N°d'ordre NNT : 2016LYSE1303

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 34
(Ecole doctorale Matériaux de Lyon)

Spécialité de doctorat : Chimie des Matériaux Polymères

Soutenue à huis clos le 20/12/2016, par :
Mélanie DUMONT

Elaboration et caractérisation de fibres mixtes Alginate/Chitosane

---

Devant le jury composé de :

Nom, prénom grade/qualité établissement/entreprise Président.e **(à préciser après la soutenance)**

Gougeon, Anne	Professeur Université Rennes 1	Rapporteuse
Bouyer, Denis	Professeur Université Montpellier 2	Rapporteur
Delair, Thierry	Professeur Université Lyon 1	Examinateur
Lack, Stéphane	Docteur Les Laboratoires Brothier	Examinateur
David, Laurent	Professeur Université Lyon 1	Directeur de thèse
Montembault, Alexandra	Docteur Université Lyon 1	Co-directrice de thèse
Villet, Régis	Docteur Université Lyon 1	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) sur le site de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (UMR 5223) et au sein des Laboratoires Brothier sur le site de R&D à Fontevraud l'Abbaye. Je tiens donc naturellement à remercier le PDG de cette société, Christian Girardière et le directeur du laboratoire IMP, Pr Philippe Cassagnau pour le financement de cette thèse.

Je souhaite aussi exprimer mes remerciements aux personnes ayant encadrées cette thèse : Pr Laurent David (directeur de thèse), Dr Alexandra Montembault (co-encadrante) et Dr Stéphane Lack (responsable scientifique).

Je remercie également les Professeurs Anne Gougeon et Denis Bouyer pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que pour leurs remarques constructives. Merci également au Pr Thierry Delair pour sa participation au jury et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je tiens à remercier le Dr Frédéric Laurent pour la collaboration en microbiologie avec le Centre International de Recherche en Infectiologie à l'hôpital de la Croix-Rousse. Je remercie particulièrement le Dr Régis Villet pour son aide lors de ces travaux. Son expertise scientifique et son implication ont été des plus précieuses. Cette collaboration m'a permis de finaliser au mieux mes travaux de thèse, aussi bien d'un point de vue scientifique que psychologique. Son soutien, ses conseils avisés et ses encouragements m'ont été d'un grand réconfort. Ce fut un plaisir de faire une rencontre aussi enrichissante. Je remercie également Manon Guirand qui s'est entièrement impliquée dans ce projet et qui a passé un temps inestimable à manipuler au laboratoire.

Je remercie tous les membres de la société qui a construit le métier à filer, sans qui le pilote n'aurait pas vu le jour. Merci de m'avoir accueillie dans vos locaux pour faire les essais de validation.

Je n'oublierai pas de remercier chaleureusement tout le personnel des Laboratoires Brothier qui m'a aidée et soutenue pour ce travail, en particulier l'ensemble du service Contrôle Qualité ainsi que la team de la maintenance : un grand merci à Jean-Paul Brisset pour toutes ses interventions, toujours accompagnées d'humour et de bonne humeur. Merci à Jacques Giraudeau pour ses dépannages informatiques et à Germain Bachelier qui m'a aidée lors de

son stage. Je remercie également Michel Barikosky pour son expertise et l'ensemble de ses conseils. Enfin, je terminerai par la personne qui m'a été la plus précieuse au quotidien dans la société. Elle m'a apporté de nombreux conseils scientifiques et elle a su me soutenir dans toutes les épreuves et même dans les moments où le moral était au plus bas. Fanny Colin, un grand merci… je n'oublierai jamais nos échanges et tes jeux de mots improbables ! Cette expérience professionnelle n'aurait pas été la même sans toi.

Je remercie maintenant l'ensemble du personnel du laboratoire IMP@Lyon 1 pour les divers échanges durant cette thèse. Merci à Thierry Tamet et Pierre Alcouffe pour leur expertise en microscopie, leur disponibilité et leur bonhomie. Merci à Laurent Cavetier pour sa disponibilité et son aide. Merci également à Olivier Gain pour ses conseils, son aide et son humour imparable, promis un jour je t'apporterai un gâteau ! Un grand merci à Agnès Crépet, Stéphane Trombotto, Catherine Ladavière et Guillaume Sudre pour avoir mis leurs connaissances sur la caractérisation du chitosane et de l'alginate au profit de ces travaux. Enfin, je remercie Flavien Mélis, Gisèle Boiteux, Sabine Sainte-Marie et Florian Doucet pour leur sympathie.

Enfin, je tiens à mentionner le plaisir que j'ai eu de rencontrer l'ensemble des doctorants et post-doctorants. C'est grâce à ces dernières rencontres que je garderai au fond de moi, un bon souvenir de ces années de thèse. En pensant à vous, c'est un sourire instantané et incontrôlable qui s'affiche sur mon visage.

Marjo, Pierre, Jimmy, Mona, Sofiane, Julie, Mathilde, Sylvain, Bryan, Laurent et KDP, je suis heureuse d'avoir rencontré des personnes aussi agréables et intéressantes que vous. Je vous remercie sincèrement pour tous les échanges agréables.

Manue, Thibault, Christophe, Jiji, Alice et Baptiste nous avons passé de nombreux moments ensemble. Que ce soit pour discuter, débattre, potiner, rire, jouer ou danser, ces moments furent toujours animés par votre sympathie et votre joie de vivre. Merci pour tout et j'espère qu'il y aura encore d'autres moments hors du labo.

Je remercie tous mes voisins de paillasse, Anaïs, Amani, Danjun, Kévin, Mamoudou et Alice avec qui j'ai pu travailler dans la bonne humeur grâce à leurs qualités humaines. Dans cette équipe Biomat', je tiens à remercier particulièrement Seb qui m'a apporté tant de gentillesse, de conseils, de soutien et d'amitié, un vrai modèle !

Je remercie enfin de tout cœur les deux biomat' avec qui j'ai tant échangé aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan personnel : Got et Nico. Il m'est difficile de décrire à quel point mes remerciements sont profonds. Got, tu as toujours été à mon écoute, tu as su me soutenir dans toutes les épreuves et surtout tu m'as toujours été de bon conseil. Je te suis tellement reconnaissante, merci mille fois.

Nico, c'est toi qui m'as accueillie la première fois au labo, c'est toi qui m'as formée et c'est toi qui m'as accompagnée tout au long de ma thèse. Que de moments passés ensemble…Tu as été mon plus grand soutien, toujours présent pour me venir en aide et me donner confiance en moi. Grâce à toi, il y avait toujours des solutions. Il est évident que ma thèse aurait été toute autre sans toi. Je ne saurai jamais te dire à quel point je te remercie. Tu as et tu auras toujours mon amitié. J'espère que j'aurai encore le droit de temps en temps à tes talents cachés d'imitateur.

Je tiens également à remercier de tout cœur le duo star du labo Antoine et Fabien sans qui l'ambiance au labo n'aurait pas été la même. Merci Fabien pour toute ton affection et ton humour indépendant de ta volonté. Tu es le râleur le plus agréable que je connaisse, qui a su animer le 3ème étage. Je t'inviterai à passer un séjour dans ma campagne profonde pour te faire découvrir « l'autre France » en guise de remerciement. Merci Antoine pour ta joie de vivre et pour tes multiples et incroyables péripéties qui ont tant animé ce labo. C'est une vraie chance d'avoir rencontré une personne aussi intéressante, drôle et ouverte d'esprit que toi. J'espère pouvoir un jour t'inviter à un loto pour te remercier à la hauteur de tout ce que tu m'as apporté !

Imed, je te remercie également pour le soutien que tu m'as apporté au quotidien et toute ta bienveillance à mon égard. Encore une fois, quelle rencontre incroyable ! Je suis fière de faire partie de tes amis. Je remercie encore 3 amis fidèles. Guillaume, merci pour la netteté de ta diction qui m'a rappelé chaque jour que j'étais sourde et pour ton humour… fantasmagorique ! Cyrille, tu m'as accompagnée durant l'intégralité de cette thèse et ton soutien m'a été très précieux, je t'en remercie sincèrement. Enfin, merci Margarita pour l'ensemble de tes qualités humaines dont tu m'as fait profiter. C'est une grande chance d'avoir parmi mes amis une personne aussi riche en qualités. Un très grand merci pour ta gentillesse et ton soutien permanent.

Un grand merci à tous les membres et ex-membres de mon bureau, Momo, Marine, Elodie, Afef, QuanYi, Yann, Soline et Michaël. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Un

merci particulier à Marine avec qui j'ai tant échangé, entre sportives, on s'est bien comprises ! Enfin, un merci inestimable à Yann, qui est la plus belle rencontre que j'ai pu faire ici. Je te remercie tellement pour ton soutien et ta patience. Je te dirai simplement merci d'être une personne exceptionnelle et d'être là pour moi.

Je fais des remerciements à tout mon groupe d'athlétisme qui m'a toujours soutenue, en particulier Farah, Marina, Laure-Claude et Fanny. Je remercie sincèrement mon coach Thomas qui a su m'élever à mon meilleur niveau alors que je réalisais cette thèse. Merci pour ton engagement, ta compréhension et pour avoir su, quand c'était nécessaire, adapter les entraînements à mon emploi du temps chargé. C'est une grande richesse de vous avoir eu pour m'aérer l'esprit dans les moments difficiles de cette thèse.

Enfin, merci à tous les autres amis d'avoir été là et je terminerai ces remerciements en adressant toute ma reconnaissance à ma famille. Maman, papa, Emeline et Fabien… il m'est difficile de trouver des mots suffisamment forts pour vous exprimer ce que je ressens. Vous m'êtes tellement nécessaires. C'est grâce à vous, vos encouragements et votre soutien inconditionnel que j'en suis là aujourd'hui. J'aimerais par ces quelques mots, vous témoigner ma gratitude et mon amour.

Table des matières

Introduction générale **1**

Chapitre 1: Etude bibliographique **5**

1 La plaie et la cicatrisation 6
2 Les textiles pour la cicatrisation tissulaire 6
2.1 Les pansements « conventionnels » 7
2.1.1 Les bandages 7
2.1.2 Les compresses de gaze 7
2.2 Les pansements « modernes » 8
2.2.1 Les pansements hydrocolloïdes 8
2.2.2 Les pansements hydrogels 9
2.2.3 Les pansememts de carboxyméthylcellulose (CMC, dites aussi hydrofibres) 10
2.2.4 Les pansements interfaces 10
2.2.5 Les pansements hydrocellulaires 11
2.2.6 Les alginates de calcium 11
2.3 Stratégie de développement d'un textile innovant pour la cicatrisation 13
2.3.1 Utilisation conseillée par la HAS des différents pansements 13
2.3.2 Panorama du marché français des pansements 14
2.3.3 Idée de conception d'un textile innovant pour la cicatrisation 16
3 Les alginates 18
3.1 Définition, source et structure 18
3.2 Comportement physico-chimique des alginates 20
3.2.1 Comportement en solution 20
3.2.2 Aptitude à la formation de gels 20
3.3 Propriétés biologiques de l'alginate 23
3.3.1 Biocompatibilité 23
3.3.2 Agent hémostatique 24
3.3.3 Agent cicatrisant 24
3.3.4 Agent absorbant 24
3.4 Diverses variétés de pansements d'alginate 25
4 Les chitosanes 26

4.1 Définition, source et structure 26
4.2 Préparation du chitosane à partir de la chitine 27
4.3 Comportement physico-chimique du chitosane 28
4.3.1 Comportement en solution 28
4.3.2 Aptitude à la formation de gels 29
4.4 Propriétés du chitosane 30
4.4.1 Biocompatibilité 30
4.4.2 Agent hémostatique 30
4.4.3 Agent cicatrisant 31
4.4.4 Agent antibactérien 31
5 Le filage et caractérisation des fibres 33
5.1 Le filage de l'alginate 34
5.2 Le filage du chitosane 35
5.3 Filage mixte alginate/chitosane 36
5.3.1 Méthode 1 37
5.3.2 Méthode 2 39
5.3.3 Méthode 3 41
5.3.4 Méthode 4 41
5.3.5 Méthode 5 42
5.4 Caractérisation des fibres 43
5.5 Orientations envisagées dans le développement du procédé de filage alginate/chitosane 44

Chapitre 2: Techniques expérimentales 47

1 Introduction 48
2 Préparation des matières premières 48
2.1 Alginate de sodium 48
2.2 Chitosane et sa purification 48
2.3 Dépolymérisation du chitosane 49
2.4 Réacétylation du chitosane 50
3 Méthodes et résultats des caractérisations de l'alginate de sodium et du chitosane 51
3.1 Résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN) 51
3.2 Chromatographie d'exclusion stérique 51
3.3 Analyse thermogravimétrique 52

3.4 Viscosité des solutions de filage et d'enduction 52
3.5 Résultats des caractérisations de l'alginate de sodium et des chitosanes 52
4 Caractérisations physiques, chimiques et biologiques effectuées sur les fibres fabriquées 53
4.1 Structure microscopique 53
4.2 Taux de chitosane enduit sur les fibres d'alginate de calcium 53
4.2.1 Introduction 53
4.2.2 Microscopie Electronique à Balayage associée à une microanalyse par EDX (electron-dispersive X-ray spectroscopy) 54
4.2.3 Réfractométrie 54
4.2.4 Synthèse du chitosane greffé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et observations par microscopie confocale 55
4.2.5 Spectroscopie visible et spectroscopie de fluorescence 56
4.3 Propriétés d'absorption 57
4.4 Propriétés mécaniques en traction 58
4.5 Méthode d'évaluation antibactérienne 61
4.5.1 Introduction 61
4.5.2 Méthode de stérilisation 61
4.5.3 Choix du milieu de culture 61
4.5.4 Choix des souches bactériennes testées 61
4.5.4.1 Staphylococcus aureus (ATCC2921) 62
4.5.4.2 Staphylococcus epidermidis (ATCC12228) 62
4.5.4.3 Escherichia coli (ATCC8739) 63
4.5.5 Protocoles mis en œuvre 63
4.5.5.1 Protocole d'énumération des unités formant colonie 64
4.5.5.2 Adhésion bactérienne sur les fibres et Microscopie Electronique à Balayage 66

Chapitre 3 : Développement des outils spécifiques 69

1 Purification du chitosane 70
1.1 Introduction 70
1.2 Solubilisation du chitosane 70
1.3 Filtration de la solution de chitosane 71
1.4 Précipitation du chitosane 71
1.5 Lavage du polymère 72

1.6 Lyophilisation du chitosane 74

2 Le métier à filer à l'échelle du laboratoire 74

2.1 Introduction 74

2.2 Solubilisation et dégazage de la solution 76

2.3 Module de coagulation et de lavage 78

2.4 Module de séchage 79

2.5 Module de bobinage 80

3 Le métier à filer à l'échelle pilote 81

3.1 Introduction 81

3.2 Solubilisation et dégazage de la solution 83

3.3 Remplissage de la cuve d'extrusion 84

3.4 Module d'extrusion 85

3.4.1 Cuve d'extrusion 85

3.4.2 Mécanisme d'extrusion 86

3.4.3 Filière 87

3.5 Modules de coagulation, d'ensimage et de lavage 88

3.6 Modules d'étirage 90

3.7 Module de séchage 91

3.8 Module de bobinage 93

3.9 Armoire électrique 95

4 Le procédé d'enduction à l'échelle du laboratoire, transposable à l'échelle pilote 97

4.1 Introduction 97

4.2 Module de débobinage 99

4.3 Module d'enduction 99

4.4 Module de coagulation et de lavage 100

4.5 Module de séchage 101

4.6 Module de bobinage 101

Chapitre 4 : Caractérisation des fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane 103

1 Introduction 104

2 Fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane 104

3 Caractérisations structurales 105

3.1 Microscopie optique 105

3.2 Etude morphologique par Microscopie Electronique à Balayage 109

4 Caractérisation du revêtement de chitosane 111
4.1 MEB associée à une microanalyse EDX 111
4.2 Dosage par microscopie confocale 113
4.3 Dosage par spectroscopie de fluorescence 117
5 Evaluation des propriétés d'absorption 118
6 Evaluation des propriétés mécaniques 118
7 Evaluation des propriétés antibactériennes 122
7.1 Propriétés antibactériennes des fibres d'alginate de calcium 122
7.2 Activité antibactérienne des fibres enduites 123
7.2.1 Résultats des masses caractéristiques de chitosane 123
7.2.2 Preuve de concept des fibres enduites par leurs activités antibactériennes 124
7.2.2.1 Résultats obtenus pour Staphylococcus aureus 124
7.2.2.2 Résultats obtenus pour Staphylococcus epidermidis 126
7.2.2.3 Résultats obtenus pour Escherichia coli 126
7.2.2.4 Conclusion 127
7.2.3 Influence de la stérilisation sur l'activité antibactérienne des fibres enduites 128
7.2.4 Influence de la masse molaire sur l'activité antibactérienne des fibres enduites 129
7.2.5 Adhésion bactérienne sur les fibres et microscopie électronique à balayage 131
8 Conclusion 133

Conclusion générale et perspectives 135

Références bibliographiques 139

Annexes 155

Annexe 1: Etude bibliographique sur la plaie et la cicatrisation 157
Annexe 2 : Résultats et traitements d'image pour la quantification du chitosane enduit sur les fibres d'alginate de calcium par microscopie confocal 165
Annexe 3 : Résultats de dosage du chitosane par spectroscopie dans la fluorescence 170

Table des matières

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATB	Antibiotique
ATG	Analyse thermogravimétrique
BHI	Brain-heart infusion
BRR	Bacterial reduction rate
CA-MRSA	Community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
CIFRE	Conventions industrielles de formation par la recherche
CMC	Carboxyméthylcelluloses
CS	Chitosane
Đ	Dispersité d'un polymère
DA	Degré d'acétylation
DP_w	Degré de polymérisation en masse
EDX	Energie dispersive des rayons X
ENP	Enquête nationale de prévalence
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
G-	Gram-négatif
G+	Gram-positif
^{1}H-RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
HA-MSSA	Healthcare associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
HAS	Haute autorité de santé

IMP@Lyon 1	Ingénierie des matériaux polymères Lyon 1
IR	Infra-rouge
MAF	Métier à filer
MEB	Microscopie électronique à balayage
MRSA	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
MSSA	Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*
M_w	Masse molaire moyenne en masse
PBP	Penicillin binding proteins
PBS	Phosphate buffer solution
PMN	Polymorphonucléaires
R&D	Recherche et Développement
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
TCA	Trypto-Caséine-Soja
UCBL	Université Claude Bernard Lyon 1
UFC	Unité formant colonie

Introduction générale

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre la société Les Laboratoires Brothier et le laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL). Il s'est effectué dans le cadre d'un financement CIFRE.

L'objectif de ces travaux de recherche concerne l'élaboration de fibres mixtes à base d'alginate de calcium et de chitosane (polysaccharides d'origine naturelle et bioactifs), utilisées en dispositifs médicaux pour la cicatrisation des plaies. Ainsi, il est nécessaire de maîtriser la fabrication de ces fibres et de contrôler leur activité biologique. Le travail réalisé au cours de cette thèse aborde à la fois les domaines du filage et des textiles de santé à base de biomatériaux naturels ou d'origine naturelle.

En mai et juin 2012, l'enquête nationale de prévalence (ENP) [1] en France a montré que 5.1 % des patients avaient une ou plusieurs infections nosocomiales. La prise en charge de ces patients et les soins spécialisés qui leur sont dispensés demandent d'importantes ressources médicales, qu'elles soient matérielles ou humaines. De plus, ces infections hospitalières participent au développement de microorganismes résistants aux antibiotiques. Une large part des infections sont dues à une infection urinaire, une pneumonie ou une infection suite à une chirurgie. Lors d'une infection nosocomiale, les trois microorganismes les plus fréquents sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (38.1 % résistants à la méticilline, MRSA) et *Pseudomonas aeruginosa*. Les actions de préventions mises en place au sein des établissements de santé afin de prévenir les infections nosocomiales et préserver l'efficacité des antibiotiques sont nécessaires. En outre, le développement de dispositifs innovants pouvant prévenir voire lutter contre les infections nosocomiales sans utiliser d'antibiotiques pourraient s'associer aux actions préventives et renforcer le programme de lutte contre les bactéries multi-résistantes.

C'est dans cette perspective qu'a été entrepris le développement de compresses cicatrisantes capables de prévenir les infections. Ce projet de recherche a donc consisté à mettre au point une fibre destinée à l'élaboration de textiles cicatrisants et inhibant la croissance bactérienne.

De par leur biocompatibilité, l'utilisation de biomatériaux naturels pour l'élaboration de cette fibre s'est imposée spontanément. L'alginate de calcium est un matériau déjà largement utilisé dans le domaine des pansements cicatrisants. Effectivement, il s'agit d'un matériau de choix de par ses propriétés absorbantes, hémostatiques et cicatrisantes et sa facilité à être ôté sans dommages pour le patient. Le chitosane connu également pour ses propriétés cicatrisantes, présente des propriétés antimicrobiennes. Pour leurs diverses caractéristiques, l'originalité de

ce projet a été de combiner ces deux biomatériaux pour la prévention des infections nosocomiales.

Ce travail s'est articulé autour de trois étapes. La première fut la conception et le développement de métiers à filer à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote. La seconde étape consistait en l'élaboration des fibres et la compréhension de plusieurs paramètres physico-chimiques liés au procédé de fabrication sur la formation des fibres. La troisième et dernière étape reposait sur l'évaluation des propriétés biologiques des fibres réalisées.

Ce mémoire sera organisé en deux parties : l'étude bibliographique et l'étude expérimentale.

L'étude bibliographique portera sur les différents pansements destinés à la cicatrisation des plaies. Puis, il sera présenté les propriétés physico-chimiques, structurales et biologiques des polysaccharides utilisés dans cette étude : l'alginate et le chitosane. Enfin, il sera détaillé les différentes stratégies de filages et d'élaboration de fibres mixtes alginate/chitosane par enduction.

La partie expérimentale présente trois chapitres. Le premier concerne les principales techniques analytiques utilisées dans ce travail pour la caractérisation des fibres mixtes et l'évaluation de leurs propriétés. Le second chapitre décrit le développement de nouveaux procédés de filage et d'enduction basés sur la gélification de solutions de polysaccharides à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote. Enfin, le dernier chapitre est consacré à la caractérisation des fibres et à l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes.

Chapitre 1:
Etude bibliographique

1 La plaie et la cicatrisation

Une plaie est définie par la Société de Cicatrisation des Plaies (Wound Healing Society, *woundheal.org*) comme une interruption anormale de la structure anatomique et physiologique d'un tissu ; elle représente un danger pour les barrières naturelles de défense en rendant les tissus plus accessibles à l'invasion par les microorganismes. Les plaies peuvent être classées en deux catégories qui sont basées sur la nature du procédé de réparation : plaies aiguës ou chroniques [2].

La cicatrisation, quant à elle est définie par la Société de Cicatrisation des Plaies comme un procédé dynamique complexe dont le résultat est la restauration des fonctions et de la continuité anatomique du tissu. Il s'agit d'un procédé physiologique impliquant une série d'étapes qui se chevauchent. Il y a entre 3 et 5 étapes de cicatrisation des plaies.

La première étape, l'hémostase, intervient immédiatement après la blessure et dure généralement quelques heures. La seconde étape, l'inflammation, commence rapidement après le début de l'hémostase et se termine entre 24 et 72 h après la blessure. La prolifération et la réparation des tissus correspondent à la troisième étape. Celle-ci s'achève 1 à 3 semaines après la blessure. La quatrième et dernière étape est le remodelage des tissus. Elle commence approximativement 3 semaines après la blessure et peut prendre plusieurs mois voire années pour atteindre l'achèvement physiologique. De plus, il est important de noter que bien que la peau soit reconstruite dans les jours ou semaines qui ont suivi la blessure, elle reste vulnérable aux dommages qu'elle subit jusqu'à la dernière étape de cicatrisation des plaies [2]. Enfin, il est conseillé de respecter l'écosystème bactérien de la plaie. Les antiseptiques ne doivent pas être utilisés de manière systématique et il est souvent préférable d'éviter les antibiotiques [3].

Les mécanismes de la cicatrisation sont davantage développés en Annexe 1. Leur connaissance permet d'établir la structure des pansements et les propriétés attendues des dispositifs médicaux destinés à la cicatrisation des plaies.

2 Les textiles pour la cicatrisation tissulaire

La plupart des pansements sont destinés à favoriser la cicatrisation, notamment en milieu humide. Certains, essentiellement apparus depuis les années 1980, peuvent être considérés comme des pansements « modernes ». Cependant, il existe des textiles cicatriciels plus

anciens tels que les pansements vaselinés (compresse gaze), les pansements en coton, les compresses humides, etc. qui font partie des pansements « conventionnels » [4].

2.1 Les pansements « conventionnels »

Les pansements conventionnels incluent la laine de coton, les bandes naturelles ou synthétiques et les compresses de gaze vaselinées ou non. Ils sont secs et ont comme principale fonction le rôle de barrière. Ils permettent de garder une plaie sèche en absorbant l'exsudat de la blessure tout en limitant l'accès d'organismes pathogènes [5]. Ils peuvent être utilisés comme pansements primaires (en contact avec la plaie) ou secondaires (recouvre le pansement primaire et sert à le maintenir en place) ou même encore être une partie d'un matériau composé de plusieurs compresses dont chaque couche contribue à une fonction spécifique [6].

2.1.1 Les bandages

Les bandages peuvent être fabriqués à partir de matériaux naturels (ex. laine de coton ou cellulose) ou synthétiques (ex. polyamides) qui contribuent à différentes fonctions. Par exemples les bandages conventionnels en coton sont utilisés pour la rétention de petites plaies alors que les bandages à forte capacité de compressions sont d'avantage utilisés dans le traitement d'insuffisance du retour veineux.

2.1.2 Les compresses de gaze

Les compresses de gaze sont faites à partir de fibres de coton tissées ou non tissées, de polyesters synthétiques ou de l'association de ces deux composants. Malgré l'arrivée de matériaux plus modernes, les compresses de gaze restent d'actualités pour diverses raisons [7]. Elles sont notamment utilisées sur les plaies ouvertes pour drainer l'exsudat de la plaie. Elles ont l'avantage d'être moins chères que les pansements plus modernes. Néanmoins, les compresses de gaze ont besoin d'être changées régulièrement afin d'éviter toute macération des tissus sous-jacents. De plus, bien qu'elles puissent fournir une certaine protection bactérienne, cette fonction est perdue à partir du moment où la surface extérieure de la compresse est mouillée par l'exsudat de la plaie ou toute autre substance extérieure. Enfin, les compresses de gaze tendent à être plus adhérentes lorsque la production de fluide diminue et peuvent devenir difficile à ôter créant des désagréments pour le patient. De par leur faible occlusion de la plaie, elles permettent également l'évaporation de l'eau au niveau de la plaie engendrant une déshydratation du lit de la plaie, élément non favorable pour la

cicatrisation. C'est pourquoi les compresses de gaze sont souvent imprégnées d'une fine couche de vaseline pour améliorer l'occlusion de la plaie tout en diminuant l'adhérence afin que le changement de la compresse soit plus agréable pour le patient ou plus facile à réaliser pour le personnel soignant.

Les pansements conventionnels sont surtout utilisés pour les plaies propres et sèches ou comme pansements secondaires pour protéger la plaie. Concernant les plaies chroniques et les brûlures, les compresses conventionnelles ont été largement remplacées par des matériaux plus modernes. Ces derniers sont plus adaptés pour protéger le lit de cicatrisation tout en apportant un environnement humide davantage favorable à la cicatrisation [6].

2.2 Les pansements « modernes »

Les pansements modernes ont pour principale caractéristique de créer et maintenir un environnement humide autour de la plaie pour faciliter sa cicatrisation. Ils sont principalement classés en fonction du matériau à partir duquel ils sont produits.

2.2.1 Les pansements hydrocolloïdes

Les pansements hydrocolloïdes sont les plus largement utilisés. Le terme « hydrocolloïdes » décrit la famille des pansements obtenus à partir de « matériaux colloïdaux » (agents gélifiants) combinés avec d'autres matériaux tels que des élastomères et des adhésifs. Les agents gélifiants fréquemment utilisés sont des carboxyméthylcelluloses (CMC), des gélatines et des pectines [6]. Ils existent sous forme de plaques adhésives de tailles, d'épaisseurs variables et de différentes formes anatomiques (pour le sacrum, le talon, le coude…), de poudres ou de pâtes [4]. Les plaques sont semi-perméables ou occlusives dont certaines autorisent les échanges gazeux. Elles sont imperméables aux liquides et aux bactéries. Les pâtes permettent d'atteindre des zones anfractueuses de la plaie. Les poudres quant à elles renforcent le pouvoir absorbant des plaques [8].

Les pansements hydrocolloïdes sont souvent utilisés puisqu'ils adhèrent aussi bien sur un site sec que mouillé, contrairement aux autres textiles [9]. Lorsque les hydrocolloïdes absorbent l'exsudat de la plaie, ils changent d'état physique et forment un hydrogel. Ce dernier devient alors progressivement perméable à l'air, assurant les échanges gazeux [10]. Les compresses hydrocolloïdes présentent généralement une couche extérieure occlusive qui prévient des échanges de vapeur d'eau entre la plaie et le milieu extérieur maintenant ainsi un milieu humide, chaud et de pH favorable à la cicatrisation.

Ils sont recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour le traitement non séquentiel des plaies chroniques, en particulier pour assurer l'épidermisation [4]. Ils sont particulièrement utilisés pour les petites et moyennes plaies comme les plaies de pression, les faibles brûlures et les blessures traumatiques. De plus, comme ils ne causent pas de désagréments au moment où le pansement est retiré, ils sont fréquemment utilisés en pédiatrie. Cependant, de par le fait qu'ils soient composés de divers matériaux, il est fréquent que quelques fibres restent sur la plaie lorsque la compresse est ôtée.

