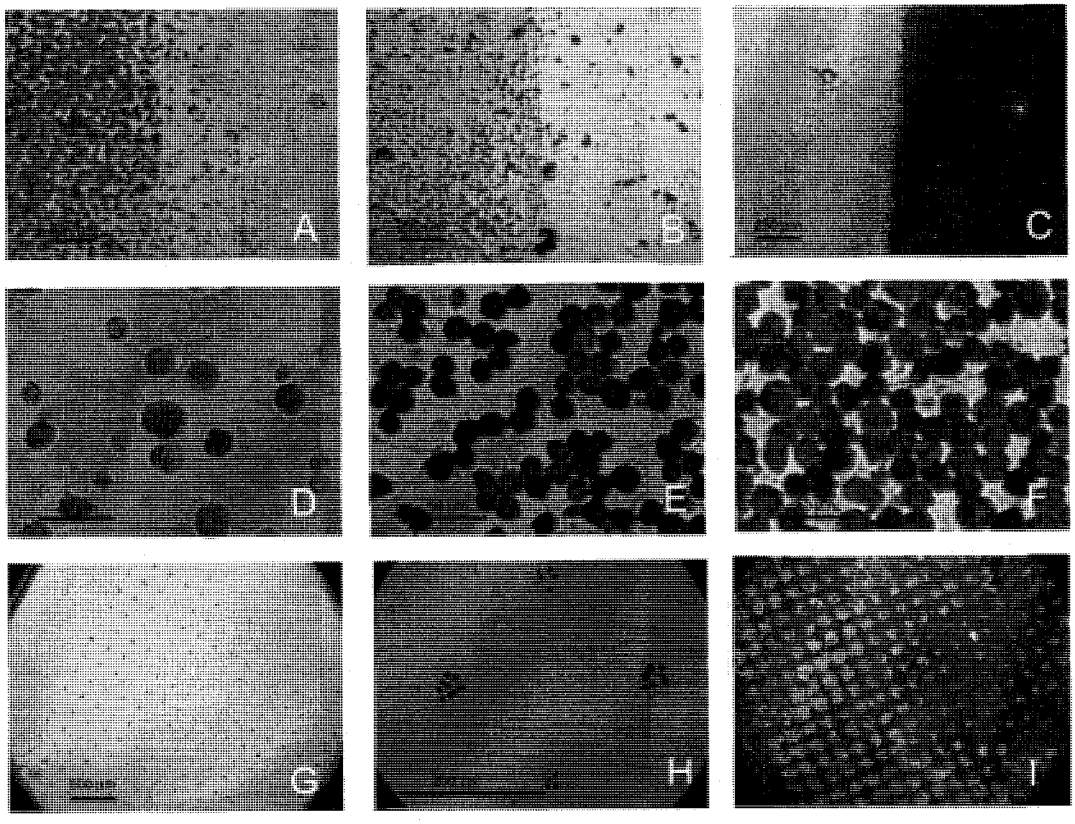


FIGURE 3.7 Cell culture and micropatterning on BOPP substrates : Cell adherence to PPE:N coatings on partially-masked BOPP surfaces, with coatings and cells on the left sides of the images : articular/epiphyseal cartilage cells (A), growth plate chondrocytes (B) and human U937 macrophages (C). Proliferation of U937 macrophages after 1h (D), 24h (E) and 48h (F). Cell adhesion on PPE:N-micropatterned BOPP substrates - U937 macrophages (G) and (H), and growth plate chondrocytes (I).

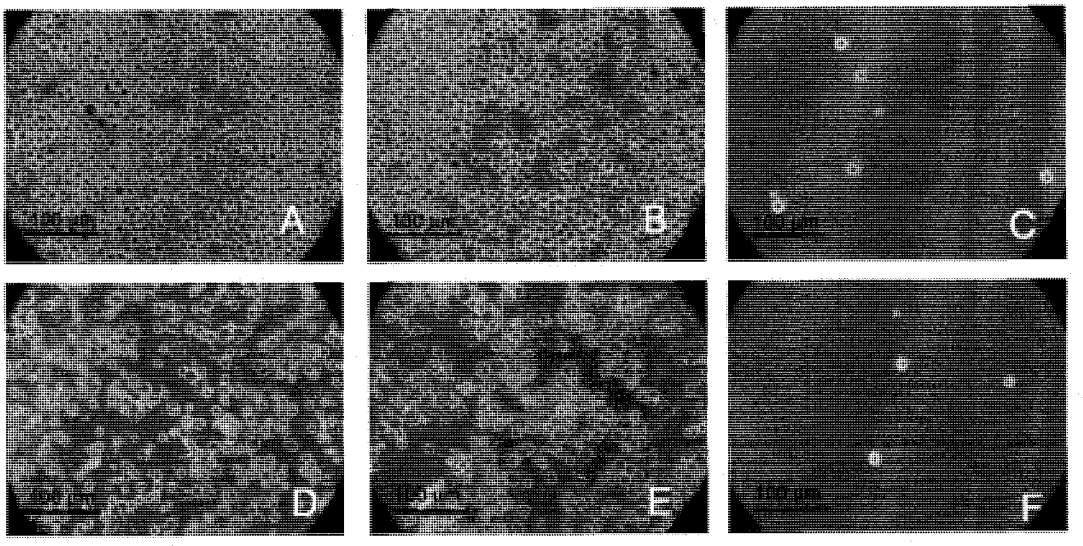


FIGURE 3.8 Adhesion of U937 macrophages (A to C) and of growth plate chondrocytes (D to F) to PPE:N films of varying [N] after 1hr of culture. [N] values for the different films; A : 29.5%, B : 25%, C : 23%; D : 29.5%, E : 19%, F : 17.5%.

3.2), the following additional sets of experiments have been conducted in order to examine cell adhesion behaviour at lower [N] values : U937 macrophages and growth plate chondrocytes were cultured on PPE:N-coated BOPP substrates, but now the [N] values were systematically decreased by enriching the N_2/C_2H_4 gas mixture with ethylene during plasma deposition of the PPE:N coatings (see Fig. 3.2). Coated substrates were then exposed to concentrated cell suspensions for 1 h durations, following which photomicrographs of the cell cultures were taken. Figure 3.8 A to C shows such micrographs of macrophages for the cases [N] = 29.5% (i.e. like in Fig 3.7), 25% and 23%, respectively. Clearly a « critical » value of nitrogen concentration, $[N]_{crit}$, exists between 25% and 23%, a value below which this cell-type does not adhere to PPE:N. The micrographs shown here are typical and fully representative for many repeated experiments : For [N] = 25%, adhering cells formed a single continuous monolayer after 1 h, even if the cell suspension was highly concentrated. On the contrary, for [N] < 25%, the observed number of cells adhering to the PPE:N surfaces was no different from the case of uncoated, pris-

tine BOPP (or polystyrene, PS, or other commercial polymers), namely virtually nil. A series of similar experiments was also conducted with growth plate chondrocytes, and the results are presented in Fig. 3.8 D to F (corresponding to [N] = 29.5%, 19% and 17.5%, respectively). As for the case of U937 macrophages, here too, we note clear evidence for an $[N]_{crit}$ value, this time between 19% and 17.5%. The results represented above provide some useful insights into the outcomes of our earlier cell-culture experiments,[3, 172] in which BOPP surfaces were nitrided by (i) low-pressure plasma treatments in N_2 or NH_3, or by (ii) vacuum ultraviolet (VUV)-photochemical surface modification in low-pressure NH_3 [3, 7] as well as those using (iii) commercial plasma-nitrided PS, Primaria^{TM}[2]. In cases (i) to (iii) above, the maximum [N] values measured by the same XPS-based method used here were typically 12%, 25%, and 8%, respectively. While U937 macrophages were not found to adhere to any of these modified polymer surfaces, growth plate chondrocytes did adhere in cases (i) and (ii) [3], but, of course, all cell types examined so far adhered to [N]-rich PPE:N surfaces. As proposed by Ohl, Schröder and their collaborators [25, 26, 167], these observations may well be related to the surface-near concentration of primary amine (-NH_2) groups : the higher the [N] value, the greater is the likelihood that the concentration of such amine groups, [NH_2], is also high. The protonated amine group possesses a localised positive charge which may, in aqueous solution at physiological pH values, attract negatively charged biomolecules. In view of their known high reactivity, amine groups are therefore believed to covalently couple proteins in aqueous environments, thereby giving rise to immobilisation of biomolecules and cell adhesion. Evidently, the arguments presented above relating to the possible role of NH_2 groups in the cell adhesion experiments does not apply to the case of structurally different materials like phosphorylcholine (PC) polymer, which has also been observed to favour the adhesion of human U937 macrophages [171, 172]. In this latter case, a plausible adhesion mechanism is still elusive.

3.1.4 Conclusion

Novel, nitrogen-rich PPE:N thin films have been deposited using an atmospheric pressure plasma polymerisation technique, which is both economical and efficient. A variety of techniques have been used to provide surface-chemical characteristics and surface energies of this new material. An important attribute is its high, stable and adjustable nitrogen content, relatively high primary amine concentration, and its high surface energy (wettability). Also, since this is a deposition technique (as opposed to a surface modification technique), PPE:N films can be deposited on many different substrates, including inorganic ones. Based on these characteristics, PPE:N is an excellent candidate for cell culture experiments, including those on micropatterned surfaces created with the help of Kapton® masks used here. The present cell culture experiments have shown that PPE:N promotes selective adhesion of all three cell types we have investigated so far, including the usually non-adherent human U937 macrophage cell line. Mid-term viability of these macrophages has been proven by their proliferation on PPE:N after 2 days in culture. Micropatterned adhesion of cells on PPE:N islands was rapid and effective for all three cell types; in the case of growth plate chondrocytes the pattern was conserved, even after 9 days in culture. Finally, we have demonstrated the existence of a "critical" nitrogen concentration, $[N]_{crit}$, of these PPE:N coatings below which specific cell lines do not adhere to the surfaces.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from NanoQuebec, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, to P.-L.G.-L., P.D., and M.R.W.), AO Foundation Switzerland, and the Canadian Institutes for

Health Research (CIHR) (to F.M.).

3.2 Article 2 : Chemical Characterisation of Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films Deposited in Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure

Pierre-Luc Girard-Lauriault[1], Patrick Desjardins[1], Wolfgang E.S. Unger[2], Andreas Lippitz[2] and Michael R. Wertheimer[1]

[1] Groupe de Recherche en Physique et Technologie des Couches Minces (GCM) and Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, P.O. square 6079, Station Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3A7, Canada

[2] Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Unter den Eichen 44-46, D-12203 Berlin, Germany

Published in : *Plasma Processes and Polymers.* vol 5, 2008, pages 631 to 644

Abstract

We have used an atmospheric-pressure dielectric barrier discharge (DBD) apparatus to deposit novel families of N-rich plasma polymers (PP:N), using mixtures of three different hydrocarbon precursors in nitrogen at varying respective gas flow ratios. This research focuses on the overall chemical characterisation of those materials, with specific attention to (semi)-quantitative analysis of functional groups. Well-established and some lesser-known analytical techniques have been combined to provide the best possible chemical and structural characterisations of these three families of PP:N thin films, namely X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS), and Fourier transform infrared

spectroscopy (FTIR).

3.2.1 Introduction

The surfaces of most synthetic polymers are chemically quite inert, for example in the context of their interactions with biological systems [1, 15]. There now exists a vast literature which describes how polymer surfaces may be modified and rendered more reactive without affecting their desirable bulk characteristics. Among the most prominent methods are those based on electrical discharge plasmas [1, 15]. These, in turn, offer two possible routes : (i) so-called « grafting » [1, 4, 15, 26] comprises the addition of new chemical groups (functionalities) via plasma-induced substitutive radical reactions ; (ii) the second route, plasma polymerisation, adds a suitable organic thin-film coating on top of the surface [9, 10, 14, 15, 33, 35, 37, 44, 49, 173, 174] In the past, both (i) and (ii) above were usually carried out in low-pressure, high-frequency plasma systems, but in recent years there has been a growing trend towards « cold » plasma-chemical reactions at atmospheric pressure. The promise of greater simplicity and lower capital investment have provided strong incentives for this trend, and Dielectric Barrier Discharge (DBD) techniques are among those most used for its implementation [4, 49, 64, 107]. Biomedical applications constitute a particularly promising and active area for types (i) and (ii) plasma processes [14, 15, 26, 49] because polymers are now used for cell-culture plates, vascular and hip-joint prostheses, contact lenses and drug-delivery systems, to name only a few examples. An important class of plasma-functionalised surfaces in the biomedical context are nitrogen (N)-rich ones ; this laboratory has pursued both methodologies (i)[3, 31, 32, 172] and (ii) [49, 52, 53] for this type of research in the recent past. However, for reasons related to higher surface concentrations of nitrogen, [N], and improved stability towards « ageing » [9, 10], we now favour plasma polymerisation, both under partial vacuum (typically a few tens of Pa) [9] and using DBD at atmos-

pheric pressure [10, 49]. In a recent study, we compared N-rich plasma-polymerised ethylene (PPE:N) films deposited in low-pressure radio-frequency (r.f.) discharges (which we call « L-PPE:N ») with their high (atmospheric)-pressure counterparts (designated « H-PPE:N ») [10]. While many similarities were noted between the two, there are also important differences, for example the ready ability to deposit H-PPE:N coatings on large surface areas and at much higher deposition rates. The present research had a twofold objective, namely to extend the earlier work on the very promising family of « H-PPE:N » coatings to organic precursors other than ethylene (C_2H_4), and to continue in greater depth the structural characterisation of N-rich plasma polymers (henceforth designated « PP:N »). A particular aim in the latter regard is to elucidate which N-bearing functionality(ies) contributes most to the observed strong bioactivity of PP:N, an open question in the current literature [15, 26]. Considering that plasma « polymers » do not possess a simple repeat unit and the fact that their elemental compositions can vary continuously over broad ranges [9, 10, 49] detailed characterisation of their structures is very challenging. As will be shown presently, we assembled a particularly broad inventory of complementary analytical techniques for the study of PP:N, not only of PPE:N but also of two new families « PPM:N » and « PPA:N », respectively obtained by replacing C_2H_4 with methane (CH_4) and acetylene (C_2H_2).

3.2.2 Experimental Methodology

3.2.2.1 Deposition of PP:N Coatings

As mentioned above, beside the « PPE:N » family of N-rich plasma polymer (« PP:N ») coatings, the present research also examines two new families, those based on methane (CH_4) and acetylene (C_2H_2) « monomers », replacing the ethylene (C_2H_4) used for depositing PPE:N ; accordingly, those two new classes of coatings are

henceforth designated PPM:N and PPA:N, respectively. The DBD apparatus and methodology employed here was largely the same as that described and illustrated earlier by Girard-Lauriault *et al.* [49]. Briefly, the apparatus used for depositing PP:N films comprised a cylindrical, dielectric-coated stainless steel high-voltage (HV) electrode and a grounded, planar Al electrode on which reposed a 300 x 240 mm, 2 mm-thick glass plate that served both as substrate and as a second dielectric layer (see more below). The gap between the two was typically 1 mm. The electrode system was housed inside a hermetic, transparent plastic enclosure in order to maintain a controlled composition of gas flow at atmospheric pressure. The lower (planar) electrode and glass plate were moved back and forth under the HV electrode at precisely controlled speed, 10 mm/s, for up to two dozen cycles, depending on the desired PP:N film thickness, usually about 100 nm, thereby ensuring a uniform coating thickness on the entire area of the substrate. The precursor gas mixture comprised a flow of nitrogen (N_2, $F_{N_2} = 10$ standard liters per minute, slm) and hydrocarbon (« C_xH_y » : CH_4, C_2H_4, or C_2H_2 - $F_{C_xH_y}$ = 5 to 70 standard cm^3/minute, sccm), controlled by electronic mass flow controllers; the gas mixture ratio, X, is the ratio of hydrocarbon to nitrogen flow rates : $X = (F_{C_xH_y}/F_{N_2}) \times 1000$. The mixture was introduced into the discharge zone between the HV electrode and the glass plate by means of a special gas diffuser. The roughly 1 cm wide plasma zone was generated with a commercial power source and transformer (Enercon Industries, model LM2727-03, 450 kVA maximum output) at a typical frequency of 10 kHz and peak-to-peak voltage of 18 kV. After the substrate was carefully pre-cleaned with isopropyl alcohol, it was introduced into the DBD enclosure and the latter was then purged with the precursor gas flow for several minutes. Following this, the discharge was initiated and monitored visually and with a digital oscilloscope, the voltage and current being measured with the help of a resistive probe (Tektronix, model P6015A) and a 50 Ohm resistor, respectively. Most deposition experiments were carried out on the glass substrates;

for some types of analyses, milligram-quantities of samples were required. This was accomplished as follows : « Flakes » of PP:N were produced and harvested shortly after deposition, by scraping the roughly 100 nm thick coating off the 700 cm^2 glass surface with a sharp (razor) blade; about 10 mg-quantities of flakes were thereby produced during a typical deposition run. Samples for certain other types of characterisation studies were also deposited on single-crystal silicon wafers, henceforth « c-Si » (TopSil, [111] boron-doped, 5 cm diameter, 240 μm thick); more will be said later about sample handling. Hereafter, particular film coatings will be referred to as PPY:N(X), where Y is either M, E, or A (see above); thus, for example, PPE:N(1) refers to a coating deposited from a mixture comprising 10 slm of N_2 and 10 sccm of ethylene (i.e. a gas mixture ratio, $X = 1$).

3.2.2.2 Characterisation Studies

In this research, we have had recourse to a number of powerful complementary techniques for characterising the composition and chemistry of the various PP:N deposits. Techniques reported in the literature include commonly-used high-resolution XPS; unfortunately, the wide variety of functional groups generally encountered in plasma polymers does not permit their direct unambiguous identification. However, the chemical derivatisation reaction of primary amines with 4-trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA), enables one to estimate the relative surface content of this particular functional group in PP:N by XPS, thanks to the bonded fluorine [27]. Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy is a potent technique for identifying unsaturated groups [33, 35, 37, 44, 144–147, 173–175] while Fourier transform infra-red spectroscopy (FTIR) can be used to analyse peaks that are isolated on the background, for example the nitrile (or cyano-, -C≡N) and isonitrile (or isocyano-, -N≡C) constituents in PP:N near 2200 cm^{-1} [48, 126, 127]. Elemental compositions of PP:N samples can be determined by gas

chromatography of the volatile reaction products following total combustion of the PP:N samples. All taken together, the characterisation methods listed above have permitted semi-quantitative analyses of the major functional groups encountered in the three families of PP:N coatings. We now present details of these various techniques.

3.2.2.2.1 XPS and Chemical Derivatisation PP:N films were characterised by XPS at most 5h after deposition, using a Kratos Axis Ultra system with a non-monochromatic Mg Kα radiation. The spectra were acquired normal to the sample surface; in the case of high-resolution spectra, binding energies were referenced to the aliphatic carbon 1s component at BE = 285.0 eV [134], to correct for charging. The energy scale of the spectrometer was calibrated following the ISO TC/201 SC7 international procedure. Throughout this article, we will be referring to the relative elemental concentrations, [E], (for the detected elements, of course excluding the undetectable hydrogen) of nitrogen, oxygen and carbon determined by XPS, $[N]_{XPS}$, $[O]_{XPS}$ and $[C]_{XPS}$, which were calculated from equation (2.4) hereunder using broad-scan spectra over the 0-1200 eV binding energy range, with a pass energy of 50 eV [10, 49]. Core-level spectra were analysed using Casa XPS software version 2.2.99, a Shirley-type background and sensitivity factors from the Kratos tables.

$$[E] = \frac{E}{N + O + C} \times 100\% \tag{2.4}$$

The relative surface concentration of primary amines, $[NH_2]/[N]$, $[NH_2]/[C]$ or simply $[NH_2]$, the species believed to be most responsible for biological activity (cell adhesion) [3, 15, 26], was determined using the method described by Favia *et al.*[27] using the formulae we presented elsewhere [10]. Data acquired by XPS survey spec-

tra of both derivatised and non-derivatised samples were combined to calculate the above-mentioned quantities : The selective reaction of trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA, Alfa Aesar) vapours with primary amine (-NH_2) groups at the surface covalently links TFBA via an imine bond; this reaction was complete after 3 hours, as reported in ref. [10], along with other details of the particular methodology used.

3.2.2.2.2 NEXAFS Spectroscopy The acquisition of NEXAFS data was carried out at the HE-SGM monochromator dipole magnet beam-line at the synchrotron radiation source BESSY II (Berlin, Germany). Spectra were acquired at the C and N K-edges in the Total Electron Yield (TEY) mode [144]. The resolution, $E/\Delta E$, of grid 1 of the monochromator at the carbonyl $\pi*$ resonance of CO ($h\nu = 287.4eV$) was found to be in the order of 2500. The slit-width used was 150 μm. Raw spectra were divided by the monochromator's transmission function, which was obtained with a freshly sputtered Au sample [144]. All spectra were recorded at an angle of 55^o, measured between the surface plane of the sample and the direction vector of the incident linearly polarised light beam. Energy alignment of the energy scale was achieved by using an I_0 feature referenced C1s$\rightarrow \pi*$ resonance measured with a pyrolytic graphite sample (Advanced Ceramic Corp., Cleveland OH) at 285.4 eV [145]. Spectra are shown with the pre-edge count rate subtracted, and after normalisation in units of the absorption edge jump [144]. Finally, we should mention that NEXAFS spectroscopy in the electron yield mode and XPS possess rather similar surface sensitivities in the low nm range.

3.2.2.2.3 Elemental Analyses (EA) Samples of flakes (scraped from the glass substrate as described above) were prepared and subjected to elemental analyses (EA) as follows : About 2 mg samples of PP:N flakes were precisely weighed and placed in small tin cups before being inserted into the auto-sampler of the EA

apparatus (EA 1108 CHN, Fisons Instruments). At given time intervals, the tin cups dropped into a quartz reaction tube in an oven at > 1000°C. At this time, the helium carrier-gas was temporarily enriched with pure oxygen, causing instantaneous combustion of the sample. Total combustion into CO_2 and H_2O was assured by passing the gas mixture through a bed of anhydrous WO_3 powder. The mixture then traversed a bed of hot copper wires, thereby removing possible excess oxygen and reducing oxides of nitrogen to molecular nitrogen. The (cooled) gas mixture was then introduced into a chromatographic column under constant flow rate of helium carrier, in order to be separated, eluted and analysed by a thermal conductivity detector. The signals corresponding to each element (carbon, hydrogen and nitrogen) were related to the absolute mass content of that element in the original sample. The concentration of oxygen in the PP:N sample, the only other element detected by XPS, could be deduced by way of a mass balance. From the mass content (in percent) of element « E », m_E, we deduced the atomic content (also in percent), A_E. Based on the A_E values, it was then possible to write a chemical formula for 100 atoms of the particular PP:N sample, as follows :

$$C_{A_C} N_{A_N} O_{A_O} H_{A_H} \tag{3.3}$$

As each C atom could form 4 half bonds, each N atom 3, each O atom 2, and each H atom one single half bond, we were able to calculate the total number of bonds in our 100-atom chemical formula, B, as follows :

$$B = \frac{4A_C + 3A_N + 2A_O + A_H}{2} \tag{3.4}$$

which, in turn, allowed us to rewrite the general chemical formula for this particular PP:N, but now based on 100 covalent chemical bonds :

$$C_{A_C/B\times 100}N_{A_N/B\times 100}O_{A_O/B\times 100}H_{A_H/B\times 100} \tag{3.5}$$

The relative degree of unsaturation of the material per 100 covalent bonds, I, can be derived directly from the chemical formula. This quantity, I, is a measure of the number of π bonds and closed rings in the material's structure. It is evaluated by comparing the number of H atoms in the corresponding « completely-saturated » chemical formula (2 H for each C, 1 H for each N) to the number of H atoms in the chemical formula of the PP:N sample, where two missing H atoms correspond to one unsaturated bond. For the case of PP:N material with the general chemical formula given by (3.3), I can be calculated from eq. 3.6, an approximation of the general unsaturation formula for macromolecules, but in which hydrogen atoms at chain ends are not taken into account :

$$I = \frac{((2A_C + A_N) - A_H)}{2} \tag{3.6}$$

By calculating I for expression (3.5), we obtain the percentage of unsaturated bonds in PP:N, valuable new information in the task of elucidating the material's complex structure, and to the best of our knowledge without precedent in the literature on plasma polymerisation. We have assumed in the foregoing that PP:N films were of homogeneous composition throughout their thickness, an assumption that has largely been substantiated by our experiments.

3.2.2.2.4 Infrared Spectroscopy PP:N samples deposited on the glass substrate were prepared for infrared spectroscopy using two different procedures, the purpose being to investigate the relative merits of each for quantification of functional groups.For both techniques, PP:N flakes were used (see above). In addition,

powders of poly(acrylonitrile), PAN (99%, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville ON) and toluenesulfonylmethyl isocyanide, TOSMIC (99%, Sigma-Aldrich) were used as standards for measuring the concentrations of nitriles and isonitriles, respectively. In the second method, exact mixtures comprising 2 mg of PP:N flakes with 150 mg of dry KBr powder were placed in a pellet press (13 mm diameter) and compressed under 6 tonnes for 10 minutes, thereby producing translucent pellets for transmission-FTIR analyses. The last method comprised dissolving exactly 2 mg of PP:N flakes in 1.5 g of dimethyl sulfoxide, DMSO (purity = 99.9%, Sigma-Aldrich). The resulting solution was introduced by syringe into the inter-window gap of a special liquid cell for IR spectroscopy, equipped with ZnSe windows (Pike Technologies, Madison WI). The said gap was kept constant by means of a 200 μm thick Teflon^{TM} spacer. All samples were analysed using a FTIR spectrometer (Bio-Rad FTS-3000 Excalibur Series) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. The ATR mode was used for the first set of samples, while the transmission mode was used for the latter two. In each case, background spectra were taken using the same methodologies, but in the absence of the PP:N analyte (in the case of ATR, the germanium crystal was exposed to ambient air) . Semi-quantitative data were acquired by determining molar absorption coefficients for nitriles and isonitriles using the above-mentioned standard materials, PAN and TOSMIC, respectively. Pellets and solutions were prepared over relevant ranges of concentrations, and corresponding IR spectra were acquired. The absorbance areas under the 2200 cm^{-1} (nitrile, isonitrile) peaks of standard materials, A_S , were plotted against their molar concentrations (C_S, in moles of nitrile or isonitrile per liter of solvent) in the solutions or pellets. Knowing the path length, l, the molar absorption coefficients, ε,could then readily be deduced from the observed linear relationships, a modified Beer-Lambert law where absorbance at a single wavelength is replaced by the absorbance area over a broad range of wavelengths.

$$A_S = \varepsilon C_S \tag{3.7}$$

This will be shown and discussed in detail later (section 3.2.3.2.3). If this method is to provide valid semi-quantitative data, we must assume that ε is constant in all of the materials. We believe that this is a reasonable assumption since it was demonstrated earlier that nitrile groups with similar environments in different molecules have very similar absorption coefficients [162]. Spectra of PP:N in the form of pellets or solution were acquired and their peaks in the region of 2200 cm^{-1} were fitted using the procedure described by Mutsukura [126, 127]; this allowed us to separate the contributions from the nitrile and isonitrile functionalities within the 2200 cm^{-1} IR peak envelope. Finally, the [CN]/[N] (nitrile) and [NC]/[N] (isonitrile) ratios were evaluated from IR peak areas and elemental analysis (EA) data : Starting from the general chemical formula 3.3, we derived that based on a single N atom, eq. 3.8, and calculated the resulting « molecular weight », $M_{w,1N}$

$$C_{A_C/A_N} N_1 O_{A_O/A_N} H_{A_H/A_N} \tag{3.8}$$

The concentrations of nitriles and isonitriles, [CN] and [NC], were calculated using their fitted peak areas, A_{CN} and A_{NC}, respectively, and the exactly-measured masses of PP:N powders used in the preparation of the pellet or solutions, $W_{PP:N}$, eq. 3.9 :

$$\frac{[CN]}{[N]} = \frac{A_{CN}}{\varepsilon W_{PP:N}} \times M_{W,1N} \tag{3.9}$$

3.2.3 Results and Discussion

3.2.3.1 Elemental Compositions

Figures 3.9 and 3.10 show the concentrations of nitrogen, [N], (the most important element in the context of this investigation) and those of the four constituent elements of all three types of PP:N deposits (C, H, N, and O), respectively. Figure 3.9, based on XPS broad-scan spectral analyses, presents elemental concentrations, [E], based on expression (2.4). It should be emphasised that in order to avoid overcrowding Fig. 3.9, [C] and [O] trends that strongly resemble those shown in Fig. 3.10, have deliberately been omitted. Figure 3.10, based on EA, shows the absolute mass contents of C, N, H, and O being determined by mass balance as described in section 3.2.2.2 above; it is noteworthy that [O] values determined this way were in excellent agreement with their broad-scan XPS counterparts. It is now well known [33, 35, 44, 49] that the observed small (typically a few at. %) [O]-content in the deposits can be explained by the reactions of long-lived radicals, when the deposits are brought in contact with atmospheric O_2 or water vapour. Total elemental analyses of hydrocarbon-based plasma polymer films, ones that include the ubiquitous hydrogen, are exceedingly rare in the literature. In the present case, this has of course been possible due to the fact that we could readily produce the required multi-milligram quantities of analytes for EA by virtue of high PP:N deposition rates (DR) and « large » areas of homogeneous deposits following the methodology described in section 3.2.2.1 and previously detailed [49]. DR values for PP:N, presented elsewhere [10, 49], were typically in the range of several hundreds of nm per minute, at least 20 times higher than those in comparable low-pressure plasma polymerisation experiments. DR was found to vary systematically with X (or $F_{C_xH_y}$), decreasing about five-fold when X decreased from 4 to 0.5 [10]. Also in regard to Fig. 3.10, it is noteworthy that the [E] values taken on a vertical line (i.e., for a

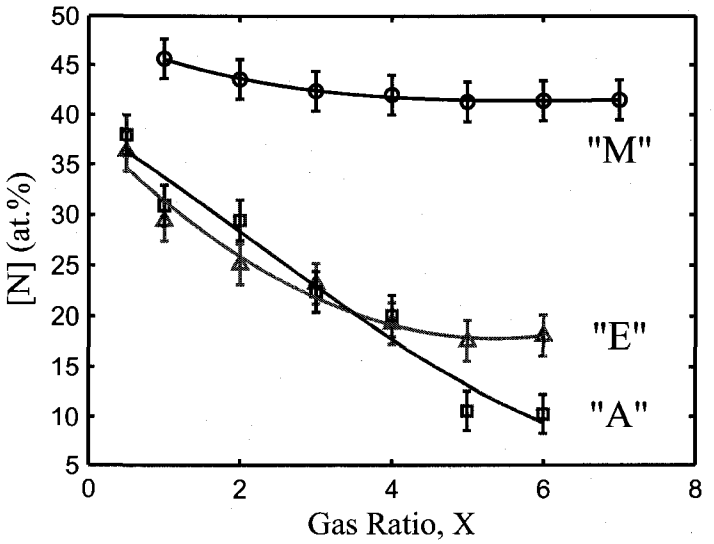


FIGURE 3.9 Concentrations of nitrogen, [N] in at.%, determined by XPS, versus gas flow ratio, X (see text), for the three PP:N families : PPM:N (« M », ○), PPE:N (« E », △), and PPA:N (« A », □).

given value of X or $F_{C_xH_y}$) yield the chemical formula of that particular PP:N film based on 100 atoms (i.e. formula (3.3) in section 3.2.2.2).

Both Figs. 3.9 and 3.10 display clearly different characteristics among the three « monomer » families : [N] is seen to decrease with rising values of X ($F_{C_xH_y}$), more so for PPE:N and PPA:N than for their (nearly-constant) PPM:N counterparts (Fig. 3.9). [N] values are seen to follow the same trends in Figs. 3.9 and 3.10, as expected, and the estimated experimental uncertainties (see error bars, which correspond to the standard deviation calculated for a few conditions on each of the graphs) are also quite similar for XPS and EA-based measurements (about 5%), but the « real » (absolute) values of [N] are those in Fig. 3.10, since hydrogen is taken into account here. From Fig. 3.10a we note that the elemental compositions of PPM:N films varied little when X ranged from 1 to 7 (corresponding to F_{CH_4} between 10 and 70 sccm, respectively) ; these possessed the highest [N] values (about 25 at.% on average) among the three PP:N families, over the entire range of compo-

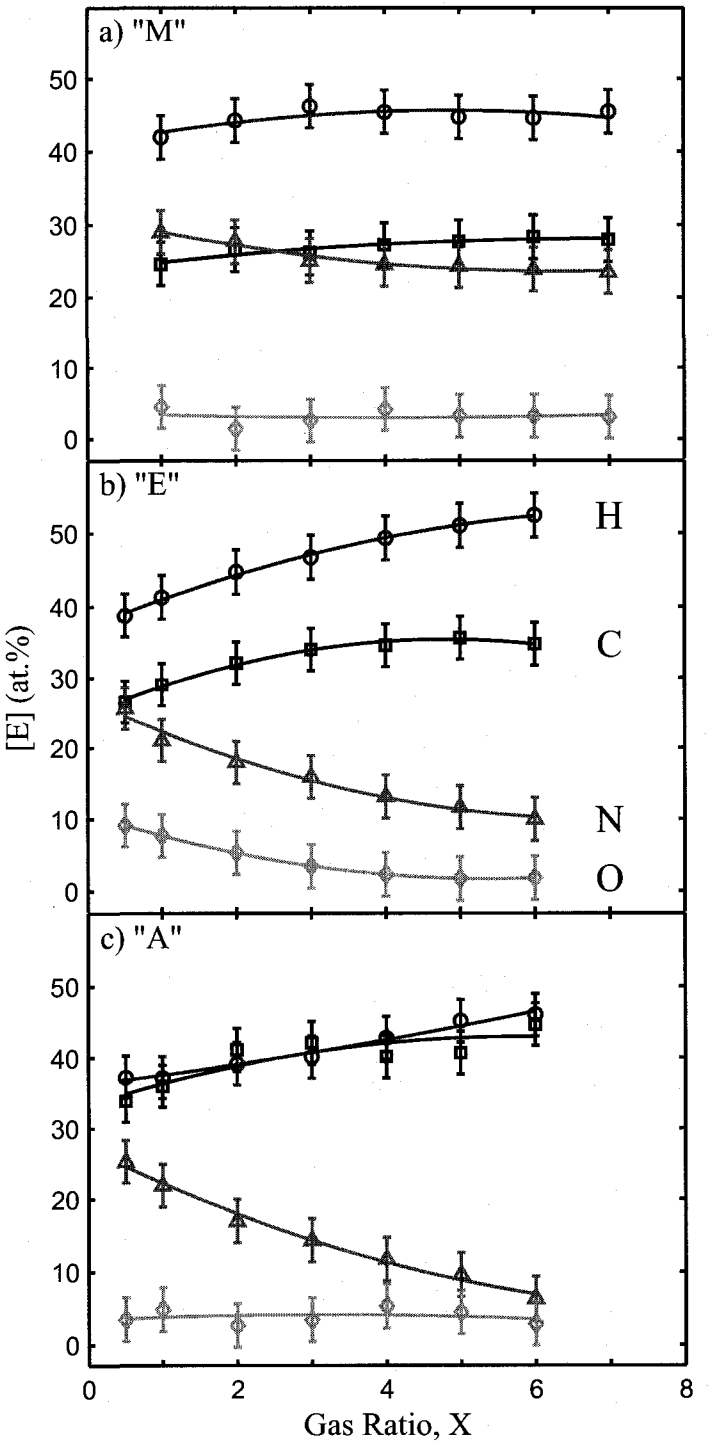


FIGURE 3.10 Concentrations (in at.%) of all constituent elements of PP:N films, as determined by Elemental Analysis (« EA », see text), versus the gas flow ratio, X : (a) « M »- PPM:N ; (b) « E »- PPE:N ; (c) « A »- PPA:N ; hydrogen (H,○), carbon (C,□), nitrogen (N,△), oxygen (O,◇).

sitions. Figures 3.10b and 3.10c show rather different behaviours for the respective PPE:N and PPA:N deposits, namely the already-mentioned monotonic drops in [N] with rising X or $F_{C_xH_y}$, accompanied by increasing values of [C] and [H]. It is interesting to note that the [H]/[C] ratio in the PP:N films is related to that of the corresponding « monomer » (C_xH_y), and that this ratio is nearly constant among films of the same family, namely 1.7, 1.4 and 1.0 for PPM:N, PPE:N and PPA:N, respectively, while $y/x = 4$, 2 and 1 for their corresponding monomers. The loss of hydrogen, due to molecular fragmentation in the plasma, comes as no surprise. As already mentioned in section 3.2.2.2 (« EA »), the degrees of unsaturation, I, of all PP:N films can be evaluated directly from their elemental analyses; the reader is reminded that I corresponds to the total fraction (percentage) of unsaturated bonds, both π bonds and closed rings. This parameter, calculated using expression (3.6), is presented in Fig. 3.11. While no important differences can be noted between PPM:N and PPE:N samples, for which I values were between 13% and 17%, the PPA:N family was clearly more unsaturated, with values between $I = 19\%$ and 23%. This is in keeping with the extreme unsaturation (triple bond) in the latter monomer, acetylene. More will be said later in this article about the specific nature of unsaturation in PP:N film samples.