2.2.2 Les pansements hydrogels

Les pansements hydrogels sont un autre exemple de pansements « modernes ». Ce sont des matériaux hydrophiles gonflés. Dans le domaine des textiles destinés à la cicatrisation tissulaire, ils sont souvent fabriqués à partir de polymères synthétiques comme des polyméthacrylates et des polyvinylpyrrolidones. Les pansements hydrogels existent sous forme de plaques, de compresses imprégnées et de gels. Dans le cas des dispositifs médicaux, ce sont généralement des polymères réticulés qui peuvent absorber et retenir l'eau. Un pansement hydrogel nécessite souvent d'être recouvert par une seconde couche de protection comme une gaze, il a besoin d'être changé régulièrement et peut être utilisé comme dispositif de première ou de seconde intention. Comme ils contiennent un taux important d'eau (> 50 %), ils sont plutôt utilisés pour humidifier les plaies non exsudatives [4]. Leur utilisation sur des plaies exsudatives est déconseillée car leur fort taux d'humidité ne leur permet pas d'avoir une forte capacité d'absorption. L'accumulation de fluide dans la plaie pourrait alors conduire à la macération de la peau et à une prolifération bactérienne pouvant engendrer une surinfection de la plaie voire une septicémie [6].

Néanmoins, l'hydrogel est la forme groupant le plus de caractéristiques désirées dans le design d'une « compresse idéale ». Cette forme est adaptée pour le nettoyage des plaies sèches ou nécrosées en réhydratant les tissus morts. La plupart des textiles en hydrogels sont non-réactifs avec les tissus biologiques, perméables aux métabolites et non-irritants [11]. Ils procurent un environnement humide, favorable à la cicatrisation. Ils sont aussi non-adhérents aux plaies engendrant une réduction de la douleur et ont par conséquent une haute acceptabilité par le patient. De plus, les pansements hydrogels ne laissent pas de résidus de fibres sur la plaie, ils sont malléables et augmentent la ré-épithélialisation de la blessure [6]. La Haute Autorité de Santé (HAS) recommande leur utilisation pour la détersion des plaies chroniques [4]. La détersion intervient lors des phases nécrotique et fibreuse. Son objectif est

d'éliminer les débris (tissus morts, sang coagulé, fibrine…) qui encombrent le fond de la plaie et empêchent la cicatrisation. C'est un préalable indispensable à la cicatrisation.

2.2.3 Les pansememts de carboxyméthylcellulose (CMC, dites aussi hydrofibres)

Ces pansements sont composés majoritairement (> 50 %) de fibres non tissées de carboxyméthylcellulose (CMC) pure. Ils existent sous forme de compresses ou de mèches. Une seule gamme de pansement est vendue sur le marché français : Aquacel® du laboratoire Convatec.

Ces fibres présentent l'avantage de se transformer au contact des exsudats en gel cohésif. Elles sont caractérisées par leur forte capacité d'absorption et de rétention qui permet d'éviter une macération au niveau de la plaie. Le gel obtenu s'adapte parfaitement au lit de la plaie ne laissant pas d'espaces vides qui sont des foyers potentiels de colonisations microbiennes. Le laboratoire Convatec revendique également un pouvoir de séquestration bactérienne permettant de limiter la prolifération bactérienne au niveau de la plaie. De plus, cette transformation en gel apporte un environnement humide à la plaie, favorable à la cicatrisation. Elle permet aussi un retrait atraumatique [3, 12].

Les fibres de CMC sont recommandées par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour le traitement des plaies aiguës sans distinction de phases de cicatrisation. De par leur grande capacité d'absorption, ces pansements sont destinés à être utilisés sur des plaies exsudatives [4, 13].

2.2.4 Les pansements interfaces

Les pansements interfaces sont constitués d'une trame enduite de polymères de différents types, tels que du gel de silicone. Ils se distinguent des simples pansements gras par une adhérence faible (absence de migration de la substance imprégnée ou enduite), afin de limiter le traumatisme et la douleur lors du retrait de pansement.

Les interfaces sont recommandées par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour des plaies chroniques aux phases de bourgeonnement et d'épidermisation ainsi que pour les plaies aiguës en phase d'épidermisation lors d'un traitement séquentiel. La HAS recommande aussi leur utilisation dans les cas spécifiques de peau fragile telles que les lésions bulleuses[1] [4, 14].

[1] Une bulle est une cavité cutanée de grande taille (supérieure à 5 mm) provoquant un soulèvement épidermique circonscrit contenant une collection de liquide clair, séreux, inflammatoire ou hémorragique.

2.2.5 Les pansements hydrocellulaires

Les pansements hydrocellulaires sont constitués de polymères absorbants (généralement en mousse polyuréthane). Ils existent sous forme de plaques adhésives ou non avec des tailles et des épaisseurs variables, de différentes formes anatomiques (talon, sacrum, coude…) et de formes adaptées au remplissage des plaies cavitaires (coussinets sphériques ou tubulaires).

Les pansements hydrocellulaires sont utilisés pour leur capacité à maintenir un environnement humide au niveau de la plaie. Ils absorbent l'exsudat au sein de leur structure, sont perméables aux échanges gazeux mais imperméables aux bactéries. Ils existent sous différentes épaisseurs permettant différents niveaux d'absorption [8].

Les pansements hydrocellulaires sont recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour le traitement séquentiel des plaies chroniques lors de la phase de bourgeonnement mais aussi pour le traitement des plaies aiguës, sans distinction de phase cicatricielle [3, 4].

2.2.6 Les alginates de calcium

Les pansements d'alginates sont composés majoritairement (> 50 %) d'alginates, avec ou sans carboxyméthylcellulose (CMC). Les alginates sont des polysaccharides nommés acides alginiques qui contiennent des unités d'acides guluroniques et mannuroniques [15].

Les pansements d'alginates se présentent sous la forme de fibres flexibles telles que des compresses ou des mèches. Les alginates sont caractérisés par leurs capacités d'absorption et leurs propriétés hémostatiques [4]. L'efficacité clinique des alginates de calcium est fondée sur leurs propriétés physico-chimiques telles que la gélification de la fibre en contact avec les exsudats, qui permet le maintien d'une atmosphère humide favorable à la cicatrisation et sa capacité d'absorption réservant les compresses d'alginate aux plaies exsudatives [16].

En effet, la capacité des ions calcium à complexer et gélifier les alginates à pH physiologique (*Cf.* Chapitre 1, paragraphe 3.2.2) est un avantage pour la conception de textiles destinés à la cicatrisation tissulaire. Dans sa forme sèche, la compresse d'alginate de calcium absorbe les fluides des plaies et reforme ainsi un gel/solution visqueux par échange ionique entre le calcium de l'alginate et le sodium présent dans l'exsudat des plaies et le sang. Ce gel/solution visqueux est alors capable de maintenir l'eau absorbée afin d'assurer un environnement humide et une température de cicatrisation optimale [6]. De plus, cette forme de gel/solution

visqueux permet de pouvoir ôter le textile sans difficulté garantissant plus de confort pour le patient (Figure 1).

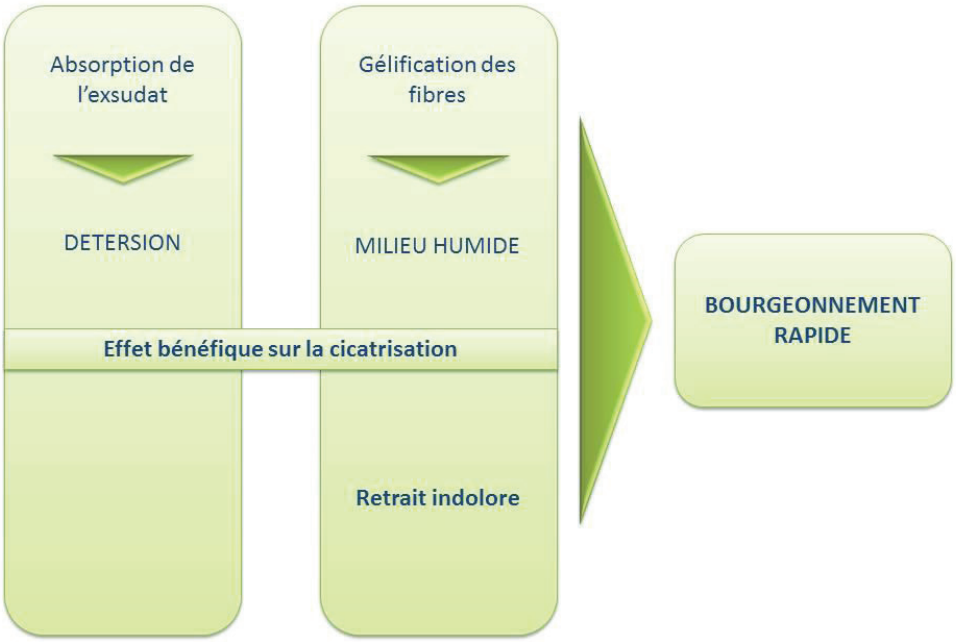


Figure 1 : Alginates, des propriétés aux plaies exsudatives

Les compresses d'alginate ont également une activité pharmacologique grâce au relargage des ions calcium. Les ions calcium libérés dans la plaie jouent un rôle fondamental au niveau de l'hémostase [17]. Il a été montré que l'alginate de calcium pouvait également stimuler la production de fibroblastes laissant suggérer une meilleure cicatrisation [18]. Il a aussi été reporté que l'alginate de calcium active des macrophages humains qui produisent le TNFα (Tumor Necrosis Factor-α) initiant le signal inflammatoire dans le processus de cicatrisation de la plaie [19]. Ces fonctions entraînent la ré-épithélialisation et la granulation engendrant une cicatrisation plus rapide [20].

Les alginates sont recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) pour le traitement séquentiel des plaies chroniques lors de la phase de détersion. De plus, la HAS recommande tout particulièrement Algostéril® et Coalgan® des Laboratoires Brothier, respectivement pour le traitement des plaies hémorragiques (dont la prise de greffe) et l'épistaxis et autres saignements cutanés et muqueux chez les patients ayant un trouble de l'hémostase. Il s'agit des seuls pansements composés d'alginates de calcium purs revendiquant une activité hémostatique sur le marché français [4].

2.3 Stratégie de développement d'un textile innovant pour la cicatrisation

2.3.1 Utilisation conseillée par la HAS des différents pansements

En France, certaines plaies, chroniques ou aigües, ouvrent droit au remboursement des pansements inscrits sur la liste des produits et prestations remboursables. Les « pansements et articles pour pansements » comprennent d'une part les pansements primaires, placés au contact direct de la plaie, et d'autre part, les pansements secondaires incluant les compresses et les matériels de fixation et de maintien. Ceux-ci ont été évalués par la Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et technologies de santé de la Haute Autorité de Santé (HAS). A la suite de ce rapport, la nomenclature des pansements remboursables a été modifiée (arrêté du 16 juillet 2010, paru au J.O. du 7 août 2010). La HAS a émis une classification des pansements recommandés dans chaque indication dans le but de fournir des outils pour orienter les choix des professionnels de santé (Tableau 1) [4].

Phase de cicatrisation	Type de plaie	Pansements recommandés
Toutes les phases (Traitement non séquentiel)	Chronique	Hydrocolloïdes
	Aiguë	Hydrocellulaires[1] Fibres de CMC (hydrofibres)[1]
Détersion (Traitement séquentiel)	Chronique	Alginates[1] Hydrogels
	Aiguë	-[2]
Bourgeonnement (Traitement séquentiel)	Chronique	Interfaces[3] Hydrocellulaires[1] Vaselinés
	Aiguë	Vaselinés
Epidermisation (Traitement séquentiel)	Chronique	Interfaces[3] Hydrocolloïdes
	Aiguë	Interface[3]

Situations cliniques spécifiques	Pansements recommandés
Peau fragile (maladies bulleuses)	Interfaces[3]
Prévention de l'infection (quelle que soit l'étiologie)	-[2]
Plaie infectée (quelle que soit l'étiologie)	-[2]
Plaie hémorragique (dont la prise de greffe)	Algostéril® (seul à revendiquer un pouvoir hémostatique avec un marquage CE de classe III)
Epistaxis et autres saignements cutanés et muqueux chez les patients ayant un trouble de l'hémostase	Coalgan®
Plaie malodorante (notamment cancers ORL, de la peau ou du sein)	Au charbon activé[4]

1. Plaies très exsudatives.
2. Aucun élément ne permet de recommander dans ce cas un type particulier de pansement.
3. Mepitel®, Urgotul®, Altreet®, Physiotulle® et Hydrotul® (arrêté du 16 juillet 2010).
4. Les pansements au charbon actif sont constitué de différents support (crèmes, compresses, plaques, etc.) auxquels a été ajouté du charbon actif, à visée d'absorption des molécules responsables des mauvaises odeurs des plaies.

Tableau 1 : Classification des indications des pansements de la HAS [13]

2.3.2 Panorama du marché français des pansements

Le Tableau 2 présente de manière non exhaustive les pansements vendus sur la marché français et quelques-unes de leurs caractéristiques.

Catégorie de compresses	Pouvoir d'absorption	Pouvoir antibactérien	Pansements	Laboratoire	Classe
Alginates	Absorption modérée à forte	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	Algisite®M	Smith & Nephew	IIb
			Algostéril®	**Brothier**	**III**
			Coalgan®	**Brothier**	**IIb**
			Comfeel Seasorb®	Coloplast	IIb
			Sorbalgon®	Hartmann	IIb
			Suprasorb®	Lohmann & Rauscher	IIb
			Urgosorb®	Urgo	IIb
Pansements vaselinés	Absorption faible	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	Atrauman®	Hartmann	IIb
			Grassolind®	Hartmann	IIb
			Jelonet®	Smith & Nephew	IIa
			Tulle gras®	Abbot	I
			Vaselitulle®	Abbot	I
Hydrocolloïdes	Absorption modérée	Activité mineure grâce au pH acide et à leur fonction barrière	Algoplaque®	Urgo	IIb
			Comfeel®	Coloplast	IIb
			Duoderm®E	Convatec	III
			Hydrocoll®	Hartmann	IIb
			Urgomed®	Urgo	IIb
Hydrogels	Faible absorption, possède en plus la capacité d'apporter un fluide pour donner un environnement humide aux plaies à faible exsudat	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	DuoDERM®hydrogel	Convatec	IIb
			Hydrosorb®	Hartmann	IIb
			Hydrotac® gel	Hartmann	IIb
			IntraSite® gel	Smith & Nephew	IIb
			Tegaderm® gel	3M Santé	IIb

Hydrocellulaires	Absorption modérée à forte	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	Allevyn®	Smith & Nephew	IIb
			Aquacel Foam®	Convatec	IIb
			Biatain®	Coloplast	IIb
			Hydrotac®	Hartmann	IIb
			Permafoam®	Hartmann	IIb
			Urgotul®	Urgo	IIb
Pansements Interface	Absorption variable	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	Adaptic®	J & J	IIb
			Altreet®	Coloplast	III
			Hydrotul®	Hartmann	IIb
			Mepitel®	Molnlycke	IIb
			Physiotulle®	Coloplast	IIb
Hydrofibres (CMC)	Forte absorption	Limitation de la prolifération par séquestration bactérienne	Aquacel®	Convatec	IIb
Pansements au charbon	Absorption des molécules responsables des mauvaises odeurs	Pas de pouvoir antibactérien spécifié	Actisorb®	J & J	IIb
			Askina Carbosorb®	B.Braun	IIa
Pansements à l'argent	Absorption faible à modérée	Fort pouvoir antimicrobien	Actisorb® Ag	J & J	III
			Altreet® Ag	Coloplast	III
			Release® Ag	J & J	III
			Urgotul® Ag	Urgo	III

Tableau 2 : Le marché français du pansement [20, 21]

2.3.3 Idée de conception d'un textile innovant pour la cicatrisation

Comme il a été vu, un pansement « idéal » doit maintenir un environnement humide à l'interface de la plaie, permettre les échanges gazeux, limiter la prolifération des microorganismes et absorber l'excès d'exsudat. Il doit aussi être non-toxique, non-allergisant, non-adhérent (c'est-à-dire facile à enlever), sans causer de lésions supplémentaires. Pour ces diverses raisons, il est envisagé de développer un biomatériau favorisant la cicatrisation tout en ayant des propriétés antimicrobiennes et qui requiert un minimum d'étapes de fabrication tout en limitant les coûts de production.

Seuls les alginates, les pansements hydrocellulaires et les pansements hydrofibres (CMC) répondent au critère important d'avoir un fort pouvoir d'absorption. Ces trois types de

pansements apportent également un environnement humide au niveau du lit de la plaie et permettent les échanges gazeux.

Une étude comparative entre des compresses d'hydrocolloïdes et des alginates a montré que les gels d'alginates pouvaient rester plus longtemps sur la plaie que les hydrocolloïdes avant de devoir être changés [22]. De plus, l'alginate est le seul matériau à présenter une activité hémostatique, l'hémostase étant la première étape clé dans le processus de cicatrisation. Algostéril® et Colagan®, fabriqués par Les Laboratoires Brothier, sont les seuls produits d'alginates purs sur le marché français que la HAS conseille d'utiliser pour les plaies hémorragiques ou en cas d'épistaxis (hémorragie extériorisée par les fosses nasales).

Effectivement, l'alginate de calcium est un matériau de choix de par sa biocompatibilité, ses propriétés absorbantes, hémostatiques et cicatrisantes et sa facilité à être ôté sans dommages pour le patient. Ce matériau est largement développé par les Laboratoires Brothier, ce qui permettra de mieux maîtriser les entrants et les aboutissants du développement industriel.

Néanmoins, dans l'idée d'obtenir la compresse idéale, le textile développé doit pouvoir limiter le développement des microorganismes. Actuellement, les pansements ayant une activité bactéricide sont essentiellement des pansements à l'argent. Leur mécanisme d'action est basé sur le relargage d'argent, molécule bactéricide. Pour les pansements hydrofibres (CMC) Aquacel®, Convatec revendique une limitation de la croissance bactérienne grâce à une séquestration des bactéries dans le gel formé au contact de l'exsudat de la plaie. Une étude en microscopie comparant une compresse Aquacel® et des compresses d'alginates, a montré que cette première possédait une capacité d'absorption de bactéries nuisibles plus importante que les compresses d'alginates. Effectivement dans cette étude, il a été démontré que la CMC contenue dans la compresse produit un gel lors de son hydratation par l'exsudat de la plaie qui a la capacité d'encapsuler un large nombre de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* contrairement au gel d'alginate [23]. Il s'agit ici d'un phénomène physique permettant de lutter contre une faible contamination bactérienne. Néanmoins, en cas d'infection, cela implique de devoir changer régulièrement le pansement qui est certes le séquestrant bactérien, mais qui est donc vite souillé. En cas d'excès de bactéries, il peut alors devenir un foyer à la colonisation bactérienne.

C'est pourquoi, dans ce contexte, il a été souhaité de développer un textile mixte à base d'alginate de calcium et comprenant du chitosane, polysaccharide connu notamment pour ses

propriétés bactériostatiques. Les alginates seront largement présentés dans le chapitre bibliographique suivant, puis les chitosanes seront à leur tour décrits.

3 Les alginates

3.1 Définition, source et structure

Les alginates sont des polysaccharides anioniques issus des algues brunes. Ils sont issus des algues brunes du genre *Phaeophyceae*, incluant *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum* et *Macrocystis pyrifera* (Figures 2, 3 et 4) [24]. Presque tous les alginates sont récoltés dans leur milieu sauvage. La culture des algues brunes est trop chère pour produire des alginates à un prix raisonnable pour des applications industrielles. La quantité et la qualité des alginates extraits dépendent de l'espèce de l'algue et de la saison de la récolte. Les alginates peuvent également être produits par des bactéries comme *Azotobacter vinelandii* et des espèces de *Pseudomonas* [5].



Figure 2 : Photo d'algues brunes du genre *Laminaria*



Figure 3 : Photo d'algues brunes du genre *Ascophyllum*

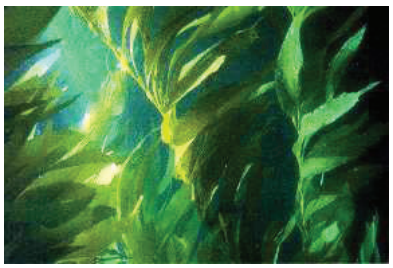


Figure 4 : Photo d'algues brunes du genre *Macrocystis*

Les algues récoltées sont lavées, macérées et subissent ensuite une extraction en utilisant du carbonate de sodium [25]. L'extrait est filtré et du chlorure de sodium ou de calcium est ajouté au filtrat formant un précipité fibreux d'alginate de sodium ou de calcium. Ce sel d'alginate peut être transformé en acide alginique par un traitement avec de l'acide chlorhydrique dilué. Après une série de purifications, l'alginate est séché et broyé sous forme de poudre dans ses différentes formes ioniques.

Le processus d'extraction permet d'obtenir de l'alginate de sodium sec en poudre. L'alginate est présent dans les parois cellulaires des algues brunes sous forme de sels de calcium, de magnésium et de sodium de l'acide alginique. Seuls les sels de sodium sont solubles dans l'eau. Afin d'extraire l'alginate des algues avec le meilleur rendement possible, il est

nécessaire de convertir tous les sels (calcium et potassium) en sels d'alginate de sodium en utilisant du carbonate de sodium. Les résidus d'algues sont éliminés par filtration. L'alginate de sodium doit ensuite être récupéré à partir de cette solution aqueuse visqueuse. Le procédé consiste à ajouter de l'acide provoquant la formation d'acide alginique, insoluble dans l'eau et générant un gel mou. Une partie de l'eau peut être retirée (par centrifugation par exemple). Puis, de l'alcool est ajouté à l'acide alginique, suivi par du carbonate de sodium, qui convertit l'acide alginique en alginate de sodium. Ce dernier, non soluble dans le mélange d'alcool et d'eau peut être séparé du système. Le procédé se termine par une étape de séchage et de broyage afin d'obtenir une poudre de granulométrie appropriée à l'application [25, 26].

L'acide alginique, forme neutralisée de l'alginate, est un polysaccharide constitué de deux unités acides uroniques [27] : l'acide D-mannuronique (M) et l'acide L-guluronique (G), associés en 1→4, selon un enchaînement de trois types de blocs (Figure 5) [28] :

- Des blocs homopolymères d'unités d'acide mannuronique (-M-M-M-)
- Des blocs homopolymères d'unités guluroniques (-G-G-G-)
- Des blocs copolymères d'unités d'acides mannuroniques et guluroniques (-M-G-M-)

La répartition et la longueur des blocs dépendent de l'espèce et de la partie de l'algue dont est extrait l'acide alginique [29].

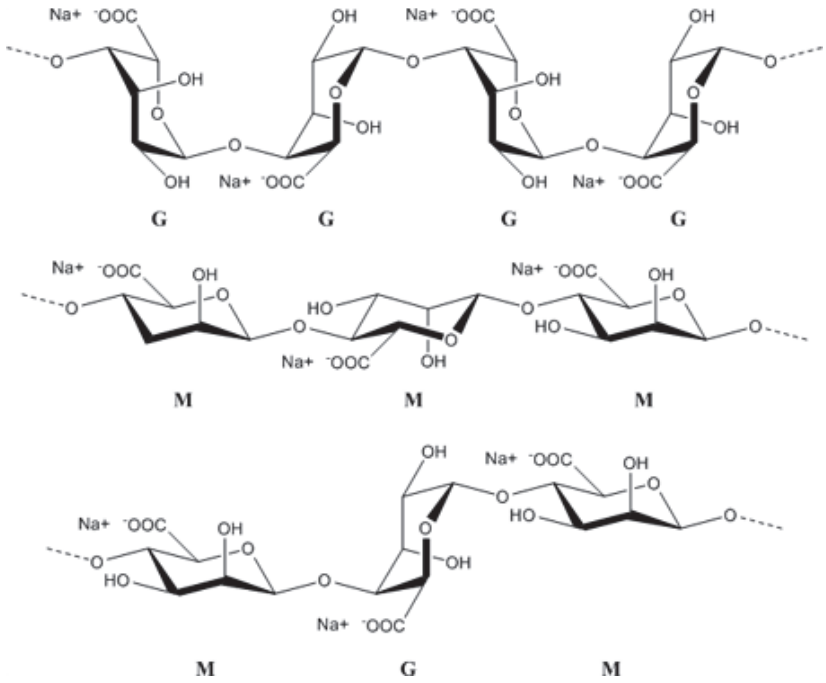


Figure 5 : Structure chimique des blocs G, blocs M et des blocs M-G [5]

3.2 Comportement physico-chimique des alginates

3.2.1 Comportement en solution

L'alginate de sodium, comme tous les sels d'alginate monovalents, est soluble dans l'eau pour des valeurs de force ionique faibles. Lorsque la salinité du milieu augmente, la solubilisation du polyanion est plus lente.

Le pH de la solution joue aussi un rôle dans la solubilisation des alginates. Si le pH de la solution contenant l'alginate est inférieure au pK_a de l'acide mannuronique ($pK_a = 3.38$) et de l'acide guluronique ($pK_a = 3.65$), alors il peut y avoir formation d'un hydrogel. Chaque alginate a son propre pK_a apparent qui dépend de la répartition des blocks G et M sur la chaine, la concentration en alginate et de la force ionique de la solution aqueuse [30].

Un changement de force ionique dans la solution peut avoir un effet important sur la conformation de la chaîne polymère et donc sur la viscosité de la solution. De plus, lorsque la force ionique augmente, la vitesse de solubilisation de l'alginate diminue. Ainsi, il est préférable de solubiliser dans un premier temps l'alginate dans l'eau pure avant d'y ajouter une espèce ionique sous agitation [31].

3.2.2 Aptitude à la formation de gels

Les hydrogels sont des réseaux polymériques dont les chaînes gonflent dans l'eau [32]. Il est possible de distinguer deux types d'hydrogels : les hydrogels chimiques et les hydrogels physiques.

Dans les hydrogels chimiques, les nœuds du réseau sont des liaisons covalentes et l'équilibre de gonflement est déterminé par le taux de réticulation et l'interaction polymère-solvant. De par le caractère irréversible de la liaison covalente, ces hydrogels ne sont ni thermoréversibles, ni solvoréversibles.

Les hydrogels physiques sont quant à eux formés d'un réseau polymère exclusivement constitué de nœuds d'interactions physiques. Ces nœuds de réticulation physiques sont des enchevêtrements de chaînes polymères, des liaisons hydrogène, ioniques, des interactions de Van-der-Waals, parfois des zones cristallines ou d'autres interactions supramoléculaires. Ces types de liaisons sont de faibles énergies et permettent une réversibilité du gel en fonction de la température et/ou du pH, etc. [33].

Les alginates ont la capacité de gélifier par l'intermédiaire de deux mécanismes :

Le premier est la gélification de l'acide alginique. Ce mécanisme se produit lorsque le pH du milieu est au-dessous du pK_a de l'alginate. L'acide alginique est alors non chargé et les associations intermoléculaires peuvent se faire par des liaisons hydrogènes et par interactions hydrophobes [30].

Le second est un mécanisme de gélification ionotrope se produisant en présence de cations multivalents [34], comme l'ion calcium ou l'ion magnésium [35]. Les complexes se forment à la fois sur les résidus mannuroniques que sur les résidus guluroniques. L'alginate de calcium peut former un hydrogel physique grâce à des interactions inter-chaines. Le modèle « boîte à œufs » (« egg box » model) est la représentation la plus couramment utilisée pour rendre compte des interactions entre les chaînes d'alginate et les cations divalents. Cette gélification est induite par un processus dans lequel sont impliqués préférentiellement des blocs G. Selon le modèle, deux unités G de deux chaînes d'alginate différentes se lient au même cation divalent et forment une jonction. La sélectivité du phénomène tient à la géométrie particulière de la liaison diaxiale entre les unités G qui forment une cavité permettant une chélation efficace du cation. Les ions calcium sont alors retenus dans une sorte de cavité et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles (Figure 6) [36].

Figure 6 : Schéma représentatif du modèle « boîte à oeufs » [36]

La formation d'une zone de jonction entre les chaînes d'alginate, *via* le contre-ion calcium, aboutit de proche en proche à la formation d'un hydrogel. La formation de ces zones de jonction (« multimères ») entre les chaînes est un procédé coopératif avec :

- Une liaison instable entre le premier ion et la chaîne alginate
- Des liaisons plus stables pour les ions suivants

Ce phénomène aboutit à une jonction stable pour un minimum de 8 à 20 unités G consécutives (Figure 7).

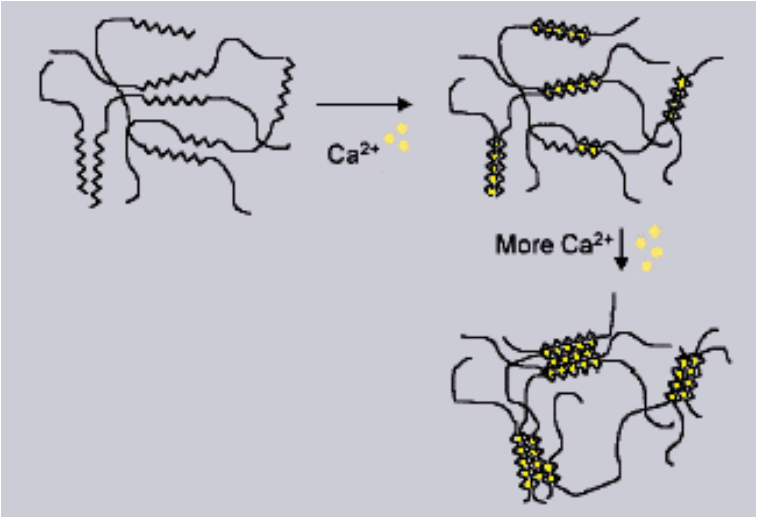


Figure 7: Représentation schématique de la formation d'egg-box (illustration : site internet fmcbiopolymers)

Les gels obtenus à partir d'alginate riche en résidus guluroniques présentent les propriétés rhéologiques les plus élevées et les vitesses de diffusion de solutés les plus grandes. En effet, le taux important d'acide guluronique, avec de longs blocs G et de courts segments élastiques est responsable de la formation d'un réseau ouvert et rigide à cause de la densité de zones d'interactions inter-chaines. A l'inverse, un réseau contenant une faible fraction de résidus guluroniques, avec de longs segments entre les nœuds présente plus d'enchevêtrements et engendre un réseau plus fermé avec une structure plus souple (Figure 8) [37].