3.2.3.2 Chemical Functionalities

3.2.3.2.1 XPS and Chemical Derivatisation Previous high-resolution XPS analyses of PP:N coatings suggested the presence of several types of functionalities, namely amines, nitriles, imines, amides, as well as hydroxyl, ether and carbonyl groups [9, 10, 49]. However, since the component peaks of the C1s, N1s and O1s envelopes cannot be fully resolved, even when using monochromatic Al Kα radiation, the chemical characterisation of PP:N coatings containing only O- and N-hetero-atoms bonded to carbon based on XPS alone is neither straightforward, nor

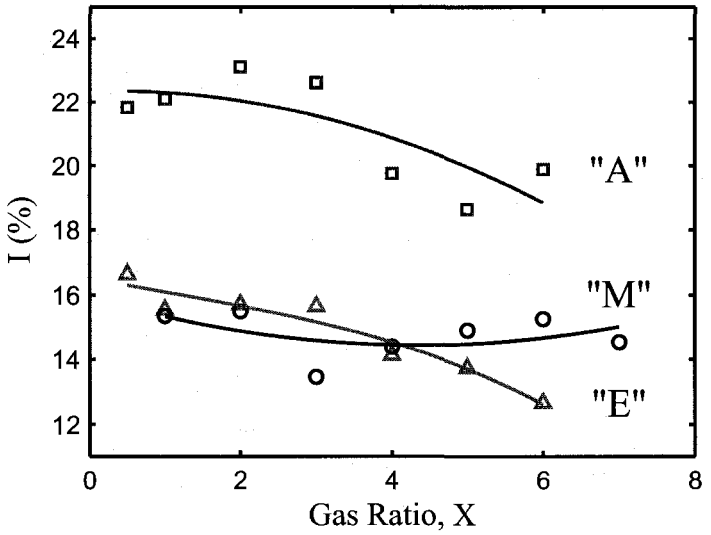


FIGURE 3.11 The unsaturation parameter, I (see eq. 3.6 in text) versus gas flow ratio, X, for the three PP:N families : PPM:N (« M », ○), PPE:N (« E », △), and PPA:N (« A », □).

unambiguous [49, 134, 173]. For these reasons, it is necessary to resort to other, complementary techniques capable of specifically addressing functionalities that are known (or likely) to be important structural constituents. Considering the low concentrations of O-containing functionalities, one such component in PP:N films are primary amines (-NH_2), which can be labelled using chemical derivatisation ; in Fig. 3.12 we show a plot of the « amine selectivity », the fraction of total [N] bonded in the form of primary amines, [NH_2]/[N], along with the absolute amine concentration, [NH_2], calculated using XPS data (eq. 2.4), both as a function of X for the three families of PP:N plasma polymers. Other authors generally chose to report amine content based on 100 carbon atoms (i.e., [NH_2]/[C], in %) [26, 27] ; however, it is felt that the value based on eq. 2.4, [NH_2], is better suited for describing the present PP:N families, since it is truly proportional to the primary amine content over the entire possible range of [N] values, including very high ones encountered in PPM:N. Clearly, the [NH_2]/[C] parameter is unsatisfactory when many nitrogen

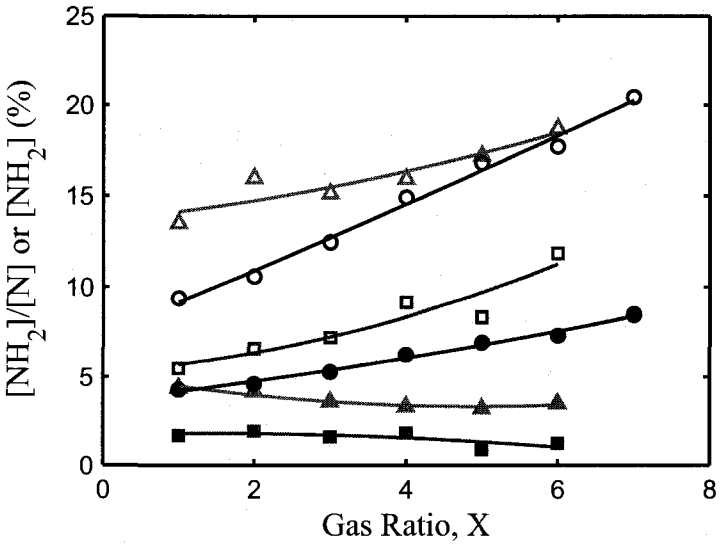


FIGURE 3.12 Contribution of primary amines to the total nitrogen content, $[NH_2]/[N]$, the so-called « amine selectivity » (open symbols), and the total amine content, $[NH_2]$, based on XPS analyses (full symbols), both versus gas flow ratio, X : PPM:N (○,●), PPE:N (□,■) and PPA:N (◇,◆).

atoms are incorporated into the molecular network and effectively replace carbon atoms; at that point [C] can no longer be considered as a meaningful constant reference.

In all three cases, the selectivity ($[NH_2]/[N]$) is seen to have increased with rising X, but the PPE:N values are about twice those for PPA:N, with PPM:N data falling between the other two. However, remembering from Fig. 3.9 that [N] was roughly constant only for PPM:N films, but decreased in the other two cases, it follows that $[NH_2]$ values were highest for the PPM:N family, and only here does one observe an increase of $[NH_2]$ with rising X.

3.2.3.2.2 NEXAFS Spectroscopy In order to help further elucidate types of chemical functionalities in the PP:N films, electron yield NEXAFS spectroscopy was used. This method, in addition to being surface-sensitive, can provide molecu-

lar information that is complementary to XPS, in particular regarding unsaturated moieties. Figures 3.13a and 3.14a show typical examples of C and N K edge spectra, respectively, obtained using selected N-containing conventional polymer films, namely PAN (a reference for nitriles), and PEI (a reference for amines). Figures 3.13 and 3.14 also present typical spectra of PP:N films corresponding to different X values, as indicated.

Assignments of the resonances that appear in the spectra have been made with reference to literature data for films of PAN, PEI, and methylene-bis-diethylaniline, the latter being another reference for primary amines [146]. The broad pre-edge feature in the range 285 to 286 eV of the carbon K-edge spectra (Fig. 3.13b,c,d) of the PP:N films is due to a superposition of at least two components, the one near 285 eV being typical of transitions to π^* orbitals related to phenyl rings and non-conjugated double bonds [33, 35, 44]. This interpretation is supported by the spectrum of a previously-reported plasma polymer, prepared with pure ethylene [9, 10] and well known from other studies of plasma polymerised ethylene [147, 174]. Figure 3.13 reveals the existence of π^*(C=C) resonances for all PP:N films. Furthermore, Shard and co-workers [37, 173] reported a $\pi \rightarrow \pi^*$(C=N) resonance near 285.5 eV, which may also be found in all of the present PP:N spectra. The feature at $\sim$ 286.8 eV, clearly evident in PAN, is therefore assigned to a C1s$\rightarrow$ π^*(C$\equiv$N) resonance. The spectra of all PP:N coatings also reveal that resonance, but at different intensity levels, least intense in PPM:N and most intense in PPE:N and PPA:N samples with the highest [N] values. Careful inspection of the difference spectra (see, for example, the one for « Δ(0.5-6) » given in Fig.3.13c) reveals a clear feature at 286.8 eV. This helps to confirm the interpretation that related shoulders in the C K-edge spectra of all samples, for example that in the « 0.5(26) » PPE:N spectrum, are due to the existence of C$\equiv$N bonding in all these cases. Since all PP:N coatings contained up to 6 at.-% [O], the feature at $\sim$286.8 eV likely also includes

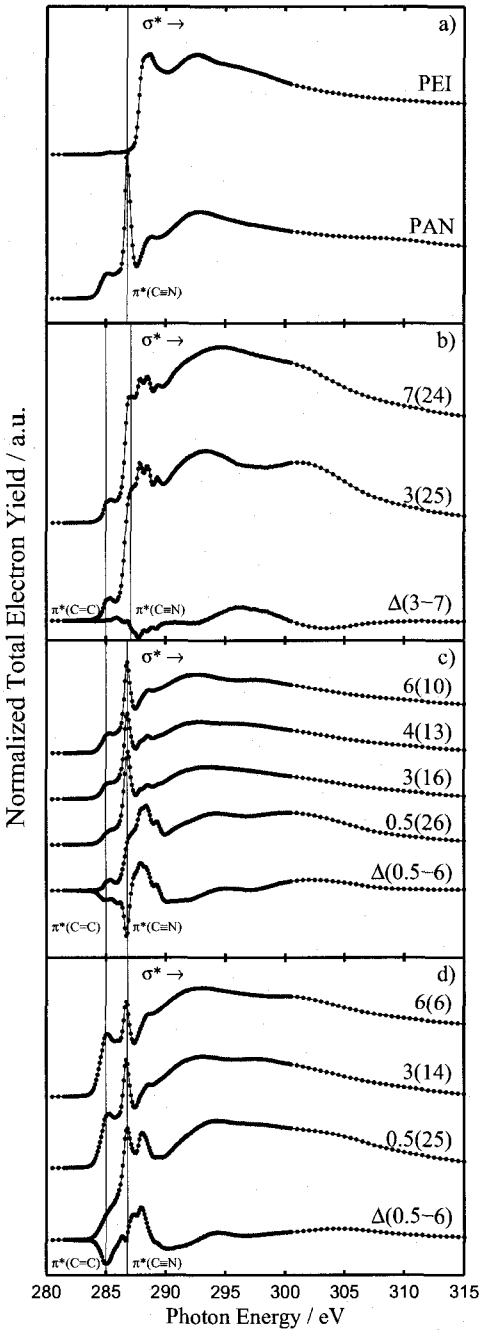


FIGURE 3.13 Carbon K-edge NEXAFS spectra of : a) reference polymers, PEI and PAN (see text); b) PPM:N; c) PPE:N; and d) PPA:N samples. For any given spectrum, two numbers are shown, where the first refers to the particular X value used for the deposition; the second number (in brackets) refers to the value of [N] for that sample, taken from Fig. 3.10. The lowest (« Δ » or « difference ») spectra in Figs. 3.13b,c,d are subtractions of the two spectra corresponding to the indicated X values. Spectral features are tentatively assigned and explained in the text. The difference spectra are given in order to highlight the trends of spectral changes with varying [N].

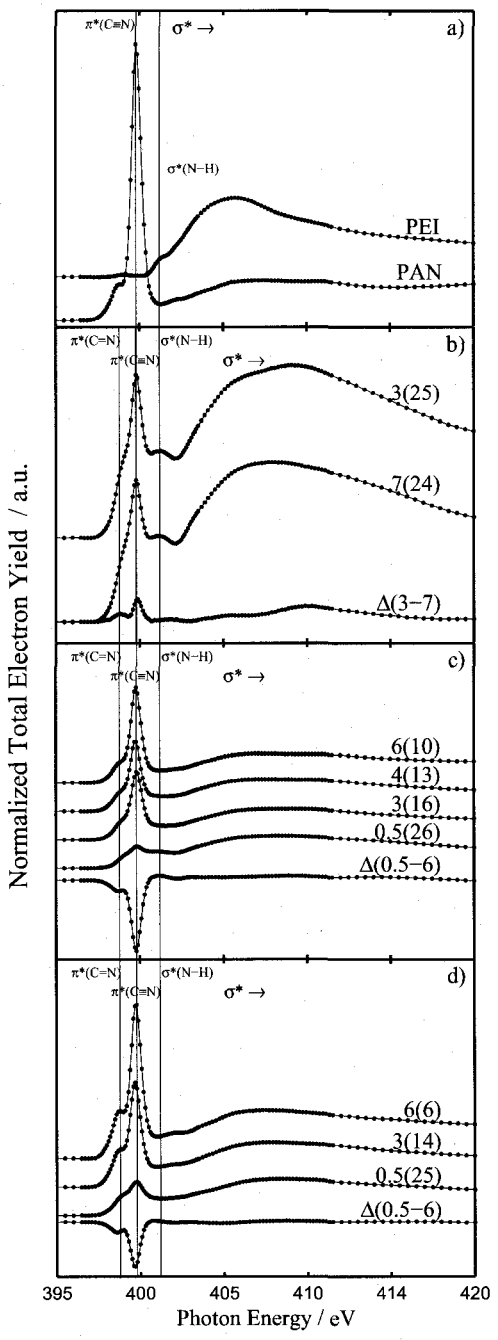


FIGURE 3.14 Nitrogen K-edge NEXAFS spectra of a) reference polymers, PEI and PAN (see text); b) PPM:N, c) PPE:N and d) PPA:N samples. For any given spectrum, two numbers are shown, where the first refers to the particular X value used for the deposition; the second number (in brackets) refers to the value of [N] for that sample, taken from Fig. 3.10. The lowest (« Δ » or « difference ») spectra in Figs. 3.14b,c,d are subtractions of the two spectra corresponding to the indicated X values. Spectral features are tentatively assigned and explained in the text. The difference spectra are given in order to highlight the trends of spectral changes with varying [N].

some minor contributions from carbonyl groups, usually found in this position [174]. Amide groups may contribute a π^* resonance at 288.2 eV [37]; probably, they also co-exist in the films as manifested by the bonded oxygen. Other features above ~288.2 eV can be attributed to C1s→ σ^* transitions for C-H, C-C/C-N, and C=C/C=N bonds [35, 37, 173]. The N K edge spectra shown in Fig. 3.14 provide further unequivocal information. The resonant feature at 399.8 eV, clearly related to C≡N groups, is very intense in the spectra of PAN, PPM:N and of lower-[N] (high-X) PPE:N and PPA:N samples. Oran *et al.* [35] conducted an extensive review of N K-edge data in the literature and provided additional experimental results that showed the lowest resonance near 398.7 eV, also found here for all PP:N films, to be most likely due to imine-like N-species. But, the same authors reported that conjugated C=C-C≡N moieties (as in acrylonitrile) also provide a manifold of resonances with an intense component at this same low energy [35]. The feature at ~401.2 eV is certainly associated with aliphatic amine environments, as evidenced by comparison with the N K-edge spectra of PEI, methylene-bis-diethylaniline [146]. However, one should not forget that the peak at 401.2 eV may also contain contributions from an amide π^* resonance [37, 175] as revealed too, for example, by N K-NEXAFS study of an acrylamide polymer, piPAAm [37, 173]. Figure 3.15 shows that integration of areas under selected pre-edge π^* features allows one to discern certain trends in the PP:N film chemistries as a function of X, the feed gas compositions. Areas were estimated for those resonances by peak fitting the pre-edge spectral sections using mixed Gaussian-Lorentzian shapes and after subtraction of a supposed polynomial background representing the low-energy extension of the absorption edge. Unfortunately, owing to the unknown shapes of the absorption edges, this is only straightforward for the case of resonant π^* features that are sufficiently far below the absorption edges, for instance the C1s→ π^*(C=C), the N1s→ π^*(C≡N) and → π^*(C≡N) resonances, for which results are shown in Figs. 3.15a,b,c for PPM:N, PPE:N, and PPA:N, respectively.

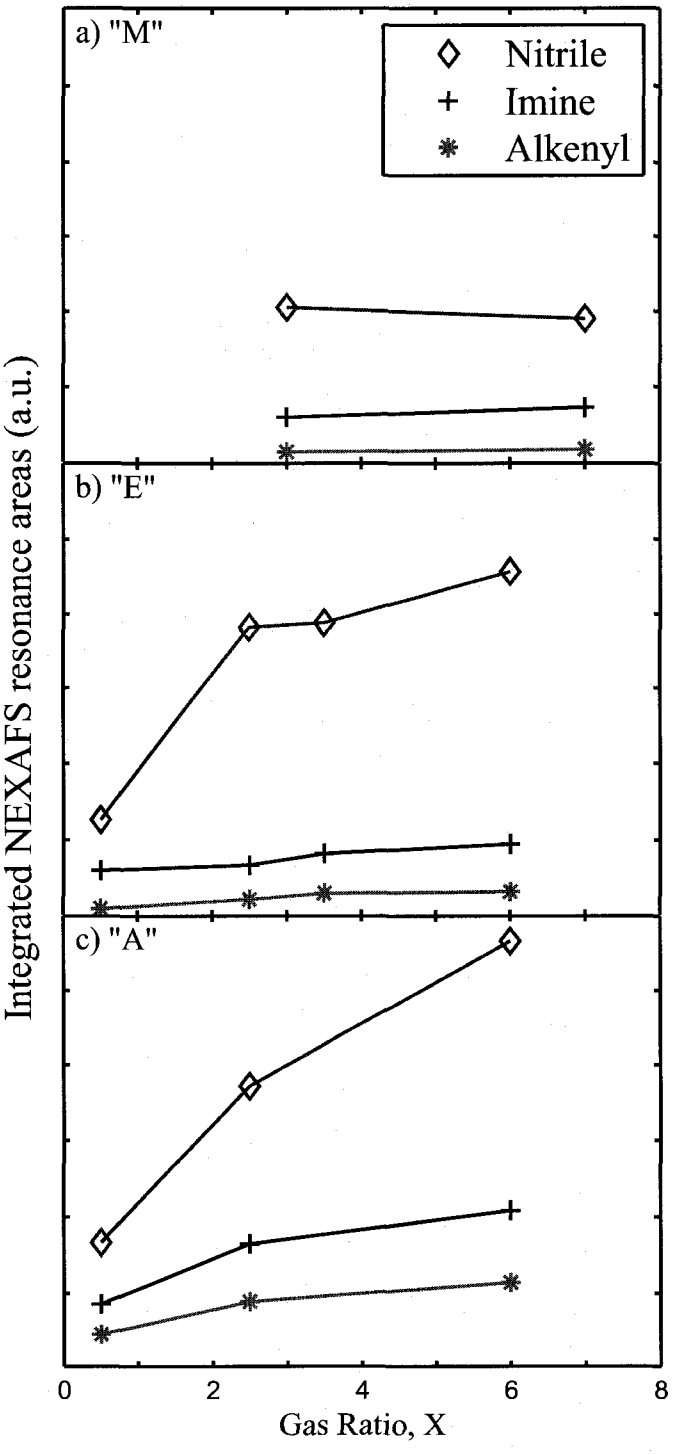


FIGURE 3.15 Selected integrated NEXAFS resonance areas for different PP:N films, versus gas flow ratios, X : (a) « M »- PPM:N ; (b) « E »- PPE:N ; (c) « A »- PPA:N. The resonance areas displayed are those for nitriles ($\diamond$), imines (+), and alkenyls (*).

To summarise, NEXAFS results harmonise with our earlier XPS data in that they indicate that all PP:N coatings contained several types of functionalities, namely aliphatic amines, nitriles, imines, and possibly amides. They also contained unsaturations (C=C, aromatic C or N), and quite likely cross-links (although the latter could not be detected either by XPS, nor by NEXAFS). However, PP:N films with very high [N] values manifested NEXAFS spectra that differed significantly from those with lower [N] contents (higher X values). The latter films had higher relative nitrile contributions, and these increased significantly with diminishing [N], especially for PPE:N and PPA:N (see Fig. 3.15b,c). Furthermore, molecular information from NEXAFS shows only minor effects when X is increased from 3 to 7 for PPM:N films, a result that agrees nicely with the corresponding IR results in Fig. 3.16 (see below). Another observation is that the molecular NEXAFS finger-prints of the PPM:N films for X = 3 or 7, characterised by [N] near 25 at.%, are rather similar to that obtained for the PPE:N(0.5) film, [N] = 26 at.%, but different from PPA:N at low X and high [N]. A similar but less obvious observation can be made on the basis of IR spectra (Fig. 3.16).

3.2.3.2.3 Infrared Spectroscopy Figure 3.16 shows the IR spectra corresponding to PPA:N (a), PPE:N (b) and PPM:N (c) samples, with the highest, lowest, and intermediate [N] values in all three cases; all spectra were obtained by transmission-mode FTIR spectroscopy using the KBr pellet samples. For improved clarity, the spectral baseline was flattened and the absorbance above 4700 cm^{-1} was set at zero; also, all intensities were normalised with respect to the weight fraction of analyte in each pellet. Since precise assignments of various IR bands can be difficult in the case of organic solids, particularly plasma polymers with both N and O bonded to carbon, we compare spectra of several PP:N deposits with increasing [N] values. Clearly, all of these spectra presented similar features, regardless of the particular monomers, namely six distinct absorption bands : I.

3700 - 3050 cm^{-1}, N-H stretch; II. 3000 - 2800 cm^{-1}, C-H stretch; III. 2250 - 2100 cm^{-1}, C≡N stretch; IV. 1800 - 1500 cm^{-1} C=C, C=N stretch; V. 1500 - 1300 cm^{-1}, CH_2, CH_3 bending; and VI. 1240 - 1100 cm^{-1}, C-N stretch [9]. Similar absorption features were also reported by other authors for the case of « a-C :H-N » films, deposited by low-pressure plasma polymerisation of hydrocarbons mixed with N_2 or NH_3 [48, 126, 127]. Except for PPE:N X <2 and the highest- X PPA:N, [O] values were always low (< 6%) with regard to [N], and since the intensities of bands I, III and IV increased noticeably with rising [N] (see Fig. 3.16), it is believed that these three bands resulted from N-containing groups; therefore, we disregard possible spectral contributions from O-containing functionalities. Since we have provided detailed assignments of all bands in a previous article [9], we limit ourselves here to a brief summary. The broad band I is attributed mostly to amine groups of different orders. Adjacent to band I, band II comprises a convolution of contributions due to aliphatic CH groups. Band III is broad and usually assigned to nitriles; however, comparison with PAN spectra (not shown here) proved that it also contains contributions from iso-nitriles (-N≡C). This is confirmed by the work of others, for example Mutsukura *et al.*[126, 127] who identified several Gaussian features in this spectral region for the case of their a-C :H-N films deposited from low-pressure r.f. discharges in CH_4/N_2 mixtures. A detailed analysis of this band is presented below. The assignment of band IV is somewhat speculative, the likeliest contributions being C=C or C=N stretching modes and N-H bending modes.[9] Finally, bands V and VI are attributed to disordered, highly branched aliphatic chains and to amine groups, respectively.

As mentioned above, band III has specifically been attributed to a combination of nitriles and isonitriles; Fig. 3.17 shows an example close-up of band III (for the case of a PPM:N(7) sample), including the Gaussian sub-peak components. Peak-fitting and the attributions of sub-peaks was achieved here by using stan-

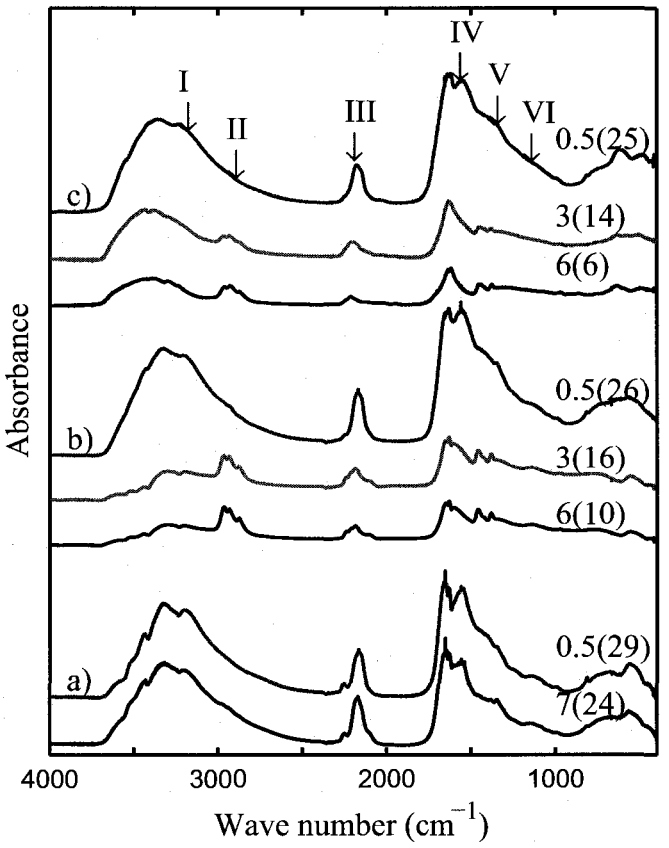


FIGURE 3.16 Transmission infrared spectra from KBr pellet samples (see text) : (a) PPM:N ; (b) PPE:N ; (c) PPA:N. For any given spectrum, two numbers are shown, where the first refers to the particular X value used for the deposition ; the second number (in brackets) refers to the value of [N] for that sample, taken from Fig. 3.10.. The bands labelled by Roman numerals are identified and discussed in the text.

dard peak-fitting software (Casa Software, Teignmouth UK), which thereby also can yield semi-quantitative information about those species, as follows : At first, calibration curves were obtained from the IR spectra of the standard materials in solutions and in KBr pellets, at different concentrations, namely PAN for nitriles and TOSMIC for isonitriles, as described in section 3.2.2.2.4 (see Fig. 3.18). The slopes of the two straight-line plots in Fig. 3.18 allow us to determine the molar absorption coefficients using eq. 3.8, namely 25.5 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ and 366 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ for nitrile and isonitrile, respectively; in other words, isonitriles absorb 14 times more strongly than their nitrile counterparts at equal concentrations. These data were, in turn, used to estimate the concentrations of nitriles and isonitriles in the PP:N samples (either in solution or in KBr pellets, depending on the materials' solubilities). However, a complete quantitative analysis of those sub-species was not possible, because their absorption coefficients were clearly not the same when going from the standard materials to the crosslinked plasma polymer samples. Instead, assuming that the same linear relationships and absorptivity ratio as in Fig. 3.18 apply also for the case of PP:N films, we conducted a semi-quantitative, comparative analysis, presented in Figure 3.19. It shows that for PPE:N and PPA:N, [CN] and [NC] respectively increase and decrease with rising X, and that both remain relatively constant in PPM:N. Both nitriles and isonitriles were found at higher concentrations in PPA:N, while their (lower) concentrations were similar in PPE:N and PPM:N. Since both of these functionalities comprise a double unsaturation, their concentrations are directly correlated with the unsaturation parameter, I, presented in Fig. 3.11. As will be discussed later, these results show good agreement with their NEXAFS counterparts, but the latter cannot distinguish between the two functionalities.

Noteworthy is the observation that in all PPM:N, PPE:N and high-[N] PPA:N films, band III sub-peaks could only be attributed to nitriles and isonitriles, while

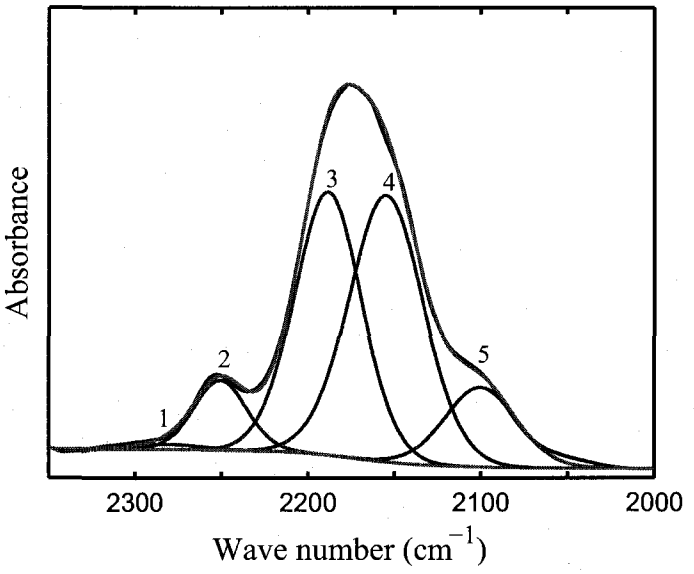


FIGURE 3.17 Deconvolution of peaks in the IR absorption band assigned to nitriles / isonitriles, centred near 2200 cm^{-1}, using the method of Mutsukara *et al.* (see text) ; this is the spectrum of a PPM:N(7) sample. Sub-peaks 1 and 2 correspond to nitrile absorption features, 4, 5, and 6 to those of isonitriles.

in low-[N] PPA:N, some new features appeared during the fitting procedure ; these could be attributed to azide groups (N_3, 2028 cm^{-1}) and allenes (-C=C=C-, 1946 cm^{-1}).

3.2.3.3 Stability of PP:N Coatings

A major concern when using plasma-engineered surfaces in biomedical applications is their stability in aqueous media normally used for cell culture. It has been found that several N-containing plasma polymers can become soluble in water and other polar solvents such as ethanol, if a high amine concentration is achieved through « mild » plasma conditions (low power input, low duty cycle) [9, 36, 38, 39]. This is believed to be due to the combination of high surface energy, resulting in a strong affinity of the deposited material towards polar solvents, and the relatively low de-

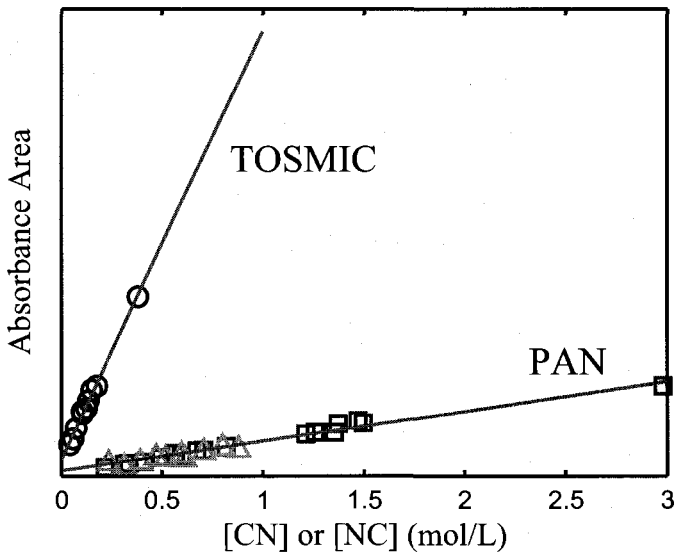


FIGURE 3.18 Absorbance peak areas under the IR absorption band near 2200 cm^{-1} versus concentrations of nitile, [CN], and isonitrile groups, [NC], for the case of reference materials, PAN and TOSMIC, respectively (see text). The upper line, for [NC], was obtained using various concentrations of TOSMIC dissolved in DMSO (○) ; the lower line plot relates to different concentrations of PAN in DMSO solution (□) or in KBr pellets (△), see text.

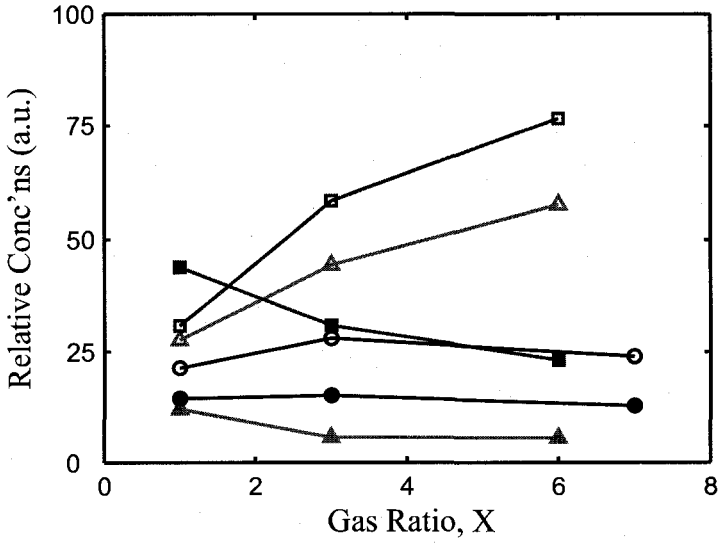


FIGURE 3.19 Relative (semi-quantitative) concentrations of nitrile (open symbols) and isonitrile groups (full symbols), versus gas flow ratio, X, for the three PP:N families : PPM:N (○,●), PPE:N (□,■) and PPA:N (◇,◆)

TABLEAU 3.1 Solubility of PP:N deposits in common organic solvents. Solvents are placed in the general order of increasing polarity from top to bottom. PP:N samples tested were those with the highest [N] values. Check marks indicate ready solubility, while crosses signify the opposite.

Solvent	PPM:N	PPE:N	PPA:N
Diethylether	x	x	x
Chloroform	x	x	x
Dichloromethane	x	x	x
Acetone	x	x	x
Ethyl Acetate	x	x	x
Acetonitrile	x	x	x
Thetrahydrofuran	x	x	x
Isopropanol	√	x	x
Ethanol	√	x	x
Methanol	√	x	x
Water	√	x	x
Dimethylformamide	√	√	x
Dimethylsulfoxide	√	√	x

grees of polymerisation and cross-linking resulting from « mild » plasma conditions. Therefore, in order to verify the stability of PP:N towards liquid environments, PP:N flakes were immersed in several common solvents of varying polarities and capacities for hydrogen bonding, of course including water. This was done for periods of 24 h, after which possible solubility was assessed ; the results are presented in Table 3.1. Clearly, PPM:N was soluble in seven of the thirteen solvents investigated : alcohols, water, and the strong organic solvents dimethylformamide (DMF) and dimethylsulfoxide (DMSO). PPE:N films were insoluble in alcohols and water, but readily dissolved in DMF and DMSO, while PPA:N was stable towards all of the solvents. Therefore, the solubility of the various PP:N samples in polar solvents appears to be strongly linked with their degrees of unsaturation, the concentrations of polar moieties such as primary amines, and also levels of cross-linking and the presence of oligomers (low molecular weight fractions) [9].

A second important concern about plasma polymers is their possible temporal instability, commonly referred to as « ageing ». Examples of possible effects include oxidation of dangling bonds and of unstable functional groups, and entropy-driven reorganisation of the near-surface regions, the latter being termed « hydrophobic recovery ». [1, 9, 38, 176]. In the case of plasma polymers, as opposed to surface grafts, hydrophobic recovery is less pronounced [9, 177], due to higher cross-linking and near-uniform composition across the layer, contrary to plasma-modified polymers. However, the same qualitative manifestations of ageing (oxygen uptake and nitrogen loss) were reported for N-containing plasma polymers during the first two weeks of normal storage [9, 15, 40]. Figure 3.20a presents the evolutions of [N] and [O] observed over a 336 hour (two week) period, for samples of each of the three PP:N materials. Small decreases and slight increases, almost indistinguishable from experimental errors, were observed in [N] and in [O], respectively, over the course of the ageing period, not inconsistent with previous findings from this and other laboratories [9, 15, 40]. However, $[NH_2]$ values were found to undergo rapid decreases during the first 24 hours, before stabilising at some fraction of the original values (Fig. 3.20b), again as reported earlier [9, 10]. Surprisingly, the extent of this ageing was quite different among the three PP:N materials, the residual $[NH_2]$ values being 48%, 21%, and 15% of those immediately after deposition, for PPM:N, PPE:N, and PPA:N, respectively. This suggests a link between the nature of the « monomer » and the ageing mechanism, possibly implicating π bonds that may favour residual radicals in the resulting films. In the present case of nominally identical deposition conditions, chemical differences among the « monomers » indeed seem to offer a plausible explanation, but more work is evidently warranted to completely clarify this question.

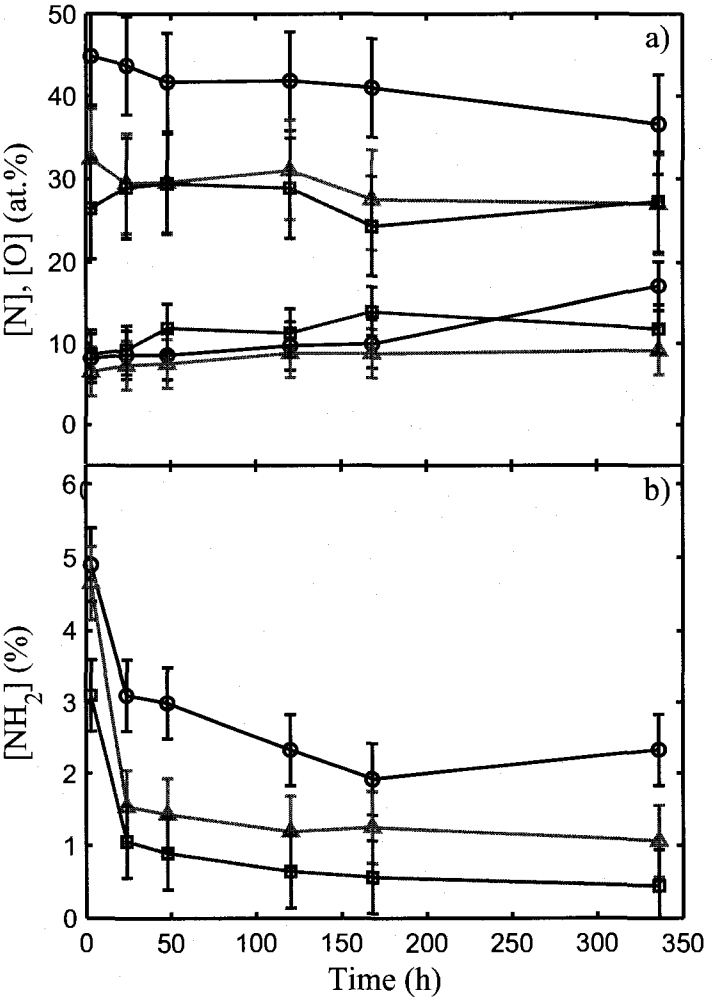


FIGURE 3.20 Time-evolutions of the compositions of three selected PP:N samples (concentrations of [N], [O], and [NH_2]), as functions of the duration of storage in laboratory atmosphere; PPM:N(1) (○); PPE:N(1) (△); and PPA:N(1) (□) : a) [N] (full symbols), [O] (open symbols); b) [NH_2]. Data were obtained from XPS measurements.

3.2.4 General Discussion and Conclusions

In this research, we have used atmospheric-pressure DBD to deposit three novel families of plasma polymers, using mixtures of nitrogen and three hydrocarbon precursors, methane, ethylene, and acetylene of varying ratios, X. Well-established and some lesser-known techniques have been combined to provide the best possible chemical characterisations of samples belonging to those families of PP:N thin films, materials with many potential applications, mostly in biotechnology. By combining XPS, EA, FTIR, and NEXAFS we were able to determine the complete chemical formulae, the degrees of unsaturation, and chemical functionalities in PP:N film structures. Some of these features are believed to be quite original, with few if any precedents in the literature on hydrocarbon plasma polymers, for example measurements of absolute compositions (including hydrogen), and of unsaturation. PP:N films were shown to be very rich in nitrogen under the appropriate experimental conditions. For PPE:N and PPA:N, [N] was found to decrease with rising X, but it varied little with X for the case of PPM:N ; certain characteristics of the respective « monomers » were reflected to some extent in the structures of their plasma polymers, notably the [H]/[C] ratios and the degrees of unsaturation, I. When they could be compared, data from the various analytical techniques were found to agree well among one another. An important initial objective of this research was to identify and quantify nitrogen-bearing functionalities in the various PP:N films ; this could be accomplished only with partial success. The proportion of total [N] in the form of primary amine groups, determined to a high degree of confidence by XPS after chemical derivatisation, was found to lie between 9 % and 20% in PPM:N, between 13% and 19% in PPE:N, and between 5% and 12% in PPA:N. However, an effort to quantify nitrile and isonitrile concentrations using eqs. (3.8) and (3.9) resulted in significant overestimations that were attributed to differences in those species' IR absorption coefficients when incorporated in the

« conventional » polymers as opposed to their plasma-polymerised counterparts. However, both the NEXAFS and the IR measurements indicated that combined nitriles and isonitriles accounted for an important fraction of [N], but again no precise numbers could be determined. Figure 3.21 shows a superposition of IR data from Fig. 3.19 with the integrated NEXAFS resonance areas (from Fig. 3.15), the latter shown as dashed lines in Fig. 3.21 ; it demonstrates remarkable agreement between the two techniques for the relative concentrations of nitrile groups in all three PP:N families. It should be emphasised that in preparing this comparison, IR and NEXAFS data from only a single sample, PPA:N(6), were forced to superimpose, and that thereupon all other data points in Fig. 3.21 fell into their shown positions. Since the two techniques could not be improved or calibrated beyond what was stated in earlier sections above, the present procedure was the best that could be done under these circumstances. However, isonitriles are not included in the NEXAFS peak at 286.8 eV because the energy of their $\pi \rightarrow \pi^*$ transition differs from that of the nitrile counterpart. While isonitriles show a strong IR absorption peak near 2200 cm^{-1}, even at low concentrations (Figs. 3.16 and 3.18), this does not reflect in the NEXAFS spectra ; their contribution here, if indeed there exists a distinct feature, may have been too small to detect on account of insufficiently high isonitrile concentrations in PP:N samples.

For all PP:N samples the selectivities for primary amines and nitriles increased with rising [N], while the opposite was observed for the less-abundant isonitriles (Fig. 3.19). Assuming that other N-containing functionalities (imines, higher-order amines, etc.) account for only a small proportion of the total [N], available data may allow us to propose the following functional makeup for one of the well-characterised materials, PPE:N(6) : $[NH_2]/[N] = 19\%$, $[C{\equiv}N]/[N] = 74\%$ and $[N{\equiv}C]/[N] = 7\%$. Obviously, the NEXAFS data unequivocally point to the presence of imines, but we are unaware of convenient methods for quantifying them ; similar arguments apply

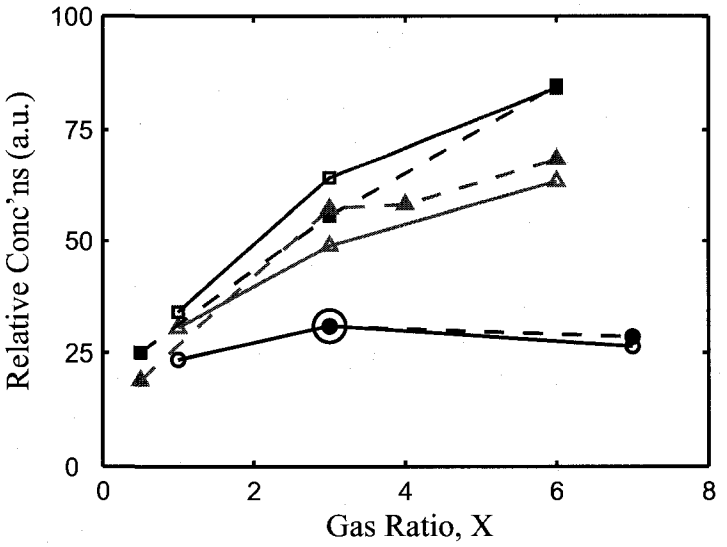


FIGURE 3.21 Composite plot of IR and NEXAFS data : IR data corresponding to relative concentrations of nitrile groups in samples from the three PP:N families, versus X (open symbols, taken from Fig. 3.19) are superimposed on the corresponding integrated NEXAFS resonance areas (full symbols, dashed lines, from Fig. 3.15) . As explained in the text, only the data points for sample PPA:N(6) (top right) were made to overlap, while all other data points then fell into the positions shown.

to higher-order amines, azides, amides, and other N- bearing species. While the elemental compositions of PP:N films were found to remain fairly stable with time elapsed after deposition (Fig. 3.20a), the concentrations of primary amines unfortunately depleted quite rapidly before attaining stable values that were at best about 50% of the original ones (Fig. 3.20b). The extents of this drop differed among PP:N families, being least in films with the highest [NH_2] values, PPM:N, but regrettably those were also the most soluble materials (Table 3.1). Solubility in water, for example, renders the films useless for many applications, foremost bio-technological ones. However, this solubility characteristic also has a potential virtue, namely to permit structural studies by an array of characterisation techniques for macromolecules that are performed in solution and are generally considered inapplicable to plasma polymers. While in this present contribution the solutions were only examined by IR spectroscopy, the possibility nevertheless exists to also perform nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and gel permeation chromatography (GPC). As already demonstrated on different plasma polymers by other workers [107, 178], these techniques may prove to become powerful new tools for characterising the structures of plasma polymers like PP:N. In spite of the stability issues described above, the attractive properties of freshly-deposited PP:N coatings (namely, high values of [N], [-NH_2], among other attributes) are rendering them very useful as bio-active surfaces. For example, the insoluble PPE:N has already proven invaluable in orthopaedic and cardiovascular research in collaboration with Montreal-based medical faculties [52, 53], and much additional work in this regard is presently in progress.

Acknowledgements

This work is being supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, NSERC. The authors are grateful to Dr. Flo-

rina Truica-Marasescu for many valuable discussions and experimental assistance. Thanks are also due to personnel at BESSY II, especially to Dr. W. Braun, Dr. O. Schwartzkopf, Dr. G. Reichardt and Mr. M. Mast, for support during our activities at the HE-SGM beamline.

CHAPITRE 4

ADHÉSION DE MONOCYTES HUMAINS U937 SUR DES COUCHES MINCES ORGANIQUES RICHES EN AZOTE : ÉTUDE DES MÉCANISMES D'ADHÉSION CELLULAIRE

Le troisième et dernier article de cette thèse présente les premiers pas faits dans le but d'élucider les mécanismes d'adhésion de monocytes U937 sur une surface riche en azote. Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié plus en détail le phénomène de concentration critique d'adhésion rapporté dans le premier article (section 3.1) à la lumière des informations chimiques obtenues sur la surface lors des travaux rapportés dans le deuxième article (section 3.2). Nous avons déterminé les conditions de surface critiques pour permettre l'adhésion de monocytes U-937 sur une série de matériaux différents et bien caractérisés chimiquement. Ces travaux ont permis de pointer les amines primaires comme ayant un rôle prépondérant dans les mécanismes d'adhésion des U937, hypothèse émise antérieurement dans cette thèse (sections 3.1 et 3.2). Dans un deuxième volet de cette recherche, nous étudions l'expression de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes d'adhésion de différenciation des U937 lors de leur adhésion sur des polymères plasma riches en azote.

Article 3 : Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-rich Organic Thin Films : Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion

Pierre-Luc Girard-Lauriault[1], Florina. Truica-Marasescu[1], Alain Petit[2], Hong T. Wang[2], Patrick Desjardins[1], John Antoniou[2], Fackson Mwale[2], Michael R. Wertheimer[1].

[1] Groupe de Recherche en Physique et Technologie des Couches Minces (GCM) and Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, P.O. square 6079, Station Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3A7, Canada

[2] Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, Montréal, QC, Canada.

Accepted for publication in : Macromolecular Bioscience, February 12^{th} 2009

Abstract

We present a two-fold study designed to elucidate the adhesion mechanism of human U937 monocytes on novel nitrogen (N)-rich thin films deposited by plasma- and by vacuum ultra-violet (VUV) photo-polymerisation, so-called « PVP:N » materials. It is first shown that there exist sharply-defined (« critical ») surface-chemical conditions that are necessary to induce cell adhesion. By comparing the extensively-characterised film chemistries at the « critical » conditions, we clearly demonstrate the dominant role of primary amines in the cell adhesion mechanism. In the second aspect of this work, quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) experiments were conducted using U937 cells that had been made to adhere on PVP:N materials for up to 24h. We show that the adhesion of U937 monocytes to PVP:N surfaces induces a transient expression of cytokines, markers of macrophage activation, as well as a sustained

expression of PPARγ and ICAM-I, implicated in the adhesion and retention of monocytes.

4.1 Introduction

Novel applications of biotechnologies manifest an ever-increasing need for surfaces that permit control over a variety of cell functions, and that can provide solutions to particular challenges [14, 15]. A good example of such a challenge is the in vitro culture of monocytes/macrophages. The function of monocytes in the immune system is to replenish resident macrophages in their normal state, and in response to inflammation signals, in which case they can move quickly to sites of infection in the tissues and differentiate into macrophages in order to elicit an immune response. When these cells act in vivo, they adhere to body tissues, but analogous cell lines tend not to reproduce this behaviour on cell culture dishes, typically poly(styrene) (PS) that has been surface-modified by gas plasma treatment. Thus, the extent to which monocyte cell lines can be used for in vitro studies is severely limited. One possible solution involves engineered surfaces that permit greater control of the cell environment, for example by directing cells to mimic their in vivo behaviour. In the case of monocytes, this can open the way to numerous important types of investigations [171, 179]. Many cell types, such as human U937 and THP-1 monocytes and human growth plate chondrocytes, do not adhere to hydrophobic pristine polymer surfaces like poly(styrene) (PS), poly(ethylene) (PE), poly(propylene) (PP), poly(ethylene terephthalate) (PET), poly(tetrafluoroethylene) (PTFE), etc, while these polymers' chemically-modified, hydrophilic surfaces do tend to facilitate cell adhesion. For example, « Primaria^{TM} », PS that comprises surface-near O- and N-containing functional groups, is widely used for cell-culture [2], its characterization by XPS was presented by Koenig *et al.* [180]. However, even that material,

currently considered among the best commercially-available ones, does not enable adhesion of these cells. In a previous study we demonstrated the adhesion of U937 cells to a new type of surface containing high nitrogen concentration, [N] [49]. As mentioned above, this non-adherent cell line is used in several biomedical research applications, and it can differentiate in response to a number of stimuli to adopt characteristics of mature macrophages. These secrete a number of cytokines, including TNF-α and IL-1β (see American Type Culture Collection specifications) and their adhesion to different substrates requires the concerted interaction of these cytokines with adhesion molecules such as ICAM-1 [181–183] and transcription factors such as PPAR-γ [181, 183].

There are numerous articles in the literature that report how specific chemical functional groups can influence surface-colonisation, differentiation, and phenotype expression by certain cell types [14–20]. As we and others have explained, thin film deposits that incorporate those functionalities have several important advantages over polymer surfaces to which they have merely been covalently grafted [10, 14, 15, 20, 49, 50]. In previous communications, we presented nitrogen (N)-rich thin film materials deposited by plasma- and by vacuum ultraviolet (VUV) photo-chemical techniques, as well as their surface-chemical characterisations and selected biotechnological applications [9–11, 49, 50]. These films, here designated « PVP:N » (for « Plasma- or VUV-Polymerised N-rich » materials), were specifically designed to contain high concentrations of N-bearing functionalities such as primary amines, and they have in many instances been shown to influence cell behaviour, for example, adhesion. In some of those earlier studies [49, 52] a particular sub-group of « PVP:N », namely N-rich atmospheric (« high », or « H »)-pressure plasma polymerised ethylene films, hereafter designated H-PPE:N, was shown to promote the adhesion of various cell types, including the U937 monocytes [49], to trigger targeted differentiation of adhering mesenchymal stem cells (MSCs) [52],

and to impede apoptosis of adhering vascular smooth muscle cells) [53]. However, the detailed mechanisms involved in such cell-surface interactions are very often still elusive. Regarding the possible role of PVP:N, we have already reported changes in gene expression profiles associated with the above-mentioned differentiation of MSCs on H-PPE:N surfaces [52, 184]. Nevertheless, the understanding of cell processes, as influenced by substrate-surface chemistry, must still be regarded as very rudimentary indeed. The present two-fold study aims to address precisely those questions, namely to gain insight into the mechanism(s) underlying the observed adhesion of U937 cells on N-rich surfaces. In an earlier article, we demonstrated the existence of a « critical » nitrogen concentration, $[N]_{crit}$, a sharply-defined [N] value at the H-PPE:N film surface, below which two different cell-types were found not to adhere at all : In the case of U937 monocytes, this value was found to be near 24%, while for growth plate chondrocytes, $[N]_{crit}$ was near 18% [49].Since growth plate chondrocytes are more difficult to obtain and since their phenotype is less homogeneous than that of U937 cells, we chose to further explore this observation only in the case of the U937 cells, which are readily available and present a very homogenous phenotype ; this is done here by measuring $[N]_{crit}$ values of several different PVP:N thin film materials. Those same materials have been subjected to careful chemical characterisation studies, described elsewhere [9–11, 49, 50]. On that basis, we sought to identify specific functional group(s) involved in the adhesion of U937 monocytes. The adhesion of circulating (non-adherent) monocytes to tissue at a site of infection or damage requires the concerted interaction of cytokines, adhesion molecules, and transcription factors [182]. However, the precise external signals that control their adhesion to tissues are unknown [185]. We therefore also explore the mechanisms implicated in this adhesion process by using RT-PCR techniques.

4.2 Materials and Methods

Several different PVP:N materials have been used in this study, and their deposition methods are briefly described in this section. In order to improve the fluency of the text, a series of acronyms are introduced that refer directly to the experimental conditions used to deposit each family of films; as explained further below, the gas flow ratio, the main parameter that was varied, was used to control the surface chemistry. More specifically, films that are deposited by vacuum ultraviolet photopolymerisation are symbolised by VUV-PY:N, those by low- and high-pressure plasma polymerisation, by L-PPY:N and H-PPY:N, respectively. The organic precursor (« monomer ») gas, « Y », was usually ethylene, E, but sometimes methane, M, or acetylene, A. Therefore, by way of example, VUV-PE:N refers to VUV photopolymerised ethylene; to simplify, the acronym PPE:N is occasionally also used to designate both low- and atmospheric-pressure plasma deposits derived from ethylene. PVP:N films were deposited on several types of substrates, as dictated by the particularities of the different deposition systems; these included 2 mm thick glass plates (for the chemical characterisation of H-PPY:N), single-crystal silicon (c-Si) wafers (for the characterisation of L-PPE:N and VUV-PY:N), and 50 μm thick biaxially-oriented isotactic poly(propylene) (BOPP, graciously provided by 3M Company).

4.2.1 Deposition of H-PPY:N Coatings

The dielectric barrier discharge (DBD) apparatus and methodology employed here were described and illustrated earlier by Girard-Lauriault *et al.* [49, 50]. Briefly, the apparatus used for depositing the H-PPY:N films (Figure 4.1a) comprised a grounded, planar aluminum (Al) electrode and a cylindrical, dielectric-coated stainless

steel high voltage (HV) electrode. The former could be moved at controlled speed under the latter electrode, to simulate continuous treatment conditions akin to those encountered in industrial equipment. A 2 mm thick glass plate was placed directly on the planar Al electrode and it served as a second dielectric layer, as also described in detail elsewhere [4, 49, 50]. The discharge zone was an adjustable 1 mm wide gap between the HV electrode and the glass plate; the precursor gas mixture was introduced there using a gas diffuser to ensure the requisite high gas purity. Gas flow rates (N_2 - 10 standard liters/minute, slm; ethylene, C_2H_4, or acetylene, C_2H_2 - 5 to 60 standard cm^3/minute, sccm) were adjusted by electronic mass flow controllers. To facilitate comparing the various PVP:N deposits, results are referenced with respect to the gas flow ratios, X ($\equiv N_2/C_xH_y$). The roughly 1 cm wide plasma zone was generated by electric power from a commercial power source and transformer (Enercon Industries, model LM2727-03, 450 kVA maximum output), at a typical frequency of 10 kHz and peak-to-peak voltage of 18 kV. After the carefully pre-cleaned substrate was introduced into the DBD system, the latter was purged with the precursor gas flow for approximately 10 min. The discharge was then initiated and monitored with a digital oscilloscope, the voltage and current being measured with the help of a resistive probe (Tektronix, model P6015A) and a 50 Ohm resistor, respectively. The substrate was made to move back and forth under the HV electrode at precisely controlled speed, 10 mm/s, for up to two dozen cycles, depending on the desired H-PPY:N film thickness.

4.2.2 Deposition of L-PPE:N Coatings

The L-PPE:N coatings were deposited in a cylindrical aluminium/steel vacuum chamber (Figure 4.1b), approximately 20 cm in diameter and 20 cm in height, which has been described before [9]. A turbo-molecular pump, backed by a two-stage rotary vane pump was used to evacuate the chamber to a base pressure

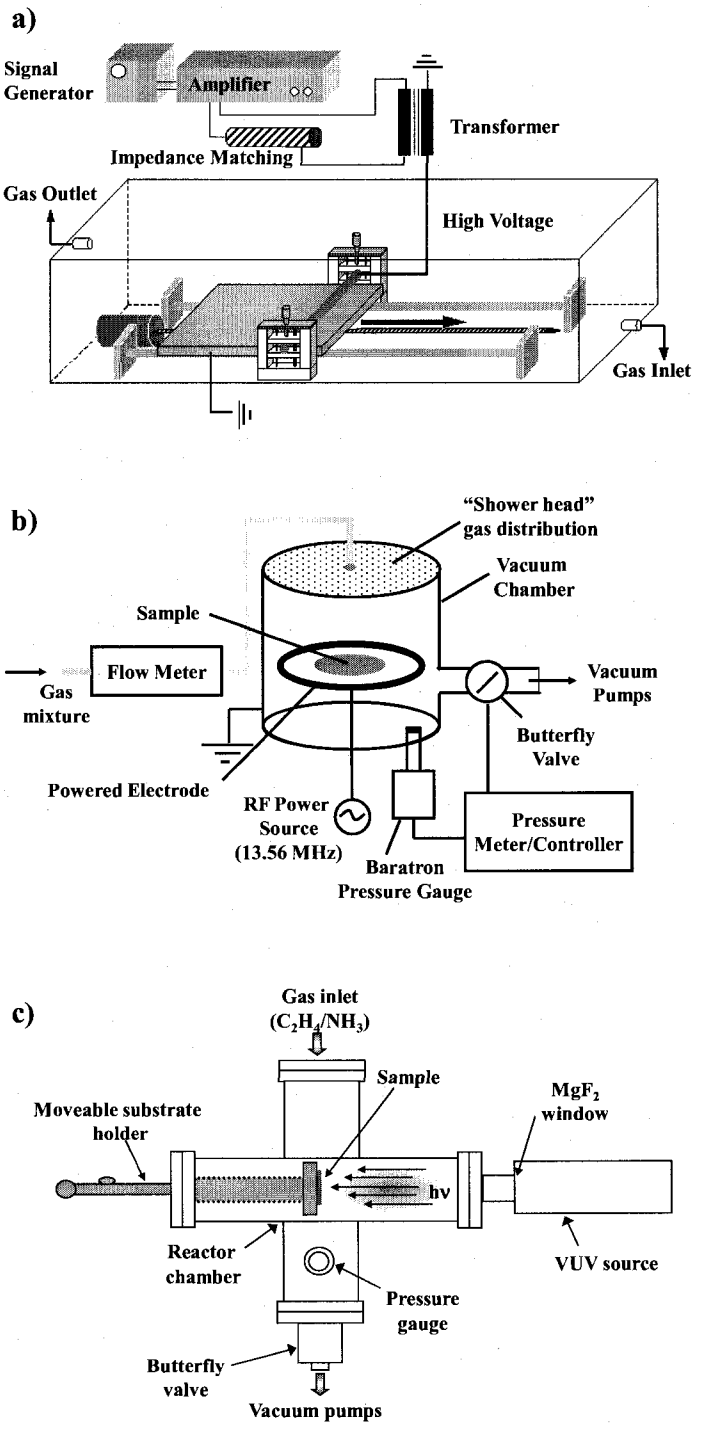


FIGURE 4.1 Schematic views of PVP:N deposition systems used : a) the dielectric barrier discharge (DBD) reactor system ; b) the low-pressure, capacitively-coupled RF reactor ; and, c) the vacuum ultra-violet (VUV) photo-chemical apparatus, used for depositing H-PPY:N, L-PPE:N, and VUV-PY:N thin film coatings, respectively. Compiled from [9–11]

of $< 10^6$ torr (10^{-4} Pa), as measured by a Pirani gauge. Flows of high-purity feed gases (ethylene 99.5% and ammonia 99.99%, Air Liquide, Canada) were then admitted into the chamber using electronic flow meter/controllers (Vacuum General Inc.), and a « shower head » gas distributor (10 cm in diameter). The flow rate of C_2H_4 « monomer » was kept constant at 20 sccm, while the gas flow ratio, R ($\equiv$ NH_3/C_2H_4), was systematically varied between 0 and 3 by varying the NH_3 flow rate between 0 and 60 sccm. The operating pressure, p, during plasma deposition was set and maintained constant at 600 mtorr (80 Pa) by a « butterfly » throttle valve, in combination with a capacitive pressure gauge (Baratron, MKS Instruments). The capacitively-coupled radiofrequency (RF, 13.56 MHz, ENI) plasma was generated with the help of an automatic impedance matching network (Advanced Energy), connected to the 10 cm diameter powered electrode in the center of the chamber, the walls acting as the grounded electrode. The distance between the bottom of the shower head and the RF-driven electrode was 15 cm. Based on our previous results [9], we chose to deposit L-PPE:N coatings using rather mild plasma conditions (P = 10 W, resulting in a negative DC bias voltage, VB =-40 V); under these conditions, polymer-like films with maximum nitrogen and amine concentrations were deposited [9].

4.2.3 Deposition of VUV-PY:N Coatings

The experimental set-up used for VUV photo-chemical experiments has also been described in detail elsewhere [7, 11, 12]. Briefly, it consists of a stainless steel « cross » chamber (Figure 4.1c), which was first evacuated to a base pressure of about 5 x 10-6 torr (7 x 10-4 Pa) using a combination of turbo-molecular and rotary vacuum pumps. In the present VUV photo-polymerisation studies, we irradiated flows of binary gas mixtures comprising either CH_4 or C_2H_4 and NH_3 at low pressure, typically 100 mtorr (13.3 Pa). The flow rate of CH_4 or C_2H_4 was

kept constant at 50 sccm, while that of NH_3 was varied between 0 and 50 sccm, yielding values of their ratio, R ($\equiv NH_3/C_xH_y$), between 0 and 1. For the case of chemical characterisation studies, the polymer-like coatings resulting from the photochemical reactions were deposited on Si wafers placed at a distance of 4.5 mm facing the VUV source. A non-coherent VUV source was used in this research, namely a commercial lamp (Resonance Ltd., Barrie, ON) based on an electrodeless, radio-frequency (RF, 100 MHz)-powered electrical discharge in Krypton (Kr) gas at low pressure. The gas was contained in a sealed Pyrex ampoule with a MgF_2 window (cut-off wavelength, λ_c=112 nm). This lamp has already been described in further detail elsewhere [7, 11, 12].

4.2.4 Chemical Characterisation

PVP:N films were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy, XPS, at most 5h after deposition using a VG ESCALAB 3MkII instrument, or in a Kratos Analytical AXIS Ultra XPS instrument, both with non-monochromatic Mg Kα radiation. The spectra were acquired normal to the sample surface, which corresponds to a sampling depth of roughly 10 nm ; binding energies were referenced to the aliphatic carbon 1s component at BE = 285.0 eV[22] to correct for charging. Throughout this article, we will be referring to the total relative concentrations of nitrogen, [N], in at.%, determined as a percentage of total nitrogen, oxygen, and carbon, which were calculated from equation (3.1) using broad-scan XPS spectra over the 0-1200 eV BE range, with a pass energy of 50 eV [9, 49, 50].

$$[N] = \frac{N}{N+O+C} \times 100\% \tag{3.1}$$

Core-level high-resolution spectra were analysed with Casa XPS software version

2.2.99, using a Shirley-type background and sensitivity factors from the Wagner (for the ESCALAB instrument) or Kratos tables. The relative surface concentrations of primary amines, $[NH_2]/[N]$ or simply $[NH_2]$ (which corresponds to the number of NH_2 groups per 100 atoms, based on XPS measurements), the species believed to be most responsible for cell adhesion [3, 14, 15, 26], were determined following chemical derivatisation with TFBA (see below), using the method described by Favia *et al.* [27] and the formulae we presented elsewhere [10]. Data acquired by XPS survey spectra of both the derivatised and non-derivatised samples were combined to calculate the above-mentioned quantities. The selective reaction of trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA; Alfa Aesar) vapours with primary amine ($-NH_2$) groups at the surface covalently links TFBA via an imine bond; this reaction was complete after 3h, as previously reported [10] along with other details of the particular methodology used.

4.2.5 Cell culture and real-time RT-PCR

In the case of all cell culture experiments, the PVP:N films were deposited on the same substrate material, a well characterised BOPP containing a minimal amount of additives and used in many previous studies in our laboratory [3, 4, 9–12, 49, 50, 52, 53, 184], in the form of uniform, ~100 nm thick deposits. Non-adherent human U937 monocytes (ATCC, Rockville, MD) were expanded in suspension in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. Cells were counted with a hemacytometer. For experiments aimed at determining $[N]_{crit}$, 100 μl volumes of cell suspension (5 x 10^5 cells) were carefully pipetted onto 1 cm^2 PVP:N surfaces of varying [N] values, which had previously been placed face-up on the flat bottoms of wells in a 24-well cell-culture plate. All of the surfaces were free of endotoxins, as shown by the Limulus Amebo-

cyte Lysate assay (Charles River Endosafe, Charleston, SC). Cells were then left in contact with the substrate surfaces in humidified air enriched with 5% CO_2 at 37°C for 1h before careful removal of the medium. We previously demonstrated that the maximal adhesion of U937 cells to PPE:N surfaces was reached within 1h [49]. Non-adherent cells were then removed rapidly to avoid their interaction with adherent ones that might modify cell-surface interactions and gene expression.Following this, fresh medium was pipetted into the wells (1 ml in each well), and again carefully removed to wash the cells. This washing procedure was repeated twice. Finally, optical photomicrographs of the surfaces were taken and $[N]_{crit}$ was determined from the lowest examined [N] value that permitted cell adhesion. All of the adhesion experiments were performed at the same time with the same cell suspension, to avoid variations due to the cells. In the case of real-time RT-PCR experiments, cells were incubated for durations ranging from 3 to 24h on PPE:N coated BOPP, that is, both « H- » and « L- », deposits that had similar values of $[NH_2]$ (= « $[NH_2]_{crit}$ », see further below), following which the total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON). Again, all of the RT-PCR experiments were performed at the same time with the same cell suspension, to avoid variations due to the cells. After centrifugation for 15 min at 12,000 x g at 4°C, the aqueous phase was precipitated in 1 volume of isopropanol, incubated for 45 min at room temperature, and centrifuged again for 15 min at 12,000 x g at 4°C. The resulting RNA pellet was washed with 75% ethanol, centrifuged, and air-dried. The pellets were suspended in 50 μl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and assayed for RNA concentration and purity by measuring $A260/A280$. The reverse transcription (RT) reaction was performed using 1 μg total RNA after DNase I digestion according to the Invitrogen protocol. In a total volume of 20 μl, the reaction solution contained 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 50 μM each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and 200 units of Superscript II - RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen). The expressions of tu-

mour necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1-β (IL-1β), peroxisome proliferators-activated receptor-γ (PPARγ), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and transcription factors Erg-1 and PU.1 were measured using a Roche Diagnostics (Laval, QC) LightCycler^{TM}, as described below. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as housekeeping gene. U937 cells in suspension served as a control. Salt-free primers for the target genes (TNF-α, IL-1β, PPARγ, ICAM-I, Egr-1, PU.1) and for the GAPDH housekeeping gene were generated by Invitrogen. Their sequences are presented in Table 4.1. For LightCycler^{TM} reaction, a master mix of the following reaction components was prepared to the indicated end-concentration : 13.4 μl water, 1.6 μl $MgCl_2$ (3 mM), 0.5 μl forward primer (0.25 μM), 0.5 μl reverse primer (0.25 μM) and 2.0 μl LightCyler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics). To these 18 μl quantities of master mix, 2 μl cDNA was added as PCR template. As negative control, the master mix was incubated with 2 μl of distilled water instead of cDNA. The following experimental-run protocols were used : denaturation (95°C for 10 min), 40 cycles of amplification and quantification (95°C for 10 sec, 58°C for 5 sec, 72°C for 13 sec, and 87°C for 1 sec, with a single fluorescence measurement), melting curve (65-95°C with a heating rate of 0.1°C per sec and a continuous fluorescence measurement), and finally cooling to 40°C.

The crossing points (CP) were determined by the LightCycler software 3.3 (Roche Diagnostics) and were measured at a constant fluorescence level [186]. Every sample was run in triplicate. The relative quantification of real-time PCR was determined by the following equation :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}\ \text{control}-\text{sample}}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}\ \text{control}-\text{sample}}} \tag{4.1}$$

Where E_{target} and E_{ref} are the real-time PCR efficiencies of the target and reference

TABLEAU 4.1 Primer sequences and sizes of PCR products for LightCycler™ experiments

Gene	Primer Sequence	Size(bp)
TNF-α	Forward : ACC ACG CTC TTC TGC CTG CTG (133-153) Reverse : TAC AAC ATG GGC TAC AGG CTT (259-279)	147
IL-1β	Forward : ACC TAT CTT CTT CGA CAC ATG (303-323) Reverse : ACC ACT TGT TGC TCC ATA TCC (450-470)	168
PPARγ	Forward : ATC TGA AGA GTT CCT GCA AGA (69-89) Reverse : TGG TGA AAG CGT GTC CGT GAT (202-222)	154
ICAM-I	Forward : ACG GTG CTG GTG AGG AGA GAT (514-534) Reverse : AGT CGC TGG CAG GAC AAAGGT (631-651)	138
Egr-1	Forward : ACA GTG GCA ACA CCT TGT GGC (431-451) Reverse : AAG GTG GGT GCC GCT GAG TAT (606-626)	196
PU.1	Forward : TCA GAA GAC CTG GTG CCC TAT (41-61) Reverse : AGC TCC GTG AAG TTG TTC TCG (180-200)	160
GAPDH	Forward : TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT (11-31) Reverse : TTC TCA GCC TTG ACG GTG CCA (171-191)	181

genes' transcripts, respectively; both E_{target} and E_{ref} have numerical values close to 2 [186]. After real-time PCR, the samples were collected by centrifugation and the gene sizes were analysed on 2.0% agarose gel.

Statistical significance was calculated using ANOVA followed by Fisher's PLSD comparison test. $P < 0.05$ was considered significant.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Chemical Characteristics of the Films

The chemical characterisations of all PVP:N films have been the subjects of previous articles, each one dedicated to a specific family of the PVP:N materials [9–11, 49, 50]. Each set of coatings, although they were prepared by comparable (gas-phase) processes and had several properties in common, nevertheless possessed

distinct chemical characteristics. Characterisation of the H-PPY:N families of films was the most exhaustive, comprising innovative combinations of complementary methods for (semi)-quantitatively analysing the diverse functional groups present, namely amines, nitriles, isonitriles, imines and alkenyls [50]. Hereunder, we compare the chemistries of three types of coating families, those prepared by high- and low-pressure plasma polymerisation, and those from vacuum-ultraviolet photopolymerisation. As already mentioned, we have used XPS as our benchmark characterisation technique, and Fig. 4.2 presents [N] for the cases of H-PPE:N, H-PPA:N, L-PPE:N, VUV-PE:N and VUV-PM:N coatings. Since H-PPY:N films were deposited using N_2 gas at atmospheric pressure, the corresponding gas mixture ratios, X, are presented on a different scale than R values of the other families of materials, where NH_3 was the N-bearing precursor gas. Films corresponding to still higher values of X or R than those shown in Fig.4.2 were not suitable, either because the deposition rates were too low, or because the films were soluble in water ; the latter was also found to apply to L-PPE:N with [N] $>$ 25%. From Fig.4.2 we note that with increasing values of X or R, H-PPY:N and L-PPE:N films contained between 17% and ~40% [N], and between 0 and 40% [N], respectively. Regarding VUV-polymerised coatings, we noted [N] values between 0% and 12% for VUV-PE:N, and between 0% and 17% for the VUV-PM:N films. However, since [N] does not provide information about the concentrations of particular functional groups, the presumed mediators of cell-surface interactions, it represents a poor indicator of the films' bioactive properties. For this reason, we next focused our attention on specific N-containing functionalities, particularly on primary amines, $-NH_2$, which have already captured the attention of other workers [3, 14, 15, 20, 26].