Figure 8 : Modèles de structures proposées pour des réseaux de gels formés à partir d'alginate possédant des blocs d'acide guluronique de longueur différente : à gauche, taux élevé de G ; à droite, taux élevé de M

Pour résumer, il existe trois étapes consécutives qui mènent à l'association du calcium à l'alginate. La première étape est l'interaction des ions calcium avec les résidus mannuroniques et guluroniques pour former un mono-complexe. La deuxième étape consiste en la propagation et la formation de dimères de type « boîte à œufs » *via* l'association des mono-complexes impliquant préférentiellement les résidus guluroniques. La troisième et dernière étape est l'association latérale des dimères « boîte à œufs », qui forment ainsi des multimères.

- **Etape 1** - Coordination des ions Ca^{2+} au sein d'une cavité créée par une paire de séquences guluronates le long des chaînes d'alginate
- **Etape 2** - Dimère « boîte à œufs »
- **Etape 3** - Multimères « boîte à œufs » associés latéralement

Les points noirs représentent les atomes d'oxygène potentiellement impliqués dans la coordination avec l'ion calcium. Les points blancs représentent les ions calcium (Figure 9).

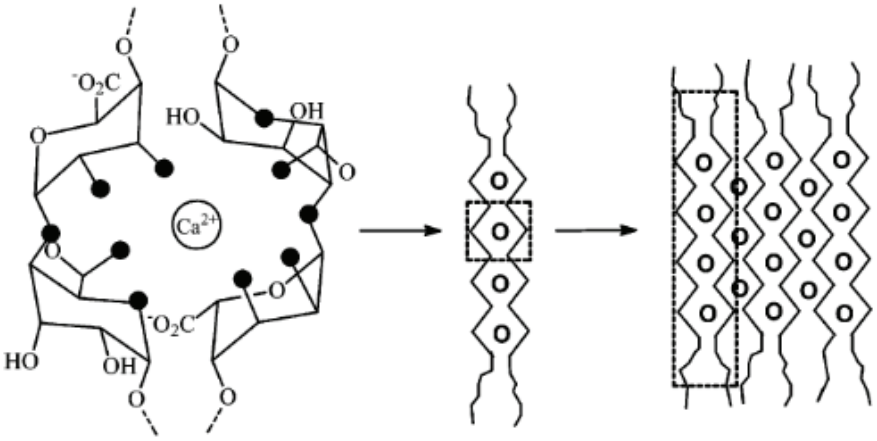


Figure 9 : Etapes de formation du gel Ca-Alginate [36]

3.3 Propriétés biologiques de l'alginate

3.3.1 Biocompatibilité

Un matériau est considéré comme biocompatible lorsqu'il n'engendre pas de réponse inflammatoire délétère pour les tissus et qu'il est bien toléré par les cellules. La biocompatibilité d'un matériau peut être caractérisée par la non-toxicité (cytocompatibilité) et son hémocompatibilité [38] (Norme ISO – EN – NF 10993).

Bien que la biocompatibilité de l'alginate ait été largement évaluée en *in vitro* et *vivo*, il existe toujours un débat au sujet de l'impact de la composition de l'alginate sur ses propriétés de biocompatiblité, et sur le rôle du cation dans cette réponse inflammatoire [39]. La réponse inflammatoire serait plus importante avec une fraction mannuronique importante [40]. La réponse immunitaire lors d'une injection d'alginate ou sur le site d'implantation pourrait être également due aux impuretés présentes dans l'alginate. L'alginate issu de source naturelle peut contenir diverses impuretés comme des métaux lourds, des endotoxines, des protéines, et des composés polyphénols [5]. Néanmoins, Orive *et al.* ont montré qu'un implant d'alginate hautement purifié par de multiples étapes d'extraction n'induisait pas de réaction immunitaire

chez l'animal [41]. Lors de leur étude sur l'injection de gel d'alginate commercial purifié chez la souris, Jangwook et Kuen Yong Lee ont également montré que le gel n'engendrait pas de réponse immunitaire [42].

3.3.2 Agent hémostatique

L'alginate de calcium est utilisé comme un agent hémostatique local. Quand l'alginate de calcium est en contact avec les tissus lésés, il échange ses ions calcium contre les ions sodium présents dans l'exsudat de la plaie. Le calcium a un rôle important dans l'hémostase et la réponse inflammatoire. Il est connu sous le nom de facteur IV dans la cascade hémostatique. Il engendre la sécrétion de médiateurs hémostatiques à partir des thrombocytes. Ainsi il active les thrombocytes, les facteurs VII, IX et X de l'hémostase [43].

3.3.3 Agent cicatrisant

Les compresses à base d'alginate de calcium ont aussi un effet sur la cicatrisation des plaies. Il a été décrit que l'alginate stimulait les fibroblastes et les monocytes engendrant la production de cytokines telles que l'interleukine-1, l'interleukine-6 et la TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) et d'autres molécules actives à partir de cellules clés impliquées dans le processus de cicatrisation [16, 44, 45]. Il a été également montré que les alginates riches en unités mannuroniques avaient plus d'effets favorables sur la cicatrisation, bien que certains auteurs pensent que cette activité est aussi fonction du niveau de purification de l'alginate [46, 47].

3.3.4 Agent absorbant

Les alginates possèdent un fort pouvoir d'absorption de l'eau. Ils sont capables d'absorber de l'eau jusqu'à 300 fois leur propre poids [24]. C'est pourquoi les compresses à base d'alginate de calcium sont utilisées pour les plaies exsudatives. Yimin Qin a montré que plusieurs facteurs influaient sur la capacité d'absorption des alginates. Deux mécanismes d'absorption ont été mis en avant : une absorption intra-fibre et une absorption inter-fibre [48]. Cette dernière correspond à une absorption des fluides entre chaque fibre alors que l'absorption intra-fibre correspond à une absorption de l'aginate de calcium, à l'intérieur de la structure de la fibre.

Le fait qu'un textile pour cicatrisation des plaies ait la capacité d'effectuer une absorption intra-fibre permet de limiter le risque d'infection de la plaie, qui peut particulièrement être

pathogène en milieu hospitalier. En effet, quand les fluides sont absorbés à l'intérieur même des fibres, celles-ci gonflent et les espaces vides inter-fibreux sont comblés. Dans ce gonflement, une partie de l'alginate de calcium redevient une solution visqueuse. Ainsi les bactéries qui sont sur le textile ou au niveau de la plaie sont immobilisées.

Ainsi, dans sa forme sèche, la compresse d'alginate de calcium absorbe les fluides des plaies et reforme ainsi un hydrogel, puis une solution fortement visqueuse par échange ionique entre le calcium de l'alginate et le sodium présent dans l'exsudat des plaies et le sang. Ceci permet de maintenir un microenvironnement humide favorisant la cicatrisation. De plus, grâce à ce phénomène le textile peut être enlevé sans douleurs et dommages pour le patient.

3.4 Diverses variétés de pansements d'alginate

Il existe une grande variété de pansements d'alginate. Cela s'explique d'une part, par la variabilité des matériaux à base d'alginates. En effet, la structure des alginates est variable en fonction de la source et notamment du genre de l'algue brune dont ils sont extraits (*Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Laminaria*). Les alginates extraits des algues brunes issues de mers froides et agitées présentent une prédominance de blocs G. Cet aspect structural est aussi retrouvé lorsque l'algue est vieille ou lorsque l'alginate est extrait de la tige de la plante. A l'inverse, les alginates présentant une prédominance de blocs M sont extraits des algues brunes issues de mers chaudes, calmes, de plantes jeunes ou de la feuille de l'algue. Le nombre et la répartition des motifs constitutifs d'acides guluronique et mannuronique jouent un rôle prépondérant dans les caractéristiques du produit fini. La structure des blocs des alginates impactent directement les propriétés du pansement d'alginate. Un pansement riche en alginate ayant une prédominance de blocs G présentera un textile rigide alors qu'un pansement riche en alginate à prédominance de blocs M présentera davantage de souplesse grâce au rôle des résidus guluroniques dans la gélification.

Peu d'industries produisent des pansements d'alginate de calcium purs. Beaucoup utilisent un mélange d'alginate de calcium/sodium ou encore un mélange d'alginates/CMC (Tableau 3).

Pansements	Laboratoire	Prédominance des blocs	Composition
Algisite®M	Smith & Nephew	M	> 50 % d'alginates
Algostéril®	**Brothier**	**G**	**Alginate de calcium pur**
Coalgan®	**Brothier**	**G**	**Alginate de calcium pur**
Sorbalgon®	Hartmann	M	> 50 % d'alginates
Suprasorb®	Lohmann & Rauscher	M	> 50 % d'alginates
Urgosorb®	Urgo	G	> 50 % d'alginates + CMC

Tableau 3 : Quelques exemples de pansements d'alginates mettant en évidence la diversité de composition

4 Les chitosanes

4.1 Définition, source et structure

Le chitosane est le principal biopolymère dérivé de la chitine (copolymère de N-acetyl-D-glucosamine et N-D-glucosamine, unis par des liaisons β-(1→4)) (Figure 10). La chitine est très riche en résidus N-acetyl-D-glucosamine. Le chitosane résulte d'une désacétylation de la chitine sous des conditions alcalines ou par hydrolyse enzymatique (en présence d'une chitine désacétylase). Le chitosane est donc un polymère plutôt riche en D-glucosamine avec des fractions molaires de N-acetyl-D-glucosamine (= degré d'acétylation (DA)) variables. Par définition, les chitosanes sont les polymères dont le DA permet leur solubilisation en milieu aqueux acide dilué (*Cf.* Chapitre 1, paragraphe 4.3.1). Ainsi, les chitosanes ont souvent un DA compris entre 0 et 65 %.

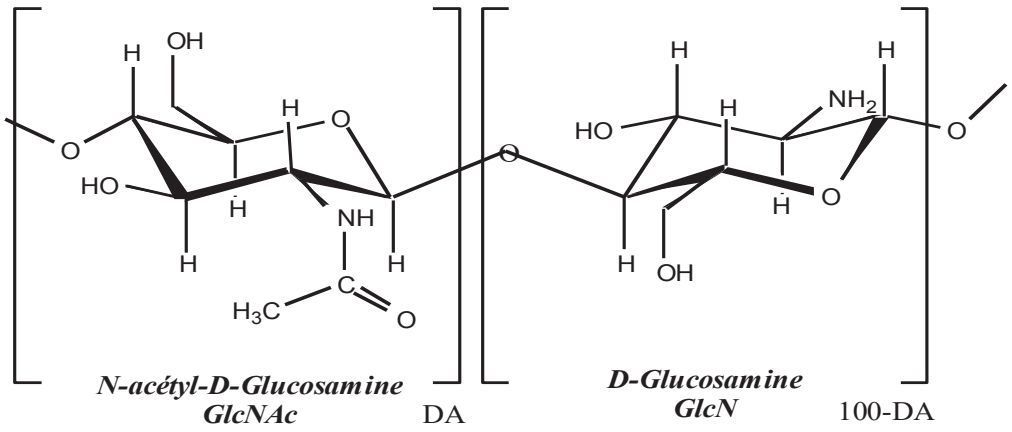


Figure 10 : Structure de la chitine et du chitosane.

La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant sur la planète, après la cellulose [49].

La chitine est obtenue à partir des cuticules des arthropodes tels que les crabes et les crevettes et de l'endosquelette des céphalopodes comme les sèches et les calamars qui contiennent sur une base sèche entre 20 et 30 % de chitine [50]. Cependant, elle est aussi trouvée dans les parois cellulaires et la matrice extracellulaire de champignons, de certaines levures et algues, ainsi que dans la cuticule des insectes [51]. La teneur en chitine varie en fonction des espèces, des conditions de croissance et des saisons. Les caractéristiques physiques (poids moléculaires et distribution en poids moléculaires) et chimiques (degré d'acétylation, pureté) varieront également selon la source et les méthodes de préparation [49].

L'isolement de la chitine à partir des carapaces se fait normalement en deux étapes :

1. la déprotéinisation
2. la déminéralisation (élimination du carbonate et phosphate de calcium)

La déprotéinisation est généralement réalisée par trempage des carapaces dans une solution de NaOH (1 – 10 %) à des températures élevées (65 – 100 °C). Le temps d'immersion peut varier entre 0.5 à 12 h et dépendra du procédé et des caractéristiques recherchées.

La déminéralisation s'effectue dans une solution d'acide chlorhydrique (jusqu'à 10 %) à température ambiante pendant des temps variant entre 0.5 h et quelques jours selon les méthodes de préparation.

La chitine obtenue peut alors être décolorée permettant d'obtenir une poudre de chitine commerciale de couleur blanche.

4.2 Préparation du chitosane à partir de la chitine

Industriellement, l'obtention du chitosane (Figure 10) est faite par la désacétylation de la chitine par immersion dans une solution concentrée de NaOH ou de KOH (40 – 50 %) à température élevée (100 °C et plus). L'opération est intégrée à l'étape de déprotéinisation de la chitine. La concentration de la solution alcaline, la température, les temps de réaction, la source et le traitement de la chitine affectent la structure chimique finale du chitosane et ses propriétés [49]. Le degré d'acétylation peut être diminué par les conditions et le nombre de traitements en solution alcaline. Le DA peut varier de 0 à 65 %, et la structure chimique peut aussi être décrite en fonction de la répartition des unités acétylées (répartition plutôt par bloc

induisant une plus faible solubilité ou répartition plutôt aléatoire ce qui permet une meilleure solubilité jusqu'à un degré d'acétylation de 60 - 65 %).

4.3 Comportement physico-chimique du chitosane

4.3.1 Comportement en solution

La solubilisation du chitosane est possible grâce à la protonation des fonctions NH_2 sur la position C2 de l'unité D-glucosamine. Le polysaccharide devient alors, en milieu aqueux acidifié, un polyélectrolyte cationique dont la solubilisation est due aux répulsions électrostatiques entre les fonctions amines. Néanmoins, la solubilité du chitosane est difficile à maîtriser. Elle dépend de différents paramètres tels que la masse molaire moyenne en masse (M_w), le DA, la concentration ionique, le pH, la nature de l'acide utilisé pour la protonation et la distribution des groupements acétylés le long de la chaîne. La solubilité du chitosane diminue avec la M_w [52]. Lorsque le DA augmente, le chitosane devient soluble sur une plus large gamme de pH en dépit d'une diminution de la solubilité [53].

En s'appuyant sur des techniques d'observations microscopiques et sur la diffusion dynamique de la lumière, Popa-Nita *et al.* montrent qu'en fonction de la densité de charge du polymère en solution, les chaines vont être isolées des unes des autres ou vont avoir des points de contacts inter-chaines [54]. La présence d'interactions dans une solution de chitosane a déjà été mentionné par Amiji [55] et Anthonsen [56]. Popa-Nita *et al.* concluent que ces interactions sont créées par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. En partant d'une solution dans laquelle les chaines du polymère sont isolées, il est possible de déplacer progressivement la balance hydrophile/hydrophobe en faveur d'un régime plus hydrophobe en diminuant la densité de charges du polymère [54]. Ces domaines intermoléculaires hydrophobes avaient déjà été suggérés par Philippova *et al.* [57]. Lorsque la concentration est plus grande que la concentration d'enchevêtrement (C*), le chitosane pourrait former des domaines intermoléculaires hydrophobes. Ces domaines agrégés seraient présents dans toutes les formes physiques du chitosane, ce qui représente un continuum de structure de la solution à la forme solide. Les propriétés physico-chimiques des solutions sont fonction du degré d'acétylation. L'établissement des évolutions des différents paramètres physicochimiques avec le DA a permis d'identifier trois domaines :

- A faible DA : comportement de poly-électrolyte fort
- A fort DA : comportement de poly-électrolyte faible ou hydrophobe

- A DA intermédiaires : une zone où les propriétés physico-chimiques varient peu avec le DA (viscosité intrinsèque, rayon de giration, dérivée de l'indice de réfraction avec la concentration « dn/dc »; coefficient du Viriel, pK_0 intrinsèque de l'amine, etc..)

4.3.2 Aptitude à la formation de gels

Comme il a déjà été évoqué (*Cf.* Chapitre 1, paragraphe 3.2.2), il existe deux types d'hydrogels, chimiques et physiques. Seuls, les hydrogels physiques de chitosane sans agents réticulants seront abordés ici. Ils possèdent ainsi l'avantage de ne pas contenir d'agents réticulants éventuellement toxiques.

Les hydrogels résultent de liaisons ou d'interactions de différentes natures : ioniques, hydrogènes, Van Der Waals ou hydrophobes. Les chitosanes ont ainsi la capacité de gélifier par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes :

L'un des mécanismes d'obtention des hydrogels de chitosane est par réticulation ionique (complexation) ou formation de complexes poly-électrolytes. La réticulation ionique implique l'interaction des groupes NH_3^+ du chitosane avec des anions comme le sulfate [58] ou le citrate [59]. Dans le cadre de la réticulation du chitosane par formation de complexes polyélectrolytes, la réaction a lieu avec un polymère chargé négativement et dont les charges sont opposées à celles du chitosane, tels que les alginates [60-63].

D'autre part, il est possible d'obtenir des hydrogels physiques de chitosane en modifiant la balance des interactions hydrophiles/hydrophobes en faisant varier certains paramètres physico-chimiques, notamment la densité de charge apparente du polymère [49, 64]. Moore et Roberts ont observé, lors d'études portant sur la réacétylation du chitosane, que la solubilité du polysaccharide diminuait progressivement avec l'augmentation du degré d'acétylation et résultait finalement en la formation de gels non réversibles [65, 66]. Plusieurs auteurs ont élaboré des hydrogels physiques de chitosane en jouant sur la densité de charge apparente et ont étudié l'impact du DA sur la gélification [50, 64, 67]. Vachoud *et al.* ont observé une augmentation de la vitesse de gélification avec le poids moléculaire du chitosane [68].

4.4 Propriétés du chitosane

4.4.1 Biocompatibilité

La non-toxicité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'humain pour des applications diététiques et cosmétiques [69, 70]. Il est préférable de considérer le dispositif médical lui-même, plutôt que le matériau avec lequel il est fabriqué pour évaluer la réelle biocompatibilité [71]. Effectivement, le même matériau pourra présenter des propriétés différentes et induire des réponses différentes en fonction de sa forme physique (solution, hydrogel, fil, etc.), de la fonctionnalité du dispositif médical et de ses conditions d'implantation.

La cytocompatibilité du chitosane a largement été étudiée, notamment sous différentes formes (solution, hydrogel, film, lyophilisat, etc.) et sur différents types de cellules telles que les fibroblastes [72, 73], les chondrocytes [74], les kératinocytes [75] ou les ostéoblastes [76]. Néanmoins le comportement des cellules au contact d'un matériau à base de chitosane (*in vitro* ou *in vivo*) dépend des paramètres structuraux du chitosane (DA, M_w) [77, 78], sans oublier la forme du matériau testé.

4.4.2 Agent hémostatique

Le chitosane n'altère pas les équilibres osmotiques du sang, les protéines plasmatiques, les éléments figurés du sang et les cellules du tissu vasculaire [79]. Néanmoins, ses interactions avec le sang sont toujours étudiées. Effectivement, bien qu'il n'ait pas été observé de symptômes anormaux après une injection en intraveineuse de chitosanes et d'oligo-chitosanes [80], des propriétés hémostatiques et thrombogènes sont décrites dans la littérature [81].

Une activité hémostatique du chitosane de haute masse a été démontrée [82]. Il a été montré que le chitosane avait la capacité de diminuer de 43 % le temps de saignement du lapin dont la coagulation avait été diminuée par l'administration d'héparine [82, 83]. Le mécanisme de coagulation provoquée par un film de chitosane serait dû à l'agglutination des globules rouges au contact du polysaccharide dont les propriétés poly-cationiques pourraient jouer un rôle important, indépendant de la cascade de coagulation classique [84].

4.4.3 Agent cicatrisant

Il a été largement publié que le chitosane était un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire [85-87]. En effet, il peut favoriser la prolifération de différents types de cellules (animales et humaines) sans modification de leur phénotype et par conséquent stimuler la production de matrice extracellulaire. Les hydrogels de chitosane ont largement été étudiés et leur capacité de cicatrisation a été démontrée par des études *in vivo* [88] et *in vitro* [72, 74]. Le chitosane a la capacité de stimuler la cicatrisation par l'activation des cellules inflammatoires tels que les macrophages [89], les polymorphonucléaires (PMN), et également les fibroblastes et les cellules endothéliales [90].

Il a été montré que le chitosane activait les macrophages engendrant leur migration et la production de facteurs de croissance (Transforming Growth Factor TGF-β1 et Platelet-Derived Growth Factor PDGF) [91] et de cytokines [92]. Ces derniers favoriseraient la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène, éléments importants lors de la phase de granulation, stade initial de la reconstruction tissulaire qui précède la ré-épithélialisation de la zone endommagée.

Le chitosane exerce aussi des effets chimiotactiques en particulier sur les PMN. Il a été montré qu'une plaie cutanée soignée à l'aide de chitosane possédait plus de PMN au niveau du tissu en cicatrisation qu'une plaie sans soin particulier. L'infiltration des PMN dans les premiers stades de la cicatrisation (phase inflammatoire) favorise le processus de reconstruction tissulaire [93].

Selon Ueno *et al.*, l'action du chitosane sur la cicatrisation s'effectue ainsi en deux étapes : la stimulation de la migration des cellules inflammatoires tels que les PMN et les macrophages, tôt dans le processus de cicatrisation puis l'accélération de la granulation induisant une augmentation du taux de collagène au niveau de la plaie [90].

4.4.4 Agent antibactérien

Un des nombreux atouts du chitosane dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires ou encore dans les dispositifs médicaux est qu'il possède la capacité d'être antibactérien.

Dans la littérature, les chitosanes possèdent une activité aussi bien sur les bactéries à Gram-positif (G+) (ex. *Staphylococcus aureus*) que celles à Gram-négatif (G-) (ex. *Pseudomonas*

aeruginosa, *Escherichia coli*) [94-97]. Les mécanismes ne sont pas encore bien compris et beaucoup de paramètres (pH, M_w, DA, le type de matériau) peuvent contribuer à l'activité antibactérienne [98, 99]. Quatre mécanismes d'action antibactériens sont proposés dans la littérature. Le plus accepté est l'interaction ionique entre le chitosane et la membrane bactérienne engendrant la mort de la cellule. Effectivement, les bactéries à G- possèdent, en globalité, une membrane cellulaire chargée négativement composée de lipopolysaccharides. En présence de chitosane, chargé positivement, l'interaction chitosane/bactérie provoquerait une déstructuration de sa membrane, puis la fuite de ses composants cellulaires et la mort de la cellule bactérienne [100].

Néanmoins, le chitosane est également actif sur les bactéries G+ dont la membrane cellulaire est globalement neutre, composée essentiellement de peptidoglycanes. Le deuxième mécanisme proposé est la liaison du chitosane avec l'ADN microbien qui engendrerait l'inhibition de la synthèse d'ARNm et de protéines via la pénétration du chitosane dans le noyau des microorganismes [101-103]. Dans cette hypothèse, la molécule de chitosane pourrait passer la paroi de la cellule bactérienne et atteindre la membrane plasmique. Des observations réalisées en microscopie confocale confirment la présence d'oligomères de chitosane (M_w de 5 et 8 kg/mol) au sein d'*Escherichia coli* [104]. Raafat *et al*. [98] ont décrit qu'un tel mécanisme est possible mais la probabilité qu'il se produise est faible. La thèse qui prévaut est que le chitosane agit essentiellement comme un perturbateur de la membrane externe plutôt que comme un matériau pénétrant, surtout pour des chitosanes ayant des M_w supérieures à 100 kg/mol. Dans ce débat, la forme physique doit jouer un rôle (polymère en solution, nanoparticule, forme solide, hydrogel…).

La troisième hypothèse est la formation d'une barrière externe qui chélate les métaux et/ou provoque la suppression des nutriments essentiels à la croissance microbienne [100, 105]. Si ce mécanisme est basé sur une interaction électrostatique, plus le nombre d'amines cationiques est grand (soit un DA faible), et plus l'activité antimicrobienne doit être importante. Cela suggère aussi que le chitosane possède une activité antimicrobienne plus grande que la chitine comme il a été confirmé expérimentalement [106, 107]. Des observations ont montré que plus la concentration en chitosane était élevée et plus le polymère avait tendance à former un revêtement autour de la bactérie sans nécessairement être attaché à la surface et indépendamment du type de bactérie [102].

Enfin, d'autres auteurs proposent un quatrième mécanisme : lorsque le chitosane est utilisé pour modifier une surface, il peut influencer l'adhésion bactérienne [108]. Il faut alors considérer les interactions entre le chitosane et les bactéries à la surface du matériau (revêtement, implant, etc.) où l'adhésion bactérienne peut être altérée par des modifications chimiques (groupes fonctionnels présents à la surface, la densité de charge en surface) et des modifications physico-chimiques (cristallinité, hydrophobie, rugosité). Ainsi l'activité antibactérienne des chitosanes reposerait sur le fait que les bactéries ne puissent pas adhérer et donc coloniser le matériau ou former un biofilm.

Différentes études ont montré que l'activité biologique des chitosanes dépendait significativement de M_w et du DA. Ces deux paramètres jouent un rôle sur les propriétés antimicrobiennes des chitosanes [109]. Nombreux auteurs ont mené des études sur notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* ou encore *Klebsiella pneumoniae* et ont montré que les chitosanes de faibles M_w possédaient une plus grande activité antibactérienne [110-112]. Liu et al. [104] ont observé qu'en dessous de $M_w = 91.6$ kg/mol, l'activité antibactérienne augmentait avec M_w et au-delà de cette masse molaire, l'activité antibactérienne diminuait. Cette observation s'explique par le fait qu'au-delà de cette masse molaire critique, la solubilité du chitosane diminue ce qui favorise une structure agrégée à travers de fortes liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les groupes aminés sont ainsi moins disponibles pour interagir à la surface des bactéries ou chélater les métaux. L'activité antibactérienne des chitosanes est alors diminuée. Ainsi, l'activité antibactérienne optimale du chitosane correspondrait au nombre maximal de groupes amines protonés disponibles qu'il serait possible de mettre à disposition des interactions membranaires.

5 Le filage et caractérisation des fibres

Contrairement aux fibres synthétiques qui peuvent être fabriquées par filage par voie fondue, le procédé de filage le plus utilisé pour les polymères naturels est le filage dit « au mouillé ». Les polysaccharides ne peuvent pas subir de filage fondu. En effet, les polysaccharides possèdent de nombreuses liaisons hydrogène, responsables d'une transition vitreuse et d'une température de fusion située au-delà de leur température de décomposition thermique.

Dans un procédé de filage mouillé, les polysaccharides sont dissous dans un collodion (solution aqueuse ou hydro-alcoolique), puis extrudés à travers une filière qui est directement

plongée dans un bain de coagulation, où le polymère gélifie [113]. L'extrudât gélifié (mono ou multibrins) est lavé, étiré et séché pour former un fil.

5.1 Le filage de l'alginate

Les pansements d'alginates sont fabriqués à partir de fibres d'alginate de calcium. La fibre d'alginate de calcium est, quant à elle, produite à partir d'une solution d'alginate de sodium, extrudée à travers une filière immergée dans un bain enrichi en ions calcium. La coagulation produit un hydrogel physique d'alginate de calcium dont la forme est conditionnée par la filière d'extrusion. Le gel ainsi formé subit ensuite différentes étapes (étirage, séchage, etc.) pour former des compresses fibreuses.

La fibre d'alginate est la forme la plus sophistiquée de ce biopolymère. Cette forme présente un fort potentiel dans les applications médicales, principalement dans le domaine des compresses cicatrisantes. Les fibres d'alginate présentes actuellement sur le marché sont essentiellement produites par une méthode de filage au mouillé en utilisant une solution d'alginate de sodium et un bain de coagulation constitué d'acide chlorhydrique ou de chlorure de calcium [114].

En effet, il a été décrit deux grands procédés de filage de l'alginate. La première consiste à coaguler l'alginate par complexation d'ions bivalents tel que l'ion calcium. Une seconde méthode est possible par précipitation de l'alginate grâce à son changement d'état d'ionisation en condition acide ($pK_0 \approx 3$).

La première méthode de filage de l'alginate est la plus largement utilisée. Néanmoins certaines équipes scientifiques ont travaillé sur la seconde méthode qui consiste à former des fibres d'acide alginique et non d'alginate de calcium. Il est possible d'extruder une solution d'alginate de sodium de 1 à 6 % m/v en fonction de la viscosité souhaitée dans un bain de coagulation contenant 0.2 M d'acide chlorhydrique [115]. Après un temps d'immersion approprié, les fibres d'alginate sont sorties du bain pour être lavées dans un bain d'eau durant approximativement 20 secondes. Suite à ce lavage, les fibres d'une longueur de 10 cm environ sont suspendues dans un four à convection durant 24 h à 30 °C (procédé discontinu) [116].

L'utilisation des ions calcium pour coaguler l'alginate consiste à extruder une solution d'alginate de sodium dans un bain de chlorure de calcium, puis les fibres sont étirées, lavées et séchées. Il est possible d'utiliser comme bain de coagulation un milieu aqueux acide

comportant en plus du chlorure de calcium et des additifs pour améliorer le procédé de filage. Les fibres obtenues sont alors étirées dans un bain contenant un milieu aqueux dilué de chlorure de calcium, puis lavées dans un bain d'eau déminéralisée contenant un mélange de Span-20/Tween-20 (étape d'ensimage pour faciliter notamment les opérations post-filage) et séchées à une température de 80 °C. Par ce procédé, les fibres d'alginate sont produites à une vitesse de 100 m/min [114].

5.2 Le filage du chitosane

Les fibres de chitosane sont envisagées pour beaucoup d'applications comme les sutures chirurgicales, prothèses pariétales, les compresses cicatrisantes. Plusieurs méthodes sont utilisées pour fabriquer des fibres de chitosane.