Figure 3 presents the « amine-selectivities » (Fig. 4.3a) and the amine concentrations, $[NH_2]$, based on 100 atoms measured by chemical derivatisation combined with XPS (Fig. 4.3b) for all of the PVP:N film families presented in Fig. 4.2.

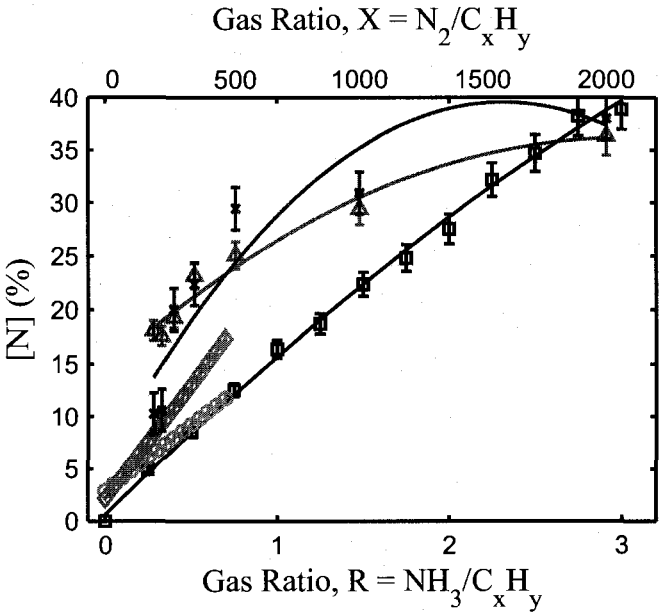


FIGURE 4.2 Concentrations of chemically-bonded nitrogen, [N], in at.-%, as determined by XPS. Results are presented versus gas flow ratios, X, for H-PPE:N ($\triangle$) and H-PPAN(x); or R, for L-PPE :N ($\square$), VUV-PE:N ($\circ$), and VUV-PM:N ($\diamond$). Solid curves serve to guide the eye. Compiled from [9, 11, 50]

Some have expressed concern that these measured values do not truly represent the real concentration of these groups at the outermost surface, the one sensed by the cells. This concern is due to the impossibility to specifically analyse the surface-monolayer by XPS, and to the fact that the derivatisation reaction may not be truly quantitative within the entire depth of analysis. However, these issues are systematic among all of the films and they therefore do not compromise a valid comparative analysis of the type we present here. Clearly, the VUV polymerisation route leads to the highest selectivity values, up to 75%, as we had already reported earlier [11]. The presumed reason is that the mono-energetic VUV photons give rise to far more selective (photo-initiated) chemical reaction pathways than those encountered in the cases of the two (high- and low-pressure) plasma-chemical polymerisation processes. In the latter two cases, reactions leading to « polymerisation » are, of course, due to bond-breakage by « hot » electrons ; the latter, far from being « mono-energetic », have « Maxwell-Boltzmann-like » energy distributions that can span several orders of magnitude [62]. In spite of this, the (L-PPE:N) films prepared by low-pressure plasma polymerisation also manifest quite high selectivity values, up to ~32%, while their atmospheric-pressure counterparts' best values, ~19 %, were rather mediocre in this regard.

Although the selectivity parameter, $[NH_2]/[N]$, is of interest when discussing (polymerisation) reaction chemistries, as we have just done above, the overall amine concentrations at the coatings' surfaces, $[NH_2]$, constitute a much more relevant parameter when considering cell-responses, as we shall demonstrate in the next sub-section. Referring to Fig.4.3b, we note that $[NH_2]$ values range from a maximum of 13% (for VUV-PM:N) to ~2% for H-PPA:N, while maximum values for L- and H-PPE:N are seen to be near 9% and 4%, respectively.

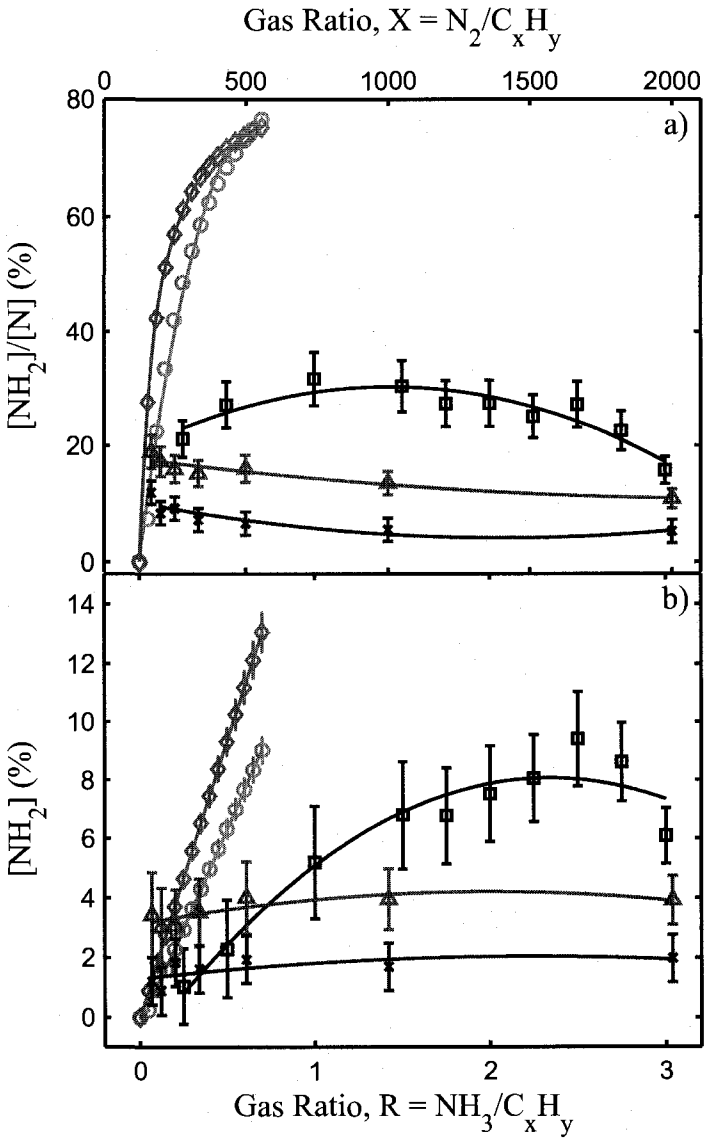


FIGURE 4.3 Contributions of primary amines to the total nitrogen content, $[NH_2]/[N]$ (in %), the so-called « amine selectivity », a) ; the total amine content per 100 atoms measured by XPS, $[NH_2]$ (in %) (b). Results are based on XPS analyses (including chemical derivatisation), and are presented as functions of the gas flow ratios : X, for H-PPE:N ($\triangle$) and H-PPAN(x) ; or R, for L-PPE :N ($\square$), VUV-PE:N ($\circ$), and VUV-PM:N ($\diamond$). Solid curves serve to guide the eye. Compiled from [9, 11, 50]

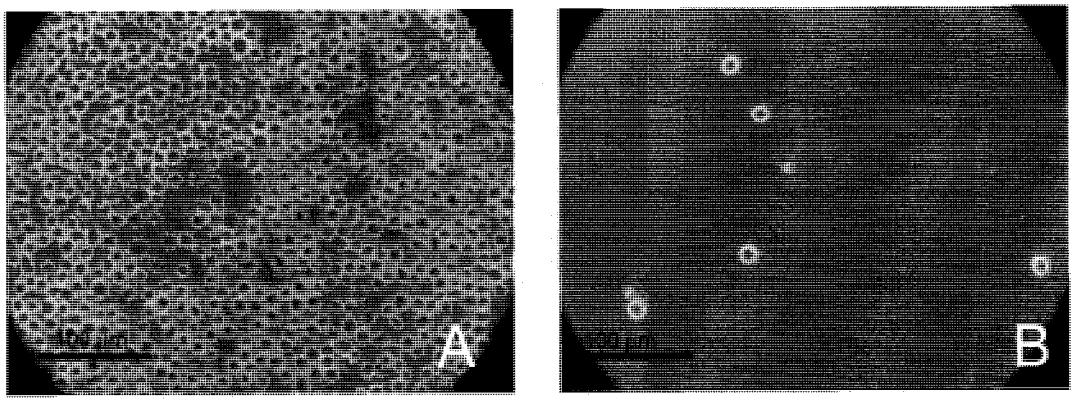


FIGURE 4.4 Optical micrographs demonstrating the effect of $[N]_{crit}$ on the adhesion of U937 monocyte cells. Results pertain to cells cultured for 1h on H-PPE:N coatings containing : A) 25 % [N], and B) 23% [N].

4.3.2 Critical Adhesion Conditions

As mentioned in the Introduction, we have already demonstrated and reported the existence of a « critical » nitrogen concentration, $[N]_{crit}$, a sharply-defined [N] value at H-PPE:N film surfaces, below which two different cell types were found not to adhere at all. In the case of U937 monocytes, the only cell type of interest in the present context, this value was found to be near 24% [49]. For all values of [N] $>$ $[N]_{crit}$, U937 cells did adhere to the coatings; Fig.4.4 presents a typical set of photomicrographs that illustrate this, where (A) and (B) correspond to [N] = 25% and 23%, respectively.

Now, having deposited and chemically characterised not only H-PPE:N, but several families of PVP:N coatings, similar adhesion experiments of U937 cells have been carried out, and the results are presented in Fig.4.5. The five different PVP:N materials examined (with the exception of H-PPA:N, a special case that will be discussed separately, further below) also exhibited sharply-defined values of $[N]_{crit}$, just like H-PPE:N. However, the exact « critical » values varied among the different PVP:N materials, ranging from 24% for H-PPE:N to 7.5% for VUV-PE:N. Due to

the chemical derivatisation experiments described earlier in this text and illustrated in Fig.4.3, we can determine the corresponding values of « $[NH_2]_{crit}$ », and these are also shown plotted in Fig.4.5. Very strikingly, we note that these values of the « critical » primary amine concentrations are the same for all materials, $[NH_2]_{crit}$ = 4.2 ± 0.5%. The key inference to emerge from Fig.4.5 is that primary amine groups play a dominant role in the mechanism of U937 adhesion to N-rich organic surfaces. This statement receives further convincing support from the observation, also illustrated on Fig.4.5, that H-PPA:N (that can have [N] up to ~40%, see Fig.4.2) has $[NH_2]$ values that never exceed 2% (see Fig.4.3b); in other words, these are always below $[NH_2]_{crit}$. Therefore, this material is inherently incapable of inducing the adhesion of U937 monocytes. These results strongly support the view that $[NH_2]$, rather than simply [N], which is general and does not consider the distribution of functional groups, should be considered in film design for such bio-applications.

4.3.3 RT-PCR studies

In this second aspect of the present research, quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) experiments were conducted using U937 cells that had been made to adhere on PPE:N materials for up to 24h. The purpose, of course, has been to provide insight into the mechanism(s) of adhesion. In the following subsections, we examine the responses of various genes that are known to play important roles in the cell biology of monocytes and macrophages. It is important to note that mRNA expression does not always correlate to.protein expression. However, the expression of TNF-α and IL-1β [187], as well as PPAR-γ [188], ICAM-1 [189, 190], and Egr-1 [191] is primarily regulated at the level of transcription, and their mRNA expression therefore represents a good indicator of their protein expression.

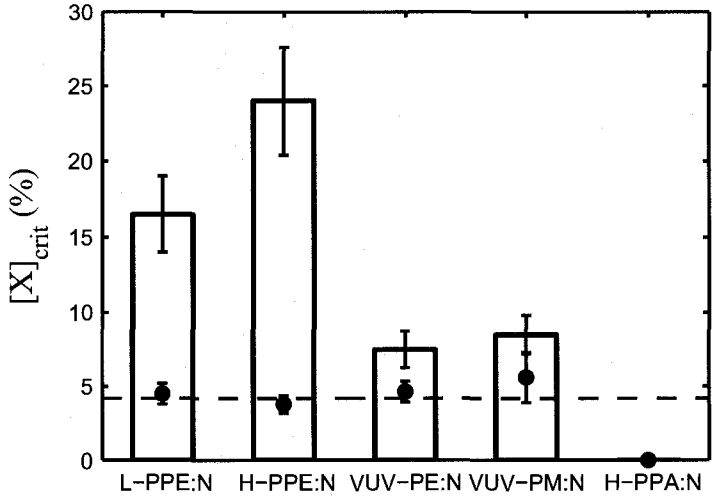


FIGURE 4.5 Quantification of $[N]_{crit}$ in the adhesion experiments involving U937 cells. The « critical » nitrogen content, $[N]_{crit}$, required to stimulate adhesion of U937 monocytes to various PVP:N substrates, namely : L-PPE:N, H-PPE:N, VUV-PE:N, VUV-PM:N and H-PPA:N, are shown in histogram-form. For each one of the PVP :N materials, the corresponding critical amino-group content ,$[NH_2]_{crit}$ (•), is superimposed. The average value of $[NH_2]_{crit}$ is presented as a dashed, horizontal line. In the case of H-PPA:N, no adhesion of U937 was observed under any circumstances, in spite of high [N] values, see Fig.4.2.

4.3.3.1 Expression of cytokine related genes

Since cytokines play a central role in the macrophage host defence [192], we first investigated the effect of U937 monocyte attachment to PPE:N surfaces on the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-1 beta (IL-1β), two cytokines secreted as part of immediate early response genes of these cells. The results of these RT-PCR experiments are presented in Fig. 4.6, and they show a rapid (3h) but transient stimulatory effect of the amine-rich surfaces on the expression of these genes, attaining 10-15 times and 7-9 times the control values for TNF-α and IL-1β, respectively. However, the return to control values within 24h suggests that major inflammatory reactions were thereby not induced, contrary to what was observed for corrosion products of orthopaedic implants that induced the expression of TNF-α in U937 cells for at least 24h under similar in vitro conditions [179]. However, further long-term adhesion studies are required to prove beyond doubt the low inflammatory reaction of these surfaces toward U937 cells.

4.3.3.2 Expression of PPAR-γ and ICAM-I

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) are known to be implicated in monocyte recruitment and retention [193, 194]. In view of the cytokine stimulatory results, where TNF-α and IL-1β, definitive markers of monocyte activation [195, 196] were transiently activated, and with the understanding that ICAM-1 and PPARγ can be readily induced in various cell types by TNF-α and IL-1β, we next measured the expression of these two genes after adhesion of U937 cells on amine-rich H- and L-PPE:N films. Of special interest here was that the expression of PPARγ increased nearly two-fold within the first 3h after adhesion (Fig.4.7). However, contrary to what was observed

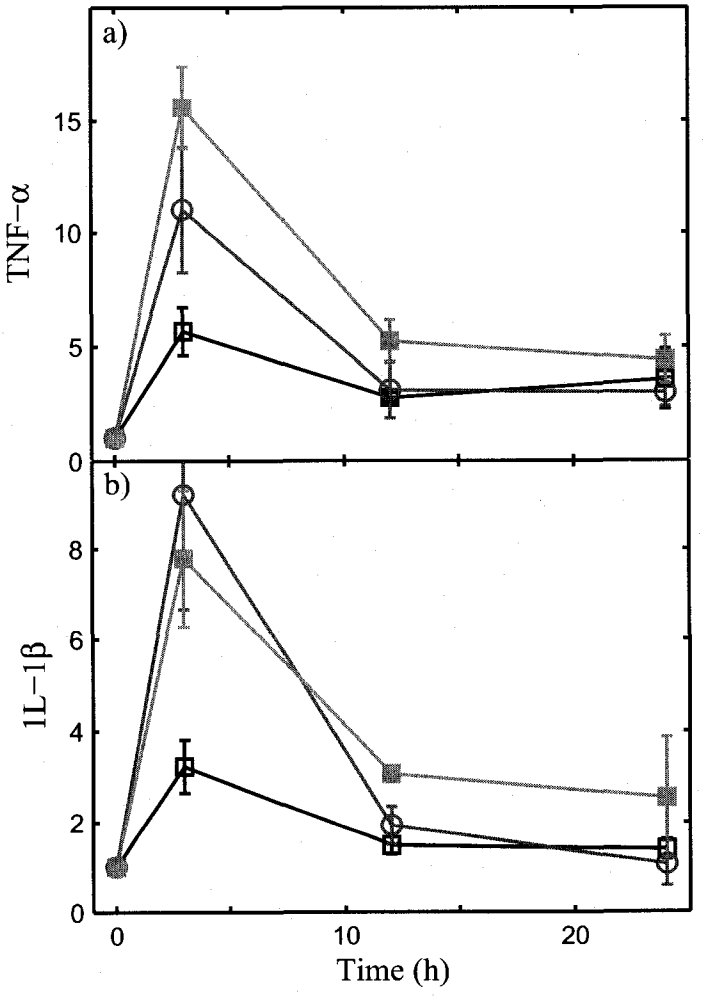


FIGURE 4.6 Expression of cytokines, as calculated from eq. 2, in U937 monocytes : U937 cells were cultured for up to 24 hours in suspension (□), and adhering on H-PPE :N (○) and L-PPE:N (■) surfaces with $[NH_2] = [NH_2]_{crit}$. Results shown are the mean values + standard error of three experiments. * $p < 0.05$ vs. suspension control.

for TNF-α and IL-1β, the stimulation of PPARγ was more sustained throughout the incubation period, with a stimulation ratio close to 1.6 times the control value after 24h. Since PPARγ was previously reported to oppose the pro-inflammatory response of monocytes/macrophages [197], it seems possible that PPARγ may attenuate the production of TNF-α and IL-1β during monocyte adhesion to amine-rich H- and L-PPE:N films. However, this remains to be further investigated. Results in Fig.4.7 also show that the expression of ICAM-I exceeded the control values by a factor of two after 3h of adhering the U937 cells, followed by a gradual return to control level after 24h. Since increased expression of ICAM-I has also been reported after exposing macrophages to silica surfaces [198], the transient increase of ICAM-I expression suggests that it is implicated in the promotion, but not necessarily in the maintenance of U937 adherence to the amine-rich organic surfaces.

4.3.3.3 Expression of Transcription Factors PU.1 and Egr-1

Since the activation of cellular function is under the control of transcription factors such as PU.1, which is required for normal differentiation to macrophages [199], or early growth response-1 (Egr-1) that is known to be induced during the differentiation of macrophages [200] we also wished to examine their effect on monocyte adhesion to amine-rich organic surfaces. Results presented in Fig.4.8 show that the expression of PU.1 was not significantly modified by the adhesion of U937 cells to amine-rich H- and L-PPE:N surfaces; however, the expression of Egr-1 increased rapidly, reaching a level 2.5 times higher than the initial one after 3h. Interestingly, the expression of the latter again decreased to control levels during the same 24h period.

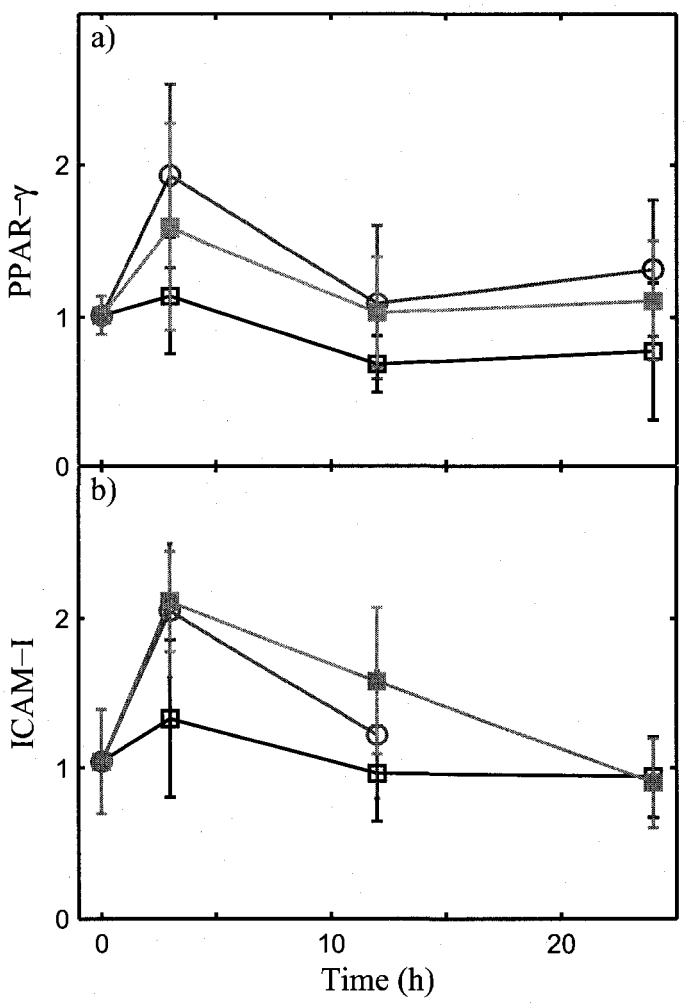


FIGURE 4.7 Expression of PPARγ and ICAM-I, as calculated from eq. 2, in U937 monocytes : U937 cells were cultured for up to 24 hours in suspension (□), and adhering on H-PPE :N (○) and L-PPE:N (■) surfaces with $[NH_2] = [NH_2]_{crit}$. Results shown are the mean values + standard error of three experiments. * $p < 0.05$ vs. suspension control.

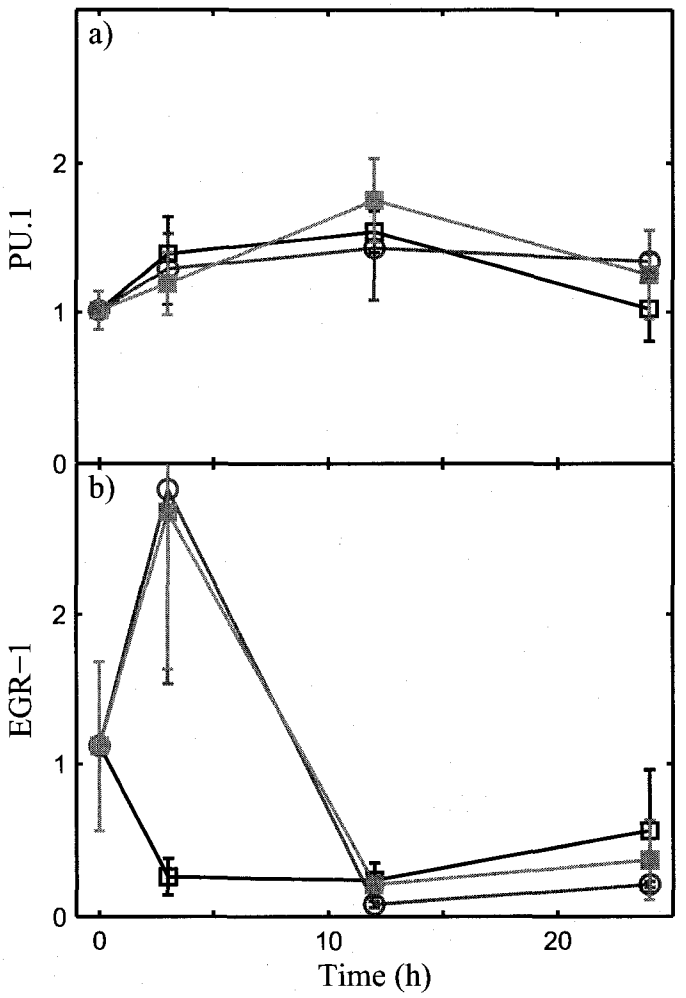


FIGURE 4.8 Expression of PU.1 and Egr-1, as calculated from eq. 2, in U937 monocytes : U937 cells were cultured for up to 24 hours in suspension (□), and adhering on H-PPE :N (○) and L-PPE:N (■) surfaces with $[NH_2] = [NH_2]_{crit}$. Results shown are the mean values + standard error of three experiments. * $p < 0.05$ vs. suspension control.

4.4 General Discussion and Conclusions

Numerous articles and reviews in the literature have demonstrated the great interest in nitrogen-, particularly in amine-group (-NH_2) containing organic surfaces for bio-technological applications, for example in cell-colonisation and the adhesion of bio-molecules [3, 14–20, 26]. In the present article, we have presented a wide array of novel N- and NH_2-rich organic thin film materials that were deposited at atmospheric- or low- pressure using well-defined, reproducible plasma- and VUV-photochemical polymerisation techniques. Each family of deposits has been shown to possess its own specific set of chemical characteristics, which can be « tailored » by varying deposition conditions described here, but in more detail in our preceding articles [9–11, 49, 50]. Most important, in the present context, the chemical reaction selectivity for primary amines has been found to differ considerably among the various families of PVP:N coatings, which has made it possible to prepare materials with surface concentrations, [NH_2], ranging from 0.9 to 13% (see Fig.4.3b). We had already discovered the existence of a « critical » nitrogen concentration for U937 monocytes cell adhesion to PVP:N surfaces, $[N]_{crit}$, but have now found that the value of $[N]_{crit}$ varied widely among the different PVP:N materials examined, from a maximum of 24 at.-% to a minimum of 7.5 at.-% (see Fig.4.5). The ability to distinguish among the numerous functionalities that contribute to [N], particularly the primary amine groups via the use of chemical derivatisation, has now allowed us to identify the key common feature among those various PVP:N coatings, namely the fact that in all cases $[N]_{crit}$ corresponded to a constant value of $[NH_2]_{crit}$, 4.2 $\pm$ 0.5 (per 100 atoms measured by XPS, see Fig.4.5). Therefore, at least for the case of U937 monocytes, this confirms the critical role of the primary amine group in cell-surface interactions, something that has so far been a topic of much uncertainty and debate in the literature [14, 15, 20]. Further studies are necessary to investigate this critical role of primary amine groups for the adhesion of other

non-adherent cells. The present data also indicate that the adhesion of U937 monocytes to PPE:N surfaces with $[NH_2] = [NH_2]_{crit}$ induced a transient expression of TNF-α and IL-1β, two cytokines secreted as part of immediate early response genes of these cells, suggesting that major inflammatory reactions were not induced (Fig.4.6). In contrast, PPARγ, implicated in the adhesion and retention of monocytes, had a more sustained expression (Fig.4.7). It was reported that PPARγ can be induced in various cell types by TNF-α and IL-1 [195, 196]. This suggests that the transient expression of TNF-α and IL-1 may induce monocyte cell adhesion via the activation of PPARγ, although this was not investigated directly in the present study. The data also indicate that the expression of PU.1, one of the master transcription factors identified to regulate development of monocytes/macrophages, was not significantly modified by the adhesion of U937 monocytes to PPE:N surfaces. In contrast, Egr-1 expression was observed to increase transiently in a manner similar to TNF-α and IL-1. Other work has demonstrated coordinated expression of these transcription factors in hematopoietic stem cells. It was reported that increased PU.1 levels promote macrophage differentiation by modulating Egr-1 [201, 202]. These results suggest that adhesion molecules such as ICAM-I and transcription factors such as Egr-1 deserve more attention in future studies on the activation of monocytes/macrophages.

4.5 Acknowledgements

This work is being supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to PD and MRW, and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the AO Foundation to FM and JA. PLGL is grateful for a post-graduate scholarship from the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Discussion générale et conclusions

Les objectifs de cette thèse sont multiples et touchent à plusieurs domaines de la science des surfaces, des plasmas, des couches minces et des biotechnologies. Le pilier central de ces recherches est le développement de nouvelles couches minces aux propriétés uniques, dites « PP:N », déposées à l'aide d'une technologie novatrice et prometteuse, soit celle des décharges à barrière diélectrique à pression atmosphérique. Ce matériau de structure chimique complexe a, dans un premier temps, servi de sujet à une étude de caractérisation élaborée, étude orientée vers la détermination des groupements fonctionnels chimiques, médiateurs proposés des interactions entre une surface et des cellules vivantes. Cette caractérisation chimique est essentielle à la compréhension des résultats obtenus dans le deuxième volet qui consiste à appliquer de ces nouveaux matériaux aux biotechnologies. Parallèlement, nous avons participé à la publication de plusieurs études où nous rapportions l'influence que peut avoir le PP:N sur l'adhésion de cellules et sur leurs processus cellulaires (prolifération, migration, apoptose, expression génétique). Cependant, ces travaux nous ont donné peu d'indices sur les mécanismes dirigeant ces processus. Donc, dans la dernière partie de cette thèse, nous avons étudié l'influence de groupements fonctionnels spécifiques, principalement les amines primaires, sur l'adhésion et l'expression génétique de cellules monocytes U937.

Les surfaces contenant des groupements fonctionnels azotés ont déjà démontré leur potentiel à influencer les processus cellulaires, permettant ainsi d'envisager leur application en biotechnologie [14, 15]. Dans cette thèse, nous avons choisi d'étudier les dépôts de couches minces organiques par plasma à pression atmosphérique pour atteindre cet objectif. Tel que détaillé à la section 1.2.2, ce choix est motivé par les

avantages potentiels combinés des dépôts organiques (incorporation élevée d'azote, stabilité accrue, faiblement dépendant de la nature du substrat) et des techniques de dépôt à pression atmosphérique (élimination des systèmes à vide, installation aisée dans une ligne de production, utilisation de l'azote comme gaz principal peu coûteux et sans danger).

Nous avons présenté le dépôt de polymères plasma appartenant à trois différentes familles, à partir d'un mélange d'azote (gaz plasmagène) et de l'un de trois précurseurs hydrocarbures, soit le méthane, l'éthylène et l'acéthylène, à l'aide d'un système de dépôt DBD conçu dans nos laboratoires. Ces polymères plasma ont pu être préparés avec des valeurs de [N] élevés, pouvant varier entre 10% et 40% selon le ratio, N_2/C_xH_y, des gaz précurseurs dans la décharge. Cette versatilité dans la composition chimique du matériau est évidemment obtenue grâce à l'utilisation de sources séparées d'azote et de carbone, ce qui distingue la présente recherche de la majorité de la littérature antérieure, qui présentait plutôt l'utilisation de « monomères » précurseurs ayant une structure chimique désirée, mais souvent toxiques et/ou coûteux.

Notre étude étant surtout orientée vers la chimie de surface, la cinétique de dépôt ainsi que la topographie de surface ont été déterminées au début et maintenues constantes durant le projet. Des taux de dépôt élevés, entre 2 nm/s et 9 nm/s, ont été mesurés par profilométrie et confirmés par ellipsométrie ; ces valeurs sont comparables aux plus hauts taux de dépôt pour des polymères plasma rapportés dans la littérature [60]. La rugosité de surface a été mesurée par AFM et vaut environ 10 nm (sur une couche de 100 nm), valeur faible et constante qui ne devrait pas interférer avec les processus cellulaires (l'on sait que la rugosité, elle-même, peut avoir une forte influence dans certains cas [156, 158]).

Nous avons utilisé la technique XPS, comme principale méthode de caractérisation

chimique dans ce projet et avons aussi pu obtenir les concentrations relatives de carbone, d'oxygène et d'azote à la surface ; ceci nous a permis d'optimiser sommairement notre procédé en fonction de l'objectif de maximiser la concentration de fonctions azotées en surface. Pour tous les PP:N, il a été démontré que la valeur de [N] augmentait avec la diminution de la proportion de l'hydrocarbure (C_xH_y) dans le mélange gazeux précurseur, N_2-C_xH_y. Nous avons montré que la partie de [N] comprenant des groupements polaires est liée à l'augmentation de l'énergie de surface, celle-ci passant de 27 mN/m pour [N] = 17% à 58 mN/m pour [N] = 30%.

Évidemment, la technique XPS ne permet pas d'obtenir la concentration d'hydrogène, [H], parce que la section efficace dans les rayons X est trop faible. La concentration de cet élément permet, cependant, d'obtenir d'essentielles informations sur la structure. Nous avons utilisé l'analyse élémentaire (AE) pour déterminer la composition chimique *complète* des PP:N. Les résultats obtenus, en accord avec ceux obtenus par XPS, ont démontré un lien étroit entre la formule chimique du « monomère » et celle du polymère plasma correspondant, par exemple, une parfaite conservation du ratio [H]/[C]=1 pour les couches déposées à partir d'acétylène. De plus, ces expériences ont permis de calculer le degré d'insaturation, un important indice structurel qui mesure le nombre combiné de liaisons π et de cycles fermés dans les structures des PP:N. Encore une fois, un lien direct a été constaté entre la structure du « monomère » et celle du polymère plasma.

Il est rapidement devenu clair qu'une compréhension adéquate des interactions entre nos nouveaux matériaux et le vivant devait être précédée d'une bonne connaissance de la chimie de surface, en particulier des concentration des divers groupement fonctionnels. Plusieurs auteurs ont utilisé l'XPS à haute résolution pour tenter d'accéder à cette information. Cependant, nos polymères plasma, contenant une valeur de [N] élevée (ainsi qu'une certaine concentration d'oxygène), ne s'y prêtent pas bien. En effet, bien que cette technique nous permette d'obtenir une idée de

la distribution des espèces azotées et oxydées dans la structure des PP:N, une analyse précise (quantitative ou même qualitative) des groupements fonctionnels s'est avérée impossible dûe à une trop large distribution de ces groupements. Nous avons donc combiné diverses technique d'analyse complémentaires, certaines bien connues dans la littérature, comme la dérivation chimique, et d'autres que nous avons adaptés à notre contexte, soit le FTIR et NEXAFS, dans l'objectif de faire l'analyse (semi)-quantitative de groupements présents dans les PP:N.

La dérivation chimique à l'aide du TFBA, suivie de la mesure du fluor lié en surface par XPS, a permis l'analyse quantitative des amines primaires, $[NH_2]$. La sélectivité, $[NH_2]/[N]$, s'est révélée être entre 5% et 20% dans l'ensemble des PP:N, alors que sa concentration totale, $[NH_2]$, s'est trouvée entre 1% et 8,5%. Nous avons, par la suite, tenté de développer une méthode semblable pour effectuer l'analyse quantitative des nitriles et des isonitriles par spectroscopie infrarouge, mais ces experiences ont surestimé leurs concentrations ; ceci a été attribué à une différence significative entre leurs coefficients d'absorption IR dans les matériaux polymères standards et ceux dans leurs contreparties déposées par plasma. Malgré cela, nous avons pu réaliser des analyses semi-quantitatives fiables de ces deux groupements dans les PP:N, ce qui a été corroboré par les mesures NEXAFS : pour le cas des nitriles, ceux-ci se superposent parfaitement aux mesures IR, permettant ainsi une auto-validation des deux méthodes. Sans pouvoir donner de concentrations précises, nous pouvons cependant affirmer que les nitriles et isonitriles comptent pour une fraction importante de [N] dans les PP:N. Les mesure NEXAFS ont aussi permis d'analyser (semi)-quantitativement les imines et les alkényles. Ces analyses semi-quantitatives nous donnent un bon indice de la distribution des groupements chimiques dans les PP:N, mais il n'est pas possible d'exclure la formation d'autres espèces azotées comme les amines d'ordres supérieurs, les amides et les azides. Cependant, le groupement le plus pertinent pour notre étude est l'amine primaire,

qui est vue comme le principal responsable des propriétés bioactives de ce type de matériau à cause de sa réactivité avec les biomolécules et de sa capacité à former l'ion ammonium chargé positivement.

L' instabilité temporelle, dite « vieillissement », des matériaux préparés par plasma (par l'entremise de processus radicalaires) est un problème bien documenté. Les polymères plasma y sont moins susceptibles que les surfaces modifiées par plasma où les « reptations » de chaînes et les espèces de faible poids moléculaire oxydées (LMWOM) en surface ont de fortes influences. Pour cette raison, les concentrations des divers éléments, mesurées par XPS, varient peu avec le temps dans le cas des PP:N. Cependant, il a été démontré que $[NH_2]$ diminuait dans les premières 24h d'exposition d'un PP:N à l'air, pour atteindre un plateau à environ 50% de sa valeur initiale dans les meilleurs cas. Un autre aspect important pour les applications biotechnologiques est la stabilité vis à vis de l'eau et à d'autres solvants. Malheuresement, certaines des couches qui présentent les valeurs de $[NH_2]$ les plus élevées, par exemple celles préparées à partir de méthane, se sont avérées solubles dans l'eau et dans plusieurs solvants organiques, ce qui les rendait inutilisables pour la culture cellulaire. Par contre, d'autres couches (insolubles et contenant des valeurs de $[NH_2]$ adéquates peuvent, quant à elles, être envisagées pour les applications biotechnologiques, prochain sujet de cette discussion.

Dans le second volet de cette thèse, nous avons utilisé nos couches insolubles et chimiquement bien caractérisées pour diverses expériences de culture cellulaire. Nous avons démontré que des PP:N riches en azote pouvaient induire l'adhésion de trois types de cellules, soit les chondrocytes de plaques de croissance et articulaires ainsi que les monocytes humains U937 ; ces derniers, reconnus pour ne pas adhérer aux surfaces des polymères synthétiques ont aussi démontré une prolifération durant 24h. Dans plusieurs études publiées en parallèlle à cette thèse, nous avons montré que les surfaces PP:N pouvaient induire l'adhésion d'autres types de cellules,

dont les cellules souches mésenchymateuses (MSC), les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), les fibroblastes dermiques, ainsi que les cellules d'ovaires de hamsters chinois, (CHO). Toutes les lignées cellulaires étudiées ont adhéré à au moins un des films PP:N étudiés.

La littérature manifeste un intérêt pour des couches en motifs micrométriques comme outil pour influencer le comportement cellulaire. La production de ce type de motifs présente aussi un intérêt général pour le développement de biopuces, par exemple. Nous avons donc développé une méthodologie pour déposer, à l'aide de masques contacts en Kapton® préparés par ablation laser, des couches de PP:N en îlots réguliers de dimensions micrométriques. Nous avons démontré que les U937 ainsi que les chondrocytes de plaques de croissances n'adhéraient que sur les îlots et nulle part ailleurs sur le substrat (BOPP) ; en plus, la conservation des motifs micrométriques a été observée durant toute la durée de expérience (de 14 jours).

Dans un autre type d'expérience simple, nous avons vérifié l'adhésion de monocytes U937 et de chondrocytes de plaques de croissance sur des surfaces contenant différentes valeurs de [N] : Nous avons pu observer l'existence d'une « concentration critique d'azote », $[N]_{crit}$, autour de 24% pour les U937 et 18% pour les chondrocytes, en dessous de laquelle aucune adhésion cellulaire n'était observée. Par contre, pour $[N] > [N]_{crit}$, les cellules ont adhéré rapidement sous forme de monocouche. Il était cependant clair que [N], qualificatif peu spécifique, ne devait pas être le seul et réel responsable de cet effet, mais qu'il s'agirait plutôt de la concentration « critique » d'un groupement fonctionnel particulier. Donc, dans une seconde expérience nous avons examiné l'adhésion des monocytes U937 sur plusieurs familles de surfaces riches en azote analogues, préparées par plasma et par photochimie VUV. Toutes ces surfaces ont pu être préparées avec une chimie de surface bien caractérisée présentant différents [N] en surface en plus d'offrir différentes sélectivités pour les groupements fonctionnels chimiques. Pour chacune de ces familles, nous avons

déterminé les valeurs de $[N]_{crit}$ et de $[NH_2]_{crit}$ correspondantes : Bien que $[N]_{crit}$ est différente pour chaque cas, $[NH_2]_{crit}$ correspond à une valeur constante, 4,2 $\pm$ 0,5 % (par 100 atomes, mesurée par XPS). Aussi, des PP:N préparés à pression atmosphérique à partir d'acétylène (avec [N] élevée ($\sim$38%), mais $[NH_2] \leq 2\%$) n'ont, dans aucun cas, pu induire l'adhésion des U937. Donc, du moins pour le cas des U937, ces résultats confiment le rôle critique des amines primaires dans les interactions cellules-surfaces, sujet qui auparavant avait engendré de multiples débats dans la littérature [14, 15, 20].

Lors d'une dernière série d'expériences, nous avons étudié les voies génétiques activées lors de l'adhésion de U937 sur deux types de polymères plasma (déposés à basse et haute pression, mais avec $[NH_2] = [NH_2]_{crit}$). L'on a trouvé que ces deux surfaces ont induit une expression transitoire des gènes TNF-α et IL-1β, deux cytokines sécrétées lors de la réponse immédiate des cellules (« immediate early response genes »), ce qui suggérait ainsi qu'une réponse inflammatoire majeure n'a pas été provoquée. Par contre, les gènes PPARγ et ICAM-I, impliqués dans l'adhésion et la rétention des monocytes, ont démontré une expression soutenue. Il a été rapporté que ces deux gènes peuvent être induits par TNF-α et IL-1 dans plusieurs types de cellules, ce qui pourrait suggérer que l'expression transitoire observée de ces deux derniers gènes est à l'origine de l'adhésion des monocytes via l'activation de PPARγ et ICAM-I ; cependant, ceci n'a pas été directement étudié ici, n'ayant pas été le but de notre étude. Deux autres gènes examinés, les facteurs de transcription PU.1 et Egr-1 ont, dans d'autres études, montré une expression concertée caractéristique de la différenciation en macrophages. Ceci n'a pas été observé dans le présent cas puisque l'expression de PU.1 est demeurée inchangée, alors que Egr-1 a présenté une expression transitoire. Ces résultats suggèrent qu'en plus des voies classiques cytokines/RANK, les molécules d'adhésion comme ICAM-I et les facteurs de transcription comme Egr-1, méritent plus d'attention.

En résumé, nous avons présenté dans cette thèse un nouveau matériau, le PP:N, dont les caractéristiques physico-chimiques se comparent avantageusement aux matériaux analoges trouvés dans la littérature, et il comporte l'avantage supplémentaire d'être déposé à pression atmosphérique. Nous en avons effectué une caractérisation chimique exhaustive à l'aide de techniques bien connues, mais aussi avec d'autres généralement considérés inappropriées pour les couches minces. Ainsi, nous avons pu obtenir des informations (semi)-quantitatives sur plusieurs groupements fonctionnels et avons pu explorer plusieurs applications biotechnologiques. Par voie d'experiences d'adhésion cellulaire, nous avons démontré le rôle prépondérant des amines primaires, NH_2, dans les mécanismes d'adhésion. Finalement, nous avons examiné des voies génétiques potentiellement impliquées dans ces mécanismes d'adhésion.

Perspectives

Dans le domaine des modifications de surfaces par plasma, des techniques de dérivation chimique sont utilisées de préférence pour effectuer la quantification de groupements fonctionnels spécifiques, puisque les techniques spectroscopiques sont en général peu efficaces. Cependant, l'exactitude de ces techniques est parfois mise en doute et les protocoles utilisés dans les différents laboratoires comportent de nombreuses variations. Bien que la plupart des auteurs s'entendent sur la validité des techniques d'analyse quantitatives par dérivation chimique pour la comparaison de couches issues d'une même étude, certains doutent de leur valeur absolue ainsi que de la légitimité de la compraison de mesures faites dans différents laboratoires. Une quantification précise et exacte des groupements fonctionnels chimiques nécessite l'utilisation de matériaux standards appropriés. Ce type de standards n'a malheureusment pas encore été développé pour bon nombre de groupements fonc-

tionnels, dont les amines primaires. Nous proposons ici la conduite d'une étude visant à régulariser et à valider ces procédés, en créant une procédure reproductible et exportable. Dans la littérature existante, nous avons trouvé quelques matériaux pouvant servir de standards. Le parylène est un composé organique qui peut être polymérisé en phase gazeuse selon une cinétique semblable à celle de la polymérisation par plasma [60]. En utilisant un parylène précurseur comportant des amines primaires, il serait possible d'en faire un « polymère standard ». Une autre option serait l'utilisation du poly(éthylène imine) qui comporte une quantité *à priori* connue d'amines primaires, secondaires et tertiaires. Une dernière voie serait l'utilisation de surfaces aminées monofonctionnelles modifiées par plasma, mais ne contenant pas de radicaux libres, tel que proposé par Friedrich *et al.* [203].

Certaines des couches les plus riches en amines primaires, de toute évidence le groupement le plus important, se sont avérées solubles dans l'eau. Il serait intéressant d'optimiser les paramètres permettant de maximiser $[NH_2]$ tout en supprimant la solubilité. Puisque la solubilité d'un polymère « classique » est inversement relié à sa masse moléculaire, ce critère pourrait possiblement servir ici : Sans mesurer directement la « masse moléculaire », la technique de chromatographie d'exclusion stérique sur gel (anglais : gel permeation chromatography, GPC), qui s'effectue à l'aide du polymère en solution dans l'eau ou dans un solvant organique fort, permetra de mesurer une valeur reliée. Nous proposons donc d'étudier certains nouveaux paramètres de fabrication de couches, par exemple la puissance, la fréquence de la source haute tension, etc., ainsi que de nouveaux « monomères » précurseurs (éthane, propane, propène, propyne, butane, butyne, butadiène) selon les critères mentionnés ici. Aussi, puisque les couches préparées à partir de méthane comportaient les plus hautes valeurs de $[NH_2]$, tandis que celles préparées avec l'acétylène ont été les moins solubles, il est possible que des mélanges CH_4/C_2H_2 produisent des matériaux comportant ces deux caractéristiques.

Les caractérisations chimiques présentées ont toutes été effectuées à l'aide d'échantillons « frais » (à l'exception, bien entendu, des études de « vieillissement ») et exposées à l'air pour une période minimale. Ces matériaux, comportant plusieurs groupements réactifs, subissent des modifications physico-chimiques lorsqu'immergées dans une solution aqueuse. Par exemple, les fonctions acides et basiques établiront un équilibre rapide selon le pH, ce qui pourrait créer des charges localisées en surface. La mesure de cette charge de surface par voie du potentiel ζ pourrait éventuellemet nous révéler des informations supplémentaires sur la chimie de surface et les d'interactions avec les cellules vivantes et les biomolécules chargées. Aussi, les PP:N immergés peuvent subir des transformation chimiques. Notamment, le nitrile peut réagir avec l'eau en milieu faiblement acide ou basique donnant comme produit un groupement amide primaire ou un acide carboxylique [204]. Sans doutes, l'étude de la chimie de surface « post-immersion » est tout aussi importante pour les interactions avec le vivant que celle « pré-immersion ».

Une prothèse faite de matériau synthétique doit être stérile avant d'être implantée dans un être vivant. Les plasmas étant bien connus pour leur capacité à stériliser [205–207] la surface de matériaux, on peut s'attendre à ce qu'un dépôt/traitement de surface spécifique permet de fournir simultanément une surface stérile. Sinon, la prothèse doit être stérilisée de nouveau avant l'implantation, et il sera impératif de vérifier l'effet de cette stérilisation sur la chimie de surface.

Une autre étude intéressante serait la suivante : Les PP:N sont riches en fonctions nitriles ; or, ces groupements peuvent assez aisément être réduits à l'amine primaire via une réaction avec un agent réducteur comme le borohydrure de sodium ($NaBH_4$). Ce type de réaction nous permettrait de créer des surfaces encore plus riches en amines primaires. Finalement, sachant que les interactions entre les surfaces et le vivant passent par l'entremise de protéines (adsorbées ou créés par les cellules) une compréhension accrue des mécanismes régissant l'adhésion de cellules

aux surfaces pourrait se faire via la caractérisation des protéines rapidement absorbées sur la surface des PP:N lorsqu'ils sont immergés dans un média de culture, e.g. à l'aide de techniques « QCM-D » [208] et « ELISA » [18].

BIBLIOGRAPHIE

[1] M.R. Wertheimer, L. Martinu, J.E. Klemberg-Sapieha et G. Czeremuszkin, *Adhesion Promotion Techniques : Technological Applications*, ch. Plasma Treatment of Polymers to Improve Adhesion, p. 139 – 174. K.L. Mittal and A. Pizzi, Eds., Marcel Dekker, New York, 1999.

[2] P. LaRocca et S. Barker, « Tissue culture surface treatments », *CellLine*, vol. 6, 1996, p. 1.

[3] N.A. Bullett, D.P. Bullett, F.-E. Truica-Marasescu, S. Lerouge, F. Mwale et M.R. Wertheimer, « Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture », *Applied Surface Science*, vol. 235, 2004, p. 395 – 405.

[4] S. Guimond, I. Radu, G. Czeremuszkin, D.J. Carlsson et M.R. Wertheimer, « Biaxially oriented polypropylene (BOPP) surface modification by nitrogen atmospheric pressure glow discharge (APGD) and by air corona », *Plasmas and Polymers*, vol. 7, 2002, p. 71 – 88.

[5] S. Guimond et M.R. Wertheimer, « Surface degradation and hydrophobic recovery of polyolefins treated by air corona and nitrogen atmospheric pressure glow discharge », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 94, 2004, p. 1291 – 1303.

[6] S. Guimond, « Physico-chimie des surfaces polyoléfines traitées par décharges luminescentes à barrière diélectrique à la pression atmosphérique », Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, 2002.

[7] F. Truica-Marasescu et M.R. Wertheimer, « Vacuum ultraviolet-induced photochemical nitriding of polyolefin surfaces », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, 2004, p. 3886 – 3898.

[8] F.-E. Truica-Marasescu, *Vacuum ultraviolet photo-physical chemistry of hydrocarbon polymers.* Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, 2005.

[9] F. Truica-Marasescu et M.R. Wertheimer, « Nitrogen-rich plasma-polymer films for biomedical applications », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, 2008, p. 44 – 57.

[10] F. Truica-Marasescu, P.-L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W.E.S. Unger et M.R. Wertheimer, « Nitrogen-rich plasma polymers : comparison of films deposited in atmospheric- and low-pressure plasmas », *Thin Solid Films*, vol. 516, 2008, p. 7406 – 7417.

[11] F. Truica-Marasescu et M.R. Wertheimer, « Vacuum-ultraviolet photopolymerisation of amine-rich thin films », *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 209, 2008, p. 1043 – 1049.

[12] F.-E. Truica-Marasescu et M.R. Wertheimer, « Vacuum ultraviolet photolysis of hydrocarbon polymers », *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 206, 2005, p. 744 – 757.

[13] F. Truica-Marasescu, S. Pham et M.R. Wertheimer, « VUV processing of polymers : surface modification and deposition of organic thin films », *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research B*, vol. 265, 2007, p. 31 – 36.

[14] R. Förch, A.N. Chifen, A. Bousquet, H.L. Khor, M. Jungblut, L.-Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E.-K. Sinner et W. Knoll, « Recent and expected roles of plasma-polymerized films for biomedical applications », *Chemical Vapor Deposition*, vol. 13, 2007, p. 280 – 294.

[15] K.S. Siow, L. Britcher, S. Kumar et H.J. Griesser, « Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and

cell colonization - a review », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, 2006, p. 392 – 418.

[16] J.M. Curran, R. Chen et J.A. Hunt, « The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate », *Biomaterials*, vol. 27, 2006, p. 4783 – 4793.

[17] J.M. Curran, R. Chen et J.A. Hunt, « Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces », *Biomaterials*, vol. 26, 2005, p. 7057 – 7067.

[18] B.G. Keselowsky, D.M. Collard et A.J. Garcia, « Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding », *Biomaterials*, vol. 26, 2004, p. 5947 – 5954.

[19] M.A. Lan, C.A. Gersbach, K.E. Michael, B.G. Keselowsky et A.J. Garcia, « Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries », *Biomaterials*, vol. 26, 2005, p. 4523 – 4531.

[20] Z.H. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Förch, R. Holcomb et D. Roitman, « Plasma polymer film structure and DNA probe immobilization », *Macromolecules*, vol. 36, 2003, p. 7689 – 7694.

[21] C. Sarra-Bournet, S. Turgeon, D. Mantovani et G. Laroche, « A study of atmospheric pressure plasma discharges for surface functionalization of PTFE used in biomedical applications », *Journal of Physics D (Applied Physics)*, vol. 39, 2006, p. 3461 – 3469.

[22] C. Sarra-Bournet, S. Turgeon, D. Mantovani et G. Laroche, « Comparison of atmospheric-pressure plasma versus low-pressure RF plasma for surface

functionalization of PTFE for biomedical applications », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, 2006, p. 506 – 515.

[23] J.R. Hollahan, B.B. Stafford, R.D. Falb et S.T. Payne, « Attachment of amino groups to polymer surfaces by radiofrequency plasmas », *Journal of Applied Polymer Science*, 1969, p. 807 – 816.

[24] R.C. Chatelier, X.M. Xie, T.R. Gengenbach et H.J. Griesser, « Effects of plasma modification conditions on surface restructuring », *Langmuir*, vol. 11, 1995, p. 2585 – 2591.

[25] A.A. Meyer-Plath, B. Finke, K. Schroder et A. Ohl, « Pulsed and CW microwave plasma excitation for surface functionalization in nitrogen-containing gases », *Surface & Coatings Technology*, vol. 174, 2003, p. 877 – 881.

[26] A.A. Meyer-Plath, K. Schroder, B. Finke et A. Ohl, « Current trends in biomaterial surface functionalization - nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity », *Vacuum*, vol. 71, 2003, p. 391 – 406.

[27] P. Favia, M.V. Stendardo et R. d'Agostino, « Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH_3-H_2 RF glow discharges », *Plasmas and Polymers*, vol. 1, 1996, p. 91 – 112.

[28] M. Mason, K.P. Vercruysse, K.R. Kirker, R. Frisch, D.M. Marecak, C.D. Prestwich et W.G. Pitt, « Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene », *Biomaterials*, vol. 21, 2000, p. 31 – 36.

[29] M. Muller et C. Oehr, « Plasma aminofunctionalisation of PVDF microfiltration membranes : comparison of the in plasma modifications with a grafting method using ESCA and an amino-selective fluorescent probe », *Surface & Coatings Technology*, vol. 116, 1999, p. 802 – 807.

[30] J.M. Grace et L.J. Gerenser, « Plasma treatment of polymers », *Journal of Dispersion Science and Technology*, vol. 24, 2003, p. 305 – 341.

[31] F. Mwale, H.T. Wang, V. Nelea, L. Luo, J. Antoniou et M.R. Wertheimer, « The effect of glow discharge plasma surface modification of polymers on the osteogenic differentiation of committed human mesenchymal stem cells », *Biomaterials*, vol. 27, 2006, p. 2258 – 2264.

[32] V. Nelea, L. Luo, C.N. Demers, J. Antoniou, A. Petit, S. Lerouge, M.R. Wertheimer et F. Mwale, « Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 75A, 2005, p. 216 – 223.

[33] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, J.F. Friedrich et W.E.S. Unger, « Study of influence of external plasma parameters on plasma polymerised films prepared from organic molecules (acrylic acid, allyl alcohol, allyl amine) using XPS and NEXAFS », *Surface & Coatings Technology*, vol. 200, 2005, p. 494 – 497.

[34] A.J. Beck, F.R. Jones et R.D. Short, « Plasma copolymerization as a route to the fabrication of new surfaces with controlled amounts of specific chemical functionality », *Polymer*, vol. 37, 1996, p. 5537 – 5539.

[35] U. Oran, S. Swaraj, A. Lippitz et W.E.S. Unger, « Surface analysis of plasma deposited polymer films, 7 - "in situ" characterization of plasma deposited allylamine films by ToF-SSIMS, XPS and NEXAFS spectroscopy », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, 2006, p. 288 – 298.

[36] J.G. Calderon, A. Harsch, G.W. Gross et R.B. Timmons, « Stability of plasma-polymerized allylamine films with sterilization by autoclaving », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 42, 1998, p. 597 – 603.

[37] A.G. Shard, J.D. Whittle, A.J. Beck, P.N. Brookes, N.A. Bullett, R.A. Talib, A. Mistry, D. Barton et S.L. McArthur, « A NEXAFS examination of unsaturation in plasma polymers of allylamine and propylamine », *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, 2004, p. 12472 – 12480.

[38] M.T. van Os, B. Menges, R. Förch, G.J. Vancso et W. Knoll, « Characterization of plasma-polymerized allylamine using waveguide mode spectroscopy », *Chemistry of Materials*, vol. 11, 1999, p. 3252 – 3257.

[39] Q. Chen, R. Förch et W. Knoll, « Characterization of pulsed plasma polymerization allylamine as an adhesion layer for DNA adsorption/hybridization », *Chemistry of Materials*, vol. 16, 2004, p. 614 – 620.

[40] T.R. Gengenbach et H.J. Griesser, « Aging of 1,3-diaminopropane plasma-deposited polymer films : Mechanisms and reaction pathways », *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, vol. 37, 1999, p. 2191 – 2206.

[41] T.R. Gengenbach, R.C. Chatelier et H.J. Griesser, « Characterization of the ageing of plasma-deposited polymer films : Global analysis of X-ray photoelectron spectroscopy data », *Surface and Interface Analysis*, vol. 24, 1996, p. 271 – 281.

[42] I. Gancarz, J. Bryjak, G. Pozniak et W. Tylus, « Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization - ii. amines plasma », *European Polymer Journal*, vol. 39, 2003, p. 2217 – 2224.

[43] T.M. Ko et S.L. Cooper, « Surface-properties and platelet-adhesion characteristics of acrylic-acid and allylamine plasma-treated polyethylene », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 47, 1993, p. 1601 – 1619.

[44] J. Friedrich, G. Kuhn, R. Mix et W. Unger, « Formation of plasma polymer layers with functional groups of different type and density at polymer surfaces

and their interaction with Al atoms », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 1, 2004, p. 28 – 50.

[45] A. Choukourov, H. Biederman, D. Slavinska, M. Trchova et A. Hollander, « The influence of pulse parameters on film composition during pulsed plasma polymerization of diaminocyclohexane », vol. 174-175, p. 863 – 866, 2003.

[46] T.G. Lee, J. Kim, D. Jung, Y. Park, Y. Kim et D.W. Moon, « Quantitative analysis of surface amine groups on plasma-polymerized ethylenediamine films using UV-visible spectroscopy compared to chemical derivatization with FT-IR spectroscopy, XPS and ToF-SIMS », *Applied Surface Science*, vol. 253, 2007, p. 4112 – 4118.

[47] D. Hegemann et M.M. Hossain, « Influence of non-polymerizable gases added during plasma polymerization », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, 2005, p. 554 – 562.

[48] D.A. Waldman, Y.L. Ziu et A.N. Netravali, « Ethylene ammonia plasma polymer deposition for controlled adhesion of graphite fibers to peek. 1. characterization of plasma formed polymers », *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 9, 1995, p. 1475 – 1503.

[49] P.-L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. Demers, P. Desjardins et M.R. Wertheimer, « Atmospheric pressure deposition of micropatterned nitrogen-rich plasma-polymer films for tissue engineering », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, 2005, p. 263 – 270.

[50] P.-L. Girard-Lauriault, P. Desjardins, W.E.S. Unger, A. Lippitz et M.R. Wertheimer, « Chemical characterisation of nitrogen-rich plasma-polymer films deposited in dielectric barrier discharges at atmospheric pressure », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, 2008, p. 631 – 644.

[51] P.-L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H.T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale et M.R. Wertheimer, « Adhesion of human U937 monocytes to nitrogen-rich organic thin films : Novel insights into the mechanism of cellular adhesion », *Macromolecular Bioscience*, 2009, Accepté.

[52] F. Mwale, P.-L. Girard-Lauriault, H.T. Wang, S. Lerouge, J. Antoniou et M.R. Wertheimer, « Suppression of genes related to hypertrophy and osteogenesis in committed human mesenchymal stem cells cultured on novel nitrogen-rich plasma polymer coatings », *Tissue Engineering*, vol. 12, 2006, p. 2639 – 2647.

[53] S. Lerouge, A. Major, P.-L. Girard-Lauriault, M.-A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M.R. Wertheimer et M.-J. Hebert, « Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair », *Biomaterials*, vol. 28, 2007, p. 1209 – 1217.

[54] F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, C.J. Hunter, J.A. Ouellet, M.R. Wertheimer et J. Antoniou, « The effect of novel nitrogen-rich plasma polymer coatings on the phenotypic profile of notochordal cells », *Biomedical Engineering Online*, vol. 6, 2007, p. 33 – 45.

[55] A. Gigout, S. Levasseur, P.-L. Girard-Lauriault, M.D. Buschmann, M.R. Wertheimer et M. Jolicoeur, « PPE:N : A new material promoting cell adhesion and specific recombinant protein production », *Macromolecular Bioscience*, 2009, Accepté.

[56] F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, M.R. Wertheimer et J. Antoniou, « The expression of potential markers of nucleus pulposus phenotypes in human mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients on novel nitrogen-rich plasma polymer surfaces », *Journal of Stem Cells*, vol. 3, 2008, p. 87 – 97.

[57] F. Mwale, H.T. Wang, A. Petit, P.-L. Girard-Lauriault, J.A. Ouellet, M.R. Wertheimer et J. Antoniou, « The potential of N-rich plasma-polymerized ethylene (PPE:N) films for regulating the phenotype of the nucleus pulposus. », *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 2, 2008, p. 137 – 144.

[58] I. Langmuir, « Space charges », *Physical Review*, vol. 33, 1929, p. 954 – 989.

[59] F.S. Denes et S. Manolache, « Macromolecular plasma-chemistry : an emerging field of polymer science », *Progress in Polymer Science*, vol. 29, 2004, p. 815 – 885.

[60] H. K. Yasuda, *Plasma Polymerization.* Academic Press, London, 1984.

[61] R. Hippler, S. Pfau, M. Schmidt et K. H. Schoenbach, *Low Temperature Plasma Physics, 2nd edition.* Wiley-VCH, Berlin, 2008.

[62] M.A. Liebermann et A.J. Lichtenberg, *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing.* Wiley, New York, 1994.

[63] A. Grill, *Cold plasma in materials fabrication-from fundamentals to applications.* IEEE Press, New York, 1994.

[64] U. Kogelschatz, « Dielectric-barrier discharges : Their history, discharge physics, and industrial applications », *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, vol. 23, 2003, p. 1 – 46.

[65] W. Siemens, « Über die elektrostatische induction und die verzögerung des stroms in flaschendrähten », *Poggendorff's Annalen der Physik und Chemie*, vol. 178, 1857, p. 66 – 122.

[66] K. Buss, « Electrodeless discharge and measurements with cathode-ray oscillograph », *Archiv für Elektrotechnik*, vol. 26, 1932, p. 261 – 265.

[67] A. Von Engel, R. Seeliger et M. Steenbeck, « Glow discharge over a wide pressure range », *Zeitschrift fur Physik*, vol. 85, 1933, p. 144 – 160.

[68] R. Bartnikas, « Note on discharges in helium under A.C. conditions », *British Journal of Applied Physics (Journal of Physics D)*, vol. 1, 1968, p. 659 – 661.

[69] R. Bartnikas, « Some observations on the character of corona discharges in short gap spaces », *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, vol. EI-6, 1971, p. 63 – 75.

[70] S. Kanazawa, M. Kogoma, T. Moriwaki et S. Okazaki, « Stable glow plasma at atmospheric pressure », *Journal of Physics D (Applied Physics)*, vol. 21, 1988, p. 838 – 840.

[71] F. Massines, A. Rabehi, P. Decomps, R. Ben Gadri, P. Segur et C. Mayoux, « Experimental and theoretical study of a glow discharge at atmospheric pressure controlled by dielectric barrier », *Journal of Applied Physics*, vol. 83, 1998, p. 2950 – 2957.

[72] S.F. Miralaï, E. Monette, R. Bartnikas, G. Czeremuszkin, M. Latrèche et M.R. Wertheimer, « Electrical and optical diagnostics of dielectric barrier discharges (DBD) in He and N_2 for polymer treatment », *Plasmas and Polymers*, vol. 5, 2000, p. 63 – 77.

[73] N. Gherardi, G. Gouda, E. Gat, A. Ricard et F. Massines, « Transition from glow silent discharge to micro-discharges in nitrogen gas », *Plasma Sources, Science and Technology*, vol. 9, 2000, p. 340 – 346.

[74] F. Massines et G. Gouda, « A comparison of polypropylene-surface treatment by filamentary, homogeneous and glow discharges in helium at atmospheric pressure », *Journal of Physics D (Applied Physics)*, vol. 31, 1998, p. 3411 – 3420.

[75] N. Gherardi, S. Martin et F. Massines, « A new approach to SiO_2 deposit using a N_2-SiH_4-N_2O glow dielectric barrier-controlled discharge at atmospheric pressure », *Journal of Physics D (Applied Physics)*, vol. 33, 2000, p. 104 – 108.

[76] Y. Sawada, S. Ogawa et M. Kogoma, « Synthesis of plasma-polymerized tetraethoxysilane and hexamethyldisiloxane films prepared by atmospheric pressure glow discharge », *Journal of Physics D (Applied Physics)*, vol. 28, 1995, p. 1661 – 1669.

[77] R. Bartnikas, *Engineering Dielectrics Volume 1 : Corona Measurments and Interpretation*, ch. Corona Discharge Processes in Voids. (ASTM Special Technical Publication 669) R. Bartnikas and E.J. McMahon (Éd.), ASTM, Philadelphie, 1979.

[78] J.S. Townsend, *Electricity in Gases.* Clarendon Press, Oxford, 1915.

[79] J.M. Meek et J.D. Craggs, *Electrical Breakdown of Gases.* Clarendon Press, Oxford, 1953.

[80] F. Garbassi, *Polymer Surfaces, From Physics to Technology, 2nd Edition.* Wiley, Chichester, 1998.

[81] J.M. Strobel, M. Strobel, C.S. Lyons, C. Dunatov et S.J. Perron, « Aging of air-corona-treated polypropylene film », *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 5, 1991, p. 119 – 130.

[82] J. Friedrich, R. Mix, G. Kuhn, I. Retzko, A. Schonhals et W. Unger, « Plasma-based introduction of monosort functional groups of different type and density onto polymer surfaces. Part 2 : pulsed plasma polymerization », *Composite Interfaces*, vol. 10, 2003, p. 173 – 223.

[83] C.L. Rinsch, X.L. Chen, V. Panchalingam, R.C. Eberhart, J.H. Wang et R.B. Timmons, « Pulsed radio frequency plasma polymerization of allyl alcohol : Controlled deposition of surface hydroxyl groups », *Langmuir*, vol. 12, 1996, p. 2995 – 3002.

[84] J.M. Tibbitt, M. Shen et Bell A.T., « Structural characterization of plasma-polymerized hydrocarbons. », *Journal of Macromolecular Science. Chemistry*, vol. A10, 1976, p. 1623 – 1648.

[85] H.S. Choi, V.V. Rybkin, V.A. Titov, T.G. Shikova et Ageeva T.A., « Comparative actions of a low pressure oxygen plasma and an atmospheric pressure glow discharge on the surface modification of polypropylene », *Surface & Coatings Technology*, vol. 200, 2006, p. 4479 – 4488.

[86] M.J. Shenton et G.C. Stevens, « Surface modification of polymer surfaces : Atmospheric plasma versus vacuum plasma treatments », *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 34, 2001, p. 2761 – 2768.

[87] F. Fracassi, « Cold plasma treatment of materials. low pressure vs. atmospheric pressure operation. », dans *The 11th International Conference on Plasma Surface Engineering, Garmisch-Partenkirchen, Germany*, 2008.

[88] Y.H. Cheng, Y.P. Wu, J.G. Chen, X.L. Qiao, C.S. Xie, B.K. Tay, S.P. Lau et X. Shi, « On the deposition mechanism of a-C :H films by plasma enhanced chemical vapor deposition », *Surface & Coatings Technology*, vol. 135, 2000, p. 27 – 33.

[89] K.L. Mittal et Pizzi A., éd., *Adhesion Promotion Techniques Technological Applications.* Marcel Dekker Inc, New York, 1999.

[90] J.G.A. Terlingen, L.M. Brenneisen, H.T.J. Super, A.P. Pijpers, A.S. Hoffman et J. Feijen, « Introduction of amine groups on poly(ethylene) by plasma

immobilization of a preadsorbed layer of decylamine hydrochloride », *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 4, 1993.

[91] S. Sano, K. Kato et Y. Ikada, « Introduction of functional-groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization », *Biomaterials*, vol. 14, 1993, p. 817 – 822.

[92] C-G. Gölander, M.W. Rutland, D.L. Cho, A. Johansson, H. Ringblom, S. Jönsson et H.K. Yasuda, « Structure and surface properties of diaminocyclohexane plasma polymer films », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 49, 1993, p. 39 – 51.

[93] B. Lassen et M. Malmsten, « Competitive protein adsorption at plasma polymer surfaces », *Journal of Colloid And Interface Science*, vol. 186, 1997, p. 9 – 16.

[94] P. Kingshott, H. Thissen et H.J. Griesser, « Effects of cloud-point grafting, chain length, and density of peg layers on competitive adsorption of ocular proteins », *Biomaterials*, vol. 23, 2002, p. 2043 – 2056.

[95] T.R. Gengenbach, R.C. Chatelier et H.J. Griesser, « Correlation of the nitrogen 1s and oxygen 1s XPS binding energies with compositional changes during oxidation of ethylene diamine plasma polymers », *Surface and Interface Analysis*, vol. 24, 1996, p. 611 – 619.

[96] F. Fally, C. Doneux, J. Riga et J.J. Verbist, « Quantification of the functional-groups present at the surface of plasma polymers deposited from propylamine, allylamine, and propargylamine », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 56, 1995, p. 597 – 614.

[97] D. Bhattacharyya, K. Pillai, O.M.R. Chyan, Liping Tang et R.B. Timmons,

« A new class of thin film hydrogels produced by plasma polymerization », *Chemistry of Materials*, vol. 19, 2007, p. 2222 – 2228.

[98] A. Villermet, P. Cocolios, G. Rames-Langlade, F. Coeuret, J.-L. Gelot, E. Prinz et F. Forster, « Aldyne^{TM} : surface treatment by atmospheric plasma for plastic films converting industry », *Surface & Coatings Technology*, vol. 174-175, 2003, p. 899 – 901.

[99] F. Massines, G. Gouda, N. Gherardi, M. Duran et E. Croquesel, « The role of dielectric barrier discharge atmosphere and physics on polypropylene surface treatment », *Plasmas and Polymers*, vol. 6, 2001, p. 35 – 49.

[100] S. Ishikawa, K. Yukimura, K. Matsunaga et T. Maruyama, « The surface modification of poly(tetrafluoroethylene) film using dielectric barrier discharge of intermittent pulse voltage », *Surface & Coatings Technology*, vol. 130, 2000, p. 52 – 56.

[101] M. Sira, D. Trunec, P. Stahel, V. Bursikova, Z. Navratil et J. Bursik, « Surface modification of polyethylene and polypropylene in atmospheric pressure glow discharge », *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 38, 2005, p. 621 – 627.

[102] L. O'Neill, L.-A. O'Hare, S.R. Leadley et A.J. Goodwin, « Atmospheric pressure plasma liquid deposition - a novel route to barrier coatings », *Chemical Vapor Deposition*, vol. 11, 2005, p. 477 – 479.

[103] D. Vangeneugden, M. Dubreuil, E. Bongaers, I. Wasbauer, A. Issaris et W. Eevers, « Development of eco-friendly alternative release liners for pressure sensitive adhesive tapes using DBD coating deposition », dans *The 11th International Symposium on High Pressure, Low Temperature Plasma Chemistry, Île d'Oléron, France (HAKONE XI)*, 2008.

[104] R. Thyen, A. Weber et C.-P. Klages, « Plasma-enhanced chemical-vapour-deposition of thin films by corona discharge at atmospheric pressure », *Surface & Coatings Technology*, vol. 97, 1997, p. 426 – 434.

[105] O. Goossens, E. Dekempeneer, D. Vangeneugden, R. Van de Leest et C. Leys, « Application of atmospheric pressure dielectric barrier discharges in deposition, cleaning and activation », *Surface & Coatings Technology*, vol. 142-144, 2001, p. 474 – 481.

[106] C. Gessner, V. Bartels, T. Betker, U. Matucha, C. Penache et C.-P. Klages, « Surface modification for biomedical purposes utilizing dielectric barrier discharges at atmospheric pressure », *Thin Solid Films*, vol. 459, 2004, p. 118 – 121.

[107] P. Heyse, R. Dams, S. Paulussen, K. Houthofd, K. Janssen, P.A. Jacobs et B.F. Sels, « Dielectric barrier discharge at atmospheric pressure as a tool to deposit versatile organic coatings at moderate power input », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, 2007, p. 145 – 157.