La plus largement utilisée consiste à extruder du chitosane solubilisé dans un milieu aqueux acidifié à l'acide acétique (pH < 5) dans un bain de coagulation alcalin [113]. Knaul *et al.* ont étudié l'étape de coagulation du chitosane lors de son filage afin de pouvoir déterminer les conditions de coagulation optimale. Ils ont pour cela étudié la nature des chitosanes et des coagulants, ainsi que le temps et la température de coagulation. Il été montré que le DA, la température et la nature du coagulant ont un impact sur la vitesse de coagulation. De tous les coagulants testés (70 % 1 M NaOH/30 % éthanol, 1 M KOH, 1 M NH_4OH, 0.5 M LiOH et 0.5 M trisodium orthophosphates), le KOH est le seul à avoir montré une coagulation complète du chitosane (DA = 15 %, M_w = 114 kg/mol, [CS] = 5 %) après 2 min à 23 °C et 45 s à 60 °C pour des fibres ayant une diamètre de 2.45 ± 0.2 mm [117].
Suite à l'étape de coagulation, des étapes d'étirages et de lavages sont effectuées. Struszczyk étire les fibres dans un système de doubles bains aqueux alcalins dilués mais l'étirage peut également être réalisé au niveau des bains de lavages. En général, les fibres sont lavées dans un bain d'eau déminéralisée pour enlever l'excès de coagulant. Certains ajoutent aux bains d'eau déminéralisée un mélange de Span-20/Tween-20 afin d'améliorer le lavage des fibres, leur aspect de surface et leur processabilité [113, 114].
La dernière étape est l'étape de séchage du fil. Pour le fil de chitosane, il est fréquemment décrit dans la bibliographie une étape de pré-séchage où le fil est immergé dans des bains déshydratants de plus en plus concentrés en éthanol ou en méthanol. Creber *et al.* parviennent, avec des bains de méthanol, à sécher les fibres de chitosane à un degré suffisamment important pour prévenir les problèmes d'adhérence qu'il est possible d'avoir lors du bobinage final, sans avoir recours à un autre système de séchage. Cette même équipe a d'ailleurs testé

d'autres systèmes de séchage tels que des rouleaux chauffants et des appareils de chauffage à radiant. Ces derniers systèmes se sont montrés efficaces au niveau du séchage mais endommagent la surface de la fibre [118]. Il est également possible de sécher des fibres de chitosane à l'aide d'un système d'air soufflé chaud à une température de 70 °C intégré à un métier à filer à l'échelle pilote dont la vitesse de filage est de 20 – 25 m/min [114].

Une autre méthode a été développée par Notin *et al.* . Il s'agit d'un pseudo filage à sec. La préparation des fibres s'effectue par filage d'une solution de chitosane directement dans une chambre de gaz d'ammoniac. Les fibres formées sont ensuite séchées. L'avantage de ce procédé est d'éviter l'étape de lavage, car les sels d'acétate d'ammonium sont volatiles et sont éliminés lors du séchage. il peut donc être considéré comme un filage pseudo-sec [113].

Yudin *et al.* ont développé une méthode de filage au mouillé de chitosane renforcé par des nano-fibrilles de chitine pour former des fibres composites. Le degré d'acétylation du chitosane est de 17 % et la masse molaire est de M_w = 215 kg/mol. La suspension de nano-fibrilles de chitine dans l'eau est homogénéisée par un mélangeur à ultrasons (40 kHz, puissance moyenne 45 W) pendant 30 min. Un mélange d'une solution de chitosane avec les nano-fibrilles de chitine est préparé en ajoutant la poudre de chitosane dans la suspension de chitine dans l'eau afin d'obtenir une solution de chitosane de 4 % en masse. La concentration en nano-fibrilles varie entre 0.05 – 20 % en masse. Les mélanges sont agités à température ambiante durant 30 min, puis une solution d'acide acétique à 2 % est introduite dans le mélange, toujours sous agitation. Le mélange est agité dans un bain de glace à 4 °C durant 90 min puis est ensuite filtré et mis sous aération durant 24 h à une pression de 0.1 atm. Enfin le mélange est coagulé dans un bain résultant du mélange d'une solution de soude à 10 % et d'éthanol (ratio 1 : 1). Le milieu est extrudé à travers une filière monofilament de diamètre 0.6 mm avec un débit de 3.3 m/min, le temps de précipitation étant de 150 secondes. Les fibres sont ensuite lavées et séchées durant 10 min à 50 °C [119].

5.3 Filage mixte alginate/chitosane

Dans l'optique de développer un textile mixte alginate de calcium/chitosane, il est envisagé de produire par filage, une fibre mixte constituée de ces deux polysaccharides. Dans un souci d'industrialisation, il est préférable de fabriquer cette fibre mixte sur une seule et même chaine de production.

La plus grande difficulté pour fabriquer des fibres mixtes d'alginate et de chitosane est liée au fait que l'alginate et le chitosane ne possèdent pas les mêmes voies de solubilisation [120]. Différentes méthodes ont été explorées pour fabriquer des textiles tissés ou non tissés d'alginate/chitosane. La première consiste à fabriquer séparément les fils d'alginate et de chitosane puis de les mélanger pour obtenir un non-tissé. Afin d'éviter de devoir faire deux chaînes de filature en parallèle, l'enjeu est de produire sur une même chaîne un fil mixte alginate/chitosane. La co-injection d'un milieu mixte alginate/chitosane à travers une filière est une voie explorée, tout comme l'enduction d'un fil d'alginate de calcium par une fine couche de chitosane. Ces différentes méthodes sont répertoriées dans le Tableau 4.

N°	Méthode utilisée	Détails	Année	Auteurs
1	Enduction	Injection de la solution d'alginate dans un bain de chitosane/$CaCl_2$	2002 2014	[121] [122]
2	Enduction	Etape 1 : fabrication du fil d'AlgCa Etape 2 : Immersion dans un bain de chitosane/acide acétique 1 %	2004 2014	[115] [122]
3	Enduction	Injection de la solution d'alginate dans un bain de chitosane/acide acétique (pH < 3)	2015	[116]
4	Enduction par injection simultanée[2]	Injection simultanée de la solution de chitosane/$CaCl_2$ et de la solution d'AlgNa dans un bain hydro-alcoolique de $CaCl_2$	2015	[123]
5	Co-injection	Injection d'une suspension de nano-fibrilles cristallines de chitosane dans une solution d'alginate de sodium dans un milieu aqueux de méthanol 50 % (v/v) comportant 5 % (m/v) de $CaCl_2$	2010	[124]

Tableau 4 : Les différentes méthodes de fabrication d'une fibre mixte Alginate/Chitosane

5.3.1 Méthode 1

Cette méthode consiste à dissoudre le chitosane dans le bain de coagulation de l'alginate, qui contient en outre le chlorure de calcium. Effectivement, en 2002, Tamura [121] a fabriqué des fibres mixtes composées d'alginate de calcium et de chitosane (Figure 11). Une solution d'alginate à 1 % est extrudée par une filière (50 trous de diamètre 0.1 mm) immergée dans un premier bain de coagulation. Ce dernier est préparé à l'aide de chitosane dissous à 1 % (m/v) dans une solution aqueuse contenant 2 % d'acide acétique (v/v) et est mélangée à une solution de chlorure de calcium à 3 % (m/v) de manière à obtenir les concentrations totales en chitosane suivantes : 0.014 - 0.041 - 0.067 % (m/v). Deux masses molaires de chitosane ont été testées 40 et 160 kg/mol. Les chitosanes à fort poids moléculaire ont tendance à précipiter en présence d'ions calcium. Il faut arriver à trouver un taux de chitosane suffisamment

[2] Le chitosane est enduit d'alginate, enduction inversée par rapport aux autres méthodes.

important pour enduire la totalité du fil d'alginate mais en même temps s'assurer qu'il ne précipite pas dans le bain en limitant sa concentration.

Les expérimentations ont montré que le diamètre des filaments dépendait de la concentration en chitosane du bain de coagulation. Bien que la surface des filaments d'alginate seul soit lisse, elle devient irrégulière lorsque la concentration en chitosane augmente. Le paramètre important pour ce procédé est la concentration de chitosane dans le bain. A l'état sec, la force de traction nécessaire à la rupture du fil sec est de 1.0 - 1.5 cN/dTex avec le chitosane à 40 kg/mol et de 1.0 - 1.6 cN/dTex avec le chitosane à 160 kg/mol. Ainsi, la masse molaire en masse du chitosane ne semble pas avoir d'impact sur ce type d'essais.

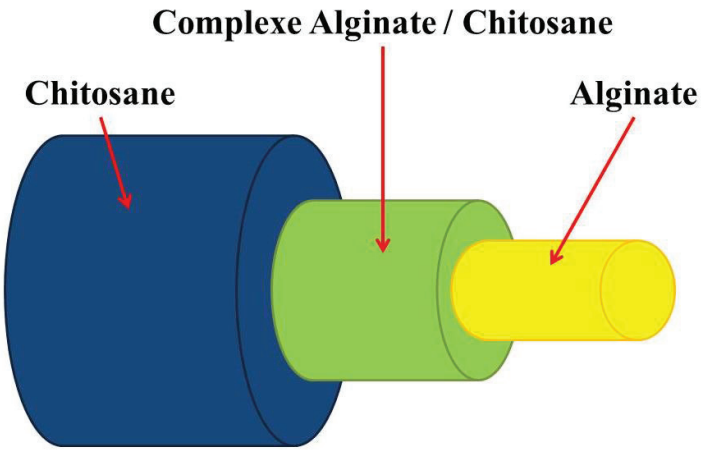


Figure 11 : Schéma de structure de la fibre Alginate/Chitosane

Par cette technique de filage, le chitosane n'est pas neutralisé et interagit avec l'alginate par la formation de complexes polyelectrolytes, en compétition avec la formation du gel d'alginate de calcium. De ce fait, il est possible d'envisager une plus grande interaction du chitosane avec les segments de l'alginate riches en unités mannuroniques puisque les portions riches en segments guluroniques sont associées aux zones de jonction du gel d'alginate de calcium (Figure 12).

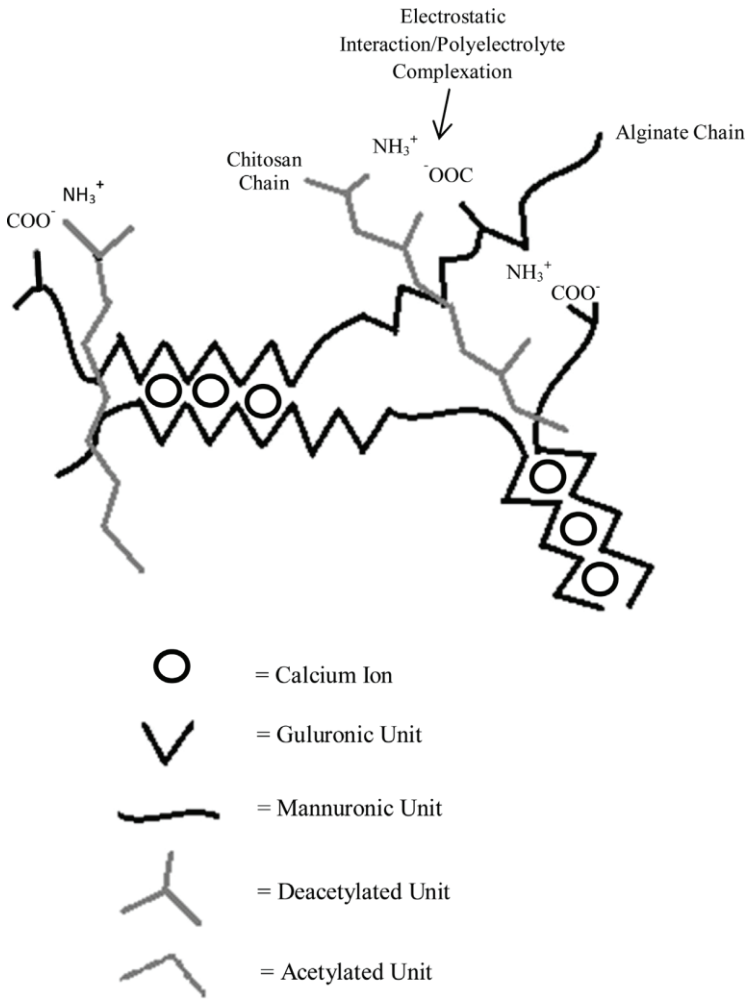


Figure 12 : Schéma des interactions entre l'alginate et le chitosane [122]

5.3.2 Méthode 2

Cette méthode consiste à former, dans une première étape, la fibre gélifiée d'alginate (200 trous, 76 µm de diamètre), suivi de lavage à l'eau et dans une seconde étape d'immerger la fibre hydrogel formée dans un bain d'acide acétique à 1% v/v comportant de 0 à 5 % m/v de chitosane partiellement hydrolysé ($M_w \leq 30$ kg/mol). Après 10 min d'immersion (procédé discontinu), le fil est enlevé du bain de chitosane et rincé à l'eau, puis il est séché à l'aide d'une déshydratation à l'acétone dans des bains de concentration croissante (50 à 100 % v/v). Ce procédé permet d'obtenir une fibre mixte contenant plus de 25 % de chitosane (Figure 13) [115].

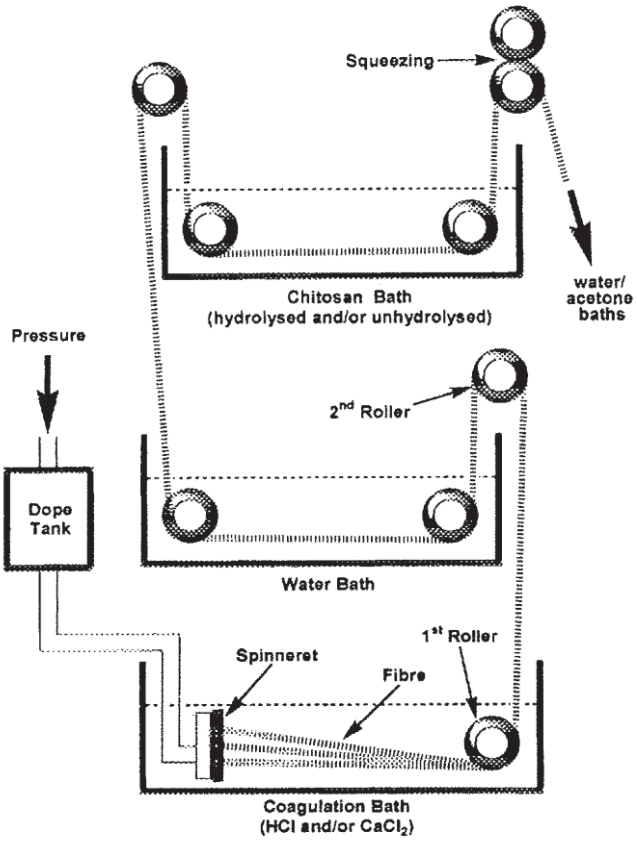


Figure 13 : Schéma du procédé de fabrication des fibres Alginate / Chitosane à l'échelle du laboratoire [115]

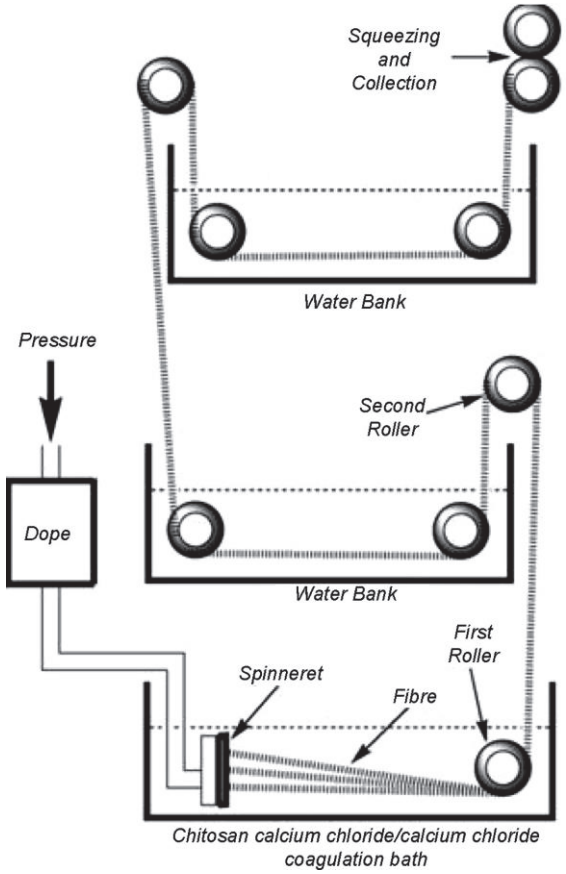


Figure 14 : Schéma du procédé de fabrication des fibres Alginate / Chitosane à l'échelle pilote [122]

Miraftab *et al*. ont proposé un nouveau procédé de fabrication développé à l'échelle pilote (Figure 14). Cette nouvelle technologie est basée sur l'injection de la solution d'alginate de sodium directement dans un bain de chitosane hydrolysé contenant du chlorure de calcium qui fait alors plus référence à la méthode 1. Ce procédé de fabrication est plus rapide et répond davantage aux enjeux industriels. L'alginate de sodium (4 % m/v) est dissout dans de l'eau déminéralisée sous agitation durant 5 h. La solution est ensuite placée dans le réservoir d'extrusion et laissée au dégazage durant 24 h. Le bain de coagulation est composé de chitosane solubilisé dans une solution aqueuse d'acide acétique (1 % m/v). De l'acide chlorhydrique est ajouté au bain qui est ensuite chauffé sous agitation durant 8 h afin d'hydrolyser le chitosane (M_w = 32,3 kg/mol). Une fois l'hydrolyse faite, du chlorure de calcium est ajouté au bain de coagulation à différentes concentrations (de 0.30 à 0.40 % m/v). La solution d'alginate de sodium est injectée, à un débit de 9 cm^3/min dans une filière de 100 trous de 76 µm de diamètre, directement dans le bain de coagulation. Les fibres ainsi formées passent dans des rouleaux d'étirage et dans les bains de lavages d'eau déminéralisée.

A la sortie de ces derniers, les fibres sont pressées entre deux rouleaux pour enlever l'excès de liquide. Il s'agit d'une étape préliminaire avant leur séchage. Toutes les fibres collectées sont séchées par immersion dans un bain de méthanol durant 15 min (procédé discontinu). Après ce traitement, les fibres sont secouées à la main pour enlever l'excès de solvant et sont placées toute la nuit à température ambiante pour obtenir un séchage complet. Ce procédé nécessite beaucoup de temps et ne peut être industrialisé en l'état.

5.3.3 Méthode 3

Cette méthode est basée sur une coagulation de l'alginate par précipitation acide grâce à un pH < 3, inférieur au pK_a de l'alginate utilisé. La solution d'alginate de sodium (450 - 550 kg/mol) à 1 % (m/v) est directement extrudée dans un bain de coagulation contenant une solution de chitosane (36 – 79 – 150 kg/mol)/acide acétique de pH < 3 à un débit de 75 mL/h. Sibaja *et al*. ont montré que le poids moléculaire du chitosane et le temps d'immersion dans le bain de chitosane affectaient la morphologie des fibres. Plus la masse moléculaire du chitosane est grande et plus le diamètre des fils est large. Les résultats ont montré, à l'exception de l'élongation à la rupture, que l'incorporation de chitosane aux fils d'alginate augmentait ses propriétés mécaniques. Le temps d'immersion, quant à lui, ne semble pas avoir d'impact sur les propriétés mécaniques du fil [116].

5.3.4 Méthode 4

La particularité de cette méthode est l'utilisation d'une filière élaborée pour la fabrication de ces fibres mixtes. Il s'agit d'une filière coaxiale avec deux entrées, chaque entrée étant connectée à une seringue (Figure 15).

Dans la première seringue, du chitosane (DA = 20 %) à 3 % (m/v) a été solubilisé dans un milieu aqueux contenant 2.5 % (v/v) d'acide acétique et après solubilisation complète du chlorure de calcium a été ajouté à la solution (0.5 ; 1 ; 2 % (m/v)). En parallèle, la solution d'alginate de sodium est préparée et introduite dans la seconde seringue.

La solution de chitosane est injectée à travers le centre de la buse de sortie directement dans le bain de coagulation contenant du chlorure de calcium dans un milieu hydro-alcoolique (éthanol/eau 1 : 5). En même temps, est expulsée la solution d'alginate de sodium comme gaine de la fibre, en fournissant une enveloppe extérieure au chitosane par injection à travers le segment externe de la buse de la filière. Grâce au chlorure de calcium présent au sein de la solution de chitosane, il est possible de gainer l'alginate autour du chitosane en coagulant

l'alginate du noyau interne de chitosane vers l'extérieur. Dans un même temps, la coagulation de l'alginate s'effectue grâce au chlorure de calcium également présent dans le bain de coagulation. Cela permet une coagulation rapide et complète de l'alginate. Les solutions sont injectées aux débits suivants : 14 mL/h pour le chitosane et 25 mL/h pour l'alginate [123].

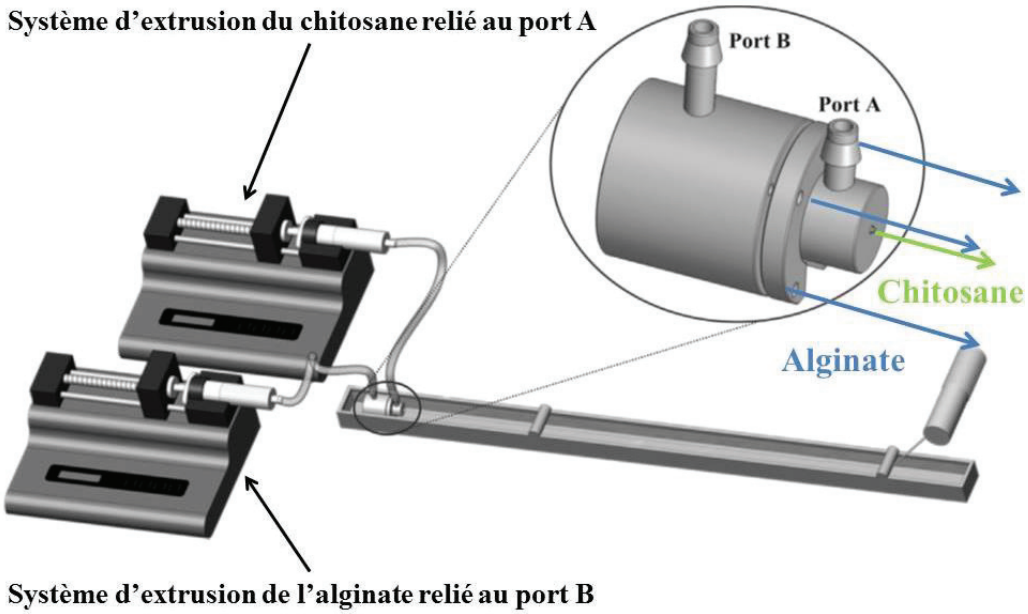


Figure 15 : Schéma de la filière coaxiale [123]

5.3.5 Méthode 5

Cette méthode est basée sur la co-injection d'un milieu mixte alginate/chitosane en utilisant une suspension de nano-fibrilles cristallines de chitosane dans une solution d'alginate de sodium à 6 % (m/v).

Les nano-fibrilles sont des particules qui peuvent être fabriquées par auto-assemblage de différents blocs ou par hydrolyse d'un matériau semicristallin en petites entités nano-cristallines [125-127]. Dans certains travaux, les nano-fibrilles cristallines de chitine ont été désacétylées. Pour cela, elles sont traitées dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 50 % (m/v). Le ratio de nano-fibrilles cristallines de chitine par rapport à la solution de NaOH est de 1 g/10 mL. La réaction de désacétylation s'effectue durant 20 min à 121 °C. Le produit obtenu est lavé et dilué à l'eau distillée, suivi d'une centrifugation à 10 000 rpm durant 10 min. Ces deux dernières étapes sont répétées plusieurs fois jusqu'à atteindre un pH 6.

Les nano-fibrilles de chitosane sont mises en suspension dans la solution d'alginate de sodium grâce à une agitation mécanique. Le ratio de nano-fibrilles par rapport à l'alginate est compris

entre 0.2 % et 1 % (m/m). La suspension est ensuite laissée au repos à température ambiante pour le dégazage, puis elle est extrudée à travers une filière de 30 trous dont le diamètre de chaque filament est de 0.02 mm. La filière est immergée dans un bain de coagulation contenant un milieu aqueux de méthanol 50 % (v/v) comportant 5 % (m/v) de $CaCl_2$. Le procédé comporte ensuite un second bain de méthanol. Ce dernier est un non-solvant de l'alginate et aide à stabiliser les fibres formées [124].

5.4 Caractérisation des fibres

Le Tableau 5 a pour but d'offrir une vue d'ensemble sur les caractéristiques des fibres décrites précédemment. Il est donné à titre informatif mais il ne faut pas lui donner le sens d'un tableau comparatif. Effectivement, pour chacune des fibres étudiées, les caractéristiques du chitosane et de l'alginate (DA, masse molaire, concentration, source, etc.) utilisés ne sont pas toujours mentionnées ou l'état structural de chaque polysaccharide varie, engendrant des propriétés différentes. Cependant, malgré cette dispersion des procédés et des propriétés, les propriétés antibactériennes des fibres mixtes alginate/chitosane sont très souvent décrites.

Méthode	Diamètre (µm)	Contrainte à la rupture (cN/tex)	Elongation à la rupture (%)	Activité antibactérienne
Fibre AlgCa [114]		15 - 22	12 - 20	
Fibre CS [114]		10 - 15	≥ 10	Inhibition de la croissance de *E coli*
1	15 - 19	1 à 16		
2	9 à 14	7 à 27	5 à 30	Inhibition de la croissance de *S. aureus*
3	55 à 75	158 à 225 MPa	9 à 31	Inhibition de la croissance d'*E. coli* sur 24h d'incubation
4	140	28 à 80 MPa	14 à 37	
5		5 à 10	25 à 50	Inhibition de la croissance d'*E. coli* et *S. aureus* sur 3h d'incubation

Tableau 5 : Caractéristiques de fibres

5.5 Orientations envisagées dans le développement du procédé de filage alginate/chitosane

L'étape de coagulation est une étape importante du procédé de filage. Elle va en grande partie conditionner la structure du matériau final. La méthode d'enduction par injection de la solution d'alginate de sodium directement dans un bain de coagulation contenant à la fois le chitosane et le chlorure de calcium (méthodes 1 et 2) semble être une bonne solution pour l'étape de coagulation dans l'optique d'un développement industriel. Cela permet d'éviter d'avoir deux bains : l'un contenant du chlorure de calcium pour coaguler l'alginate puis un deuxième bain de chitosane pour enduire la fibre d'alginate. Néanmoins les chitosanes à fort poids moléculaires ont tendance à précipiter en présence d'ions calcium ce qui limite cette technique d'enduction aux chitosanes de petites masses molaires. La méthode 3 utilise comme bain coagulant une solution de chitosane fortement acide (pH < 3) afin d'effectuer une précipitation acide de l'alginate tout en l'enduisant de chitosane. Cette technique demande d'être en excès d'acide acétique par rapport au chitosane engendrant une hydrolyse acide partielle du chitosane (et de l'alginate). Le chitosane dans ce bain de coagulation n'est donc pas stable à l'échelle de temps d'une journée et la masse molaire du chitosane enduit ne sera pas la même entre le début et la fin du filage. Dans l'optique d'un développement industriel où le filage peut s'effectuer sur plusieurs heures, il n'est pas envisageable d'avoir de trop grandes disparités entre les fibres fabriquées. L'injection simultanée des solutions d'alginate et de chitosane dans un bain de coagulation (méthode 4) demande aussi de solubiliser du chlorure de calcium dans le chitosane (limitation des masses molaires). De plus, pour avoir une meilleure synergie des propriétés, il est souhaité d'avoir une fibre d'alginate enduite de chitosane et non l'inverse comme le propose cette méthode. Enfin, l'injection d'une solution d'alginate de sodium contenant en suspension de nano-fibrilles de chitosane (méthode 5) est une solution intéressante mais la fabrication des nano-fibrilles est une étape supplémentaire à prendre en compte dans le contexte d'un développement industriel.

Une autre phase clé du procédé de filage est l'étape de séchage. Il est fréquemment décrit une étape de pré-séchage où la fibre est immergée dans des bains déshydratants de plus en plus concentrés en éthanol ou méthanol. Creber *et al.* ont même réussi, avec des bains de méthanol, à sécher les fibres de chitosane à un degré suffisamment important pour prévenir les problèmes d'adhérence qu'il est possible d'avoir lors du bobinage final, sans avoir recours à un autre système de séchage [118]. Néanmoins, l'utilisation du méthanol pose des

problèmes dans le cadre du développement d'un procédé industriel avec marquage CE ou FDA, car il est neurotoxique par absorption cutanée et par inhalation. De plus, pour les fibres mixtes, il est souvent ajouté une autre étape de séchage à température ambiante durant plusieurs heures. Une alternative à cette technique de séchage doit donc être envisagée pour développer un procédé de filage continu à plus grande échelle comme l'utilisation de bains d'acétone ou un séchage par air chaud soufflé ou par émetteurs radiants.

Chapitre 2:
Techniques expérimentales

1 Introduction

Dans ce chapitre, il sera présenté les différents polymères utilisés et leur préparation, ainsi que les principales techniques expérimentales employées pour la caractérisation de ces polysaccharides et des fibres fabriquées au cours de cette étude. Le procédé de fabrication des fibres a demandé de développer des outils spécifiques qui seront décrits dans le prochain chapitre.

Les techniques de purification, dépolymérisation et réacétylation du chitosane seront quant à elles détaillées ici. D'autre part, il sera exposé les techniques utilisées pour caractériser le chitosane et l'alginate telles que la résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), l'analyse thermogravimétrique (ATG) et l'analyse rhéologique. Enfin, les méthodes de caractérisations des fibres fabriquées seront également présentées. Il s'agit de méthodes permettant l'analyse de la structure macro- et microscopique des fibres, l'évaluation du taux de chitosane enduit autour des fibres d'alginate de calcium, l'évaluation des propriétés mécaniques, et enfin les propriétés d'absorption et les propriétés antibactériennes.

2 Préparation des matières premières

2.1 Alginate de sodium

L'alginate de sodium a été fourni par FMC industry (Norvège). Il est extrait d'algue brune *Laminaria hyperborean*. Ce matériau a été utilisé sans purification et sans modification.

2.2 Chitosane et sa purification

Le chitosane initial obtenu à partir de carapaces de crevettes a été acheté chez Mahtani Chitosan (numéro de lot 244). Avant d'utiliser ce chitosane, il a été nécessaire de le filtrer afin d'éliminer les insolubles et impuretés indésirables à la fabrication de matériaux destinés au développement de dispositifs médicaux. Pour obtenir un matériau de haute pureté, le chitosane a été dissout à 1 % (m/m) en solution aqueuse en présence d'une quantité d'acide acétique suffisante pour atteindre la protonation stœchiométrique des sites -NH_2. Après dissolution complète, la solution a été successivement filtrée à l'aide de membranes (Merck Millipore, Allemagne) dont la taille des pores est de 3, 0.8 et 0.45 µm. Puis, de l'ammoniaque dilué a été ajouté jusqu'à obtenir un pH de 9 pour précipiter entièrement le polymère. Le

précipité a été récupéré par centrifugation puis lavé plusieurs fois avec de l'eau déionisée jusqu'à ce les eaux de lavage aient un pH neutre. Une fois ce pH atteint, le précipité de chitosane a été lyophilisé.

2.3 Dépolymérisation du chitosane

Différentes masses molaires moyennes en masse ont été testées dans cette étude. La réduction de la M_w du chitosane a été effectuée par une désamination nitreuse [128, 129] (Figure 16). Néanmoins, deux techniques ont été utilisées. La première, appliquée pour obtenir des poids moléculaires moyens, consiste à utiliser une solution de nitrite de sodium en excès mais avec un temps de réaction contrôlé. La seconde méthode est basée sur une réaction complète (temps de réaction de 24 h) du nitrite de sodium et était davantage utilisée pour obtenir de manière contrôlée des faibles masses molaires.

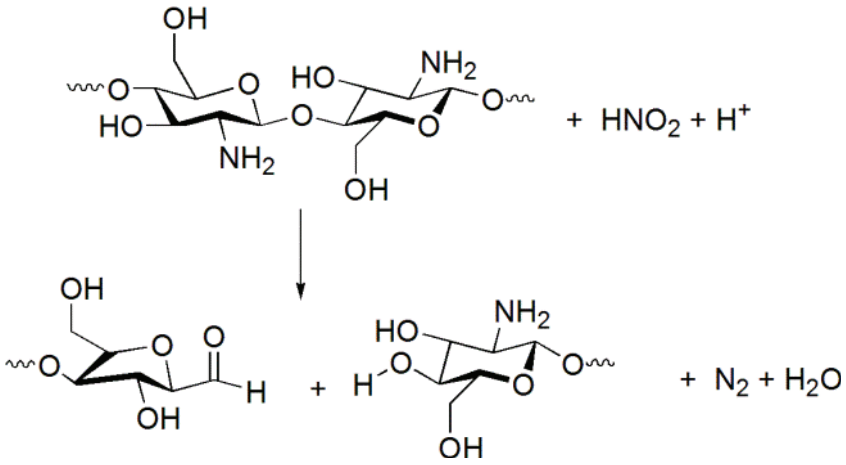


Figure 16: Equation bilan de la dépolymérisation du chitosane par réaction de désamination nitreuse

Dans la première méthode, le chitosane a été dissout à 0.5 % (m/m) dans un tampon d'acide acétique/acétate d'ammonium 0.2 M/0.15 M (pH = 4.5). La solution a été agitée à température ambiante. Après dissolution complète, une solution de nitrite de sodium à 10 g/L a été ajoutée. Le volume de solution de nitrite de sodium ajouté est tel que le ratio molaire $r = \left(\frac{n_{NaNO_2}}{n_{GlcN}}\right)$ (nombre de moles de nitrite de sodium/nombre de moles de -NH_2 dans le chitosane) soit égal à 0.1.

Une agitation mécanique à température ambiante a été appliquée pendant 1 h de façon à atteindre une masse molaire moyenne en masse de 60 kg/mol. Une solution d'ammoniac a été ajoutée pour précipiter le chitosane. Le précipité a été récupéré par centrifugation et lavé

plusieurs fois à l'eau déionisée jusqu'à obtenir un pH compris entre 6 et 7 (*Cf.* Chapitre 2, paragraphe 2.2). Enfin, le chitosane a été lyophilisé.

Dans la seconde méthode, après dissolution complète du chitosane à 0.5 % (m/m) dans le tampon d'acide acétique/acétate d'ammonium 0.2 M/0.15 M (pH = 4.5), le volume ajouté de la solution de nitrite de sodium à 10 g/L correspondait au ratio molaire $r = \left(\frac{n_{NaNO_2}}{n_{GlcN}}\right) = \frac{1}{30}$ afin d'obtenir des masse molaires moyennes en masse comprise entre 10 et 15 kg/mol. Une agitation mécanique à température ambiante a été appliquée pendant 24 h et une solution d'ammoniac a été ajoutée pour faire précipiter le chitosane. Le précipité a été récupéré, lavé et lyophilisé de la même manière que dans la première méthode.

2.4 Réacétylation du chitosane

Pour cette étude, plusieurs lots de chitosanes avec différents DA ont été préparés par réacétylation du polymère purifié. Pour cela, le chitosane a été dissout à 1 % (m/m) en présence d'une quantité d'acide acétique suffisante pour atteindre la protonation stœchiométrique des sites -NH_2. Après dissolution complète, cette solution a été mélangée avec du 1,2-propanediol pour atteindre une concentration de polymère final de 0.5 % (m/m). La solution obtenue a été agitée durant 2 h puis laissée au repos durant 3 h à température ambiante. La réaction d'acétylation a été réalisée à l'aide d'une solution fraîchement préparée d'anhydride acétique dans le 1,2-propanediol à 1.95 % (v/v) [68].

La solution alcolique d'anhydride acétique a été lentement ajoutée sous agitation à la solution de chitosane. La réaction s'est déroulée sous agitation à température ambiante durant 12h. La quantité d'anhydride acétique correspondait à la quantité stœchiométrique nécessaire pour atteindre le degré d'acétylation souhaité. Une solution d'ammoniac a été ajoutée pour précipiter le chitosane. Le précipité a été récupéré, lavé et lyophilisé de la même manière que lors de la purification et de la dépolymérisation (*Cf.* Chapitre 2, paragraphes 2.2 et 2.3).

3 Méthodes et résultats des caractérisations de l'alginate de sodium et du chitosane

3.1 Résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN)

Le DA du chitosane a été calculé à l'aide du spectre de résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN). Pour cela, un échantillon de chitosane (7.46 g/L) et d'acide chlorhydrique (5.10^{-3} % (v/v)) ont été dissout dans de l'eau deutérée (D_2O) (2 mL). Les spectres ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker Avance III 400 (400 MHz) à 25 °C. Comme proposé par Hirai *et al.* [130], le DA a été calculé en prenant le rapport de l'intensité du signal de résonance des protons méthyles du groupe acétamide à 2 ppm des unités N-acetylglucosamine sur l'aire des protons « H_2-H_6 » (Figure 17) des unités N-acetylglucosamine et glucosamine, située entre 3 et 4 ppm.

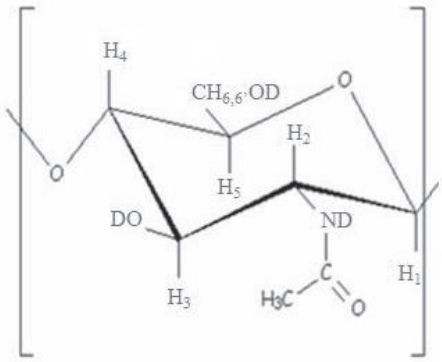


Figure 17: Formule chimique d'un monomère acétylé et deutéré de chitosane

Le rapport M/G de l'alginate de sodium a également été calculé à partir du spectre de ^{1}H-RMN. L'échantillon d'alginate de sodium a été dissous dans du D_2O à un pH neutre de manière à obtenir une concentration d'environ 15 % (m/v). Les spectres ont aussi été enregistrés grâce au spectromètre Bruker Avance III 400 (400 MHz) à 80 °C. Le rapport M/G a été déduit en suivant la méthode de calcul de la norme ASTM F2259-03 (America Society of the International Association for Testing and Materials) [131].

3.2 Chromatographie d'exclusion stérique

La masse molaire moyenne en masse (M_w), le degré de polymérisation (DP_w) et la dispersité ($Đ$) des chitosanes et de l'alginate de sodium ont été mesurés par un système de chromatographie exclusion stérique (SEC). L'appareillage utilisé a été le système Agilent 1260, équipé d'un réfractomètre différentiel Wyatt Optilab T-rEX ($\lambda = 658$ nm)

couplé à un détecteur multiangulaire de diffusion de la lumière (MALLS) (Wyatt HELEOS, λ = 664 nm). La colonne de gel de séparation utilisée variait en fonction du polymère analysé.

Pour l'analyse du chitosane, la séparation a été réalisée sur deux colonnes de gel Tosoh TSK PW G2500 et TSK PW G6000. L'élution s'est déroulée à 22 °C, à un débit de 0.5 mL/min. L'éluant utilisé était un tampon d'acide acétique 0.2 M et d'acétate d'ammonium 0.15 M à un pH de 4.5. Une incrémentation de l'indice de réfraction (dn/dc) de 0.198 mL/g (correspond à un chitosane avec un DA proche de 0) a été utilisée.

Pour l'analyse de l'alginate de sodium, la séparation a été réalisée sur deux colonnes de gel PL aquagel OH mixed M et PL aquagel OH mixed H (300 × 7.5 mm, diamètre des pores: 8 μm). L'élution s'est déroulée à 22 °C, à un débit de 0.5 mL/min. L'éluant utilisé était un tampon aqueux de nitrate de sodium (0.1 M), ajusté à un pH 7.0 avec de l'hydroxyde de sodium 1 M. Une incrémentation de l'indice de réfraction (dn/dc) de 0.13 mL/g a été utilisée.

Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/mL et filtrés avant injection à travers une membrane poreuse dont le diamètre des pores était de 0.45 μm.

3.3 Analyse thermogravimétrique

La teneur en eau des échantillons de chitosane et d'alginate a été évaluée par analyse thermogravimétrique avec l'appareillage suivant : TA Instrument TGA Q500. L'analyse s'est déroulée de 20 à 210 °C et l'augmentation de la température s'effectuait de manière continue à la vitesse de 5 °C/min sous un flux d'hélium.

3.4 Viscosité des solutions de filage et d'enduction

La viscosité des solutions de chitosane et d'alginate a été mesurée en écoulement, en mode continu, avec une géométrie cône-plan par le rhéomètre AR2000Ex (TA Instruments) à 20 °C et avec des vitesses de cisaillement de 0.01 à 1000 s^{-1}.

3.5 Résultats des caractérisations de l'alginate de sodium et des chitosanes

Toutes les caractéristiques de l'alginate et des chitosanes étudiés sont résumées dans le Tableau 6.

Matière première	DA (%)	Ratio M/G	Taux d'humidité (m/m %)	M_w (kg/mol)	DP_w	Đ (M_w/M_n)
Alginate de sodium	-	0.7	14.0 (± 1.0)	140 (± 1.1)	790 (± 63)	2.1 (± 0.1)
Chitosane 1	≈ 0	-	7.0 (± 1.0)	180 (± 6.5)	1110 (± 111)	1.8 (± 0.1)
Chitosane 2	≈ 0	-	3.5 (± 1.0)	50 (± 1.0)	340 (± 10)	1.6 (± 0.1)
Chitosane 3	≈ 0	-	3.9 (± 1.0)	20 (± 0.6)	126 (± 4)	1.5 (± 0.1)
Chitosane 4	17.0 (± 0.5)	-	3.8 (± 1.0)	180 (± 6.5)	1110 (± 111)	1.8 (± 0.1)

Tableau 6: Caractéristiques de l'alginate et des chitosanes étudiés dans ce travail

4 Caractérisations physiques, chimiques et biologiques effectuées sur les fibres fabriquées

4.1 Structure microscopique

Des images des fibres préparées ont été obtenues à l'aide du stéréomicroscope Leica M205A et la mesure de leur diamètre a été réalisée via le logiciel LAS V4.4.

4.2 Taux de chitosane enduit sur les fibres d'alginate de calcium

4.2.1 Introduction

Plusieurs dosages du chitosane enduit sur les fibres d'alginate de calcium ont été réalisés : des dosages qualitatifs et des dosages quantitatifs. La microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une microanalyse par énergie dispersive des rayons X (EDX) et la microscopie confocale ont été des méthodes utiles pour le dosage qualitatif du chitosane sur les fibres. La microscopie confocale a aussi permis de pouvoir effectuer un dosage quantitatif, tout comme la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie UV-Visible. Cependant, ces méthodes demandent d'utiliser un chitosane greffé au fluorochrome FITC (isothiocyanate de fluorescéine). C'est pourquoi d'autres méthodes quantitatives ont été développées auparavant mais sans résultats satisfaisants telles que le dosage par réfractométrie et le dosage par colorimétrie à l'orange II. Le principe de ces deux dernières méthodes d'analyse sera succinctement décrit dans ce manuscrit mais les résultats ne seront pas présentés.

4.2.2 Microscopie Electronique à Balayage associée à une microanalyse par EDX (electron-dispersive X-ray spectroscopy)

La morphologie des fibres à la surface et en coupe a été étudiée à l'aide du Microscope électronique à balayage (MEB) FEI Quanta 250 (Centre Technologique des Microstructures « CTμ », Université Claude Bernard, Lyon 1, France) en mode haut-vide et à une tension d'accélération d'électrons comprise entre 5 et 15 kV. Les fibres ont été préparées par métallisation au carbone avec un métalliseur Maltec MED 010.

Une microanalyse EDX a été effectuée pour la mise en évidence de la présence d'atome d'azote à l'aide de l'appareillage Silicon Drift Detector X-Max^N (SAMX industry) d'une taille de 30 mm^2 lors des observations au MEB. Cette méthode a permis de mettre en évidence la présence de chitosane sur les fibres enduites grâce à la présence du pic $K_{\alpha 1,2}$ des atomes d'azote, constituant atomique présent dans la molécule de chitosane mais pas dans celle de l'alginate.

4.2.3 Réfractométrie

Après avoir démontré la présence de chitosane sur les fibres, l'idée était de le re-solubiliser afin de doser la quantité enduite par réfractométrie. Pour cela, 4 m de fil (soit ≈ 200 mg) ont été mis dans 2 mL d'une solution de tampon acétate d'ammonium pH 4.5 enrichie à 2 % (m/m) en chlorure de calcium afin de ne solubiliser que le chitosane et pas l'alginate de calcium. Effectivement, l'ajout de chlorure de calcium provoque un excès d'ions calcium dans le milieu, présents sous forme ionisée en solution et sous forme complexée avec l'alginate. Cet excès empêche tout appauvrissement en calcium complexé avec l'alginate dans le milieu maintenant ainsi l'alginate de calcium insoluble. La re-solubilisation simultanée des deux polysaccharides entrainerait la formation de complexes polyélectrolytes et le dosage du chitosane serait erroné. Après solubilisation durant une nuit à température ambiante, la solution a été injectée dans le réfractomètre afin de mesurer son indice de réfraction. La quantité de chitosane a ensuite été déterminée grâce à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée représentant l'indice de réfraction en fonction de la quantité de chitosane. Pour obtenir des données significatives et reproductibles, les expériences ont été répétées cinq fois. Malheureusement, la réponse (ligne de base) du réfractomètre réalisée à partir de la solution tampon enrichie en chlorure de calcium n'était pas assez stable dans le temps pour avoir une mesure précise des indices de réfraction.

4.2.4 Synthèse du chitosane greffé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et observations par microscopie confocale

La présence de chitosane enduit a pu être mise en évidence grâce au greffage de FITC sur le polymère. De plus, via cette technique, il a pu être fait une approximation de la quantité de chitosane enduite sur les fibres d'alginate de calcium. Des approches quantitatives avaient été explorées au préalable. La mesure du diamètre en microscopie a montré ses limites face à la fine épaisseur de l'enduit et la précision de la mesure du diamètre. La détermination de la masse de chitosane sur les fibres avant et après le revêtement avait également été essayée mais le poids des fibres était trop sensible à la teneur en eau qui peut varier en fonction de l'hygrométrie et du procédé d'enduction lui-même.

Le FITC, molécule fluorescente (λ d'excitation à 495 nm et λ d'émission à 519 nm), peut être greffé par liaison covalente aux molécules de chitosane, ce qui permet la visualisation du polymère par microscopie confocale. Le FITC a été greffé au chitosane selon la méthode de Ma & Lim [132]. Du méthanol déshydraté (1 L) a été mélangé à une solution de chitosane (2 L) à 1 % (m/m) (l'acide acétique utilisé pour la préparation de la solution de chitosane est ajouté en quantité stœchiométrique par rapport aux sites $-NH_2$ à protoner) sous agitation continue et à température ambiante. La solution de FITC (10 mg/mL dans le DMSO) a été ensuite ajoutée de manière à obtenir un ratio molaire final de FITC/résidus de D-glucosamine de 1/50. Après 3 h de réaction dans l'obscurité à température ambiante, le chitosane marqué au FITC a été précipité en ajoutant une solution de soude 1 M jusqu'à obtenir un pH compris entre 8 et 9. Le précipité a ensuite été récupéré, lavé et lyophilisé de la même manière que lors de la purification (*Cf*. Chapitre 2, paragraphe 2.2).

Les fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane greffé au FITC ont été produites selon le protocole d'enduction qui sera décrit dans le chapitre suivant (*Cf*. Chapitre 3, paragraphe 4).

La section des fibres d'alginate enduites de chitosane greffé au FITC a été observée à l'aide du microscope confocal à balayage laser CARL ZEISS LSM 510. Les fibres ont été sectionnées par coupure avec une lame de rasoir à température ambiante. Le taux volumiques de chitosane des fibres enduites a été déterminé ultérieurement par traitement d'image à l'aide du logiciel LSM sur des images de fibres coupées.

4.2.5 Spectroscopie visible et spectroscopie de fluorescence

Dans un premier temps, un dosage par colorimétrie du chitosane (non greffé au FITC) enduit sur les fibres d'alginate de calcium a été testé en utilisant de l'orange II. Il s'agit d'un colorant anionique ayant la capacité de se complexer avec les groupements $-NH_3^+$ du chitosane (Figure 18). Les fibres sont dans un premier temps immergées dans un tampon acétate d'ammonium pH 4.5 enrichi en chlorure de calcium de façon à resolubiliser le chitosane présent. Puis l'orange II est ajouté. Le complexe formé précipite. Celui-ci est récupéré par centrifugation et l'absorbance de l'orange II en excès est alors mesurée. La quantité d'orange II ajoutée initialement étant connue, il est alors possible d'en déduire la quantité de chitosane présente en solution. Cependant, les ions calcium présents dans la solution tampon enrichie rentrent en compétition avec le chitosane pour la complexation avec l'orange II. Effectivement, il a été observé que l'ajout d'orange II dans le tampon enrichi (sans chitosane) provoquait un précipité, témoin de la formation d'un complexe entre les ions calcium et le colorant. Le dosage du chitosane fut alors impossible par cette méthode dans ces conditions expérimentales.

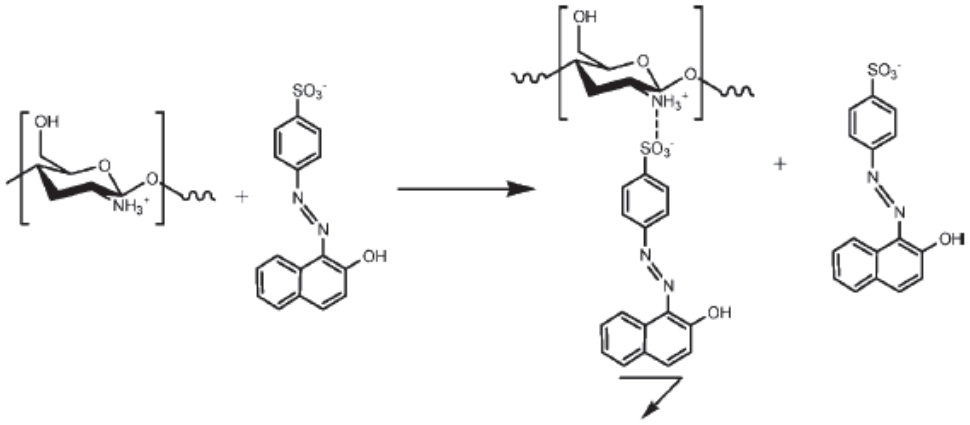


Figure 18: Réaction de complexation du chitosane par un colorant anionique (orange II) [133]

A l'aide des fibres enduites au chitosane greffé par du FITC, il a pu être fait, en plus des traitements d'image de microscopie confocale, un dosage du chitosane greffé par spectroscopie visible et spectroscopie de fluorescence par re-solubilisation du chitosane enduit. Pour cela, 4 m de fil (soit ≈ 220 mg) ont été mis dans 2 mL d'une solution de tampon acétate d'ammonium pH 4.5 enrichie à 2 % (m/v) en chlorure de calcium afin de ne solubiliser que le chitosane et pas l'alginate de calcium. Comme vu dans le Chapitre 2, paragraphe 4.2.3, la re-solubilisation simultanée des deux polysaccharides pourrait entrainer la formation de complexes poly-électrolytes insolubles. Le dosage par spectroscopie de

fluorescence se faisant sur des entités solubles, le dosage du chitosane serait erroné. Après solubilisation durant une nuit à température ambiante et toujours à l'abri de la lumière, 150 µL ont été prélevés et introduits dans plusieurs puits d'une plaque multi-puits. Une lecture de la plaque par spectroscopie de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation à 495 nm et une longueur d'onde d'émission à 519 nm a été effectuées par l'appareil Synergy Mx BioTek. La quantité de chitosane a été évaluée grâce à une courbe d'étalonnage préalablement réalisée. Pour obtenir des données significatives et reproductibles, les expériences ont été répétées trois fois.

4.3 Propriétés d'absorption

Les fibres d'alginates de calcium sont particulièrement reconnues pour leur grande capacité d'absorption, propriétés intéressantes pour le traitement des plaies exsudatives (*Cf.* Chapitre 1, paragraphes 2.2.6 et 2.3). Bien qu'il soit souhaité d'enduire ces fibres avec du chitosane, il est également souhaité de maintenir cette propriété d'absorption primordiale compte-tenu de l'application envisagée. C'est pourquoi une évaluation des propriétés d'absorption sur des fibres enduites a été menée au cours de cette étude.

Les propriétés d'absorption de fibres ont été testées selon la norme européenne « Test methods for primary wound dressings – Part 1: Aspects of absorbency » EN 13726-1/AC:2003 [134]. Environ 200 mg de fibres ont été conditionnés à 20 °C et à une humidité relative de 65 % durant toute une nuit. Les fibres ont ensuite été pesées (m) avant d'être placés dans des boîtes de Pétri en plastique (diamètre = 90 mm), puis elles ont été humidifiées par une quantité massique d'une solution A (solution aqueuse contenant 142 mmol/L de chlorure de sodium et 2.5 mmol/L de chlorure de calcium) correspondant à 40 fois leur propre poids. Cette solution a une composition ionique comparable au sérum humain ou l'exsudat des plaies. La boite de Pétri a ensuite été placée dans une étuve à 37 °C pendant 30 min. Après cela, les fibres ont été retirées de la solution à l'aide d'une pince. Pendant 30 s, la fibre est maintenue en l'air afin de laisser s'écouler la solution A puis les fibres humides sont de nouveau pesées (m_1). La capacité d'absorption (CA) a été calculée par le rapport suivant : $CA = (m_1 - m) / m$.

Pour obtenir des données significatives et reproductibles, les expériences ont été répétées 10 fois.

4.4 Propriétés mécaniques en traction

Les propriétés de traction des fibres ont été mesurées à l'aide d'un appareil MTS Insight 2, avec un capteur de force de 100 N. L'échantillon est maintenu entre deux mors adaptés, limitant les ruptures au niveau des mors et les glissements de la fibre dans les mors pendant le test. En effet, l'utilisation de mors non adaptés aux matériaux fibreux conduit à des ruptures très fréquentes au niveau des mors entrainant une dispersion des résultats. La longueur initiale de l'échantillon a été choisie proche de 155 mm et la vitesse de déplacement de la traverse était de 20.0 mm/min. La contrainte et la longueur de l'échantillon au point de rupture ont été mesurées. La déformation à la rupture a été calculée à partir du ratio entre l'élongation de la fibre à la rupture $\Delta L_b = L_b - L_o$ et la longueur initiale de la fibre par l'équation suivante :

Équation 1:

$$déformation\ \text{à}\ la\ rupture = \frac{\Delta L_b}{L_0} \times 100$$

Où L_b est la longueur à la rupture et L_0 la longueur initiale de la fibre.

Ensuite, la courbe représentant la contrainte nominale en fonction de la déformation a été tracée et donne la loi de comportement mécanique des fibres. Le module de Young (E), paramètre important dans la caractérisation des propriétés mécaniques des fibres, est déterminé à partir de la pente de la première partie de la courbe, dans le domaine de comportement élastique de la fibre (domaine linéaire). On peut également déterminer la limite d'élasticité de la fibre, c'est-à-dire la contrainte (σ_p) et la déformation (ε_p) à partir de laquelle le matériau commence à se déformer de manière irréversible, ainsi que le paramètre de durcissement de la fibre dans le domaine défini par la pente de la droite dans le domaine de déformation plastique (E_p). Les paramètres à rupture sont σ_r et ε_r (Figure 19). Dans le cas des fibres textiles, les valeurs de contraintes à la rupture et de modules de Young sont usuellement exprimées en unités spécifiques qui prennent en compte la masse linéique des fibres (masse par unité de longueur) afin de s'affranchir des problèmes de dispersion dans les mesures de diamètre (en particulier lorsque la fibre n'est pas de section parfaitement circulaire). L'unité de masse linéique généralement utilisée dans la littérature est le Décitex (dTex = masse pour 10000 m de fil). Ainsi, la contrainte à la rupture est exprimée en N/dTex.

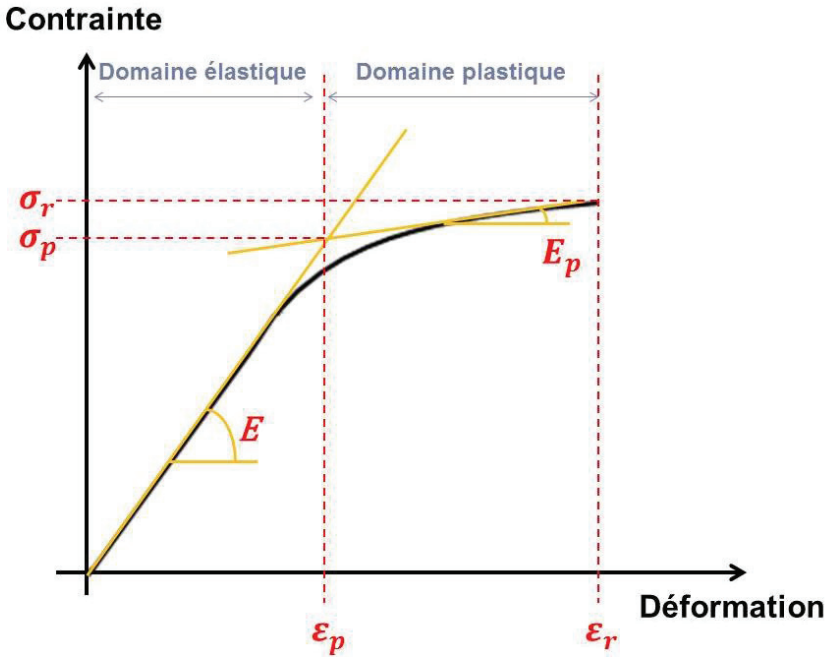


Figure 19: Loi de comportement mécanique contrainte-déformation d'une fibre de polysaccharide

Pour caractériser le comportement à rupture, une analyse statistique a été réalisée en utilisant la distribution de Weibull. Cette dernière est largement utilisée pour décrire le comportement de résistance des matériaux fragiles comme les céramiques et certaines fibres [135-137]. Elle repose sur l'hypothèse que le plus gros défaut joue le rôle de défaut critique et conduit à la rupture de la fibre. En raison de la présence de défauts critiques de taille variable dans le volume des fibres, la résistance mécanique s'avère être statistiquement distribuée. La probabilité de rupture à la contrainte (σ_r) est généralement décrite par le modèle standard de Weibull [138]:

Équation 2:

$$P(\sigma_f) = 1 - e^{\left\{-\left(\frac{V}{V_0}\right)\left(\frac{\sigma_r}{\sigma_0}\right)^K\right\}}$$

Où P: Probabilité de rupture de la fibre

K : Module de Weibull, qui définit la largeur de la distribution de la résistance des fibres

σ_0: Résistance caractéristique de Weibull

V_0: Volume de référence

V: Volume experimental de la fibre

Le module de Weibull permet de donner une idée de la dispersion de la taille des défauts dans le matériau. Plus il est faible, plus cette dispersion est importante. Ceci signifie que plus K est

petit et plus le matériau possède des irrégularités et donc peut manifester un comportement fragile dans une large gamme de contraintes appliquées. Enfin, le paramètre d'échelle σ_0 est relié à la contrainte moyenne de rupture.

Équation 3:

$$\bar{\sigma} = \sigma_0 \left(\frac{V}{V_0}\right)^{-1/m} \Gamma\left(1 + \frac{1}{m}\right)$$

Où Γ est la fonction d'Euler.

En réorganisant et en prenant en considération le logarithme népérien de l'Équation 2:, on obtient l'expression suivante :

Équation 4:

$$ln(ln(\frac{1}{1-P})) = Kln(\sigma_r) + \left[ln(\frac{V_0}{V}\sigma_0^K)\right]$$

Par conséquent, la courbe représentant cette équation où $y = ln(ln(1/(1-P))$ en fonction de $x = ln(\sigma_r)$ donne une droite si la distribution de la résistance du matériau est effectivement décrite par la distribution de Weibull. Cette courbe permet de déterminer le paramètre K. Pour un volume de fibre testée constant (4.87 mm^3), la droite donne aussi la valeur $\sigma_0(V_0)^{1/K}$.