[108] J.M. Hill, E. Karbashewski, A. Lin, M. Strobel et M.J. Walzak, « Effects of aging and washing on UV and ozone-treated poly(ethylene terephthalate) and polypropylene », *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 9, 1995, p. 1575 – 1591.

[109] U. Kogelschatz, « Excimer lamps : history, discharge physics, and industrial applications », dans *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 5483, p. 272 – 286, 2004.

[110] I.W. Boyd, J.-Y. Zhang et U. Kogelschatz, *Photo-Excited Processes, Diagnostics and Applications*, ch. Development and Applications of UV Excimer Lamps, p. 161 – 199. Springer, USA, 2004.

[111] M. Charbonnier, M. Romand, H. Esrom et R. Seebock, « Functionalization of polymer surfaces using excimer VUV systems and silent discharges. application to electroless metallization », *Journal of Adhesion*, vol. 75, 2001, p. 381 – 404.

[112] J. Heitz, V. Svorcik, L. Bacakova, K. Rockova, E. Ratajova, T. Gumpenberger, D. Bauerle, B. Dvorankova, H. Kahr, I. Graz et C. Romanin, « Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere », *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 67, 2003, p. 130 – 137.

[113] E. Sarantopoulou, J. Kovac, Z. Kollia, I. Raptis, S. Kobe et A.C. Cefalas, « Surface modification of polymeric thin films with vacuum ultraviolet light », *Surface and Interface Analysis*, vol. 40, 2008, p. 400 – 403.

[114] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen et J.E. Lemons, éd., *Biomaterials Science : An Introduction to Materials in Medicine, 2nd Édition.* Elsevier, San Diego, 2004.

[115] J.J.A. Barry, M.M.C.G. Silva, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle et M.R. Alexander, « Using plasma deposits to promote cell population of the porous interior of three-dimensional poly(D,L-lactic acid) tissue-engineering scaffolds », *Advanced Functional Materials*, vol. 15, 2005, p. 1134 – 1140.

[116] D.B. Haddow, S. MacNeil et R.D. Short, « A cell therapy for chronic wounds based upon a plasma polymer delivery surface », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, 2006, p. 419 – 430.

[117] L. Tang, Y. Wu et R.B. Timmons, « Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 42, 1998, p. 156 – 163.

[118] P. Favia, M. Vulpio, R. Marino, R. d'Agostino, Mota R.P. et Catalano Mé, « Plasma-deposition of Ag-containing polyethyleneoxide-like coatings », *Plasmas and Polymers*, vol. 1, 2000, p. 1 – 14.

[119] M. Touzin, P. Chevallier, F. Lewis, S. Turgeon, S. Holvoet, G. Laroche et D. Mantovani, « Study on the stability of plasma-polymerized fluorocarbon ultra-thin coatings on stainless steel in water », *Surface & Coatings Technology*, vol. 202, 2008, p. 4884 – 4891.

[120] A. Petit, F. Mwale, D.J. Zukor, I. Catelas, J. Antoniou et O.L. Huk, « Effect of cobalt and chromium ions on BCL-2, BAX, Caspase-3, and Caspase-8 expression in human U937 macrophages », *Biomaterials*, vol. 25, 2004, p. 2013 – 2018.

[121] T. Herbert, *Plasma Technologies for Textiles*, ch. Atmospheric-pressure cold plasma processing technology, p. 79 – 128. Cambridge, UK : Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 2006.

[122] J. Bour, J. Bardon, H. Aubriet, D. Del Frari, B. Verheyde, R. Dams, D. Vangeneugden et D. Ruch, « Different ways to plasma-polymerize HMDSO in DBD configuration at atmospheric pressure for corrosion protection », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, 2008, p. 788 – 796.

[123] Site web de la compagnie AFS, « Products and applications : Generators », Decembre 2008. `http://www.AFS.biz`.

[124] D. Hegemann, M.M. Hossain, E. Koerner et D.J. Balazs, « Macroscopic description of plasma polymerization », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, 2007, p. 229 – 238.

[125] J. Hong, F. Truica-Marasescu, L. Martinu et M.R. Wertheimer, « An investi-

gation of plasma-polymer interactions by mass spectrometry », *Plasmas and Polymers*, vol. 7, 2002, p. 245 – 260.

[126] N. Mutsukura et K. Akita, « Infrared absorption spectroscopy measurements of amorphous CN_x films prepared in CH_4/N_2 R.F. discharge », *Thin Solid Films*, vol. 349, 1999, p. 115 – 119.

[127] N. Mutsukura et Y. Daigo, « Effect of ion-bombardment on the deposition of a-CNx : H films in CH_4/N_2 r.f. plasma », *Diamond and Related Materials*, vol. 12, 2003, p. 2057 – 2060.

[128] R.F. Brady jr., *Comprehensive Desk Reference of Polymer Characterization and Analysis.* Oxford University Press, UK, 2004.

[129] K. Siegbahn, *ESCA : Atomic, molecular and solid state structure studied by means of electron spectroscopy.* Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, 1967.

[130] D. Briggs, *Surface analysis of polymers by XPS and Static SIMS.* Cambridge University Press, UK, 1998.

[131] D. Briggs et M.P. Seah, *Practical Surface Analysis vol. 1.* John Wiley and Sons, Toronto, 1983.

[132] J.H. Scofield, « Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV », *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 8, 1976, p. 129 – 137.

[133] C.D. Wagner, L.E. Davis, M.V. Zeller, J.A. Taylor, R.H. Raymond et L.H. Gale, « Empirical atomic sensitivity factors for quantitative analysis by electron spectroscopy for chemical analysis », *Surface and Interface Analysis*, vol. 3, 1981, p. 211 – 225.

[134] G. Beamson et H. Briggs, *High Resolution XPS of Organic Polymers : The Scienta ESCA 300 Database.* Wiley, Chichester, UK, 1992.

[135] M.P. Seah et W.A. Dench, « Quantitative electron spectroscopy of surfaces : a standard data base for electron inelastic mean free paths in solids », *Surface and Interface Analysis*, vol. 1, 1979, p. 2 – 11.

[136] J.G. Jenkin, « The development of angle-resolved photoelectron spectroscopy : 1900-1960 », *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 23, 1981, p. 187 – 273.

[137] C.S. Fadley, « Angle-resolved X-ray photoelectron spectroscopy », *Progress in Surface Science*, vol. 16, 1984, p. 275 – 388.

[138] P.J. Cumpson, « Angle-resolved XPS and AES : depth resolution limits and a general comparison of properties of depth-profile reconstruction methods », *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 73, 1995, p. 25 – 52.

[139] H. Shimada, K. Sato, N. Matsubayashi, M. Imamura, T. Saito et K. Furuya, « XPS depth profiling of powdered materials », *Applied Surface Science*, vol. 144-145, 1999, p. 21 – 25.

[140] S.V. Merzlikin, N.N. Tolkachev, T. Strunskus, G. Witte, T. Glogowski, C. Woll et W. Grunert, « Resolving the depth coordinate in photoelectron spectroscopy - comparison of excitation energy variation vs. angular-resolved XPS for the analysis of a self-assembled monolayer model system », *Surface Science*, vol. 602, 2008, p. 755 – 767.

[141] R. Snyders, O. Zabeida, C. Roberges, K.I. Shingel, M.-P. Faure, L. Martinu et J.E. Klemberg-Sapieha, « Mechanism of adhesion between protein-based

hydrogels and plasma treated polypropylene backing », *Surface Science*, vol. 601, 2007, p. 112 – 122.

[142] B.R. Pistillo, L. Detomaso, E. Sardella, P. Favia et d'Agostino R., « Rf-plasma deposition and surface characterization of stable (COOH)-rich thin films from cyclic L-lactide », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, 2007, p. S817 – S820.

[143] A. Meyer-Plath, R. Mix et J. Jörg Friedrich, « Amino functionalization of polymers by low-pressure plasma processing : Status and perspectives », dans *The 10th International Conference on Plasma Surface Engineering, Garmisch-Partenkirchen, Germany*, 2006.

[144] J. Stöhr, *NEXAFS Spectroscopy.* Springer Verlag, Heidelberg, 1992.

[145] P.E. Batson, « Carbon-1s near-edge-absorption fine-structure in graphite », *Physical Review B*, vol. 48, 1993, p. 2608 – 2610.

[146] E. Yegen, A. Lippitz, D. Treu et W. E. S. Unger, « Derivatization of amino groups by pentafluorobenzaldehyde (PFB) as observed by XPS and NEXAFS spectroscopy on spin coated 4,4'-methylenebis(2,6-diethylaniline) films », *Surface and Interface Analysis*, vol. 40, 2008, p. 176 – 179.

[147] I. Retzko, J.F. Friedrich, A. Lippitz et W.E.S. Unger, « Chemical analysis of plasma-polymerized films : The application of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray absorption spectroscopy (NEXAFS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) », *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, vol. 121, 2001, p. 111 – 129.

[148] S. Swaraj, *Surface Chemical Characterization of Plasma-Chemically Deposited Polymer Films by X-ray Photoelectron Spectroscopy and Near-Edge X-ray Absorption Fine Structure.* Thèse de doctorat, Freie Universität Berlin, 2005.

[149] T. Young, « An essay on the cohesion of fluids », *Philosophical Transactions*, vol. 95, 1805, p. 65 – 87.

[150] D.K. Owens et R.C. Wendt, « Estimation of the surface free energy of polymers », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 13, 1969, p. 1741 – 1747.

[151] D.H. Kaelble, *Physical Chemistry of Adhesion.* John Wiley and Sons, New York, 1971.

[152] D.H. Kaelble, « Dispersion-polar surface tension properties of organic solids », *The Journal of Adhesion*, vol. 2, 1970, p. 66 – 81.

[153] F.M. Fowkes, « Determination of interfacial tensions, contact angles, and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces », *Journal of Physical Chemistry*, vol. 66, 1962, p. 382.

[154] L.A. Girifalco et R.J. Good, « A theory for the estimation of surface and interfacial energies. I. derivation and application to interfacial tension », *Journal of Physical Chemistry*, vol. 61, 1957, p. 904 – 909.

[155] R.J. Good, « Surface free energy of solids and liquids : Thermodynamics, molecular forces, and structure », *Journal of Colloid Interface Science*, vol. 59, 1977, p. 398 – 419.

[156] E. Sardella, L. Detomaso, R. Gristina, G.S. Senesi, H. Agheli, D.S. Sutherland, R. d'Agostino et P. Favia, « Nano-structured cell-adhesive and cell-repulsive plasma-deposited coatings : chemical and topographical effects on keratinocyte adhesion », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, 2008, p. 540 – 551.

[157] M.T. Frey, I.Y. Tsai, T.P. Russell, S.K. Hanks et Yu li Wang, « Cellular responses to substrate topography : role of myosin II and focal adhesion kinase », *Biophysical Journal*, vol. 90, 2006, p. 3774 – 3782.

[158] W. Yuqing, W. Yong, L. Zhimin, Q. Xue, H. Buxing, B. Jianzhong et W. Shenguo, « Adhesion and proliferation of oct-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(l-lactide) », *Biomaterials*, vol. 26, 2005, p. 4453 – 4459.

[159] J.Y. Wong, J.B. Leach et X.Q. Brown, « Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell-biomaterial interface : issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response », *Surface Science*, vol. 570, 2004, p. 119 – 133.

[160] A.W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces, 5^{th} Édition.* Wiley, New York, 1990.

[161] A. Baazkin et W. Norde, *Physical Chemistry of Biological interfaces.* Marcel Dekker, New York, 2000.

[162] M.W. Skinner et H.W. Thompson, « Intensities of vibration bands. Part VIII. The C≡N group. », *Journal of the Chemical Society*, 1955.

[163] R.M. Silverstein et F.X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6^{th} edition.* John Wiley&Sons, New York, 1999.

[164] C.N. Banwell et E.M. McCash, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy, 4^{th} edition.* The McGraw-Hill Companies, London, 1995.

[165] Site web de la compagnie Pike Technologies, « Demountable liquid cell », Decembre 2008. `http://www.piketech.com`.

[166] J.M.S. Bartlett et D. Stirling, « A short history of the polymerase chain reaction », *Methods in Molecular Biology*, vol. 226, 2003, p. 3 – 6.

[167] A. Ohl, W. Schleinitz, A. Meyer-Sievers, A. Becker, D. Keller, K. Schroder et J. Conrads, « Design of an UHV reactor system for plasma surface treatment

of polymer materials », *Surface and Coatings Technology*, vol. 116-119, 1999, p. 1006 – 1010.

[168] R. M. A. Azzam et N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light.* North-Holland, Amsterdam, 1997.

[169] S. Pal, L. H. Tang, H. Choi, E. Habermann, L. Rosenberg, P. Roughley et A. R. Poole, « Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. », *Collagen and Related Research*, vol. 1, 1981, p. 151 – 176.

[170] F. Mwale, C. Billinghurst, W. Wu, M. Alini, C. Webber, A. Reiner, M. Ionescu, J. Poole et A.R. Poole, « Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype », *Developmental Dynamics*, vol. 218, 2000, p. 648 – 662.

[171] Y.K. Gong, L. Luo, A. Petit, D.J. Zukor, O.L. Huk, J. Antoniou, F.M. Winnik et F. Mwale, « Adhesion of human U937 macrophages to phosphorylcholine-coated surfaces », *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 72A, 2005, p. 1 – 9.

[172] Y.K. Gong, F. Mwale, M.R. Wertheimer et F.M. Winnik, « Promotion of U937 cell adhesion on polypropylene surfaces bearing phosphorylcholine functionalities », *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, vol. 15, 2004, p. 1423 – 1434.

[173] A.J. Beck, J.D. Whittle, N.A. Bullett, P. Eves, S. Mac Neil, S.L. McArthur et A.G. Shard, « Plasma co-polymerisation of two strongly interacting monomers : Acrylic acid and allylamine », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 2, 2005, p. 641 – 649.

[174] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, R.D. Schulze, J.F. Friedrich et WES Unger, « Surface analysis of plasma-deposited polymer films, 4(a) - In situ characterization of plasma-deposited ethylene films by XPS and NEXAFS », *Plasma Processes And Polymers*, vol. 2, 2005, p. 310 – 318.

[175] M.L. Gordon, G. Cooper, C. Morin, T. Araki, C.C. Turci, K. Kaznatcheev et A.P. Hitchcock, « Inner-shell excitation spectroscopy of the peptide bond : Comparison of the C 1s, N 1s, and O 1s spectra of glycine, glycyl-glycine, and glycyl-glycyl-glycine », *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 107, 2003, p. 6144 – 6159.

[176] A. Meyer-Plath, « Identification of surface radicals on polymers », *Vakuum in Forschung und Praxis*, vol. S1, 2005, p. 40 – 46.

[177] M.M. Hossain, A.S. Herrmann et D. Hegemann, « Incorporation of accessible functionalities in nanoscaled coatings on textiles characterized by coloration », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, 2007, p. 135 – 144.

[178] K. Takahashi et K. Tachibana, « Molecular composition of films and solid particles polymerized in fluorocarbon plasmas », *Journal Of Applied Physics*, vol. 89, 2001, p. 893 – 899.

[179] L. Luo, A. Petit, J. Antoniou, D.J. Zukor, O.L. Huk, R.C.W. Liu, F.M. Winnik et F. Mwale, « Effect of cobalt and chromium ions on MMP-1 TIMP-1, and TNF-α gene expression in human U937 macrophages : A role for tyrosine kinases », *Biomaterials*, vol. 26, 2005, p. 5587 – 5593.

[180] A.L. Koenig, V. Gambillara et D.W. Grainger, « Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 64A, 2003, p. 20 – 37.

[181] S. Schleser, R. Ringseis et K. Eder, « Conjugated linoleic acids have no effect on TNF-α -induced adhesion molecule expression, U937 monocyte adhesion, and chemokine release in human aortic endothelial cells », *Atherosclerosis*, vol. 186, 2006, p. 337 – 344.

[182] C.Y. Yeh, J.Y. Chen et J.S. Chia, « Glucosyltransferases of viridans group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence », *Infection and Immunity*, vol. 74, 2006, p. 1273 – 1283.

[183] Y. Jung, S. Song et C. Choi, « Peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists suppress TNF-α -induced ICAM-1 expression by endothelial cells in a manner potentially dependent on inhibition of reactive oxygen species », *Immunology Letters*, vol. 117, 2008, p. 63 – 69.

[184] A. Petit, H.T. Wang, P.-L. Girard-Lauriault, M.R. Wertheimer, J. Antoniou et F. Mwale, « Mechanism of decreased expression of type X collagen in human mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients cultured on nitrogen-rich plasma polymers : Implication of cyclooxygenase-1 », *Biomaterials*, 2009, p. Soumis.

[185] C. Chi et D.I. Simon, « Integrin Signals, Transcription Factors, and Monocyte Differentiation », *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 16, 2006, p. 146 – 152.

[186] M.W. Pfaffl, « A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR », *Nucleic Acids Research*, vol. 29, 2001.

[187] S. Mitschik, R. Schierl, D. Nowak et R. A. Joerres, « Effects of particulate matter on cytokine production in vitro : A comparative analysis of published studies », *Inhalation Toxicology*, vol. 20, 2008, p. 399 – 414.

[188] K.O. Ahn, S.W. Lim, H.J. Yang, C. Li, A. Sugawara, S. Ito, B.S. Choi, Y.S. Kim, J. Kim et C.W. Yang, « Induction of PPAR gamma mRNA and protein expression by rosiglitazone in chronic cyclosporine nephropathy in the rat », *Yonsei Medical Journal*, vol. 48, 2007, p. 308 – 316.

[189] P.Y. Yang, Y.C. Rui, K. Li, X.H. Huang, J.M. Jiang et L. Yu, « Expression of intercellular adhesion molecule-1 in U937 foam cells and inhibitory effect of imperatorin », *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 23, 2002, p. 327 – 330.

[190] V. Benson, A.C. McMahon et H.C. Lowe, « ICAM-1 in acute myocardial infarction : A potential therapeutic target », *Current Molecular Medicine*, vol. 7, 2007, p. 219 – 227.

[191] H. Shao, D.H. Kono, L.Y. Chen, E.M. Rubin et J. Kaye, « Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 185, 1997, p. 731 – 744.

[192] K. Bendtzen, « Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity », *Immunology Letters*, vol. 19, 1988, p. 183 – 192.

[193] G. Chinetti, J.C. Fruchart et B. Staels, « Peroxisome proliferator-activated receptors : new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function », *Current Opinion in Lipidology*, vol. 14, 2003, p. 459 – 468.

[194] K.F. Hilgers, « Monocytes/macrophages in hypertension », *Journal of Hypertension*, vol. 20, 2002, p. 593 – 596.

[195] R. Pigott, L.P. Dillon, I.H. Hemingway et A.J.H. Gearing, « Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine

activated cultured endothelial-cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 187, 1992, p. 584 – 589.

[196] J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick et M.A. Gimbrone Jr, « Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin : comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species », *The Journal of Immunology*, vol. 138, 1987, p. 3319 – 3324.

[197] A. Von Knethen et B. Brune, « PPARγ - an important regulator of monocyte/macrophage function », *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 51, 2003, p. 219 – 226.

[198] A.K. Hubbard, M. Thibodeau et C. Giardina, « Cellular and molecular mechanisms regulating silica-induced adhesion molecule expression in mice », *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 20(Suppl.1), 2001, p. 45 – 51.

[199] A.F. Valledor, F.E. Borras, M. Cullell-Young et A. Celada, « Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation », *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 63, 1998, p. 405 – 417.

[200] D.A. Liebermann et B. Hoffman, « Differentiation primary response genes and protooncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic-cell differentiation », *Stem Cells*, vol. 12, 1994, p. 352 – 369.

[201] P. Laslo, C.J. Spooner, A. Warmflash, D.W. Lancki, H.-J. Lee, R. Sciammas, B.N. Gantner, A.R. Dinner et H. Singh, « Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates », *Cell*, vol. 126, 2006, p. 755 – 766.

[202] D. Muzzey et A. van Oudenaarden, « When it comes to decisions, myeloid progenitors crave positive feedback », *Cell*, vol. 126, 2006, p. 650 – 652.

[203] S. Wettmarshausen, G. Kuhn, G. Hidde, H.-U. Mittmann et J.F. Friedrich, « Plasmabromination - the selective way to monotype functionalized polymer surfaces », *Plasma Processes and Polymers*, vol. 4, 2007, p. 832 – 839.

[204] S. Ege, *Organic Chemistry : Structure and Reactivity, 4^e Édition.* Houghton Mifflin Company, Boston, New York, 1999.

[205] S. Lerouge, M. Tabrizian, M.R. Wertheimer, R. Marchand et L. Yahia, « Safety of plasma-based sterilization : Surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad((R)) and Plazlyte (TM) processes », *Bio-Medical Materials and Engineering*, no. 1, 2002, p. 3 – 13.

[206] M.K. Boudam, M. Moisan, B. Saoudi, C. Popovici, N. Gherardi et F. Massines, « Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture », *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 39, 2006, p. 3494 – 3507.

[207] J. Pollak, M. Moisan, D. Keroack et M.K. Boudam, « Low-temperature low-damage sterilization based on UV radiation through plasma immersion », *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 41, 2008, p. 135212 (14 pp.).

[208] E.A. Scott, M.D. Nichols, L.H. Cordova, B.J. George, Y.-S. Jun et D.L. Elbert, « Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels », *Biomaterials*, vol. 29, 2008, p. 4481 – 4493.

ANNEXE I

SUPPRESSION OF GENES RELATED TO HYPERTROPHY AND OSTEOGENESIS IN COMMITTED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED ON NOVEL NITROGEN-RICH PLASMA POLYMER COATINGS

TISSUE ENGINEERING
Volume 12, Number 9, 2006
© Mary Ann Liebert, Inc.

Suppression of Genes Related to Hypertrophy and Osteogenesis in Committed Human Mesenchymal Stem Cells Cultured on Novel Nitrogen-Rich Plasma Polymer Coatings

FACKSON MWALE, Ph.D.,[1,2] PIERRE-LUC GIRARD-LAURIAULT, B.Sc.,[3] HONG TIAN WANG, M.Sc.,[1,2] SOPHIE LEROUGE, Ph.D.,[4] JOHN ANTONIOU, M.D., Ph.D.,[1,2] and MICHAEL R. WERTHEIMER, Ph.D.[3]

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent progenitor cells with the ability to generate cartilage, bone, muscle, tendon, ligament, and fat. However, recent evidence indicates that a major drawback of current cartilage- and intervertebral disc-tissue engineering is that human MSCs isolated from some arthritic patients (a clinically relevant source of stem cells) express type X collagen (a marker of chondrocyte hypertrophy associated with endochondral ossification) and osteogenic markers. Some studies have attempted to use growth factors to inhibit type X collagen expression, but none has addressed the possible effect of the chemical composition of the substratum on chondrocyte hypertrophy and osteogenesis. Here, we examine the growth and differentiation potential of human MSCs cultured on nitrogen (N)-rich plasma polymer layers (N-doped plasma-polymerized ethylene, containing up to 36% nitrogen; PPE:N). We show that PPE:N almost completely suppresses the expression not only of type X collagen, but also of osteogenic marker genes such as alkaline phosphatase, bone sialoprotein, and osteocalcin. In contrast, neither aggrecan nor type I collagen expression were significantly affected. These results indicate that PPE:N coatings may be suitable surfaces for inducing MSCs to a chondrocyte or disc-like phenotype for tissue engineering of cartilage or intervertebral discs, in which hypertrophy and osteogenesis are suppressed.

INTRODUCTION

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) are present in a variety of tissues during human development, and in adults they are prevalent in bone marrow. MSCs can be isolated, expanded in culture, and stimulated to differentiate into bone, cartilage, muscle, marrow stroma, tendon, fat, and a variety of other connective tissues.[1] The study of these cells provides the basis for tissue engineering. Bone and cartilage formation involves the differentiation of MSCs to a specific and distinctive phenotypic pathway.[2]

However, recent evidence indicates that a major drawback of current cartilage or intervertebral disc tissue engineering is that human MSCs rapidly express type X collagen,[3,4] a marker of chondrocyte hypertrophy associated with endochondral ossification.[5,6] In particular, MSCs obtained from the femoral intramedullary canal of patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis (60–80 years old) rapidly express type X collagen.[4] Some studies have attempted to use growth factors to inhibit type X collagen expression[7] and osteogenic marker genes; however, little work has been done to investigate the effect of material surfaces on stem cell differentiation.

[1]Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, Montréal, Québec, Canada.
[2]Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Québec, Canada.
[3]Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada.
[4]Research Center, Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

It has been known for some time that cells may be sensitive to subtle differences in surface chemistry.[8–12] The nature of the surface can directly influence cellular responses,[4,9,13,14] ultimately affecting the rate and quality of new tissue formation.[9,15] Previous studies have shown that contact with vitronectin and collagen I promotes the osteogenic differentiation of MSCs.[14] Furthermore, the creation of functional groups (-CH_3, -NH_2, SH, -OH, and -COOH) by silanization on glass surfaces was found to alter the differentiation potential of the human MSCs.[12] However, the mechanisms controlling human MSC differentiation are not well understood. These studies suggest that extracellular matrix contact alone may be sufficient to induce stem cell differentiation.

We have recently developed a unique design of a "smart surface," extremely rich in nitrogen (N) (N-doped plasma-polymerized ethylene; PPE:N) that is capable of promoting cell adhesion.[13] In this study we use this technology to elucidate the effect of 3 different PPE:N substrates with differing chemically bound N concentrations ([N]), on markers of hypertrophy and osteogenesis. Markers of chondrogenesis include collagen type II and aggrecan, with collagen type X being used as a marker of late-stage chondrocyte hypertrophy (associated with endochondral ossification).[6,16] Osteogenic markers include alkaline phosphatase (ALP),[17] bone sialoprotein (BSP),[17,18] osteocalcin (OC),[17,18] and runt-related transcription factor 2 (RUNX2).[19,20] The findings we present indicate that the type of substrate used can influence cellular processes, particularly stem cell differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Deposition of PPE:N

Girard-Lauriault *et al.* have described the methods employed for depositing PPE:N films.[13] For the experiments reported here, they were deposited on biaxially oriented polypropylene (BOPP); the characteristics of this 50-μm-thick isotactic polymer film, graciously provided by 3M Company, have also been described elsewhere.[21,22] The atmospheric pressure plasma deposition system consisted of a moveable aluminium plate electrode on which flat sheets of BOPP were uniformly coated in a 10-kHz, high-voltage (HV, ~18 kV peak-to-peak) dielectric barrier discharge (DBD).[13] This was accomplished using carefully controlled linear displacement of the substrate through the approximately 1-cm-wide discharge zone between the cylindrical, ceramic-coated HV electrode and the grounded aluminum plate. Using this apparatus, films containing a high and controllable [N] (see Fig. 1 and relationship (1) below) were deposited from the precursor gas mixture composed of N_2 (10 standard L per minute) and ethylene (C_2H_4, from 10 to 60 standard cubic cm per minute, sccm).

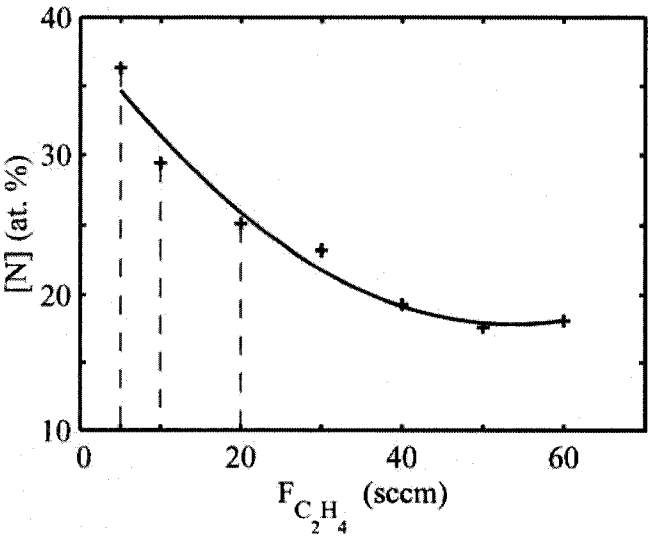


FIG. 1. Dependence of nitrogen concentration ([N]) in nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene films on the ethylene (C_2H_4) monomer flow rate ($F_{C_2H_4}$). The dashed vertical lines indicate the particular values used here; sccm, standard cubic cm per minute.

PPE:N films with different [N] were studied and compared, knowing that changing [N] values can lead to significantly different cell responses.[13] As shown in Fig. 1, changing the flow rate of the C_2H_4 gas precursor ($F_{C_2H_4}$), from the lowest value of 5 sccm to higher values up to 60 sccm gradually reduces [N], all other deposition conditions of course being maintained constant. Thus, for $F_{C_2H_4} = 5$ sccm, [N] ≈ 36%; for $F_{C_2H_4} = 10$ sccm, [N] ≈ 29.5; and for the highest F_{C2H4} value used here, 20 sccm, [N] ≈ 25%. In later parts of this text, we shall refer to the 3 different PPE:N coatings used in the present study in terms of the respective $F_{C_2H_4}$ values for their preparation, namely 5, 10, and 20 sccm. The surface compositions of PPE:N films were determined using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS);[13,22] throughout this article, we will be referring to their surface elemental concentrations ([X]) in terms of the elements that constitute PPE:N (N, carbon (C), and oxygen (O)); because XPS cannot detect hydrogen, [X] is given by:

$$[X] = \frac{X}{N + C + O} \times 100\%, \qquad (1)$$

N, O, and C being determined from XPS broad-scan spectra.[13,22] Other characterization methods used for PPE:N films included attenuated total internal reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), contact angle goniometry, atomic force microscopy, stylus profilometry, and spectroscopic ellipsometry, as described elsewhere.[13] Results (thickness, elemental composition, chemical bonding types) were reported in considerable detail in an earlier article by Girard-Lauriault *et al.*[13] Particularly noteworthy is the partial characterization of chemical functionalities at the films' surfaces; we know from chemical derivatization

experiments, coupled with XPS, and from FTIR measurements, that primary amines account for 5% to 10% of [N] and that nitriles (-C ≡ N) also constitute an important surface functionality.

Source and preparation of stem cells

MSCs were obtained from 15-mL aspirates from the intramedullary canal of donors (60–80 years of age) undergoing total hip replacement for osteoarthritis, using a protocol approved by the Research Ethics Committee of the Jewish General Hospital. Bone marrow aspirates were processed essentially as previously described.[4,23] Briefly, each aspirate was diluted 1:1 with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and layered over 1:1 Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences, Baie-d'Urfé, Quebec). After centrifugation at 900 *g* for 30 min, the mononuclear cell layer was removed from the interface, washed with DMEM, and re-suspended in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine. We obtained approximately 60 million cells of a stem cell–enriched fraction. The cells were plated in 20 mL of medium in a 176-cm^2 culture dish and incubated at 37°C in a 5% carbon dioxide–humidified atmosphere. After 72 h, nonadherent cells were discarded, and adherent cells were thoroughly washed twice with DMEM. Thereafter, the cells were expanded as previously described.[23]

Cell culture

One million passage 3 or 4 MSCs were cultured on each of the 3 different PPE:N coatings on BOPP, in DMEM plus 10% fetal bovine serum. Commercial polystyrene (PS) tissue culture dishes (Sarstedt, Inc., St-Leonard, Québec) were used as controls. The medium was changed every 2 days for up to 14 days, after which cells were harvested at different times or at the endpoint for gene expression studies.

Total ribonucleic acid isolation

Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from MSCs using a modification of the method of Chomcynski and Sacchi[24] using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario). After centrifugation for 15 min at 12,000 *g* at 4°C, the aqueous phase was precipitated in 1 volume of isopropanol, incubated for 20 min at room temperature, and centrifuged again for 15 min at 12,000 *g* at 4°C. The resulting RNA pellet was air dried and re-suspended in 40 μL of diethylpyrocarbonate-treated water, and 5 μL was assayed for RNA concentration and purity by measuring A_{260}/A_{280}.

Reverse transcription and polymerase chain reaction

The reverse transcription (RT) reaction was performed using 0.5 μg total RNA isolated from the MSCs in a total volume of 20 μL, containing 50 mM Tris-hydrochloric acid (HCl, pH 8.3); 75 mM potassium chloride; 3 mM magnesium chloride ($MgCl_2$), 10 mM dithiothreitol; 50 μM each 2′-deoxy-adenosine-5′triphosphate (dATP), 2′-deoxy-guanosine-5′triphosphate (dGTP), 2′-deoxy-cytidine-5′triphosphate (dCTP), and 2′-deoxythymidine-5′triphosphate (dTTP); and 200 units of Superscript II - RNAse H reverse transcriptase (Invitrogen).

PCR was performed in a total volume of 25 μL containing: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 1.5 mM $MgCl_2$; 0.4 mM each of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP; 0.8 μM of each primer; 1 μL of RT mixture; and 2.5 units of TAQ deoxyribonucleic acid (DNA) polymerase (Invitrogen). The 30 cycles of PCR included denaturation (94°C, 1 min 30 s), annealing (60°C, 45 s), and extension (72°C, 7 min). After agarose (1.6%) gel electrophoresis, PCR products were visualized using ethidium bromide staining and analyzed using the Bio-Rad VersaDoc image analysis system, equipped with a cooled CCD 12-bit camera (Bio-Rad, Mississauga, Ontario). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as reference for gel loading. To confirm the lack of chromosomal DNA contamination of RNA samples, PCR was also performed with RNA aliquots. After confirming that there was no band detected that indicated contamination of the DNA, we proceeded with the experiments.

The primer sequences used for PCR shown in Table 1 were chosen because they are specific for human DNA and they amplify a single product. GAPDH primers have been described in one of our earlier articles.[4]

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. Statistical differences between the treated and the control were analyzed using Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC) for each culture time. Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. All results are the average of 3 samples ± standard deviation.

RESULTS

Expression of type X collagen

The results of RT-PCR analyses of gene expression of type X collagen, related to GAPDH (a housekeeping gene), are shown in Fig. 2. Expression of type X collagen, a definitive marker for the hypertrophic phenotype,[6,16] was consistently detectable in MSCs cultured on control PS culture dishes from day 3 (Fig. 2 lane 1, "Ctl"). The expression of type X collagen did not change significantly throughout the culture period up to 14 days. In contrast, its expression was decreased when cultured on PPE:N coatings produced with $F_{C_2H_4}$ ranging from 5 to 20 sccm (Fig. 2 lanes 2, 3, and 4). It was almost completely suppressed by day 14, when MSCs were cultured on all of the studied PPE:N

TABLE 1. PRIMER SEQUENCES OF GENES STUDIED

Aggrecan	Forward: 5′-CTACGACGCCATCTGCTACA-3′ Reverse: 5′-ACGAGGTCCTCACTGGTGAA-3′	357 bp
Type X collagen α1 chain	Forward: 5′-ACAGGAATGCCTGTGTCTGCTTTTACT-3′ Reverse: 5′-CATTGGGAAGCTGGAGCCACACCTGGTC-3′	331 bp
Type I collagen α2 chain	Forward: 5′-CGGTTACCCTGGCAATATTG-3′ Reverse: 5′-TCCAGTGCGACCATCTTTT-3′	364 bp
Alkaline phosphatase	Forward: 5′-TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA-3′ Reverse: 5′-ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC-3′	454 bp
Bone sialoprotein	Forward: 5′-AATGAAAACGAAGAAAGCGAAG-3′ Reverse: 5′-ATCATAGCCATCGTAGCCTTGT-3′	450 bp
Osteocalcin	Forward: 5′-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3′ Reverse: 5′-GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC-3′	294 bp
Runt-related transcription factor 2	Forward: 5′-GGTTCAACGATCTGAGATTTG-3′ Reverse: 5′-CATACTGGGATGAGGAATGCGC-3′	230 bp
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Forward: 5′-GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC-3′ Reverse: 5′-CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3′	346 bp

surfaces. There was no apparent toxicity, as indicated by the lack of effect on GAPDH.

Expression of aggrecan and type I collagen

Because aggrecan and type II collagen have been used as markers of chondrogenesis,[3] we next explored whether the culture of MSCs on PPE:N could affect aggrecan and type II collagen expression. Furthermore, because stem cells express type I collagen,[4] we also wished to examine the effect on type I collagen expression when culturing MSCs on the present substrate materials.