Pour le traitement des données, la probabilité cumulée de rupture de la fibre P peut être estimée à l'aide de l'approximation suivante :

Équation 5:

$$P(\sigma_{ri}) = \frac{i - 0.3}{n + 0.4}$$

Où n: le nombre de données (c'est-à-dire le nombre de mesures effectuées sur une même fibre)

i: le rang de la donnée parmi les contraintes à la rupture classées par ordre croissant ($i = 1$ correspond à la plus petite et $i = n$ correspond à la plus grande)

4.5 Méthode d'évaluation antibactérienne

4.5.1 Introduction

Comme vu au cours de l'étude bibliographique (Chapitre 1, paragraphe 4.4.4), les propriétés antibactériennes des chitosanes sont largement documentées dans la littérature de par ses nombreuses applications dans les domaines pharmaceutique, agro-alimentaire et biomédical. Il s'agit d'une propriété primordiale, recherchée ici dans l'élaboration de ces fibres destinées au développement de textiles cicatriciels. Effectivement, les patients souffrant de plaies profondes sont susceptibles de souffrir d'infections. Le plus souvent, les études ont été conduites avec du chitosane en solution, et donc dans des conditions de pH acide. Il est alors difficile de savoir si l'activité antibactérienne observée est due au chitosane lui-même ou à l'acidité du milieu. Peu d'études ont été conduites sur des fibres. Or, il est important d'évaluer *in vitro* cette propriété en se rapprochant le plus possible des conditions réelles d'application afin que cela soit le plus représentatif possible. C'est pourquoi les fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane ont directement été testées par immersion dans un bouillon de culture bactérien tamponné à un pH de 7.4 (± 0.2).

4.5.2 Méthode de stérilisation

Les fibres mixtes alginate/chitosane ont été stérilisées par rayonnement bêta à une dose de 25 kGy. Cette stérilisation a été réalisée par la société Ionisos (France) avec un accélérateur d'électrons A29 d'une énergie nominale de 9.8 ± 0.2 Mev.

4.5.3 Choix du milieu de culture

Le milieu de culture qui a été choisi est le bouillon de culture Brain-Heart Infusion (BHI, infusion de cœur-cervelle). Il s'agit d'un bouillon d'usage courant qui convient à la culture de germes exigeants. Il est composé principalement d'infusion de cervelle de veau (12.5 g/L), d'infusion de cœur de bœuf (5.0 g/L), de protéose-peptone (10.0 g/L), de glucose (2.0 g/L), de chlorure de sodium (5.0 g/L), de phosphate disodique (2.5 g/L) et d'eau. Les infusions d'organes sont riches en éléments nutritifs, permettant une croissance rapide des bactéries.

4.5.4 Choix des souches bactériennes testées

Les souches bactériennes testées ont été choisies pour leur grande potentialité à être pathogènes sur des plaies profondes. Les tests ont été effectués sur des souches bactériennes à

Gram-positif de genre *Staphylococcus* tels que *S. aureus* et *S. epidermidis*, ainsi que sur une souche bactérienne à Gram-négatif *Escherichia coli*.

4.5.4.1 Staphylococcus aureus (ATCC2921)

Plus connu sous le nom de staphylocoque doré, *Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses, c'est-à-dire qu'elle vit sur l'organisme humain sans lui porter préjudice. Néanmoins elle peut se révéler être pathogène dans certains cas. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est l'une des principales bactéries responsables des infections cutanées, des infections ostéo-articulaires, des pneumonies bactériennes et des septicémies notamment à cause de sa capacité de dissémination dans l'organisme. De plus, cette bactérie a la capacité de produire des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales.

Certains germes de *Staphylococcus aureus* sont résistants aux antibiotiques dont la méticilline. Ils sont nommés MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus)*. Le milieu hospitalier est l'endroit « idéal » pour sélectionner ces germes multi-résistants, responsables de nombreuses infections nosocomiales. Le HA-MRSA (Healthcare Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) est reconnu comme un pathogène nosocomial d'envergure en raison de son importante propagation. Bien qu'une infection à MRSA soit avant tout considéré comme une infection nosocomiale, il a été rapporté des infections aux MRSA acquises dans la communauté chez des patients qui n'ont aucun lien avec les milieux de soins. Une distinction est donc faite entre les MRSA où les HA-MRSA sont des germes résistants à la méticilline acquis au sein d'un milieu hospitalier alors que les CA-MRSA (Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) sont des germes résistants à la méticilline acquis au sein de la communauté.

Dans cette étude, il a donc été choisi d'évaluer les propriétés antibactériennes des fibres fabriquées sur ces trois types de germes : MSSA (Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*), HA-MRSA et CA-MRSA.

4.5.4.2 Staphylococcus epidermidis (ATCC12228)

Staphylococcus epidermidis est essentiellement une bactérie commensale de la peau. Bien qu'elle soit habituellement non pathogène, c'est une cause importante d'infections chez des patients immunodéprimés ou des patients qui ont des cathéters ou des prothèses. Cette bactérie est responsable d'infections cutanées, d'infections nasales comme des sinusites et

d'infections urinaires. Elle a également la capacité de produire des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales.

4.5.4.3 Escherichia coli (ATCC8739)

Egalement appelée colibacille, il s'agit d'une bactérie du tube digestif des mammifères très commune chez l'être humain. C'est une bactérie intestinale commensale. Néanmoins, elle peut devenir pathogène lorsqu'elle est présente dans un autre organe que l'intestin ou chez une personne immunodéprimée et engendrer par exemple des diarrhées, des gastro-entérites, des infections urinaires, des infections cutanées ou même encore des méningites et des septicémies.

Ces cinq souches bactériennes ont été choisies en raison de leur caractère pathogène pouvant engendrer des infections au niveau des plaies, notamment en milieu hospitalier.

4.5.5 Protocoles mis en œuvre

Trois protocoles ont été testés au cours de cette étude mais seulement deux ont été entièrement développés. Le premier consistait à énumérer des unités formant colonie (ufc) après avoir été en contact avec les fibres. Le second protocole reposait sur l'évaluation de l'adhésion bactérienne par la formation d'un biofilm.

Le troisième protocole consistait à évaluer qualitativement l'activité antibactérienne des fibres. Pour cela, un fossé central sur une gélose en boite de Pétri a été effectué (Figure 20). Seul un côté de la gélose était ensemencé et un « pont » était réalisé à l'aide d'un fagot de fibre. Le but était d'évaluer le temps nécessaire pour que la souche bactérienne contamine l'autre côté de la gélose non ensemencé. Il a été difficile d'obtenir des résultats reproductibles à cause d'une mauvaise précision de l'ensemencement initial. De plus, la fabrication des fagots fibreux nécessitait beaucoup de temps. Cette méthode n'a donc pas été retenue pour la suite, bien qu'elle ait donné quelques résultats qualitatifs.

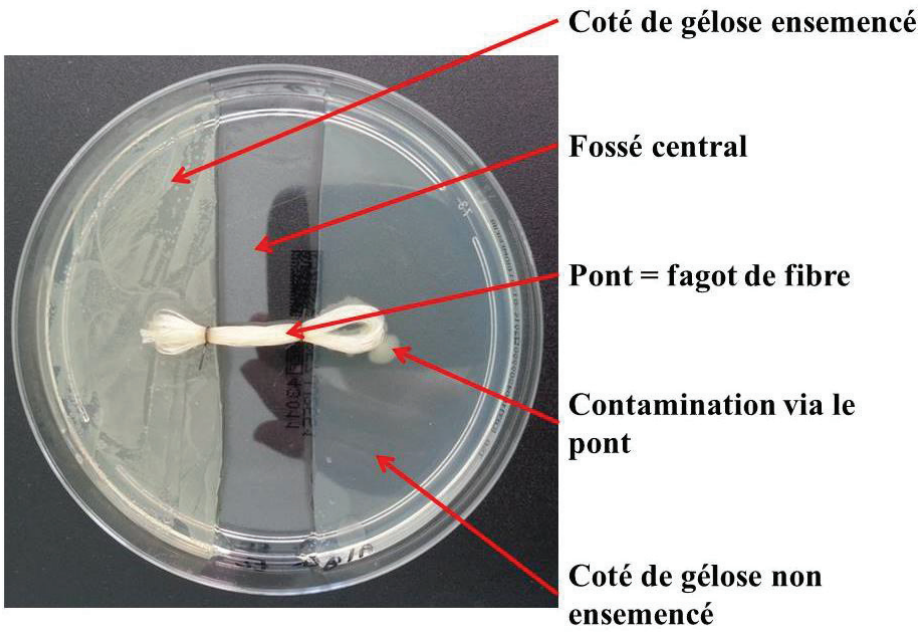


Figure 20: Photo d'une boite de Pétri contenant deux espaces gélosés, reliés par un pont fibreux

4.5.5.1 Protocole d'énumération des unités formant colonie

Les propriétés antibactériennes des fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane ont été évaluées par une méthode d'énumération des colonies. Une suspension de bactéries (500 µL) a été préparée à 0.5 x 10^3 ufc/mL dans un milieu BHI (Brain-Heart Infusion). L'ensemencement initial a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 10, compteur de densité cellulaire, Amsterdam Biosciences) et doit être réalisé avec précision afin que les expériences puissent être reproductibles et qu'il soit possible de comparer les résultats entre eux. Cela a été l'une des difficultés rencontrées lors de nos essais au sein des Laboratoires Brothier pour contrôler précisément le taux d'ensemencement (appareillage de contrôle utilisé : densiCHEK, Biomérieux). C'est pourquoi les essais bactériologiques ont ensuite été réalisés au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie du centre hospitalier de Croix-Rousse à Lyon (Equipe de Frédéric Laurent et Régis Villet). Plusieurs longueurs de fibre ont été testées et introduites dans le bouillon de culture : 12.5, 25, 50 et 100 cm. Le mélange a été mis en culture pendant 6 h (temps de discriminant pour voir un impact des fibres sur la croissance bactérienne), à 37 °C dans une étuve. Après agitation des mélanges, 100 µL ont été prélevés et ensemencés sur une gélose Trypto-Caséine-Soja (TCA) en boîte de Pétri. Les géloses TCA contiennent de l'extraite de soja (5.0 g/L), du tryptone, du chlorure de sodium (5.0 g/L) et de la gélose (15 g/L). La croissance bactérienne a été évaluée par énumération du nombre de colonies après 24 h d'incubation à 37 °C avec l'appareil Scan 1200 (Interscience). Le taux de réduction bactérienne (BRR, Bacterial Reduction Rate)

pour chaque type de fibre contre chaque souche bactérienne a été calculé. Il est obtenu à partir de la différence entre le nombre de colonies de la suspension de bactérie témoin (N_1) et le nombre de colonies de la suspension contenant la fibre testée (N_2), comme l'indique l'équation suivante :

Équation 6:

$$BRR = \frac{(N_1 - N_2)}{N_1} \times 100$$

Les suspensions de bactérie témoin ont été préparées sans fibre et une autre suspension de bactérie de contrôle a été préparée en présence de fibres d'alginate non enduites.

Les résultats expérimentaux ont permis de tracer la courbe BRR (%) en fonction de la masse de chitosane introduite, normalisée par le volume de la suspension (exprimée en g/L) et peut être modélisée par l'équation suivante :

Équation 7:

$$BRR = \left[1 - e^{\left(\frac{-m}{m_c}\right)}\right] \times 100$$

Où m est la masse de chitosane par unité de volume (g/L), et m_c est la masse caractéristique par unité de volume suffisante pour atteindre un BRR de 63 % (g/L). Cette masse caractéristique est à la fois dépendante de la fibre et de la souche bactérienne, et caractérise l'effet antibactérien.

Le chitosane n'est certainement que partiellement solubilisé dans le bouillon de culture. Il serait donc incorrect de parler de concentration en chitosane, il s'agit plus de la quantité de chitosane (présent à la fois au niveau de la fibre et dans le milieu) dans un milieu (bouillon de culture et bactéries en suspension) d'un volume défini. Néanmoins, pour une facilité de langage, la masse de chitosane normalisée par une unité de volume du milieu (volume constant dans ces travaux V = 500 µL) sera nommée la « masse de chitosane ».

La masse caractéristique représente la masse de chitosane nécessaire pour tuer 63 % des bactéries et peut être décrite par l'équation suivante :

Quand $m = m_c$,

Équation 8:

$$BRR = \left[1 - e^{(-1)}\right] \times 100 = 63\ \%$$

La masse caractéristique est donc déterminée à l'aide de la relation suivante :

Équation 9:

$$-\ln(1 - BRR) = \frac{m}{m_c}$$

Graphiquement, si $x = m$ et $y = -ln(1-BRR)$) la pente de la droite est $1/m_c$.

4.5.5.2 Adhésion bactérienne sur les fibres et Microscopie Electronique à Balayage

L'adhésion des bactéries a été évaluée sur les fibres de chitosane et les fibres d'alginate de calcium. L'essai a été effectué sur MSSA et CA-MRSA. Une suspension de bactéries (500 µL) a été préparée à 0.5 x 10^3 ufc/mL dans un milieu BHI où 100 cm de fibre ont été introduits dans la suspension. Le mélange a été mis en culture à 37 °C dans une étuve pendant 24 h. Ensuite, les fibres ont été retirées du milieu de culture bactérien à l'aide d'une pince stérile. Les fibres ont été rincées par immersion dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Lors de ce rinçage par immersion, seules les bactéries adhérentes restent sur la fibre alors que les bactéries non adhérentes se décrochent. Après cela, les fibres ont été introduites dans un micro-flacon contenant 1 mL d'une solution de PBS. Les bactéries adhérentes ont ensuite été décrochées des fibres par sonication pendant 10 min à une puissance de 100 % à l'aide du sonicateur BactoSonic (Bandeline, Allemagne). La suspension obtenue a été secouée et diluée à 10, 100 et 1000 dans une solution de PBS. Il a été prélevé 100 µL de la suspension bactérienne obtenue qui ont ensuite été étalés sur une gélose TCA en boîte de Pétri. La croissance bactérienne a été évaluée après 12 h d'incubation à 37 °C et les ufc ont été dénombrées. Pour obtenir des données significatives et reproductibles, les expériences ont été répétées 5 fois.

Pour observer les bactéries sur les fibres par MEB, un tampon cacodylate de sodium (0.2 M) avec 4 % de glutaraldéhyde a été utilisé comme fixateur. Les fibres ont été immergées dans le fixateur pendant 1 h à température ambiante. Après cela, l'excès de fixateur a été éliminé et les fibres ont été rincées dans des bains de lavage contenant un tampon de cacodylate de sodium (0.2 M). Une immersion d'au moins 15 min/bain, dans trois bains de rinçage à température ambiante ont été nécessaires. Les fibres fixées et rincées ont été stockées dans le

troisième et dernier bain de rinçage à 4 °C. Les observations de microscopie électronique à balayage ont été réalisées selon le même protocole décrit dans le Chapitre 2, paragraphe 4.2.2.

Chapitre 3 :
Développement des outils spécifiques

1 Purification du chitosane

1.1 Introduction

Une étape de purification est nécessaire avant de pouvoir utiliser le chitosane dans un procédé de filage. En effet, les filières d'injection ne doivent pas être obstruées par des impuretés afin d'éviter toute interruption de la filature. De plus, les fibres fabriquées se destinent à constituer un dispositif médical et leurs propriétés biologiques doivent être conservées. En s'inspirant du dispositif de purification déjà en place au sein de l'IMP@Lyon1, un dispositif de plus grande échelle (échelle pilote) a été développé. Ce dispositif permet de purifier des lots de 400 g (lots de 20 – 40 g à l'échelle laboratoire).

Cinq étapes clés sont nécessaires pour la purification du chitosane :

1. La solubilisation du chitosane
2. La filtration de la solution
3. La précipitation du chitosane
4. Le lavage du polymère
5. La lyophilisation du chitosane

1.2 Solubilisation du chitosane

Une solution de chitosane concentrée à 1 % (m/m) est préparée sous agitation mécanique à 200 rpm dans de l'eau déminéralisée acidifiée à l'aide d'acide acétique, présent en quantité stœchiométrique par rapport aux groupements $–NH_2$ du chitosane. La mise en solution sous agitation mécanique est réalisée à température ambiante en utilisant un agitateur mécanique Turbotest VMI (Figure 21), et ne nécessite que quelques heures (3 à 5 h) grâce à sa pale d'agitation appropriée. Par ce système, il est possible de préparer jusqu'à 20 L de solution.

L'acquisition de deux agitateurs mécaniques Turbotest (VMI Rayneri, France) a permis d'optimiser cette étape de solubilisation par le gain du volume de solution (2 x 20 L contre 4 L auparavant, à l'échelle du laboratoire) et du temps de solubilisation (3 à 5 h contre 12 à 15 h auparavant).



Figure 21: Agitateur mécanique utilisé pour la solubilisation de l'alginate et du chitosane, Turbotest (VMI Rayneri, France)

1.3 Filtration de la solution de chitosane

La solution de chitosane est filtrée à trois reprises à l'aide de filtres en acétate de cellulose de porosités décroissantes : 3, 0.8 et 0.45 µm. La filtration se fait sous pression d'air (2 à 3 bars) arrivant par le haut de la cuve contenant la solution et poussant cette dernière à travers le filtre placé en bas de la cuve. La solution passe ainsi à travers le filtre et est récupérée dans un bécher placé à la sortie, au-dessous de la cuve. Le volume de la cuve est de 500 mL.

L'amélioration apportée à cette étape de la purification est l'ajout d'unités de filtration. Cette étape pourrait d'avantage être optimisée en développant des unités de filtration de plus grand volume mais qui sont plus onéreuses.

1.4 Précipitation du chitosane

Après ces filtrations, le chitosane est ensuite récupéré par précipitation en ajoutant une solution d'ammoniac concentrée jusqu'à atteindre un pH de 9-10. Le système est laissé sous agitation mécanique au Turbotest (Figure 21) à 200 rpm durant 10 à 15 minutes.

1.5 Lavage du polymère

Le chitosane précipité doit être lavé afin d'ôter l'excès de solvant et revenir à un pH physiologique. Pour cette étape, il est utilisé une presse hydraulique de 20 L (Speidel, Allemagne) (Figure 22). Cette presse est composée d'une chambre de pressage constituée d'un sac filtrant compris entre une membrane en caoutchouc reliée à une arrivée d'eau et une grille à fente. Le précipité obtenu dans son milieu basique est introduit dans le sac filtrant. En ouvrant l'arrivée d'eau, celle-ci pénètre dans la membrane caoutchouteuse qui se dilate et vient presser le contenu du sac contre la grille à fente de la presse. L'eau basique passe alors à travers le filtre et les fentes de la presse mais le précipité, lui, reste dans la chambre de pressage. L'eau est évacuée par le chemin d'écoulement et est acheminée dans des bidons de rejet (Figure 23). Le précipité quant à lui peut être récupéré facilement dans le sac filtrant et remis en suspension dans de l'eau déminéralisée pour être lavé. Ces étapes sont alors recommencées autant de fois que nécessaire pour laver correctement le chitosane afin qu'il revienne à un pH d'environ 6 (5 à 6 lavages).

L'acquisition de la presse hydraulique permet de récupérer l'ensemble du chitosane précipité en seulement deux passages (2 x 20 L) et chaque pressage dure moins d'une minute. C'est extrêmement efficace et rapide. La récupération du chitosane précipité peut aussi se faire par centrifugation. La centrifugeuse du laboratoire ne peut contenir que 4 flacons de 500 mL soit 2 L par tour de centrifugation. Or, pour purifier 40 g de chitosane, une solution de 4 L doit être préparée (concentration à 1 % (m/m)). Il faut faire deux tours de centrifugeuse pour effectuer un seul lavage et chaque tour de centrifugeuse dure 10 min. Ainsi, par comparaison pour 40 L de suspension, il faut moins de 15 minutes de temps de pressage alors qu'il aurait fallu environ au total 20 heures de centrifugation. L'utilisation de cette presse hydraulique a ainsi permis d'optimiser cette étape de récupération et de lavages du chitosane précipité.



Figure 22: Presse hydraulique de 20 L (Speidel, Allemagne) (http://www.wiltec.de/presse-hydraulique-speidel-90litres-3bars-acier-inoxydable-presse-cidre.html; 2016)

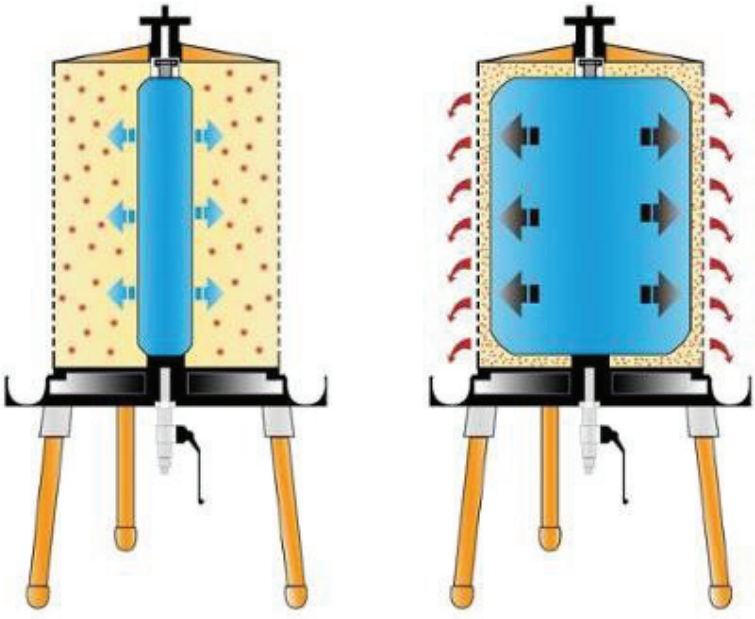


Figure 23: Schéma du principe d'évacuation du surnageant par la presse hydraulique (Speidel, Allemagne)(http://www.wiltec.de/presse-hydraulique-speidel-90litres-3bars-acier-inoxydable-presse-cidre.html; 2016)

1.6 Lyophilisation du chitosane

Le chitosane est ensuite lyophilisé durant 48 h à l'aide du lyophilisateur LyoBeta 35 Series (Telstar), appareil ayant une capacité de condensation de 40 kg (Figure 24). Le lyophilisateur utilisé au sein de l'IMP@Lyon1 possède une capacité de condensation de 12 L. L'utilisation du lyophilisateur Telstar permet une lyophilisation à plus grande échelle.



Figure 24: Lyophilisateur LyoBeta 335 series (Telstar)

2 Le métier à filer à l'échelle du laboratoire

2.1 Introduction

L'étude bibliographique (*Cf.* Chapitre 1) a mis en évidence un fort potentiel de l'association de l'alginate de calcium avec le chitosane dans le cadre du développement de textiles hémostatiques et cicatriciels. Ces deux polymères possèdent des propriétés biologiques particulièrement intéressantes pour l'application envisagée ; l'alginate de calcium ayant des propriétés hémostatiques et cicatrisantes, le chitosane lui ayant des propriétés cicatrisantes et antimicrobiennes. Dans le cadre de cette étude, la stratégie employée pour développer ces fibres mixtes est l'enduction de fibres d'alginate de calcium par du chitosane. L'objectif est de fabriquer du fil d'alginate de calcium par filage au mouillé et de l'enduire ensuite par immersion dans une solution de chitosane. La première étape est donc la fabrication d'un fil d'alginate de calcium. La méthode de filage de l'alginate de calcium est basée sur la

gélification par échange ionique d'une solution aqueuse d'alginate de sodium dans un milieu riche en ions calcium telle qu'une solution aqueuse de chlorure de calcium.

Le développement de fibres d'alginate de calcium a nécessité de mettre en place des outils de filage adaptés à ces polysaccharides et à des échelles plus adaptées à la R&D que l'échelle industrielle. Ces outils ont tout d'abord été développés à l'échelle du laboratoire puis dans un second temps à l'échelle pilote. De plus, ces outils ont été conçus pour pouvoir aussi réaliser du filage de chitosane. Un schéma fonctionnel et une photographie du métier à filer (MAF) à l'échelle du laboratoire montrant les principaux modules le constituant sont présentés sur les Figures 25 et 26. Le dispositif de filage développé à l'échelle du laboratoire permet d'étudier l'influence de la concentration en polymère, des conditions de coagulation (nature et concentration du bain de coagulation) et du séchage (nature et température) sur la morphologie des fibres ainsi produites. Cette échelle permet également de déterminer les limites du procédé de fabrication en contrôlant l'ensemble de ces paramètres physico-chimiques.

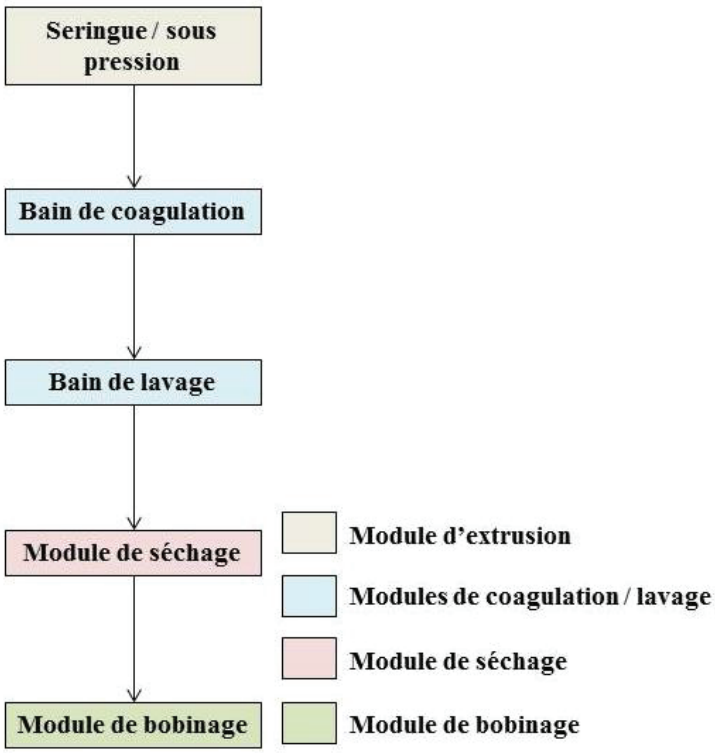


Figure 25: Schéma fonctionnel du MAF à l'échelle du laboratoire

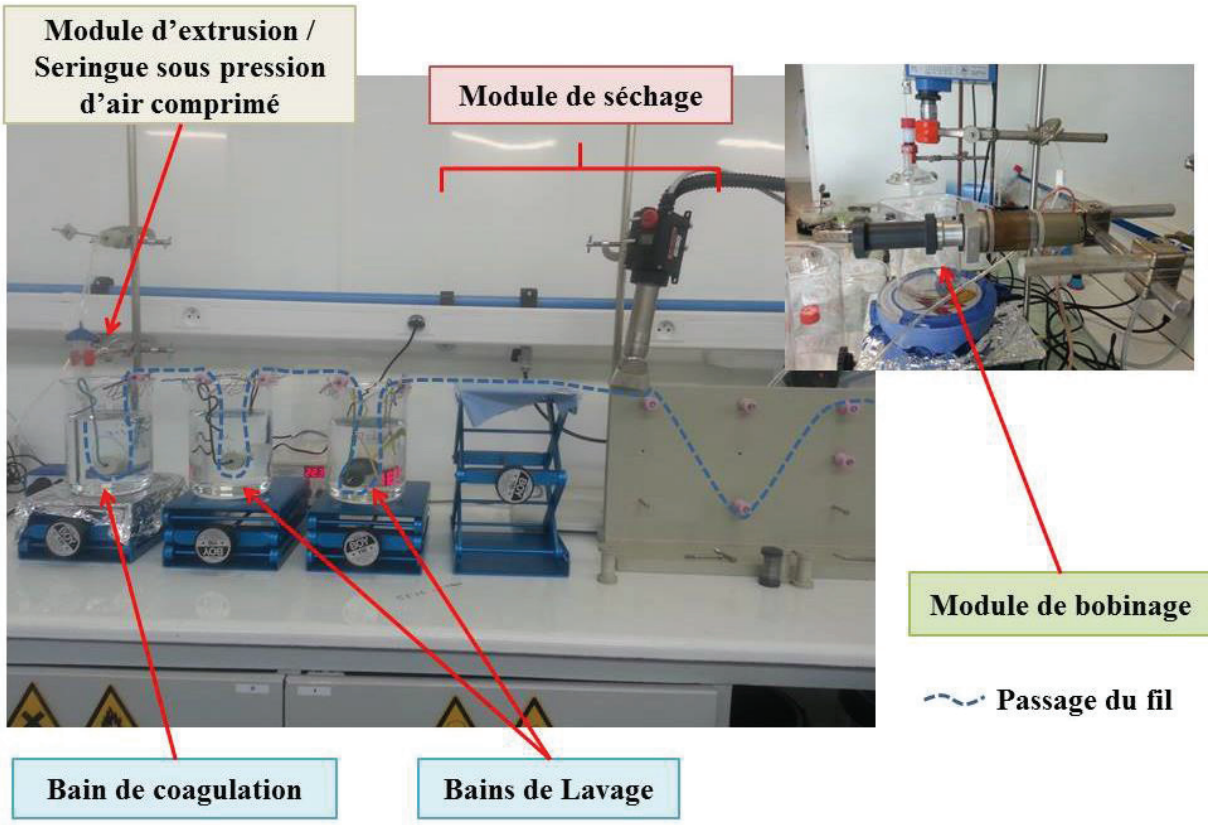


Figure 26: MAF à l'échelle du laboratoire

2.2 Solubilisation et dégazage de la solution

La solution aqueuse d'alginate de sodium est préparée sous agitation mécanique à 200 rpm dans un bécher. La concentration standard choisie pour le filage de l'alginate est de 10 % (m/m) (prenant en compte le taux d'humidité de l'alginate de 14 %). Des volumes de solution entre 50 et 100 mL sont préparés pour les essais.

Le développement du MAF a pour objectif de pouvoir fabriquer des fibres de tous types de polysaccharides, notamment le chitosane et l'alginate. Or les viscosités des collodions de chitosane peuvent varier entre 50 et 10000 Pa.s. Leur préparation par agitation mécanique engendre l'incorporation de bulles d'air qu'il est préférable d'enlever avant l'étape d'extrusion puisqu'elles peuvent entrainer des irrégularités dans la fibre et altérer ses propriétés mécaniques finales, ou provoquer une rupture prématurée de la fibre au cours du procédé de filage. Un dégazage par centrifugation s'est avéré parfaitement efficace. Les collodions préparés sont ainsi introduits dans des seringues Nordson EFD qui peuvent être centrifugées via la Centrifugeuse Universelle ProcessMate^{TM} 5000 (Figures 27 et 28). Pour une élimination complète des bulles d'air, les seringues sont centrifugées durant 7 min à 5000 rpm.



Figure 27: Seringues Nordson EFD et leurs accessoires (http://www.directindustry.fr/prod/efd/product-449-56368.html?utm_source=images.google.fr&utm_medium=ImagesFr&utm_term=undefined; 2016)

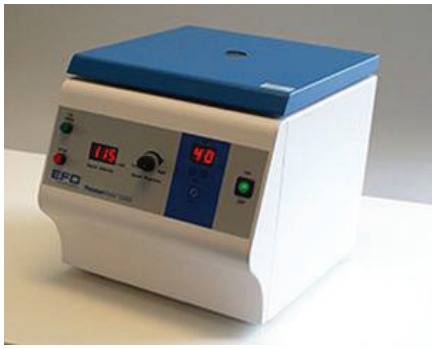


Figure 28: Centrifugeuse Universelle ProcessMate™ 5000 (http://www.directindustry.fr/prod/efd/product-449-456530.html ; 2016)

Les seringues de Nordson EFD présentent deux grands avantages. Comme expliqué précédemment, le premier avantage est qu'elles peuvent être centrifugées et permettent ainsi d'évacuer les bulles d'air emprisonnées durant la phase de solubilisation du polymère. Le second est qu'elles peuvent directement être utilisées comme minicuve d'extrusion en pouvant se fixer à un appareillage de mise sous pression d'air comprimé de Nordson EFD, l'Ultimus I. En utilisant directement ces seringues centrifugeables, comme cuve d'extrusion, l'étape de transfert du collodion est évitée, empêchant toute réinsertion de bulles d'air (Figure 29).



Figure 29: Système d'extrusion Ultimus I (Nordson EFD) et d'une seringue

Avec une pression pouvant aller jusqu'à 7 bars, l'air pousse le piston poussant lui-même le collodion vers la filière conique. Pour le filage, la pointe du cône de la seringue est immergée

d'environ 1 cm dans le bain de coagulation. Pour le filage de l'alginate, la vitesse d'extrusion est d'environ 1 m/min.

2.3 Module de coagulation et de lavage

Qu'il s'agisse du bain de coagulation ou des bains de lavage, les bains sont contenus dans des béchers de 3 L, d'un diabolo (bobine diabolo $Ø_1$ 20, $Ø_2$ 10, $Ø_{int}$ 6.3, L = 25, Ref. U25-V ou Ref. U25-U, Petit et cie, http://www.hpetit.fr/textile.php) ou d'une bobine (fait à façon) de roulement en entrée (sauf pour le bain de coagulation) et en sortie de bain, ainsi qu'au fond de chaque bain. Les diabolos sont soutenus à l'aide de gaines amovibles permettant ainsi la modulation du temps de séjour dans les bains (Figure 30).

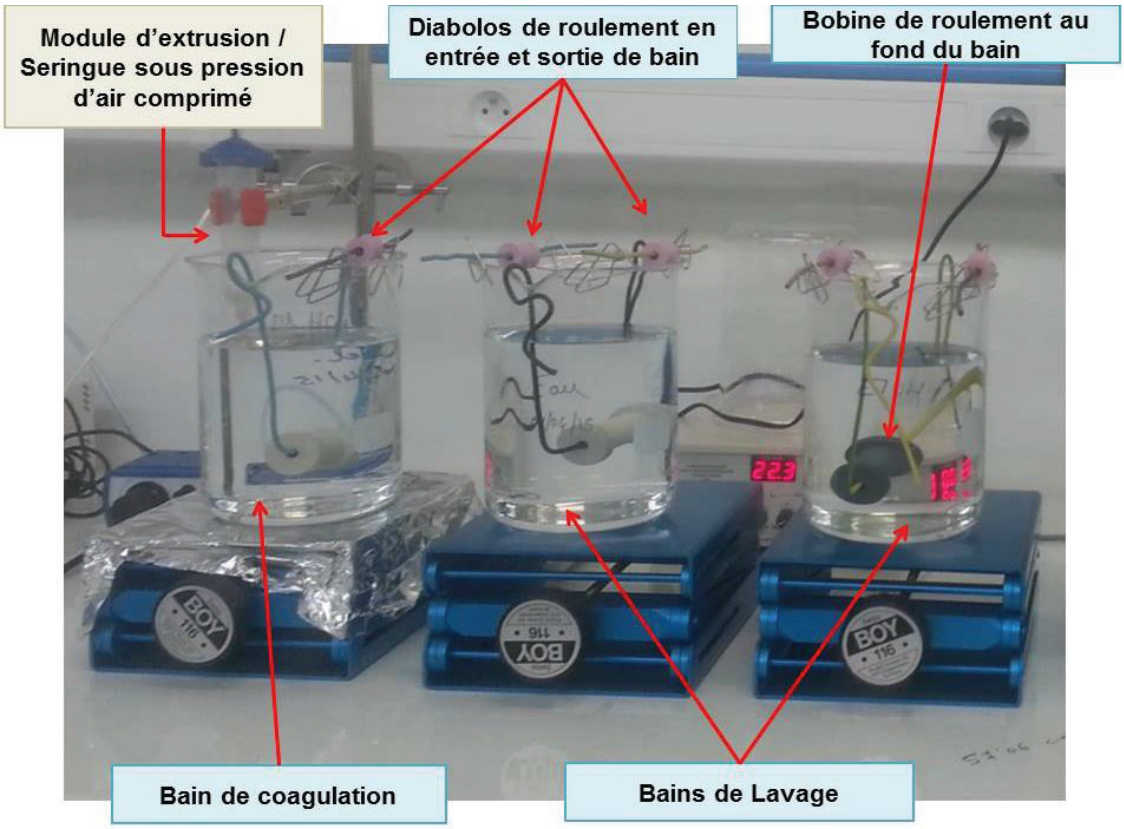


Figure 30: Module de coagulation et de lavage du MAF à l'échelle du laboratoire

Les fibres mono-filament d'alginate de calcium fabriquées au cours de cette étude à l'aide du MAF à l'échelle laboratoire ont été produites à partir d'une solution d'alginate de sodium à 10 % (m/v) comme décrit dans le Chapitre 3, paragraphe 2.2, extrudée à travers un cône d'un diamètre interne de 0.61 mm et coagulées dans une solution de chlorure de calcium à 8 % (m/m). Comme vu dans la bibliographie, les ions calcium entrent en compétition avec les ions sodium ; cet échange ionique engendre presque instantanément la coagulation de

l'alginate et il est obtenu un fil d'alginate de calcium en sortie de filière. Les bains de lavages sont constitués d'eau déionisée. Le nombre de bains est limité de par la résistance du fil aux différentes zones de frottements puisque le seul guidage motorisé du fil n'est situé qu'en fin de filature. Ceci limite le nombre de bains de lavage à deux au maximum.

2.4 Module de séchage

Le séchage de la fibre avant son bobinage sur l'enrouleur est indispensable afin d'éviter l'adhésion du filament sur lui-même lors de son bobinage. Le système de séchage est basé sur un appareil d'air soufflé chaud Leister, composé d'une soufflerie ROBUST G63A2 et de deux chauffeurs d'air LHS 21S SYSTEM 230V 2KW. Un chauffeur d'air est placé juste en sortie du dernier bain de lavage et un second est placé juste avant le module de bobinage. Les deux chauffeurs d'air sont distants d'une distance d'environ 60 cm pour laisser le temps au fil de sécher aussi à l'air ambiant. Il a été effectué un séchage à 90 - 100 °C pour une vitesse de filage compris entre 0.5 et 1.5 m/min. En amont des chauffeurs d'air, il a parfois été ajouté un module composé de papier absorbant contre lequel la fibre vient glisser. Cette pré-étape permet de commencer à absorber l'excès d'eau contenu par la fibre et améliore l'efficacité du séchage (Figure 31).

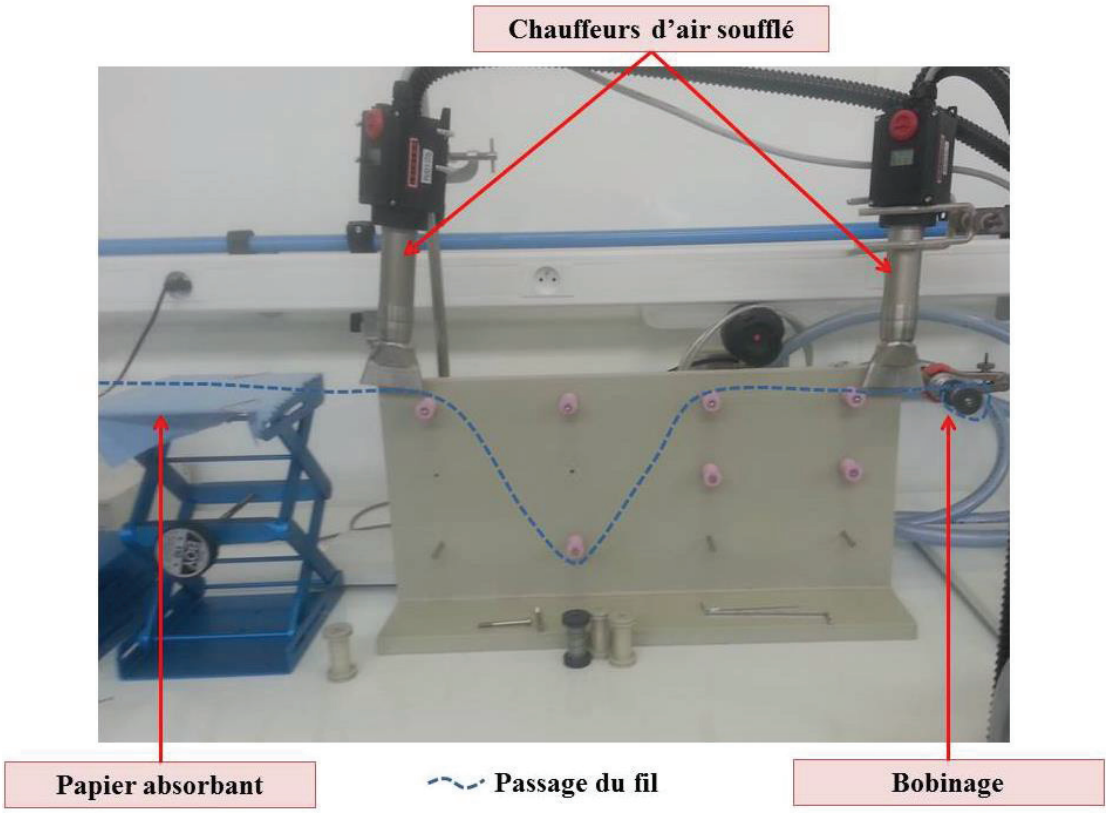


Figure 31: Système de séchage du MAF à l'échelle du laboratoire

2.5 Module de bobinage

La dernière étape du procédé de filage consiste à bobiner le fil. Le système de bobinage est motorisé par un moteur VCC 24V/11W. Un réducteur Portescap Planétaire ayant un rapport de réduction 301:1 est monté sur le moteur. La bobine est fixée sur l'axe de sortie du réducteur. Le tout est alimenté en électricité par une alimentation réglable ELC ALR3003 (Figure 32).

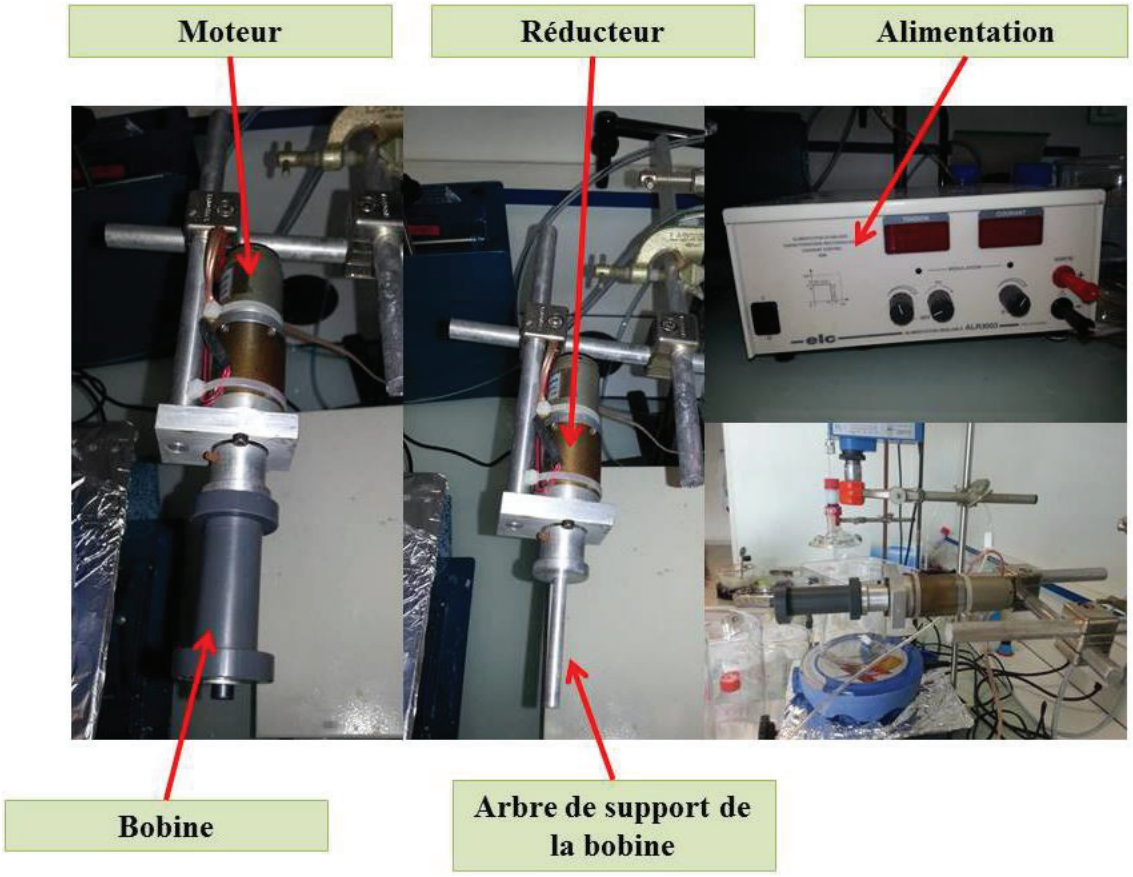


Figure 32: Système de bobinage du MAF à l'échelle du laboratoire

3 Le métier à filer à l'échelle pilote

3.1 Introduction

Dans le but de développer au mieux les procédés de fabrication des fibres, une part importante du projet a été consacrée à la construction et à la mise au point d'un métier à filer (MAF) à l'échelle d'un pilote industriel. L'intérêt majeur de ce MAF est de pouvoir fabriquer des fibres en plus grande quantité et plus rapidement, notamment des fibres d'alginate de calcium. De plus, cet outil permet d'améliorer la reproductibilité des propriétés des matériaux élaborés en contrôlant davantage les paramètres d'étirage et de séchage.

Au sein de l'IMP@Lyon1, un premier pilote de filage avait été élaboré au cours de la thèse de Laure Notin qui permettait de produire des fibres de chitosane uniquement par voie pseudo-sèche (coagulation dans une chambre de gaz alcalin et élimination des sels générés par hydrolyse pendant l'étape de séchage sous air chaud humide [113], *Cf*. Chapitre 1, paragraphe 5.2). A la suite de ces travaux, un autre pilote de filage avait aussi été développé au cours de la thèse de Mylène Desorme [139]. Celui-ci était davantage destiné à faire du filage par voie humide. Cependant ce MAF a montré ses limites notamment dans la quantité de solution filable et son module de mise en pression à « double pot » (le passage d'un récipient à l'autre sans arrêter le filage reste délicat). C'est pourquoi il a été souhaité de développer un nouveau MAF plus modulaire et plus facile d'emploi, en l'intégrant dans un contexte industriel. Le MAF développé au cours de ces travaux de thèse s'est inspiré de ce dernier tout en apportant des optimisations et des adaptations. Il a été conçu pour être le plus modulaire possible afin qu'il puisse s'adapter à toutes sortes de matériaux et de procédés de fabrication en pouvant ôter ou rajouter différents éléments en fonction des besoins. Le système d'extrusion du pilote de filage déjà en place au sein de l'IMP@Lyon1 est constitué d'une pompe à engrenage alimentée par un système de piston. Pour le nouveau MAF, une pompe à engrenage a été conservée mais une deuxième option d'extrusion est possible par simple pression d'air comprimé au-dessus du collodion, système qui sert également à alimenter la pompe dans le cadre de son utilisation pour l'extrusion. L'extrusion par pression d'air comprimé permet de réduire et de simplifier le trajet du collodion limitant ainsi les frottements et le risque d'incorporation de bulles d'air. De plus, dans l'intention d'optimiser le système de séchage du MAF, le nouveau système est basé sur des émetteurs à rayonnement infra-rouges (IR) alors que l'ancien système était basé sur un système d'air chaud soufflé.

Enfin, les bacs pour les bains de coagulation, lavages ou ensimages, les étirages et le système de bobinage ont été optimisés notamment par leur taille et leur système d'évacuation.

La réalisation du MAF a été effectuée par une société d'engineering en étroite collaboration avec l'IMP@Lyon1 et les Laboratoires Brothier et s'est déroulée en trois étapes. La première fut basée sur de nombreux échanges aboutissant à la définition d'un cahier des charges. La seconde étape fut la construction des différents éléments du MAF qui s'est finalisée par des essais de validation sur le site du constructeur. La validation a permis de mettre au point pas à pas chaque étape du procédé de filage en effectuant des réajustements. Enfin, la dernière étape fut la livraison, le réassemblage du MAF et sa revalidation sur le site des Laboratoires Brothier. Quinze mois ont été nécessaires pour concevoir, construire et valider ce MAF à l'échelle pilote. Son principe de fonctionnement est le suivant:

- Un sous ensemble de remplissage assurant l'alimentation discontinue de la machine en matière d'œuvre.
- Un dispositif de filage permettant de filer les produits de différentes manières (sous l'effet d'une pression d'air ou sous l'effet combiné de la pression d'air et d'une pompe à engrenage).
- Quatre bacs contenant des solutions de différentes natures pour les étapes de coagulation, lavage, ensimage…
- Quatre postes d'étirage permettant de réaliser une action d'allongement du fil
- Deux postes de séchage assurant un chauffage de la fibre afin de retirer un maximum d'eau la constituant
- Un poste de bobinage permettant d'enrouler la fibre produite autour d'une bobine conique

Dans l'idée d'avoir un MAF modulable, les bacs et les systèmes d'étirage peuvent être retirés facilement de la ligne pour en adapter le nombre en fonction des besoins.

L'ensemble est commandé depuis l'armoire électrique située en amont de la ligne, sur un châssis commun aux dispositifs de remplissage et de filage. Un schéma fonctionnel du MAF montrant les principaux modules le constituant est présenté sur la Figure 33.

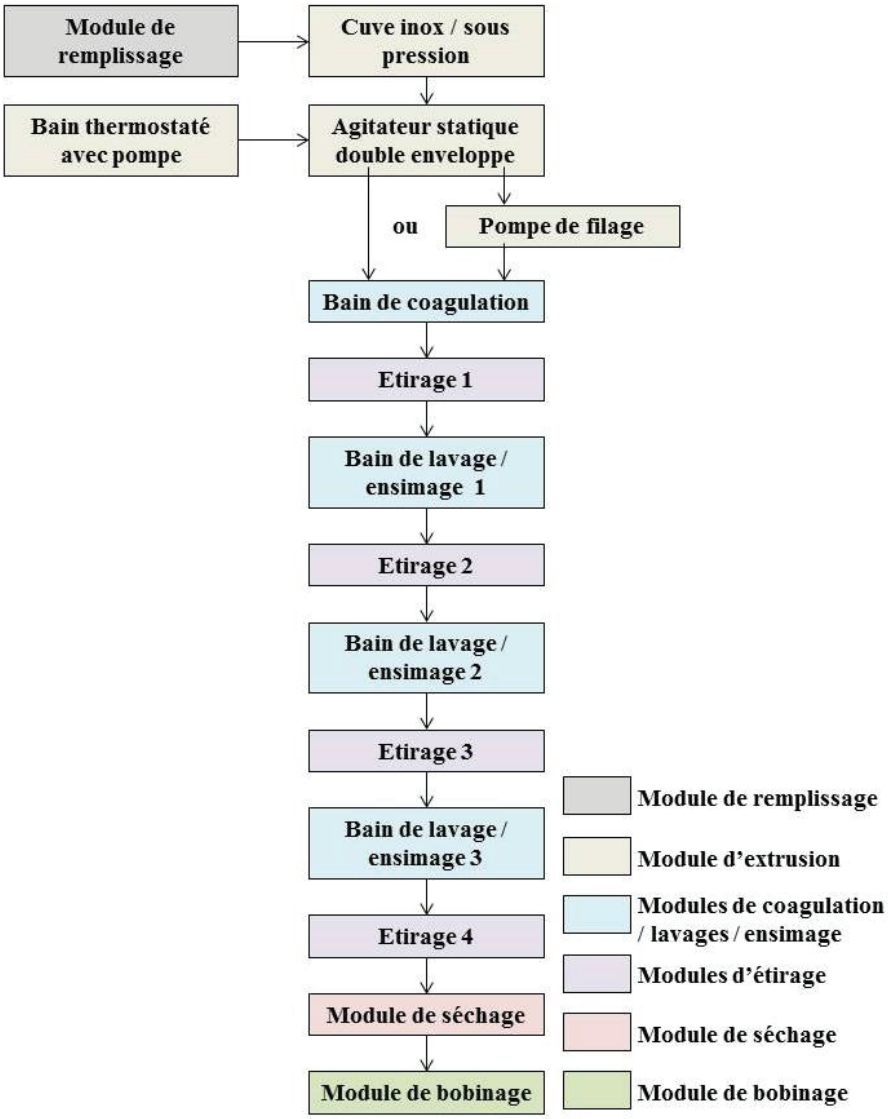


Figure 33: Schéma fonctionnel du Métier à filer à l'échelle pilote

3.2 Solubilisation et dégazage de la solution

La solution aqueuse d'alginate de sodium est préparée sous agitation mécanique à 200 rpm. La cuve de filage du MAF peut contenir un volume maximum de 5 L et il est nécessaire d'avoir au minimum un volume de 0.5 L pour que le filage s'effectue de manière continue sans interruption dans l'extrusion du collodion. En effet, un trop faible volume dans la cuve d'extrusion mis sous pression d'air engendre des jaillissements discontinus rendant la filature impossible. Il est donc possible de préparer un volume de solution compris entre 0.5 et 5 L en fonction du besoin. Néanmoins, le MAF est doté d'un système de remplissage de la cuve de filage qui peut être fait en cours de filage permettant d'alimenter la cuve de filage autant de fois que nécessaire. La concentration standard choisie pour le filage de l'alginate est de 10 % (m/m), en tenant compte de la teneur en eau de la poudre d'alginate de sodium.

La préparation du collodion emprisonne de nombreuses bulles d'air. Là encore, il convient d'éliminer ces dernières avant l'étape d'extrusion puisqu'elles peuvent engendrer des irrégularités dans la fibre et altérer ses propriétés mécaniques finales ou entrainer une rupture prématurée de la fibre au cours du procédé de filage. Pour cela, après solubilisation complète du polymère, la solution est directement versée dans la cuve de filage et laissée au repos 12 h afin d'obtenir un dégazage. Dans le cas où il est souhaité d'obtenir rapidement un dégazage complet de la solution, il est possible de le faire par centrifugation directement dans les pots du système de remplissage, puis de remplir la cuve de filage via ce système de remplissage (*Cf*. Chapitre 3, paragraphe 3.3).

3.3 Remplissage de la cuve d'extrusion

La préparation des collodions par agitation mécanique engendre l'insertion de bulles d'air qu'il est préférable d'enlever avant l'étape d'extrusion comme vu dans le Chapitre 3, paragraphe 2.2. Pour des viscosités en dessous de 100 Pa.s, un dégazage en laissant reposer la solution toute une nuit est efficace mais pour des viscosités plus élevées, les bulles d'air restent emprisonnées dans le milieu. Un dégazage par centrifugation s'avère parfaitement efficace. Néanmoins, le challenge est de transférer le collodion centrifugé dans la cuve d'extrusion sans y réintroduire de bulles d'air ou de pouvoir centrifuger directement la cuve de filage. Cette dernière solution avait d'abord été envisagée mais dans le commerce il n'existe pas de centrifugeuse pouvant recevoir des cuves d'une telle taille (5 L) dans des prix acceptables pour notre projet. La solution a donc été de concevoir un système de transfert du collodion dégazé à la cuve d'extrusion sans turbulence afin d'éviter toute réinsertion de bulles d'air.

Ce système de remplissage est composé de 4 pots d'un volume de 400 mL, façonnées de manière à être compatibles avec la centrifugeuse suivante : Centrifugeuse 5810 (Eppendorf, Allemagne). Ces pots sont fabriqués en aluminium anodisé, matériau résistant aux pH acides. De plus, l'aluminium est un matériau léger choisi pour obtenir un volume de pot suffisamment important tout en ayant un poids minimal afin de pouvoir être facilement centrifugé. Ces pots possèdent un couvercle à visser pour les fermer au moment de la centrifugation. Ils se fixent ensuite au système de remplissage en ôtant le couvercle et en les vissant directement au support de remplissage. Une fois le pot de remplissage vissé, le transfert du collodion vers la cuve d'extrusion s'effectue grâce à une arrivée d'air comprimé au-dessus du pot. L'orifice de mise sous pression est alimenté par une électrovanne. Un

régulateur de pression est ajouté et commandé analogiquement par un variateur. Enfin, pouvant appliquer une pression jusqu'à 10 bars, il a été ajouté un système de sécurité autour du pot de remplissage afin d'éviter son expulsion en cas de décrochage accidentel.

L'application d'une différence de pression entre le pot de remplissage (p_r) et la cuve d'extrusion (p_e) permet un transfert du collodion lorsque $p_e - p_r < 0$. Le collodion est alors poussé par le haut vers le bas de la cuve où une paille d'absorption est située et permet de faire le transfert vers la cuve d'extrusion. Ce système de remplissage a été mis au point pour pouvoir remplir la cuve d'extrusion avant le filage sans insertion de bulles d'air mais également pour la remplir en cours de filage, toujours possible en appliquant une différence de pression. Cela permet de ne pas limiter le temps de filage au simple volume de la cuve d'extrusion. Afin d'éviter d'insérer en début de remplissage l'air emprisonné dans les tuyauteries, il a été conçu un système de purge permettant l'évacuation de tout indésirable (air, impuretés, etc.). Enfin, un système de mesure du niveau de la surface du collodion dans la cuve par un rayon laser a été ajouté avec un écran numérique afin de savoir à tout moment la quantité restante dans la cuve.

3.4 Module d'extrusion

La fonction du module d'extrusion est d'extruder la solution de chitosane ou d'alginate de sodium contenue dans la cuve de filage à travers une filière afin d'en obtenir un fil.

3.4.1 Cuve d'extrusion

Comme les photos de la Figure 34 le montrent, il s'agit d'une cuve simple enveloppe de 5 L en inox, ayant une grande ouverture en partie haute venant se fixer sur un support de fermeture à l'aide de vis et d'écrous adaptés. Ce support est monté sur une glissière verticale coulissante afin d'assurer une insertion aisée du couvercle sur la cuve sans démonter l'instrumentation. Un joint entre le couvercle et la cuve assure une bonne étanchéité. La cuve est dotée de deux orifices en partie basse. L'un correspond à l'orifice de sortie vers la filière d'extrusion et le second est l'orifice d'entrée de remplissage. Chaque orifice est contrôlé par une vanne manuelle qui est reliée à la cuve par un raccord rapide.