Figures 3 and 4 show that there were no significant effects on aggrecan or type I collagen expression, respectively. The sole possible exception occurred on day 14, when there appeared to be some up-regulation of type I collagen for MSCs cultured on 10-sccm PPE:N. Furthermore, the data show that MSCs constitutively expressed aggrecan and type I collagen messages throughout the culture period. Type II collagen was not expressed at all, even in PS control cultures (data not shown).

Expression of alkaline phosphatase

The results of RT-PCR analyses of ALP gene expression are shown in Fig. 5. ALP expression appeared to be up-regulated when MSCs were cultured on PS control, although this appeared to decrease with time. In contrast, its expression was lower when cultured on all 3 PPE:N surfaces examined (Fig. 5 lanes 2, 3, and 4). The expression profiles were somewhat similar to those observed for type X collagen (Fig. 2), except that ALP expression levels did not seem to change when MSCs were cultured on any one of the PPE:N surfaces beyond day 14.

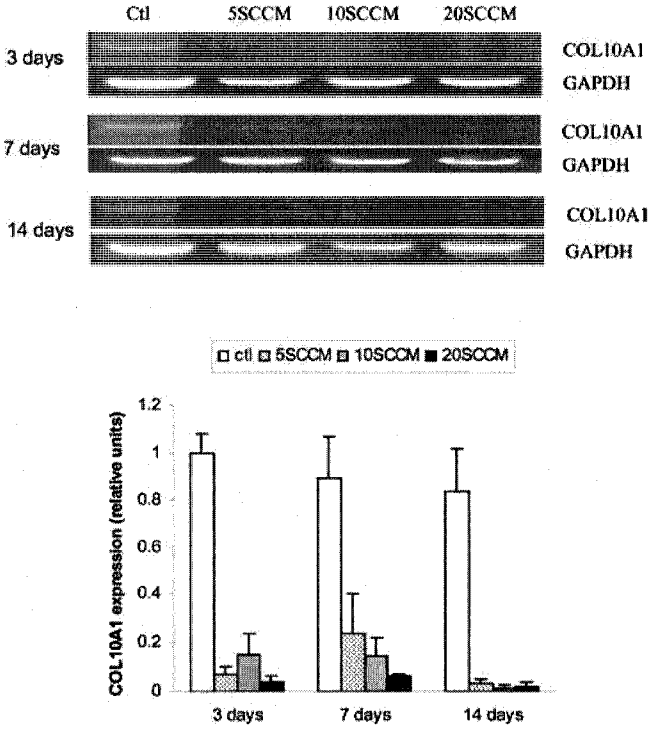
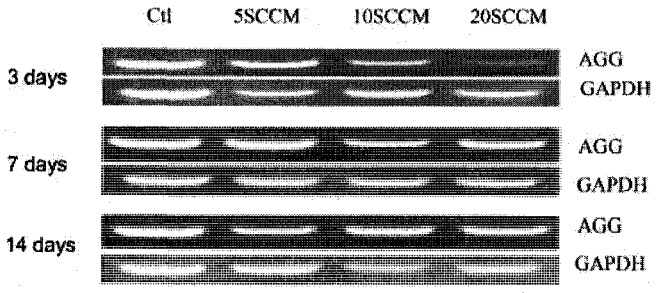
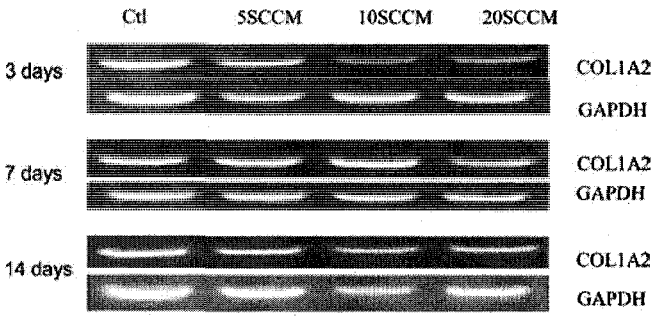


FIG. 2. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of type X collagen (COL10A1) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctr - polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene (PPE:N). Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. The labels "5 sccm" etc. refer to the ethylene flow rates used in the preparation of the particular PPE:N deposits (see Fig. 1). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.





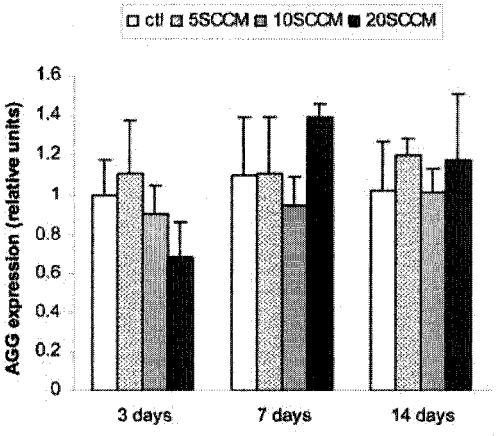


FIG. 3. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of aggrecan (AGG) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

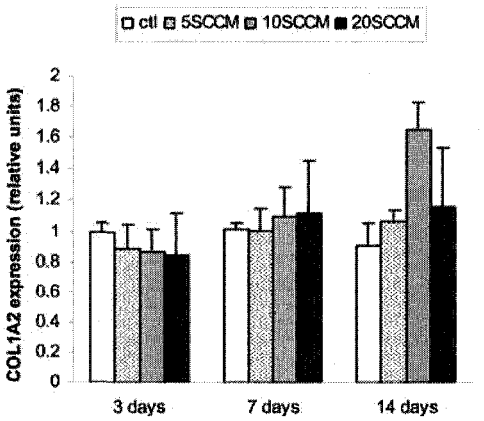


FIG. 4. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of type I collagen (COL1A2) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Expression of bone sialoprotein

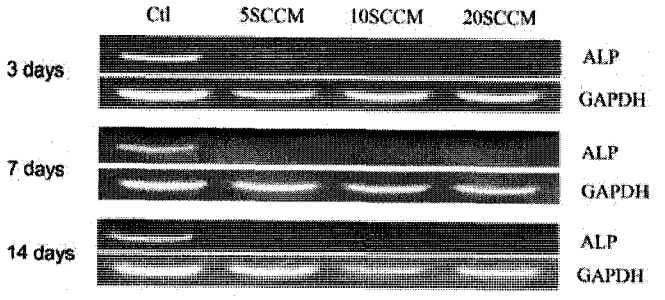
Because BSP has been used as one of the bone-specific markers,[18] we also wished to examine the effect on BSP expression of culturing MSCs on the present PPE:N substrate materials. Results presented in Fig. 6 show that BSP was expressed on day 3 for the case of MSCs cultured on PS control, but was slightly down-regulated later (Fig. 6 lane 1). Of special interest, however, is the finding that BSP expression was almost completely suppressed throughout the 14-day culture period on all of the PPE:N substrates we examined (Fig. 6 lanes 2, 3, and 4).

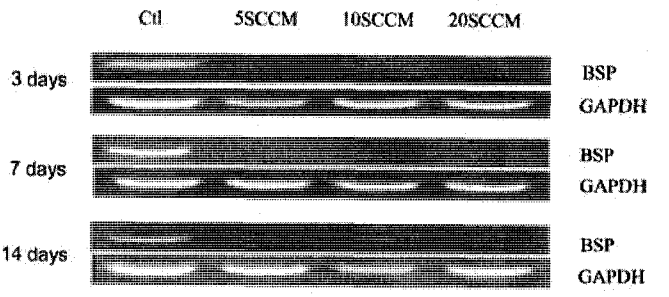
Expression of osteocalcin

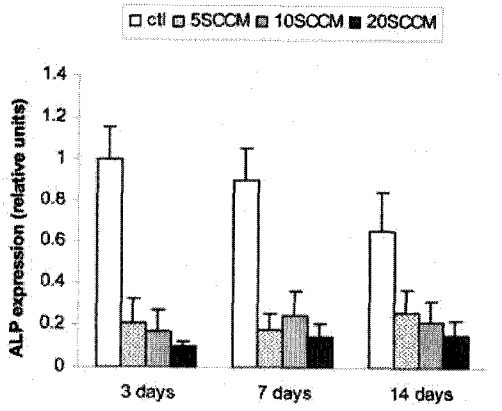
Because the major non-collagenous component of bone matrix, OC, has been used as another bone-specific marker,[18] we next explored whether the culture of MSCs on PS control or PPE:N surfaces could affect OC expression. Figure 7 shows that MSCs constitutively expressed OC from day 3 to day 14 on PS controls, although the levels appeared to drop slightly with time. OC expression was largely suppressed on PPE:N surfaces throughout the culture period, particularly on day 14 for the 20-sccm substrate material (Fig. 7 lanes 2, 3, and 4).

Expression of RUNX2

Because ALP, BSP, and OC expression appeared to be selectively suppressed when MSCs were cultured on PPE:N, it seems probable that the various PPE:N surfaces affected regulatory mechanisms that are requisite for bone cell growth and differentiation, as well as for skeletal homeostasis.[19] Accordingly, we tested the ability to regulate RUNX2 expression, a transcription factor that mediates osteoblast differentiation and bone formation.[20] Figure 8 shows that MSCs constitutively expressed RUNX2 from day 3 to day 14 on PS control surfaces, without the levels changing significantly with time. In contrast, the expression was largely suppressed when cultured on PPE:N, particularly by day 14 (Fig. 8 lanes 2, 3, and 4).







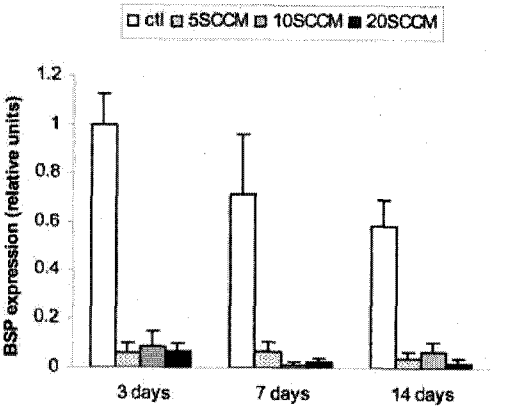


FIG. 5. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of alkaline phosphatase (ALP) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

FIG. 6. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of bone sialoprotein (BSP) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Cartilage and disc tissue engineering relies on the differentiation of MSCs to specific phenotypes. A current working hypothesis is that MSCs may represent an alternative cell source for the treatment of cartilage and intervertebral disc defects.[2,25] However, a major drawback of cartilage and disc tissue engineering is that human MSCs rapidly express type X collagen,[4,7] a marker of chondrocyte hypertrophy associated with endochondral ossification and osteogenic markers.[5,6,16] The results presented here suggest that MSCs obtained from the intramedullary canal of donors (60–80 years of age) undergoing total hip replacement for osteoarthritis, a clinically relevant source of stem cells, express not only type X collagen but also osteogenic differentiation markers (ALP, BSP, OC) and the transcription factor RUNX2. Recent studies have attempted to use growth factors to inhibit type X collagen expression.[7] Until recently,[4] no study had addressed the possible effect of the substratum on chondrocyte hypertrophy.

In the current study, we sought to examine the growth and differentiation potential of MSCs cultured on 3 different PPE:N surfaces. Using PPE:N as cell culture substrates for MSCs, PCR was used to assess the expression of aggrecan; type I, II, and X collagens; and ALP, BSP, OC, and RUNX2. However, because the cells remained fibroblastic, and aggrecan, ALP, BSP, OC, and type I and type X collagen were constitutively expressed, whereas type II collagen was not expressed at all, it should be considered that the expression of these genes reflects that the MSCs are committed to hypertrophy and osteogenesis.[4] Although aggrecan is supposed to be a marker of chondrogenesis, chondrocytes are thought to express type X collagen only when they become hypertrophic.[5,6,16]

The recent advances in our group in creating novel bioactive synthetic polymer surfaces with the aid of ultraviolet-photochemical and plasma-chemical processes,[4,13,21] particularly the latter, have enabled us to study the culture of MSCs on N-enriched ([N] up to ~20%) polymers such as BOPP and nylon-6 polyamide, as well as on super-rich ([N] ≥ 25%) plasma-polymerized thin films, PPE:N.[13] The latter substrates have distinguished themselves by their ability to adhere certain cell types that earlier resisted adhesion to all prior-known cell culture surfaces, for example, human U937 macrophages.[13] The current research is the first ever to report the effect on MSC genes when the cells are grown on PPE:N or similar [N]-rich plasma-polymer surfaces.

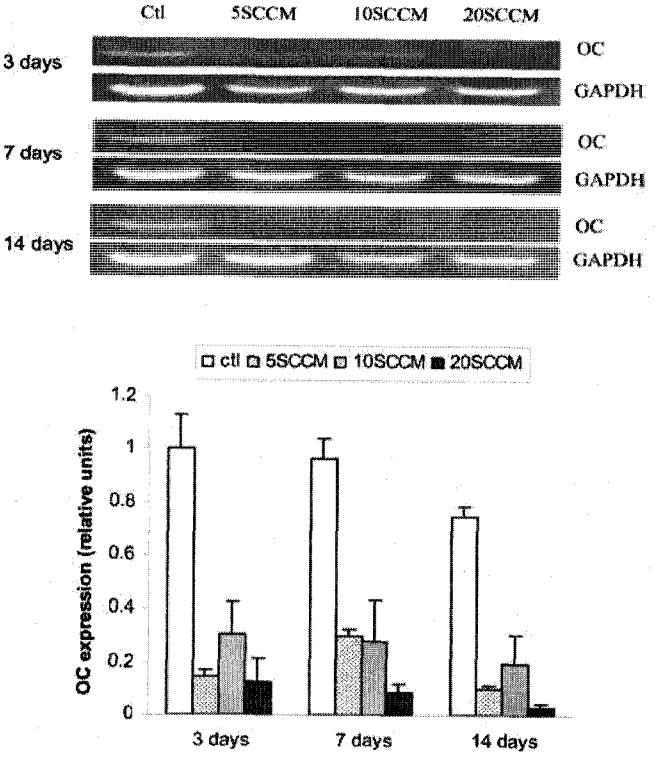


FIG. 7. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of osteocalcin (OC) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

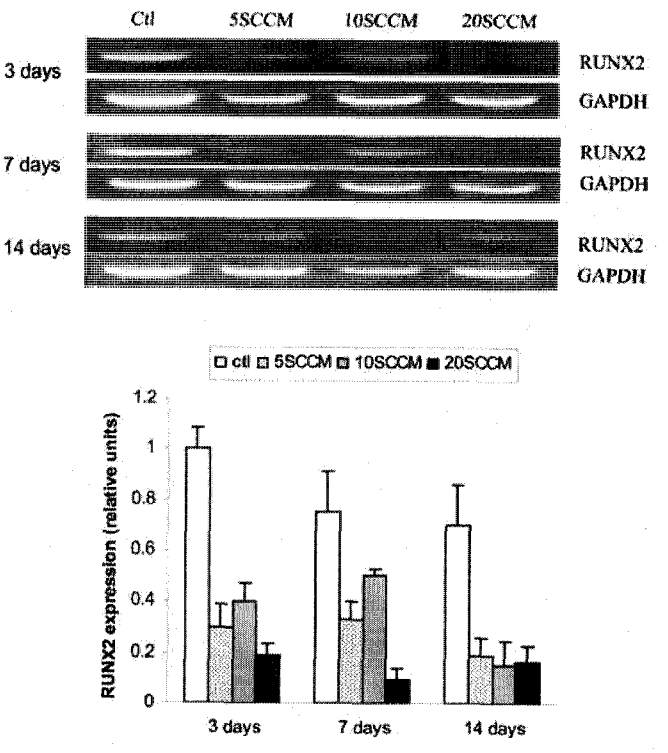


FIG. 8. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) expression in mesenchymal stem cells cultured on different surfaces. Ctl, polystyrene control; 5 standard cubic cm per minute (sccm); 10 sccm; 20 sccm nitrogen-doped plasma-polymerized ethylene. Results represent the mean ± standard deviation of 3 donors. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Our findings reveal that type X collagen, as well as ALP, BSP, and OC, but not type I collagen or aggrecan expression, were suppressed when cultured on the three different PPE:N surfaces examined. Thus, these results indicate that PPE:N may be a suitable substrate for inducing MSCs to a disc-like phenotype for tissue engineering of intervertebral discs and cartilage, in which hypertrophy and osteogenesis is suppressed; more specifically, this statement applies to PPE:N with [N] $\geq 25\%$. However, in these experiments there were no significant differences on gene expression between PPE:N coatings fabricated with $F_{C_2H_4} = 5$, 10 or 20 sccm. Our earlier study showed that while both ammonia plasma-treated and untreated nylon-6 polyamide partially inhibited type X collagen expression, plasma-treated polypropylene (BOPP) almost completely inhibited its expression; the highest [N] value measured for those modified polymer surfaces was 16.5%.[4] However, thin PPE:N deposits on BOPP evidently have a much stronger suppression of gene expression, as we have shown here. Moreover, PPE:N thin films have several advantages over plasma-functionalized surfaces: in this work they are deposited using an atmospheric pressure plasma polymerization technique, that is both economical and efficient. An important attribute is the high, stable (not prone to the so-called "ageing" phenomenon[22]) and adjustable [N] of PPE:N, its relatively high primary amine concentration, and its high surface energy (wettability). Furthermore, since this is a coating process (as opposed to a surface modification technique[4,21,22]), PPE:N films can be deposited on many different substrates, including inorganic ones. Based on these characteristics, PPE:N is an excellent candidate for cell culture experiments; in the light of what has been discussed above, of the results presented in Fig. 1, and of the fact that some cell processes have been observed to manifest a "critical [N] value" below which PPE:N is ineffective (see Ref.[13]), it would be intriguing to investigate the possible existence of a lower limit in [N] for PPE:N films in this present context.

Now, total [N] at the surface is an admittedly crude means to characterize the substrates for evaluating their potential to influence cell processes; more realistically, the concentrations of various surface-chemical functionalities, for example amines, imines, nitriles, amides, acids, and alcohols, should be taken into account. The latter 3 are encountered because bound oxygen is always incorporated into plasma polymer films as a result of the reaction of residual surface radicals with ambient air. Unfortunately, plasma polymers are notoriously difficult to characterize, because of their random, highly crosslinked structure; the

resulting peak broadening, therefore, greatly complicates quantitative, even qualitative, analysis using most spectroscopic methods (high-resolution XPS, FTIR, solid-state, nuclear magnetic resonance [NMR], etc.), and this inherently limits our knowledge of the specific surface chemistries of PPE:N films.

However, our discovery that all PPE:N film compositions examined here can suppress markers of hypertrophy and osteogenesis on committed MSCs immediately suggested that this coating material may affect signaling mechanisms in MSCs. MSCs possess diverse cell-surface receptors, enabling them to respond to various external signals that initiate differentiation into a variety of cell types.[26] It is tempting to speculate that this may work by deactivating the "hedgehog signaling" pathway,[27,28] known to be involved in the development of bone cells. However, elucidating the mechanisms involved in suppression of hypertrophy and osteogenesis in committed human MSCs will require further studies. Furthermore, we did not compare the differentiation ability of the cells recovered after the 14-day culture on the substrate with the highest [N] value to determine whether they can still be induced to chondrocytes or adipocytes. Studies are now underway to determine the differentiation potential of these cells when treated with the appropriate chondrogenic or adipogenic cocktails. Moreover, although we show suppression of hypertrophy and osteogenesis, it appears that chondrogenesis is not induced, as evidenced by the absence of type II collagen expression.

Cell adhesion to extracellular matrix ligands through integrin receptors plays a central role in tissue formation and maintenance by anchoring cells and triggering signals that direct cell proliferation and differentiation.[29] Stem cells use the beta 1 integrin adhesion receptor subfamily to adhere and proliferate,[30] but it remains to be determined whether these mechanisms are active in the present circumstances. Initiatives that rely on controlling the adsorption of extracellular matrix ligands, or on engineering synthetic supports that present bioadhesive motifs from extracellular matrix proteins, are providing promising strategies for the engineering of matrices that control cell adhesion and signaling.[31]

The current work paves the way for systems that could help select specific phenotypes on demand, which, in turn, opens the door to a wide variety of applications. It is the first time, to our knowledge, that anyone has reported a true phenotype selectivity of stem cell differentiation based on a particular surface property, in this case apparently the high [N] value ($\geq$ 25%) of PPE:N. As a result, we believe that these studies lay the fundamental groundwork for a new paradigm in surface engineering, one that may be of considerable significance in materials science, biology and medicine.[4,13]

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from the Canadian Institutes of Health Research, AO Foundation (Switzerland), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Caplan, A.I., and Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med **7,** 259, 2001.
2. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res **9,** 641, 1991.
3. Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., and Murphy, J.M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res **268,** 189, 2001.
4. Nelea, V., Luo, L., Demers, C.N., Antoniou, J., Petit, A., Lerouge, S., Wertheimer, M.R., and Mwale, F. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. J Biomed Mater Res **75A,** 216, 2005.
5. Mwale, F., Tchetina, E., Wu, C.W., and Poole, A.R. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. J Bone Miner Res **17,** 275, 2002.
6. Ayad, S., Kwan, A.P., and Grant, M.E. Partial characterization of type X collagen from bovine growth-plate cartilage. Evidence that type X collagen is processed in vivo. FEBS Lett **220,** 181, 1987.
7. Steinert, A., Weber, M., Dimmler, A., Julius, C., Schutze, N., Noth, U., Cramer, H., Eulert, J., Zimmermann, U., and Hendrich, C. Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. J Orthop Res **21,** 1090, 2003.
8. Acarturk, T.O., Peel, M.M., Petrosko, P., LaFramboise, W., Johnson, P.C., and DiMilla, P.A. Control of attachment, morphology, and proliferation of skeletal myoblasts on silanized glass. J Biomed Mater Res **44,** 355, 1999.
9. Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., and Schwartz, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials **17,** 137, 1996.
10. Britland, S., Clark, P., Connolly, P., and Moores, G. Micropatterned substratum adhesiveness: a model for morphogenetic cues controlling cell behavior. Exp Cell Res **198,** 124, 1992.
11. Hu, Y., Winn, S.R., Krajbich, I., and Hollinger, J.O. Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro. J Biomed Mater Res **64A,** 583, 2003.
12. Curran, J.M., Chen, R., and Hunt, J.A. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. Biomaterials **26,** 7057, 2005.
13. Girard-Lauriault, P.L., Mwale, F., Iordanova, M., Demers, C.N., Desjardins, P., and Wertheimer, M.R. Atmospheric pressure deposition of micropatterned N-rich plasma-polymer films for tissue engineering. Plasma Proc Polymers **2,** 263, 2005.
14. Salasznyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., and Plopper, G.E. Adhesion to vitronectin and collagen I

promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biomed Biotechnol **1,** 24, 2004.

15. Li, W.J., Tuli, R., Huang, X., Laquerriere, P., and Tuan, R.S. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. Biomaterials **26,** 5158, 2005.
16. Mwale, F., Billinghurst, C., Wu, W., Alini, M., Webber, C., Reiner, A., Ionescu, M., Poole, J., and Poole, A.R. Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. Dev Dyn **218,** 648, 2000.
17. Aubin, J.E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. J Cell Biochem **72,** 396, 1999.
18. zur Nieden, N.I., Kempka, G., and Ahr, H.J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation **71,** 18, 2003.
19. Stein, G.S., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Young, D.W., Choi, J.Y., and Pockwinse, S.M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. Oncogene **23,** 4315, 2004.
20. Lian, J.B., and Stein, G.S. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. Curr Pharm Des **9,** 2677, 2003.
21. Bullett, N.A., Bullett, D.P., Truica-Marasecu, F., Lerouge, S., Mwale, F., and Wertheimer, M.R. Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture. Appl Surf Sci **235,** 395, 2004.
22. Guimond, S., Radu, I., Czeremuszkin, G., Carlsson, D.J., and Wertheimer, M.R. Biaxially oriented polypropylene (BOPP) surface modification by nitrogen atmospheric pressure glow discharge (APGD) and by air corona. Plasmas Polym **7,** 71, 2002.
23. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., and Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A **97,** 3213, 2000.
24. Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem **162,** 156, 1987.
25. Mwale, F., Roughley, P., and Antoniou, J. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. Eur Cell Mater **8,** 58, 2004.
26. Oreffo, R.O., Kusec, V., Romberg, S., and Triffitt, J.T. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. J Cell Biochem **75,** 382, 1999.
27. Chung, U.I., Kawaguchi, H., Takato, T., and Nakamura, K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. J Orthop Sci **9,** 410, 2004.
28. Hoffmann, A., and Gross, G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr **11,** 23, 2001.
29. Akiyama, S.K. Integrins in cell adhesion and signaling. Hum Cell **9,** 181, 1996.
30. Gronthos, S., Simmons, P.J., Graves, S.E., and Robey, P.G. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. Bone **28,** 174, 2001.
31. Garcia, A.J., and Keselowsky, B.G. Biomimetic surfaces for control of cell adhesion to facilitate bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr **12,** 151, 2002.

Address reprint requests to:
Fackson Mwale, Ph.D.
Division of Orthopaedic Surgery
McGill University
Lady Davis Institute for Medical Research
3755 Chemin de la Cote Ste-Catherine
Montréal, Québec H3T 1E2, Canada

E-mail: fmwale@ldi.jgh.mcgill.ca

241

ANNEXE II

NITROGEN-RICH COATINGS FOR PROMOTING HEALING AROUND STENT-GRAFTS AFTER ENDOVASCULAR ANEURYSM REPAIR

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Biomaterials 28 (2007) 1209–1217
Biomaterials
www.elsevier.com/locate/biomaterials

Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair

Sophie Lerouge[a,b,*], Annie Major[a], Pierre-Luc Girault-Lauriault[c], Marc-André Raymond[a], Patrick Laplante[a], Gilles Soulez[b], Fackson Mwale[d], Michael R. Wertheimer[c], Marie-Josée Hébert[a]

[a]*Research Center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, QC, Canada*
[b]*Department of Radiology, Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada*
[c]*Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montréal, QC, Canada*
[d]*Lady Davis Institute and Department of Surgery, McGill University, Montréal, QC, Canada*

Received 15 August 2006; accepted 26 October 2006

Abstract

Complications following endovascular aneurysm repair (EVAR) are related to deficient healing around the stent-graft (SG). New generations of SG with surface properties that foster vascular repair could overcome this limitation. Our goal was to evaluate the potential of a new nitrogen-rich plasma-polymerised biomaterial, designated PPE:N, as an external coating for polyethylene terephtalate (PET)- or polytetrafluoro-ethylene (PTFE)-based SGs, to promote healing around the implant. Thin PPE:N coatings were deposited on PET and PTFE films. Then, adhesion, growth, migration and resistance to apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and fibroblasts, as well as myofibroblast differentiation, were assessed in vitro. In another experimental group, chondroitin sulphate (CS), a newly described mediator of vascular repair, was added to normal culture medium, to search for possible additional benefit. PPE:N-coatings, especially on PET, increased and accelerated cell adhesion and growth, compared with control PET and with standard polystyrene culture plates (PCP). PPE:N was also found to increase the resistance to apoptosis in VSMC, an important finding as aneurysms are characterised by VMSC depletion caused by a pro-apoptotic phenotype. Addition of CS in solution further increased migration and resistance to apoptosis. In conclusion, PPE:N-coating and/or CS could promote vascular repair around SGs following EVAR.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Aneurysm; Stent-graft; Plasma polymerisation; Chondroitin sulphate; Cell adhesion; Apoptosis

1. Introduction

In industrialised countries, where the prevalence and surgical risks of abdominal aortic aneurysms (AAA) are increasing in ageing populations [1,2], endovascular aneurysm repair (EVAR) with a stent-graft (SG) prosthesis offers a promising, less invasive alternative to open surgery. Its widespread use is, however, limited by frequent complications such as SG migration [3,4] and persistence of blood flow into the aneurysm (i.e. endoleaks) [5–7]. Recently, two large randomised studies comparing EVAR with open repair showed that despite a gain in peri-operative morbidity and mortality in the EVAR group, there was no difference in mid-term mortality between both groups, and more reinterventions were observed in the EVAR group [8,9]. Mounting evidence suggests that complications are related to deficient healing around SGs. Even several years after implantation, SGs were found to be surrounded by an amorphous, unorganised thrombus composed mainly of a fibrin matrix and phantoms of red blood cells, and characterised by a strong deficit in vascular smooth muscle cells (VSMC),

*Corresponding author. Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV), JA de Sève Building, room Y-1603, Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke St. East, Montreal, Que., Canada H2L 4M1.
Tel.: +1 514890 8000x28821; fax: +1 514 412 7785.
E-mail address: sophie.lerouge@umontreal.ca (S. Lerouge).

0142-9612/$ - see front matter © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biomaterials.2006.10.033

myofibroblasts and collagenous extracellular matrix (ECM) [10–12]. The lack of vascular cell ingrowth into the graft material limits its fixation to the vessel wall and prevents a good seal at the neck of the aneurysm. More generally, it raises concern about the long-term outcome of this treatment.

Pathophysiology of AAA and surface properties of SGs are two major factors that can explain deficient healing around SGs. SGs consist of a metallic structure covered by a fabric of woven poly(ethylene terephtalate) fibers (polyethylene terephtalate (PET), Dacron®) or by expanded polytetrafluoro-ethylene (ePTFE). These two biomaterials have a long clinical history as vascular implants due to their relatively low thrombogenicity and good mechanical properties, but they are not optimal for SG incorporation. The hydrophobic surface of ePTFE is known to drastically limit cell adhesion [13]. Dacron® grafts are less inert, and have been shown to result in slightly improved but still insufficient incorporation [14]. Moreover, the aneurysm wall is characterised by a strong depletion of VSMC, related to increased apoptosis [15,16]. Development of an external coating that can enhance cell adhesion, proliferation, migration and resistance to apoptosis should help increase SG biological fixation into the aneurysm and improve the outcome of this minimally invasive procedure.

We have recently developed a novel plasma-polymerised thin film coating that is extremely rich in nitrogen (hereafter called "PPE:N", or N-doped plasma-polymerised ethylene), which increases the adhesion of different cell types [17]. The principal objective of this study was to explore the potential of this new biomaterial as an external coating for PET- or PTFE-based SGs to improve healing around the implant.

Chondroitin sulphate (CS) has recently been identified among cryptic bioactive factors released by ECM proteolysis, which foster a fibroproliferative reaction during normal vascular repair [18]. CS increases resistance to apoptosis of VMSC and fibroblasts and promotes fibroblast differentiation into a contractile phenotype in vitro [18,19]. Hence, this readily available polysaccharide could be incorporated into a bioactive coating to foster further SG incorporation. Therefore, the second objective of this study was to explore the potential of CS to add further benefit to the PPE:N coating in promoting a fibro-proliferative reaction in vitro.

PPE:N coatings were deposited onto thin commercial PET and PTFE films; physico-chemical characterizations of the same coatings deposited on glass were carried out using complementary techniques including attenuated total reflectance (ATR) FT-IR, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, including with chemical derivatization), contact angle goniometry, atomic force microscopy (AFM), and ellipsometry. Since these were already reported elsewhere [17], we shall briefly summarise them in Section 4 only. In this work, surface characterization was limited to XPS and to contact angle measurements, in order to assess possible differences between coatings on the current substrates with those previously deposited on glass or on polypropylene [17]. The effect of PPE:N coatings was evaluated in vitro on VSMC and fibroblasts, the two major cell types implicated in vascular repair. Cell adhesion, growth and resistance to apoptosis, as well as myofibroblast differentiation were assessed in normal media with or without the addition of CS in solution.

2. Materials and methods

2.1. Plasma polymer deposition

PET and PTFE films were obtained from DuPont Teijin Films (Hopewell,VA) and from GoodFellow (Devon, PA), respectively. PPE:N coatings were deposited on both films using an atmospheric pressure plasma deposition system described elsewhere [17]. Briefly, this system comprises a cylindrical, dielectric-coated stainless steel high voltage (HV) electrode and a grounded planar Al electrode, covered by a 2 mm thick glass plate that serves as a second dielectric layer. The entire apparatus is placed inside a transparent plastic enclosure containing the controlled gas atmosphere at a pressure of 1 bar. The PET or PTFE film samples were placed on the glass plate, which was moved under the HV electrode at precisely controlled speed. The precursor gas mixture composed of nitrogen (N_2, 10 standard liters per minute, (slm) and ethylene (C_2H_4, 10 standard cubic centimeters per minute (sccm)) (1000:1 ratio) was introduced into the discharge zone, an adjustable gap between the HV electrode and the glass plate, usually 1 mm. The discharge duration was selected so as to create a 75 nm-thick coating. PET and PTFE films were sterilised using ethylene oxide and ultra-violet (UV) irradiation, respectively, prior to PPE:N film deposition. These sterilization methods were chosen since they induce minimal surface modification, as assessed by contact angle measurements described below. After plasma coating, specimens were still sterile since plasma discharges are known for their bactericidal effect [20].

2.2. Film characterisation

The elemental compositions of PPE:N films were determined by XPS, using a Kratos Axis Ultra system with non-monochromatic Mg–Kα radiation. The spectra were acquired normal to the sample surface; survey spectra were used to determine the relative nitrogen concentration, [N] (expressed as the percentage of N with respect to the sum of all detected elements, excluding hydrogen, which is not detected by XPS). PPE:N compositions on PET and PTFE were compared to those of coatings deposited on glass and propylene surfaces [17].

The wettability of PET and PTFE before and after PPE:N coating was evaluated by static contact angle measurements (Visual Contact Angle (VCA) Optima, AST Products, Billerica, MA). The surface free energy, γ_s, and its polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) components were calculated after multiple ($n \geqslant 4$) measurements of contact angles with water, formamide, ethylene glycol and tricresyl phosphate (TCP), according to the method described by Kaelble [21]. Contact angle measurements were also used to assess possible surface damage induced on the films by sterilization.

2.3. Cell lines and materials

A7R5 cells, a clonal smooth muscle cell (VSMC) line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM/F12 supplemented. WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue (ATCC, Rockville, MD) were grown in Fibroblast Basal Medium (Cambrex, Walkersville, MD), and used at passages 4–15. Culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; MEDICORP, Que., Canada) and 1% penicillin-streptomycin (GibcoBRL, Invitrogen, Grand Island, NY). For each experiment, coated and control films were cut to fit into 6- or 24-well polystyrene culture

plates (PCP). PCP surfaces, commonly used for cell culture, served as a positive control in each test. Chondroitin 4-sulphate was acquired from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

2.4. Cell adhesion, apoptosis, growth, migration and differentiation assays

Cell adhesion after 1–4 h of culture on the different film surfaces was determined using crystal violet staining [18], as detailed below. One square cm film samples were placed at the bottoms of 24-well PCP; their floatation to the surface was prevented by a cloning cylinder (Fisher, Pittsburgh, PA) of 10 mm diameter and height. This also allowed controlling the surface area where cells could adhere, and thereby rendered the tests reproducible. Cells were seeded in the cloning cylinder in 200 μl of normal medium and left to adhere for 1–4 h at 37 °C in an incubator with 5% CO_2. Films were then washed twice in PBS to remove non-adherent cells; 50 μl of 0.75% crystal violet/30% acetic acid was added to 500 μl of PBS for 15 min. Films were then washed and allowed to dry. Three micrographs at 400 × magnification were taken by light microscopy for each sample; the numbers of adherent cells were counted on each micrograph by a single investigator blinded to experimental conditions.

Resistance to apoptosis of VSMC adhered on coated films was compared to that of cells adhered on unmodified films and PCP. Apoptosis was induced by serum starvation and was assessed using fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilised cells stained with Hoechst 33342 (2′-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5′-bi-1H-benzimidazole (HT)) and propidium iodide (PI), as described in our previous work [19–22]. This technique was shown to accurately differentiate early apoptotic, late apoptotic, and primary necrotic cells, and it is more accurate for the evaluation of apoptosis than TUNEL assays [23]. Briefly, cells were left to adhere and grow to confluence on films in 24-well PCP. Apoptosis was induced by serum starvation for 4, 8, 16 or 24 h. HT (1 μg/ml) was added for 10 min at 37 °C. To prevent further uptake of HT, cells were washed with PBS. PI was added to each sample to a final concentration of 5 μg/ml, immediately before analysis by fluorescence microscopy (excitation filter $\lambda = 360.4$ nm). The percentages of normal, apoptotic, and necrotic cells adherent to each sample surface were calculated based on three areas of observation, at a magnification of 200 × . To evaluate the impact of CS on VSMC apoptosis on the various surfaces, CS was added to the serum-free (SS) medium at a concentration of 0, 125, 250 or 500 μg/ml [18] ($n \geqslant 4$). Experiments with 8 h serum starvation were performed in triplicate.

To compare cell growth on the various surfaces, VSMC were added within the cloning cylinder placed on film samples and left to adhere during 4 h. To counterbalance the lower degree of cell adhesion on virgin surfaces (see Section 3) and to obtain comparable numbers of adherent cells on each surface after 4 h, 10,000 cells were added in wells containing the virgin films, but only 5000 cells on coated film samples. After 4 h, media were changed to remove non-adherent cells (henceforth designated "t_0"). Cells were then allowed to grow for 0, 2, 4 and 7 days. Cell numbers at each time point were evaluated on 6 wells for each type of surface by HT-PI staining, according to the apoptosis protocol described above. Data were expressed as the percentage of initial cell numbers (at t_0) on a similar surface.

Cell migration on each surface, with and without CS, was evaluated with an adapted wound assay [24]. Cells were grown to near confluence on both control and PPE:N-coated film samples at the bottom of 24-well plates, in the centre of which a 23G stainless steel needle (BD-Canada, Oakville, ON) had been placed horizontally. The needle was then gently removed, leaving a 0.5 mm-wide space free of cells. Cells were then left to migrate for 12 h in normal serum, with or without addition of CS at concentrations of 125, 250 or 500 μg/ml. Cells were washed and stained with crystal violet, as described above. Migration was assessed using light microscopy at a magnification of 100 × . Migration was defined as the ratio of (numbers of cells present in the partially denuded experimental area over the number of cells present in the initially denuded control area) × 100. Three fields per well were evaluated, and experiments were done in duplicate.

Myofibroblast differentiation, as characterised by expression of alpha-SMA, was assessed by immunoblotting. Fibroblasts were plated on virgin and coated film samples at the bottom of 6-well PCPs and allowed to reach confluence. They were then kept in normal culture medium (changed every other day) for 7 days and retrieved by trypsination. Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed as we previously described [19]. The antibody used was anti-α-smooth muscle actin (anti-α-SMA; Sigma, St. Louis, MO). All membranes were stripped (2% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol and 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) at 50 °C for 30 min by gentle shaking, then reprobed with anti-α-tubulin monoclonal antibody (Oncogene, Boston, MA) as a control for protein loading.

2.5. Statistical analyses

Results are expressed as mean values ± standard deviation (SD). Data were analysed using Student t-tests or multivariate ANOVA, as appropriate. A p-value of 0.05 or less was considered significant.

3. Results

3.1. Coating characterisation

As expected, PPE:N coatings possessed high nitrogen contents ([N] ~32%), as determined by XPS analysis (Table 1), values on PET being similar to those on glass and polypropylene substrates used in previous work [17]. On PTFE, however, the first set of experiments revealed about 8% F content (see Table 1). This may be due to some uncoated regions or to volatilised F incorporated into the coating during plasma deposition, or possibly to a combination of both. To avoid this, surface pre-treatment of the PTFE with nitrogen plasma was performed prior to PPE:N deposition, which yielded surfaces with elemental compositions close to those of coated PET and glass, except for a small amount of F (Table 1, PTFE, second set of experiments). The measured elemental concentrations of virgin PET and PTFE differ slightly from those expected from the molecular formulae of the polymers (71.5% and 33.5% carbon for PET and PTFE, respectively). This disparity is due to unavoidable contamination of the surfaces by atmospheric hydrocarbons.

Contact angle measurements showed that the PPE:N-coated surfaces exhibit substantially increased wettability (reduced contact angles), especially in the case of the strongly hydrophobic PTFE surface (Fig. 1). The films'

Table 1
Relative elemental compositions, determined from XPS survey spectra (atomic %)

Elemental composition (%)	C	N	O	F
Virgin PET	79	0	21	0
Virgin PTFE	36	0	0	64
PPE:N-coated PET	65	32	3	0
PPE:N-coated PTFE (first set)	58	25	9	8
PPE:N-coated PTFE (second set)[a]	69	29	1.5	0.5

[a]Deposition following surface pre-treatment with N_2 plasma.

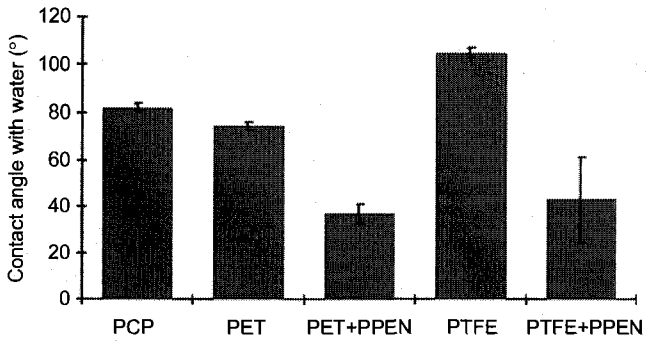


Fig. 1. Values of water contact angle for control and PPE:N-coated PET and PTFE surfaces, in comparison with polystyrene culture plates (PCP)(mean + SD).

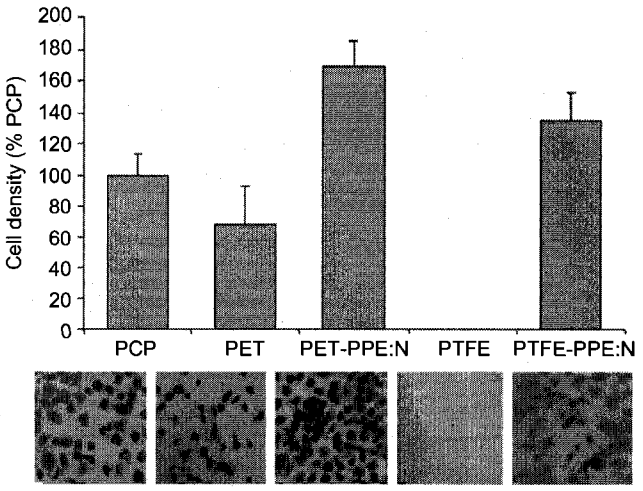


Fig. 2. VSMC adhesion after 1 h on PCP, control and coated PET and PTFE films: the cell density is expressed as a percentage compared to that on PCP surfaces. Most cells manifested a rounded morphology on PCP and control PET, while spreading is observed on the PPE:N-coated films. Results are represented as mean and standard deviation.

surface energies, γ_s, indicative of their wettability by aqueous media, was found to increase from 38 or 25 mN/m (or dynes/cm) for virgin PET and PTFE, respectively, to about 56 mN/m for the PPE:N-coated surfaces, the same value reported previously for PPE:N-coated glass [17]. While coated PET and PTFE exhibit similar average wettabilities, a higher standard deviation was observed for the coated PTFE. This can be explained by the presence of some areas on the samples having contact angles close to 80° and confirms the inhomogeneity of the coating on this substrate.

3.2. Cell adhesion, apoptosis, growth, migration and differentiation

Cell adhesion on the surface is the first cellular event required to promote a strong biological fixation of the SG. PPE:N coatings do increase the adhesion and adhesion rate of VSMC and fibroblasts compared to untreated control surfaces ($p<0.001$), as well as to PCP, as shown in Figs. 2 and 3. Virtually, no adhesion is seen to have occurred on untreated PTFE films (thus, other biological endpoints could not be tested on these surfaces). In contrast, PPE:N-coated PTFE was covered with VSMCs. PPE:N-coated PET gave even higher cell density ($p = 0.05$). The adhesion rate was higher on coated PET: adhesion reached the maximal level after 1 h on coated PET, whereas the number of adherent cells was still increasing between 1 and 4 h on virgin PET (Fig. 3). Differences between the two surfaces were still significant after 4 h ($p>0.05$). While after 1 h most VMSCs exhibited a rounded morphology on control PET, cell spreading was observed on the PPE:N-coated PET (Fig. 2). A similar behaviour was also observed with fibroblasts (Fig. 3b).

Cell growth was enhanced on PPE:N-coated PET compared to all other surfaces, including PCP. Difference was already significant after 48 h (Fig. 4). After 7 days, cell growth on control PET was significantly lower than on the other three materials ($p<0.05$).

Regarding resistance to apoptosis, VSMC cultured in the presence of normal FBS-containing medium displayed a

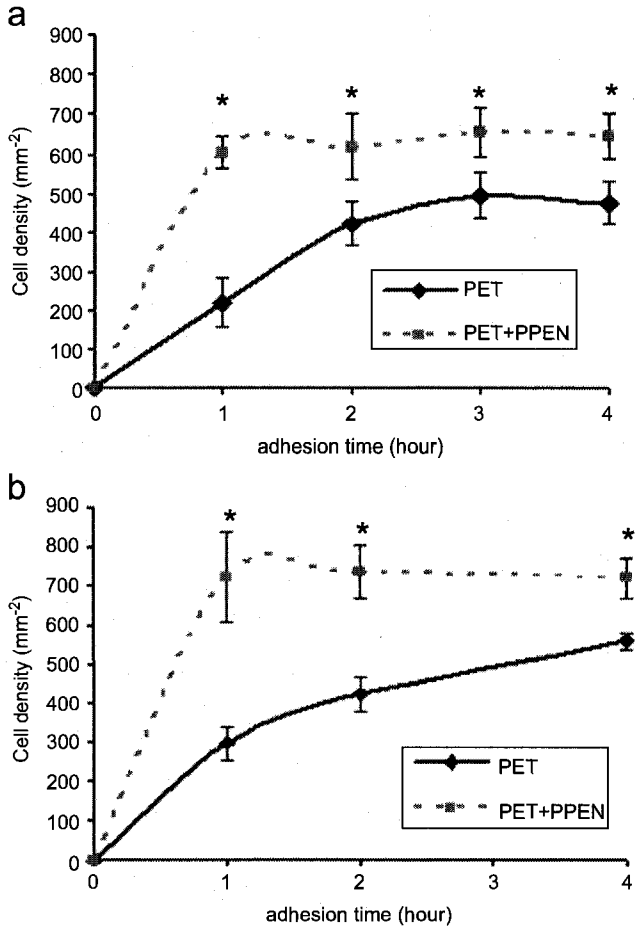


Fig. 3. Rate of adhesion of VSMC (a) and fibroblasts (b) on PPE:N-coated and control PET films, expressed as densities of cells on the surfaces after 1, 2, 3 and 4 h of incubation (*$p<0.001$, $n = 6$).

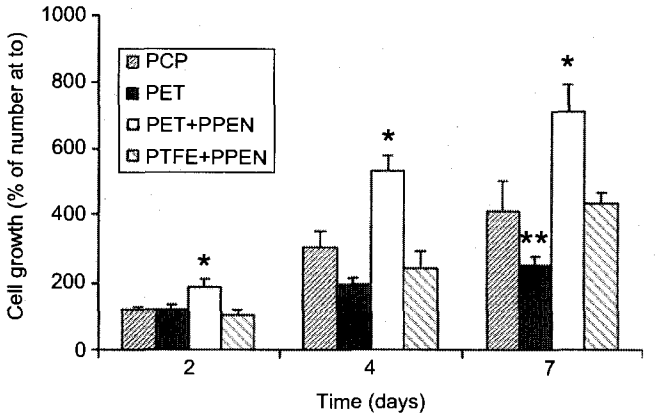


Fig. 4. Cell growth on PPE:N-coated films, compared to that on virgin PET and on PCP. Cell densities are expressed as a percentage with respect to those observed at t_0 (4 h of culture) for each surface (*PET + PPE:N is significantly higher than for all other surfaces ($p<0.05$); **PET is significantly lower than for all other surfaces ($p<0.05$)).

higher rate of apoptosis when grown on PET films as compared with PCP (5.8±2.9% versus 2.3±1.0%, $p<0.05$). No difference was found between PCP and PET-PPE:N (2.3±1.0% versus 2.5±0.4%, $p=0.95$) (Fig. 5a). As availability of growth factors may be limited in the abluminal side of the SG, which will not be in direct contact with flowing blood, we evaluated apoptosis levels of VSMC grown on the various surfaces and exposed to SS medium. The percentages of apoptotic VSMC increased drastically when exposed to SS for 8 h, especially for the case of control PET (35.4±4.0%), but to a lesser extent on PPE:N coatings (16.4±2.2%), even though the latter was still significantly higher than on PCP (significant differences were found between all groups ($p<0.001$)). Less benefit was found in the case of PPE:N-coated PTFE, on which cells in normal or SS-medium showed significantly higher apoptosis than those on the coated PET surfaces ($p<0.001$).

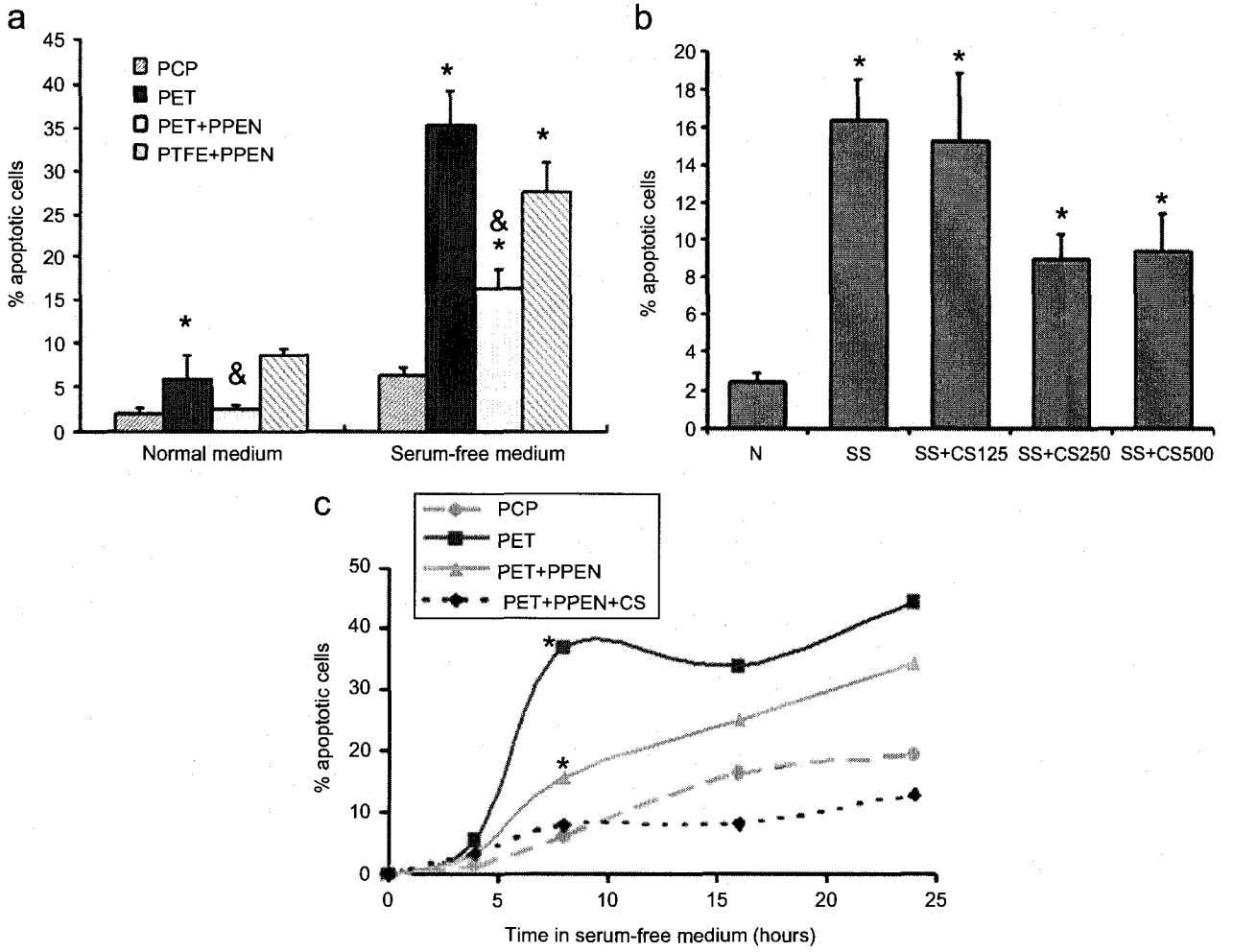


Fig. 5. (a) Percentages of apoptotic VSMCs grown on different surfaces in normal and serum-free (SS) media for 8 h. (*significantly different than PCP ($p<0.05$); & significantly different than PET ($p<0.01$)); (b) CS dose dependence of VMSC apoptosis (*$p<0.01$) for the case of PPE:N-coated PET; (c) Percentages of apoptotic VSMCs after 4, 8, 16, and 24 days in serum-free media (PPEN-PET + CS: VSMC apoptosis on PPE:N in SS with an addition of 250 μ/ml CS. Since experiments at 4, 16 and 24 h were not performed in duplicate, statistical analysis was here only performed for the time point at 8 h *$p<0.05$).

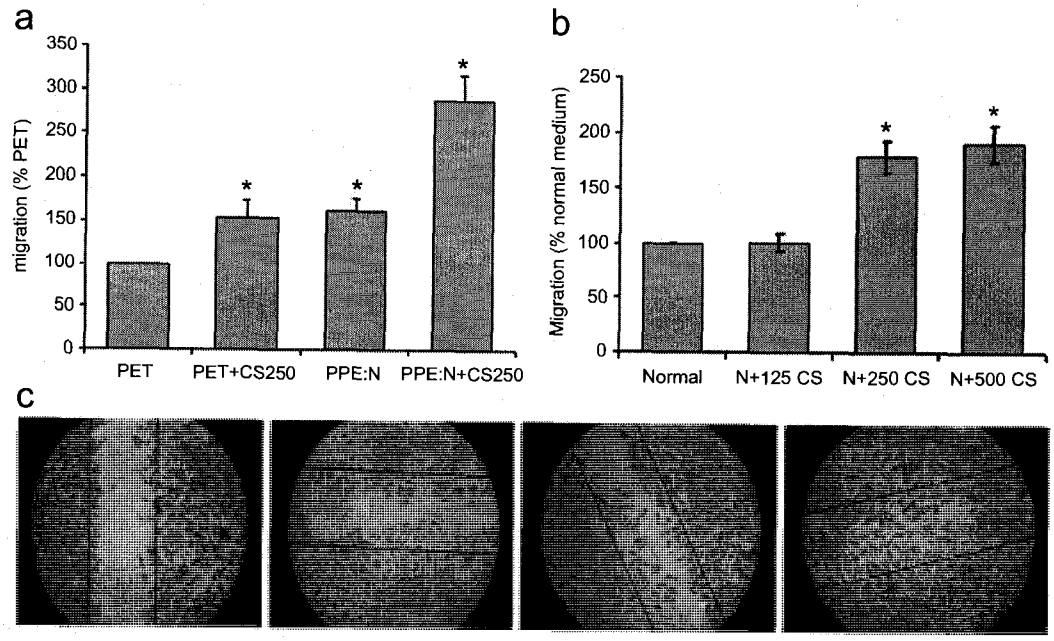


Fig. 6. (a) Migration of VSMC after 12 h in normal medium on PET or PET-PPEN surfaces, with or without the presence of CS (250 μg/ml); (b) Migration of VSMC on PPE:N-coated PET, with addition of CS (125, 250 or 500 μg/ml); (c) Micrographs illustrating migrations under the various conditions indicated in a.

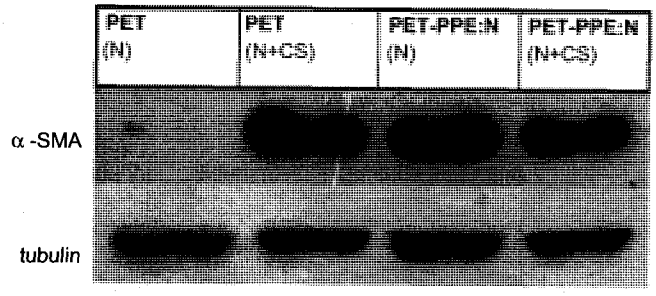


Fig. 7. Immunoblotting analysis showing increased levels of α-actin in WI-38 fibroblasts when cultured on PPE:N surfaces or exposed to medium with addition of CS for 7 days (α-tubulin is used as a control).

On each surface, incidence of apoptosis was significantly reduced when VSMCs were exposed to SS containing CS compared with SS alone (Fig. 5b). As illustrated in Fig. 5c, addition of CS resulted in additional increase in resistance to apoptosis on PPE:N-coated PET. The percentage of apoptotic VSMCs remained around 10% after up to 24 h in SS, a level close to or even below that observed on PCP surfaces (Fig. 5c).

Cell migration is a highly integrated multistep process that contributes to tissue repair and regeneration [25]. VSMC migration from the aneurysmal neck on a SG implant surface would constitute an important factor towards achieving neointima formation and healing along the implant, not only at the necks of the aneurysm. Here, we have evaluated whether PPE:N coatings can increase VSMC migration on the surface, using an adapted in vitro wound assay. PPE:N coating and the addition of CS were both found to lead to significantly increased migration on PET films ($p<0.0001$) (Fig. 6), the best results being obtained when PPE:N coating and 500 μg/ml of CS are combined ($p<0.0001$).

Finally, as myofibroblasts are essential to wound closure during normal repair and are also implicated in tissue contraction [26], we have investigated whether PET, PPE:N coatings and CS mediators can regulate fibroblast differentiation. Fibroblasts exposed either to PPE:N-coated surfaces or to CS in normal medium for 7 days showed increased protein levels of α-SMA compared with cells on PET and PCP (Fig. 7). No further increase was observed when PPE:N was combined with CS in solution.

4. Discussion

4.1. Cell behaviour on PET and PTFE

SG incorporation and biological fixation into the vessel and aneurysmal walls require the adhesion, growth and migration of the various cell types implicated in neointima formation (VSMCs, myofibroblasts) on the surface of the implant. The development of an AAA is associated with an intrinsic propensity for aortic VSMC to undergo apoptosis, leading to progressive loss of tensile forces and to aortic dilation [27,28]. Under these circumstances, it appears particularly important to foster a state of resistance to apoptosis in VSMC and myofibroblasts, in order to facilitate biological incorporation of the SG. In this study, we showed that VMSCs and fibroblasts manifested significantly less adhesion, growth and resistance to apoptosis on PET and PTFE film surfaces as compared with PCP. This was indeed expected for the case of PTFE,

which has a very low surface tension and wettability (105° water contact angle). Like other strongly hydrophobic surfaces, PTFE limits protein adsorption and cell adhesion, and thus favours a programmed form of cell death called anoikis, which is induced by the loss of cell/matrix interactions [29]. Cell adhesion observed on control PTFE films was minimal and, consequently, further study (growth, differentiation, migration, apoptosis) could not be undertaken on this material. To a lesser extent, PET films also manifested lower adhesion and growth than did the PCP surfaces commonly used for cell culture. More importantly, the cells that adhered to PET were shown to be much less resistant to apoptosis induced by serum starvation. This is of special importance in the AAA environment, where cells repopulating the SG from the abluminal side, and thus without direct access to blood supply, may have a limited access to growth factors. We used PET and PTFE films in this study for the purpose of simplifying the in vitro experiments. Since their smooth surfaces and non-porous structures do not perfectly mimic vascular fabrics used in endovascular implants, these results need to be reproduced with commercial graft materials made of ePTFE or of woven PET fibers (Dacron®).

4.2. Surface modification by PPE:N coating

To date, very few efforts have been reported to enhance the incorporation and to stimulate healing around SGs [30]. Replacement by other polymeric graft materials such as polyurethane has been reported to improve incorporation in animal models [14], but insufficient stability and poor mechanical properties limit the use of this material [31]. Surface modification of the external surfaces of PET or ePTFE grafts by plasma discharges appears promising for favoring cell growth and SG incorporation into the vessel wall without affecting the mechanical properties and low thrombogenicity of the luminal surface. Many efforts have been made to modify polymeric surfaces such as PET by plasma discharges [32–36]. In particular, surface functionalisation by nitrogen or ammonia low-pressure plasma had already proven to increase cell adhesion on various polymers [35,36]. But, the nitrogen concentration, [N], that could be achieved was limited and it decreased with time, an effect known as ageing, which affects surface functionalisation in general. The plasma-deposited thin PPE:N coating developed in our laboratory has several advantages over the above-mentioned surface modification, namely a higher [N] value (>30%) and the absence of ageing [17,37]. As previously reported, characterization by ATR FT-IR has shown the main functional groups in the PPE:N to be amines, nitriles and some amides. XPS analysis after chemical derivatization with trifluoromethylbenzaldehyde (TFBA, Alfa Aesar) vapour revealed 5–10% primary amine groups, $[NH_2]/[N]$. The PPE:N coating possesses much higher surface energy than PET and PTFE films, largely due to the polar component, γ_s^p, related to highly polar groups at the surface. Another advantage of the PPE:N coating is its highly cross-linked, homogeneous structure that is not subject to "hydrophobic recovery", or ageing, unlike plasma-modified polymer surfaces. This coating can, in principle, be deposited on objects of any relevant geometry and composition. When deposited on PTFE, unlike the other substrate materials, its composition differed slightly and it appeared to be less uniform, as suggested by contact angle variations between 20° and 80° in some areas. A possible explanation may be that the soft PTFE films were observed to buckle during plasma deposition, resulting in varying deposit characteristics over the surface. This surface heterogeneity may at least partly explain the differences in cell behaviours and the larger standard deviations observed for coated PTFE compared with coated PET substrates. Further work is required to achieve optimal PPE:N coatings on all surfaces of interest in this research.

4.3. Influence of PPE:N on cell behaviour

As already mentioned, earlier work had already shown that PPE:N coatings promote adhesion of various cell types, including generally non-adherent U937 macrophages, mesenchymal stem cells, and chondrocytes [17,36]. In this study, we have shown that PPE:N coatings not only increased the densities of adherent VSMC and fibroblasts compared to virgin PET and PTFE, but also accelerated cell adhesion, spreading, and viability in normal media. More important, PPE:N drastically increased VSMC cell resistance to apoptosis induced by serum starvation, a condition that simulates the lack of nutrients in aneurysms excluded by SG deployment. Cell growth after 1 week was found to be significantly increased on PPE:N compared to all other surfaces, including PCP that was used as a positive control. Increased cell growth on PPE:N could be the result of higher proliferation and/or lower cell death. Since experiments on cell death in normal culture medium did not show differences between PPE:N and PCP surfaces, results suggest that PPE:N might contribute to VSMC proliferation. This needs, however, to be further evaluated. VSMC adhesion, proliferation and migration on an implant surface, as well as development of a state of resistance to apoptosis, are pivotal events for the initiation of healing around vascular implants, and for SG incorporation into the vessel wall.

Finally, as myofibroblasts are a key contractile cellular constituent of healing tissues implicated in wound closure, we evaluated whether the various surfaces and CS promote myofibroblast differentiation. Fibroblasts cultured on PPE:N coatings showed increased protein levels of α-SMA compared with virgin PET, indicative of a trend towards their differentiation into myofibroblasts. The myofibroblast is a contractile form of fibroblasts, characterised by the presence of a contractile apparatus that contains bundles of actin microfilaments. These terminate at the surfaces of the myofibroblasts, in the fibronexus—a

specialised adhesion complex that uses transmembrane integrins to link intracellular actin with the ECM [26]. This provides a mechano-transduction system; that is, the force that is generated by stress fibres can be transmitted to the surrounding ECM, and it results in soft-tissue contraction. Myofibroblasts can continuously generate such forces over long periods of time; they are essential to wound closure during normal repair and could favour shrinkage of aneurysms. Hence, in our system, increasing myofibroblast differentiation could facilitate SG incorporation and facilitate populating the aneurysmal sac with contractile cells that promote aneurysm shrinkage.

Signaling pathways implicated in PPE:N-cell interactions are evidently complex and virtually unknown. Cell adhesion to biomaterial surfaces is known to be mediated by a layer of adsorbed proteins, the type, quantity and activity of which are influenced by the properties of the underlying substrate [38]. In addition to anchoring cells, adhesive interactions also activate various intracellular signaling pathways that direct cell viability, proliferation, and differentiation. Surface chemistry (in particular, the types of functional groups, for example NH_2) is known to modulate integrin binding and focal adhesion assembly, composition, and signaling. In turn, various integrin-mediated cell signaling pathways, such as focal adhesion kinase, integrin-linked kinase, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and extracellular signal- regulated kinases (Erk) are known to initiate potent anti-apoptotic signals that may at least partially explain the anti-apoptotic activity conferred by PPE:N [39,40]. We showed recently that integrin-dependent activitation of PI3K plays a key role in inhibition of apoptosis induced by growth factor deprivation [41].

4.4. Influence of CS on cell behaviour

CS has recently been identified among cryptic bioactive factors released by apoptotic cells following vascular injuries. Previous work already showed that chondroitin 4-sulphate can inhibit VSMC and fibroblast apoptosis, and induce myofibroblast differentiation when cultured on PCP [18,19]. In this study, we confirmed that development of an apoptosis-resistant state related to the presence of CS was in evidence on each of the biomaterials surfaces tested. CS was found to add further benefit to PPE:N-coating and to allow resistance to apoptosis to reach levels similar to or even above those of PCP surfaces. Its benefit was also evident when examining VSMC migration. Possible mechanisms implicated in the development of resistance to apoptosis by CS have been the subject of recent studies. We showed that CS can inhibit VSMC apoptosis through increased extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 phosphorylation and protein levels of Bcl-xl, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family in VSMC [18]. We also showed previously that CS induces resistance to apoptosis and myofibroblast differentiation through PI3K-dependent pathways [41].

5. Conclusions

A local deficit of contractile cells in aneurysms may prevent SG incorporation and aneurysm healing following EVAR. Promising in vitro data suggest that PPE:N-coating of the external surface of a SG, and/or the presence of CS, could help promote most of the pivotal events leading to the growth of a fibro-proliferative reaction around the implant. Due to the numerous limitations of in vitro studies, in vivo studies are required to confirm the potential of PPE:N coating. Such approaches may prove to be beneficial for better SG incorporation, and possibly for prevention of progressive growth of an aneurysm.

Acknowledgments

This project has been funded by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; Grant no. RMP-72548), and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ research award to SL).

References

[1] Melton LI, Bickerstaff L, Hollier L. Changing incidence of abdominal aortic aneurysms: a population-based study. Am J Epidemiol 1984;120:379–86.

[2] Geraghty P, Sicard G. Abdominal aortic aneurysm repair in high-risk and elderly patients. J Cardiovasc Surg (Torino) 2003;44: 543–7.

[3] Mohan I, Harris P, Van Marrewijk C, Laheij R, How T. Factors and forces influencing stent-graft migration after endovascular aortic aneurysm repair. J Endovasc Ther 2002;9:748–55.

[4] Kalliafas S, Albertini J, Macierewicz J, Yusuf S, Whitaker S, Davidson I, et al. Stent-graft migration after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. J Endovasc Ther 2002;9:743–7.

[5] Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA, Panneton JM, Andrews J, Bower TC, et al. Perioperative complications and early outcome after endovascular and open surgical repair of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg 2004;39(3):497–505.

[6] Veith F, Baum RA, Ohki T, Amor M, Adiseshiah M. Nature and significance of endoleaks and endotension: summary of opinions expressed at an international conference. J Vasc Surg 2002;35: 1029–35.

[7] Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. Br J Surg 1999;86(5):581–7.

[8] Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. Lancet 2004;364(9437):843–8.

[9] Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, et al. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. N Engl J Med 2004;351(16):1607–18.

[10] McArthur C, Teodorescu V, Eisen L, Morrissey N, Faries P, Hollier L, et al. Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: does healing occur? J Vasc Surg 2001;33(4):733–8.

[11] Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jonsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron

stent-grafts in human aortoiliac vessels. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;19(1):5–11.

[12] Major A, Guidoin R, Soulez G, Gaboury L, Cloutier G, Sapoval M, et al. Implant degradation and poor healing after endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm: an analysis of explanted stent-grafts. J Endov Ther 2006;13(4):457–67.

[13] Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, et al. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft, Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. J Vasc Interv Radiol 2002;13(8):823–30.

[14] Marty B, Leu AJ, Mucciolo A, von Segesser LK. Biologic fixation of polyester- versus polyurethane-covered stents in a porcine model. J Vasc Interv Radiol 2002;13(6):601–7.

[15] Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Gunduz Y, Kallakuri S. Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. J Surg Res 2001;101(1):37–43.

[16] Thompson RW, Liao S, Curci JA. Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms. Coron Artery Dis 1997;8(10):623–31.

[17] Girard-Lauriault PL, Iordanova M, Demers C, Desjardins P, Wertheimer MR. Atmospheric pressure deposition of micropatterned nitrogen-rich plasma-polymer films for tissue engineering. Plasma Process Polym 2005;2:263–70.

[18] Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. Faseb J 2004;18(6):705–7.

[19] Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. J Immunol 2005;174(9):5740–9.

[20] Lerouge S, Wertheimer MR. Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms and limitations. Plasmas Polym 2001;6(3):177–90.

[21] Kaelble DH. Physical chemistry of adhesion. New York: Wiley; 1974.

[22] Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. J Immunol 1996; 157(7):3105–15.

[23] Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology 1995;21(5): 1465–8.

[24] Raymond MA, Desormeaux A, Labelle A, Soulez M, Soulez G, Langelier Y, et al. Endothelial stress induces the release of vitamin D-binding protein, a novel growth factor. Biochem Biophys Res Commun 2005;338(3):1374–82.

[25] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. Science 2003;302(5651):1704–9.

[26] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(5):349–63.

[27] Stehbens WE. Pathology and pathogenesis of degenerative atherosclerotic aneurysms. In: Keen RR, Dobrin PB, editors. Development of aneurysms: Eurekah.com edition, 2000. p. 84–125.

[28] Tang PC, Coady MA, Lovoulos C, Dardik A, Aslan M, Elefteriades JA, et al. Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. Circulation 2005;112(8):1098–105.

[29] Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(12):2146–54.

[30] Van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, Visser MJ, van der Linden E, van Bockel JH. Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing. J Vasc Surg 2004;39(4): 850–8.

[31] Christenson EM, Dadsetan M, Wiggins M, Anderson JM, Hiltner A. Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: in vivo studies. J Biomed Mater Res A 2004;69(3):407–16.

[32] Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J. Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human smooth muscle cell growth on grafted films. Biomaterials 2002;23(3):863–71.

[33] Xie Y, Sproule T, Li Y, Powell H, Lannutti JJ, Kniss DA. Nanoscale modifications of PET polymer surfaces via oxygen-plasma discharge yield minimal changes in attachment and growth of mammalian epithelial and mesenchymal cells in vitro. J Biomed Mater Res 2002;61(2):234–45.

[34] Pu FR, Williams RL, Markkula TK, Hunt JA. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro. Biomaterials 2002;23(11):2411–28.

[35] Bullett NA, Bullett DP, Truica-Marasescu FE, Lerouge S, Mwale F, Wertheimer MR. Polymer surface micropatterning by plasma and UV-photochemical modification of controlled cell culture. Appl Surf Sci 2004;235(4):395–405.

[36] Nelea V, Luo L, Demers CN, Antoniou J, Petit A, Lerouge S, et al. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. J Biomed Mater Res A 2005;75(1):216–23.

[37] Guimond S, Radu I, Czeremuszkin G, Carlsson DJ, Wertheimer MR. Biaxially oriented polypropylene (BOPP) surface modification by nitrogen atmospheric pressure glow discharge (APGD) and by air corona. Plasmas Polym 2002;7(1):71–88.

[38] Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. Biomaterials 2004;25(28):5947–54.

[39] Frisch S, Screaton RA. Anoikis mechanisms. Curr Opin Cell Biol 2001;13:555–62.

[40] Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. Nat Cell Biol 2002;4(4):E65–8.

[41] Laplante P, Raymond MA, Labelle A, Abe JI, Iozzo RV, Hebert MJ. Perlecan proteolysis induces an alpha2beta 1 integrin and Src-family kinases dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. J Biol Chem 2006; 281(41):30383–92.