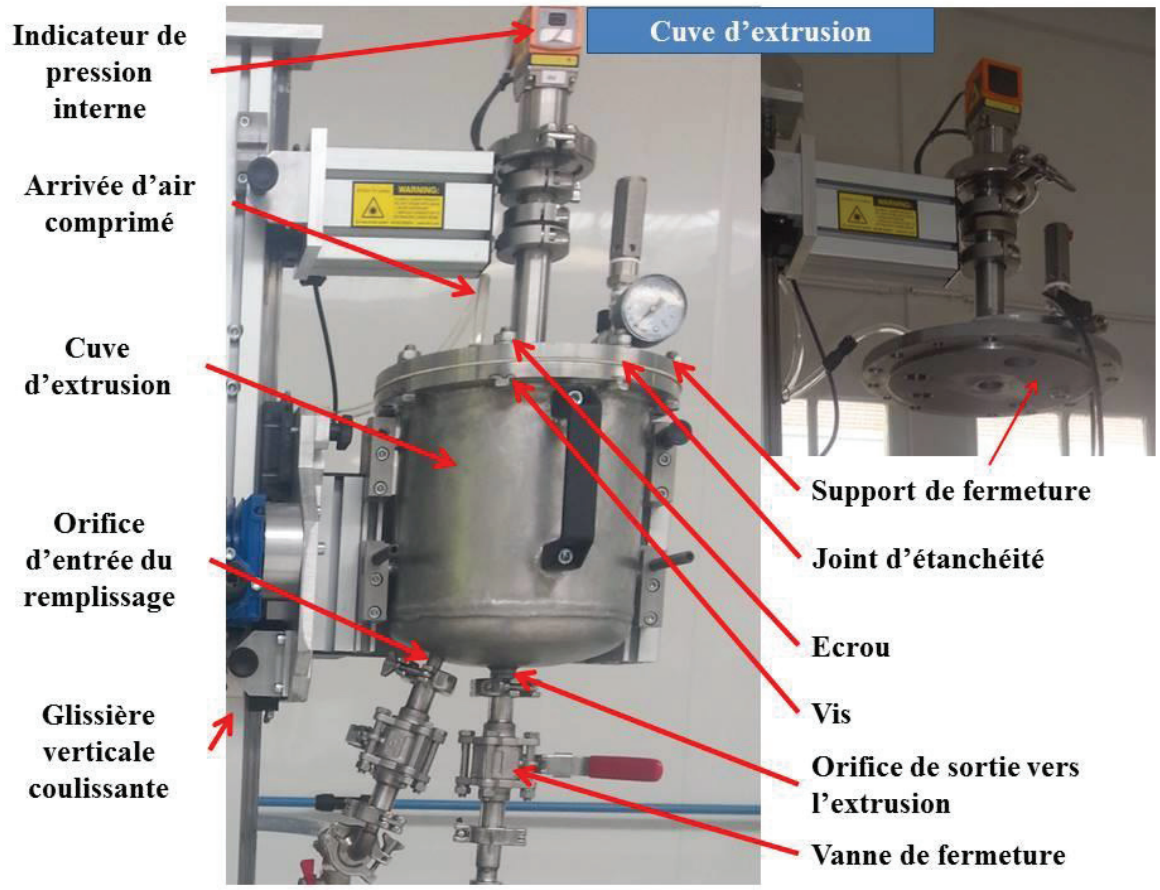


Figure 34: Cuve d'extrusion

3.4.2 Mécanisme d'extrusion

Au niveau de ce module, comme indiqué précédemment, deux systèmes d'extrusion ont été envisagés : un système d'extrusion sous pression d'air arrivant par le haut de la cuve de filage et un autre système d'extrusion grâce à une pompe à engrenage.

Le premier système est identique à celui mis en place au niveau de la cuve de remplissage avec une entrée d'air au-dessus de la cuve (Figure 34). Avec une pression pouvant aller jusqu'à 10 bars, l'air entrant vient pousser le collodion vers l'orifice de sortie qui va alors passer directement dans une filière située en dessous de la cuve d'extrusion. La mise sous pression est déclenchée par une électrovanne. Un régulateur de pression est ajouté et commandé analogiquement par un variateur.

Le deuxième système utilisant une pompe à engrenage a été choisi notamment pour les collodions de très fortes viscosités, là où l'extrusion sous air comprimé pourrait atteindre ses limites (Figure 35).

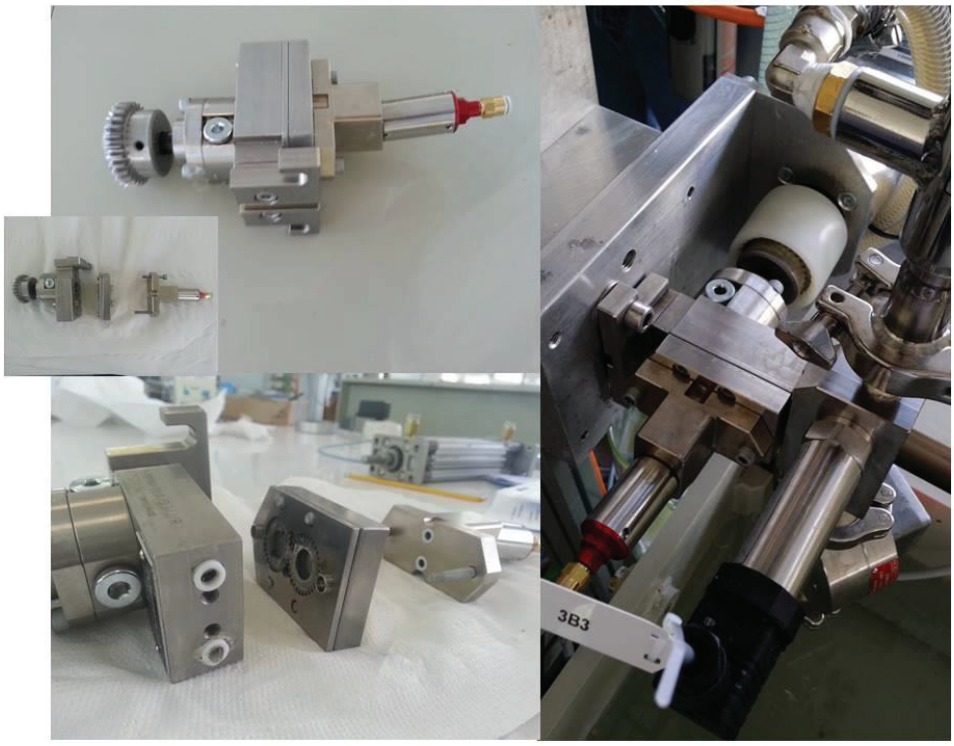


Figure 35: Pompe à engrenage montée et démontée

3.4.3 Filière

Dans ce projet de thèse, le collodion est extrudé à travers une filière mono-filament de 0.6 mm de diamètre (Figure 36).

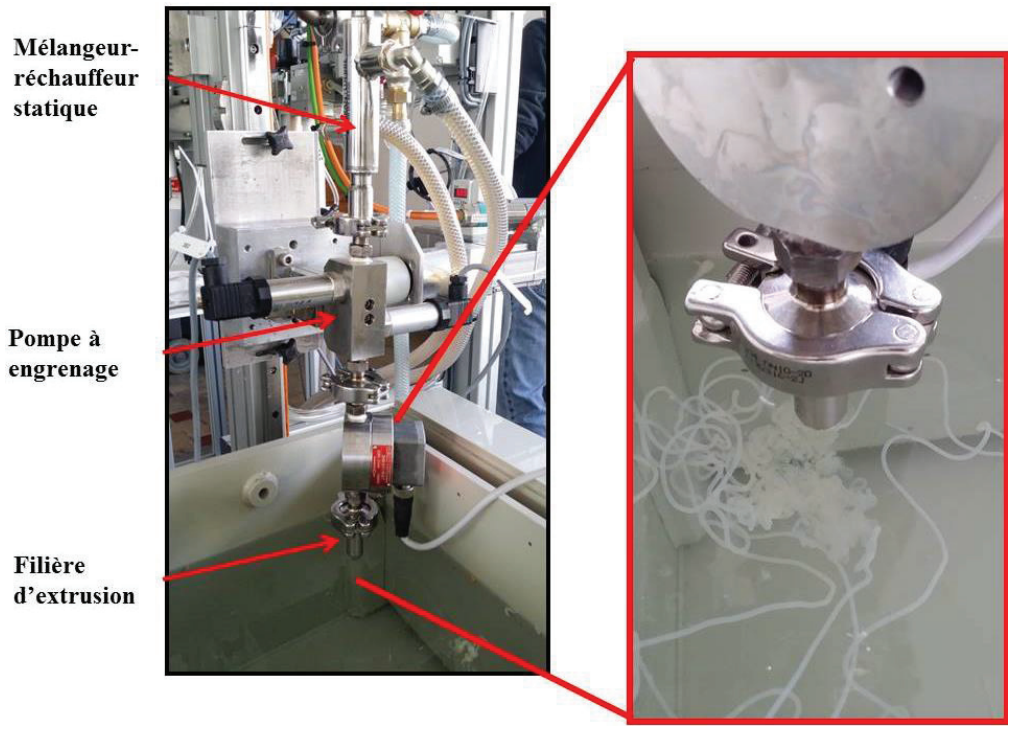


Figure 36: Filière d'extrusion

Pour conclure sur le module d'extrusion, il est important de noter qu'il a été conçu pour être modulable et chaque élément peut être intégré ou retiré de la chaine d'extrusion en fonction des nécessités. Enfin, ce module contient un bouton d'arrêt d'urgence arrêtant instantanément la pompe et/ou l'air comprimé entrant en cas d'urgence.

3.5 Modules de coagulation, d'ensimage et de lavage

Tout comme les autres modules, les bacs de coagulation et de lavage ont été conçus pour offrir un maximum de modularités et d'options dans le procédé de filage. Il s'agit de bacs rectangulaires en polypropylène gris thermosoudé de 245 L (dimensions : 2000 x 350 x 350 mm) dont la face supérieure est à 900 mm du sol. Des structures en profilés d'aluminium sur roues pivotantes équipées de freins soutiennent les bacs qui sont fixés par des vis à lobes permettant un montage/démontage manuel. Cela donne la possibilité de moduler le nombre de bains en pouvant ôter rapidement un bain si nécessaire. Le fond des bains est incliné afin d'assurer une vidange totale grâce à une vanne inox sur piquage en point bas de la cuve. Les cuves possèdent des orifices en entrée et sortie de cuve pour laisser un passage à la fibre sans encombre et sans frottement. Deux orifices latéraux avec bouchons ont également été créés sur les cuves pour une éventuelle mise en place d'un circuit de renouvellement ou de filtration du bain. Dans chaque cuve est introduit un support de diabolos de roulement modulaire. Ce support est également réalisé en polypropylène gris et est inséré et maintenu dans les bacs grâce à des glissières. Il est perforé sur toute sa longueur et sa hauteur afin de pouvoir offrir un maximum de possibilités de fixation des diabolos. Ces diabolos de roulement (bobine diabolo $Ø_1$ 20, $Ø_2$ 10, $Ø_{int}$ 6.3, L = 25, Ref. U25-V ou Ref. U25-U, Petit et cie, http://www.hpetit.fr/textile.php) permettent de jouer facilement sur le temps d'immersion du fil dans les bains en contrôlant son trajet. Chaque support a été fourni avec 4 diabolos céramiques ainsi positionnables à façon. Enfin, chaque cuve possède un couvercle amovible en polypropylène gris pouvant être fermé durant le filage et une goulotte porte-câble sur l'arrière de la cuve (Figures 37 et 38).



Figure 37: 1) Module contenant un bain, 2) Ensemble des bains avec les couvercles fermés, 3) Ensemble des bains avec les couvercles ouverts, 4) Vanne de purge d'un bain

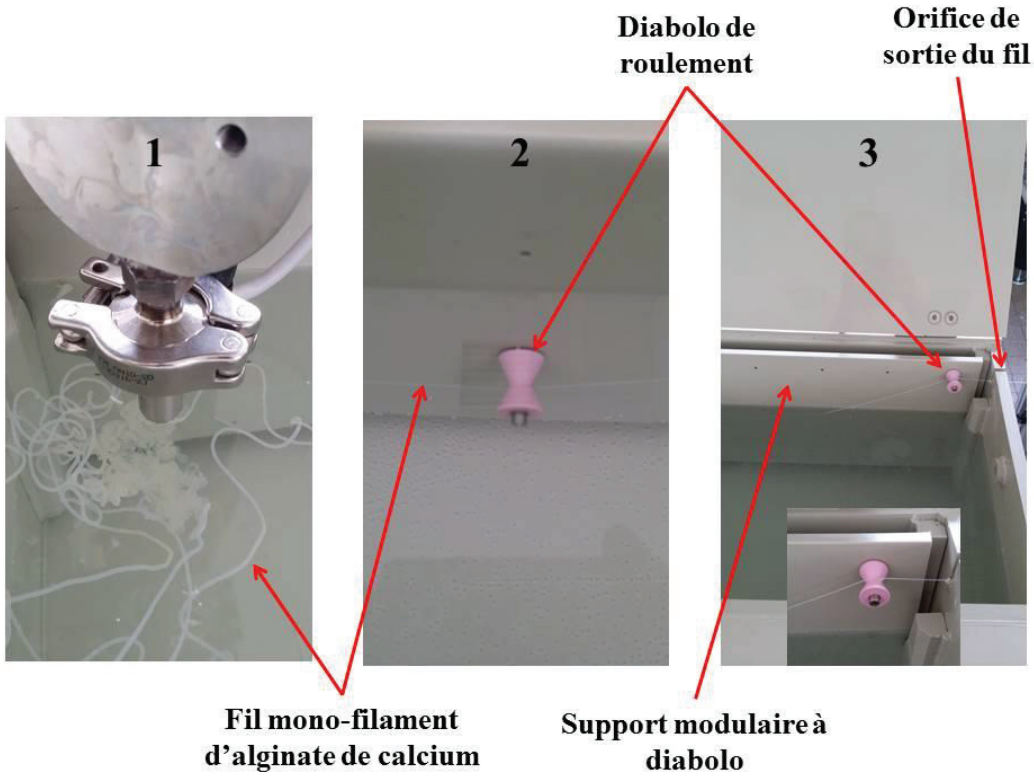


Figure 38 : 1) Coagulation de l'alginate à la sortie de la filière dans le bain de chlorure de calcium 2) Diabolo de roulement maintenant le fil d'alginate de calcium en immersion 3) Diabolo de roulement en sortie de bain et orifice de sortie pour laisser passer le fil

Les bains peuvent être utilisés pour la coagulation, le lavage, l'enduction de la fibre par une solution d'un autre polymère (ex. chitosane, sous réserves de quelques adaptations) ou encore pour l'incorporation de principes actifs. Dans cette étude, le MAF a été utilisé pour produire la fibre mono-filament d'alginate de calcium.

Les fibres mono-filament d'alginate de calcium fabriquées au cours de cette étude à l'aide du MAF ont été produites à partir d'une solution d'alginate de sodium à 10 % (m/m) (*Cf*. Chapitre 3, paragraphe 3.2) coagulée dans un bain d'une solution de chlorure de calcium à 8 % (m/m). A l'aide d'un guide-fil (tige crochetée fabriquée manuellement à partir de fils électriques gainés), la fibre est déposée sur les diverses bobines de roulement. Deux bains de lavage ont été utilisés pour la fabrication de ces fibres.

3.6 Modules d'étirage

L'étirage de la fibre est contrôlé à chaque étape de son élaboration grâce à des têtes d'étirage constituées d'un rouleau motorisé et de trois diabolos positionnés en parallèle (Figure 39). La fibre est alors enroulée autour du rouleau et des diabolos pour subir l'étirage. Il y a quatre modules d'étirage, placés après chaque bain. L'étirage est contrôlé par le réglage des vitesses de chaque tête d'étirage par rapport à la vitesse linéaire d'extrusion préalablement définit par l'opérateur et rentré sur l'écran synoptique. Chaque rouleau motorisé des têtes d'étirage est alimenté de façon indépendante. Ce rouleau de traction et d'étirage réalisé en silicone est monté sur l'axe de sortie du réducteur. Un axe parallèle constitué de 3 diabolos en céramique est placé au-dessous du rouleau d'étirage. Cet axe de diabolos peut être incliné afin de faciliter l'entraînement de fil. Les diabolos sont non-motorisés. Les moteurs sont reliés à l'armoire électrique par des câbles de raccordement placés sur les goulottes porte-câble à l'arrière des différents bains. Des structures en profilés d'aluminium sur roues pivotantes équipées de freins soutiennent les modules d'étirage. Chaque module contient un bouton d'arrêt d'urgence arrêtant instantanément son moteur en cas de besoin et une cage de protection en plexiglass est posée autour des moteurs/réducteurs afin de limiter les risques d'accident.

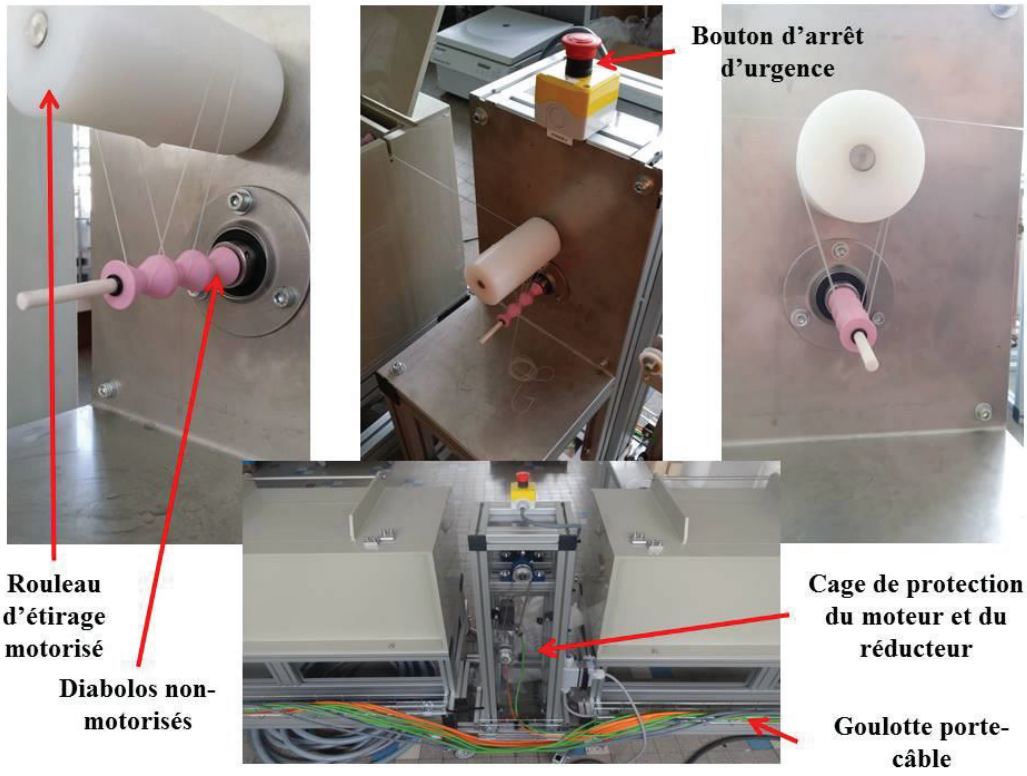


Figure 39 : Module d'étirage

3.7 Module de séchage

Le séchage est réalisé par quatre émetteurs à rayonnement Infra-Rouge (IR) (Heraeus, Allemagne) de 400 mm de longueur (300 mm de longueur utile). Le système de séchage est composé de deux modules indépendants, constitués chacun de deux émetteurs IR soutenus par une structure en profilés d'aluminium sur roues pivotantes équipées de freins, toujours dans une recherche de modularité maximale. A chaque entrée et sortie de module est positionnée une roue de guidage qui permet de soutenir et guider le fil. Deux roues de guidage supplémentaires sont placées en partie haute, c'est-à-dire entre les deux émetteurs du module. De plus, chaque module est monté sur un support mobile pouvant faire coulisser les émetteurs vers l'arrière afin d'effectuer le passage de la fibre sur les roues de guidage sans être gêné. Une fois la fibre positionnée sur les roues, le module d'émetteurs n'a plus qu'à être avancé grâce au support à coulissage et les émetteurs viennent directement confiner la fibre dans leur gouttière (Figures 40 et 41). La régulation de la puissance d'émission (en pourcentage) se définit au niveau de l'écran interactif de l'armoire électrique par des graduateurs à consigne analogique.

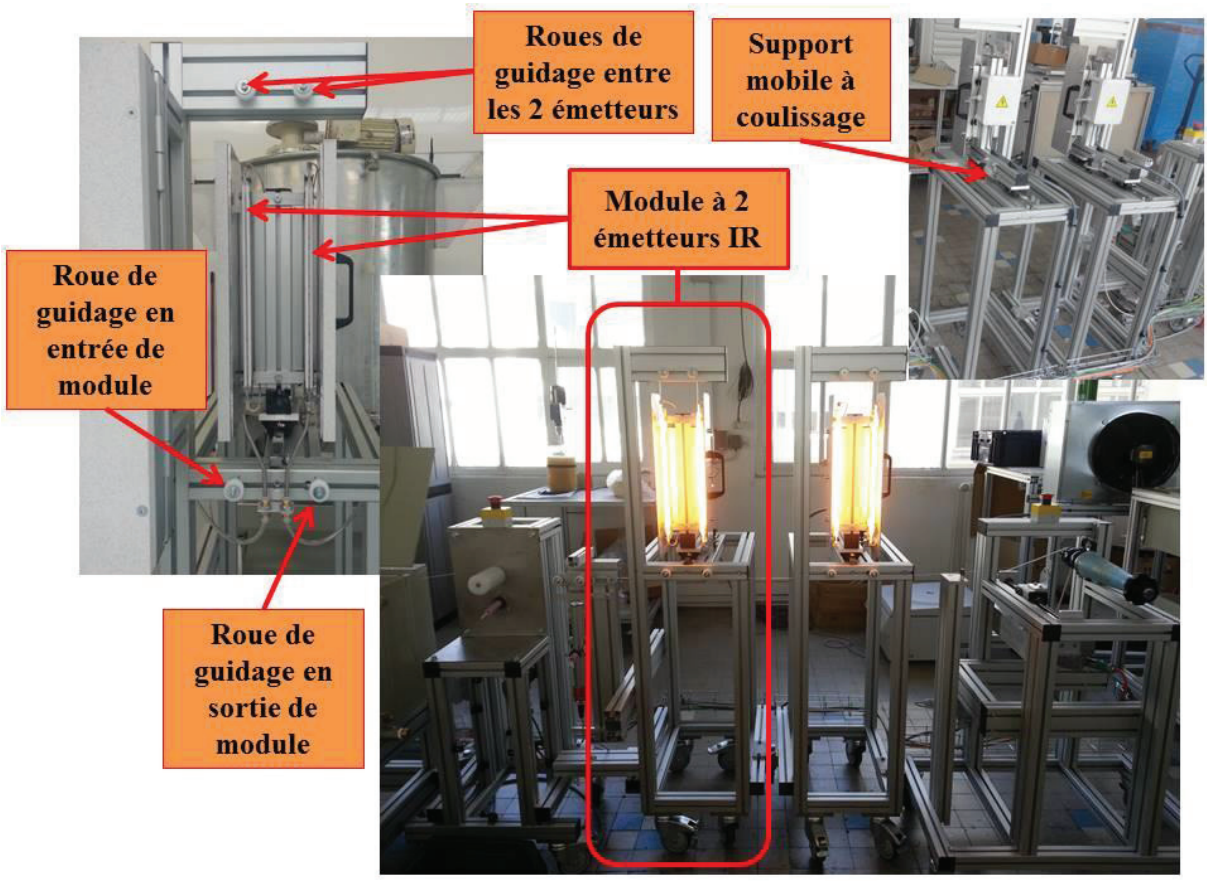


Figure 40: Module de séchage à émetteurs Infra-Rouges

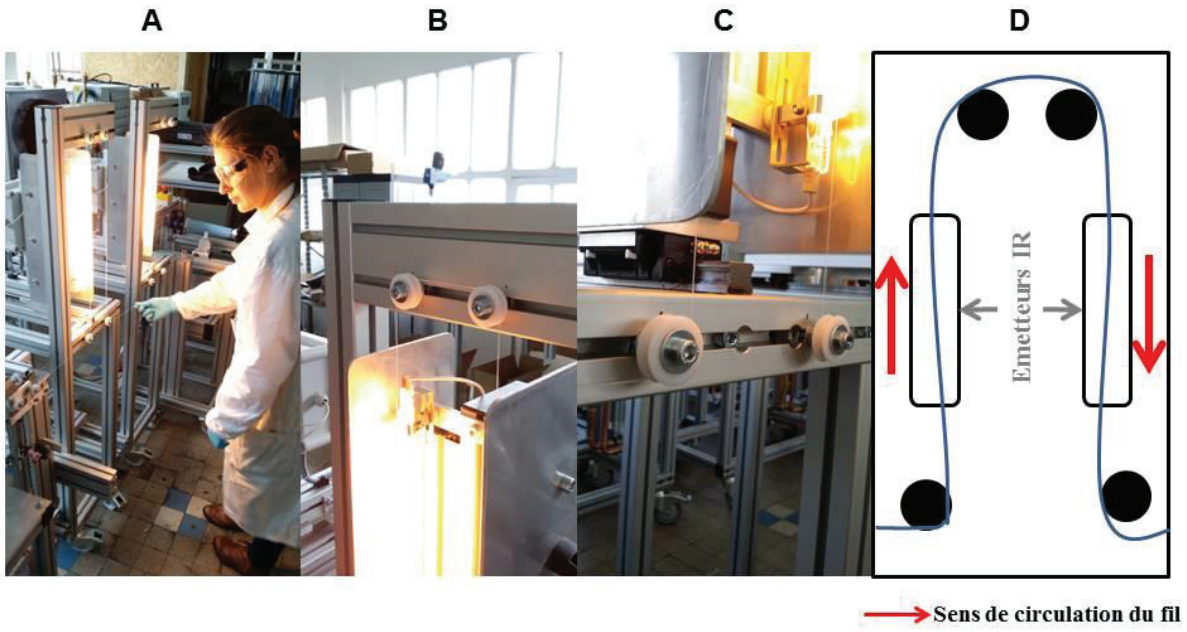


Figure 41: A) Mise en place de la fibre sur les roues de guidage avec les émetteurs Infra-Rouges (IR) en position arrière, B) Vue de la fibre passant sur les roues hautes de guidage avec les émetteurs en position avant, (C) Vue de la fibre passant sur les roues de guidage en entré et sortie de module avec les émetteurs en position avant et (D) Schéma d'un module de séchage

Ce système de séchage s'est avéré efficace pour le séchage de la fibre mono-filament d'alginate de calcium à une vitesse maximum de 15 m/min. Néanmoins, le séchage d'une fibre mono-filament de chitosane s'est montré plus difficile même à des vitesses inférieures. C'est pourquoi, il a été ajouté de manière modulable un système d'arrivée d'air comprimé à température ambiante. Une buse a été placée sous chaque émetteur IR (soit quatre buses) venant souffler dans la gouttière de l'émetteur où passe la fibre. De plus, il a également été ajouté un appareil d'air soufflé chaud Leister, composé d'une soufflerie ROBUST G63A2 et de deux chauffeurs d'air LHS 21S SYSTEM 230V 2KW (Figure 42). Un appareil d'air soufflé chaud Leister a été placé au-dessus du rouleau motorisé du dernier étirage et un second a été placé juste avant l'entrée de la fibre dans le premier émetteur IR. Avec ces différents modules complémentaires, le séchage de la fibre de chitosane s'est montré satisfaisant à 120 °C comme température de consigne des appareils Leister et au niveau 9 comme consigne pour le débit de l'air pour une vitesse de filage comprise entre 5 et 10 m/min.

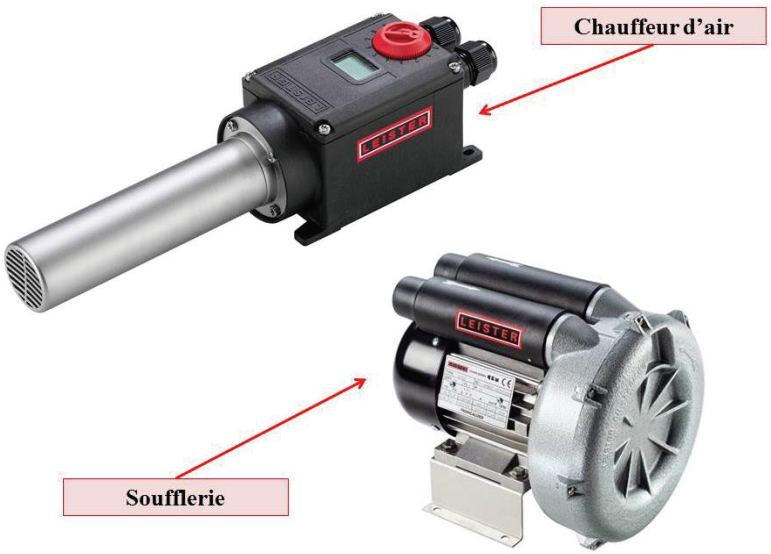


Figure 42: Appareil d'air soufflé chaud Leister composé d'un chauffeur d'air et d'une soufflerie

3.8 Module de bobinage

La bobine est fixée sur l'axe de sortie du réducteur. Dans une optique de débobinage de la fibre d'alginate de calcium pour des essais d'enduction, il a été choisi d'utiliser des bobines coniques, plus faciles à débobiner. En amont de la bobine est installé un système de trancannage. La vitesse de rotation de la bobine et du déplacement du guide du système de trancannage est calculée automatiquement à partir du débit d'extrusion préalablement définit par l'opérateur et rentré sur l'écran synoptique.

Une fois de plus, des structures en profilés d'aluminium sur roues pivotantes équipées de freins sont utilisées pour soutenir ce module. De plus, le module de bobinage contient un bouton d'arrêt d'urgence arrêtant instantanément son moteur en cas de besoin. Une cage de protection en plexiglass est posée autour des moteurs/réducteurs afin de limiter les risques d'accident.

L'élimination des molécules d'eau lors du séchage engendre une rétraction de la fibre et donc une modification du diamètre du fil. Ces modifications sont variables en fonction du taux d'évaporation d'eau, qui dépend des paramètres de séchage, de la vitesse de filage mais aussi de la structure de la fibre. En conclusion, il est nécessaire que la vitesse finale de filage soit parfaitement asservie à la vitesse de bobinage. C'est pourquoi, le module de bobinage possède une autorégulation de la vitesse de rotation du moteur et du trancannage par mesure de déflexion du fil. Autrement dit, s'il y a création de mou au niveau du fil, la vitesse de rotation du bobinage va accélérer. Et inversement, si le fil est trop tendu (fil plus sec) et risque de casser, alors la vitesse de rotation va diminuer. Cette déflexion est mesurée et régulée à l'aide d'un pantin. Ce dernier repose sur un diabolo de roulement suspendu à un fil de nylon passant dans un système de poulies et est contrebalancé par des poids. La fibre en cours de fabrication vient passer sur un rouleau de support, puis sous le diabolo de roulement du pantin et enfin de nouveau sur un rouleau de support. En fonction de la longueur du 'mou' de la fibre entre la sortie du bac de lavage et la bobine, le diabolo va descendre ou monter. En cas de mou, le diabolo descend et engendre alors une augmentation de la vitesse de bobinage et inversement si la fibre est sèche (tendue), le diabolo remonte et la vitesse de bobinage diminue. Ce pantin est donc situé avant le module de séchage (Figure 43).

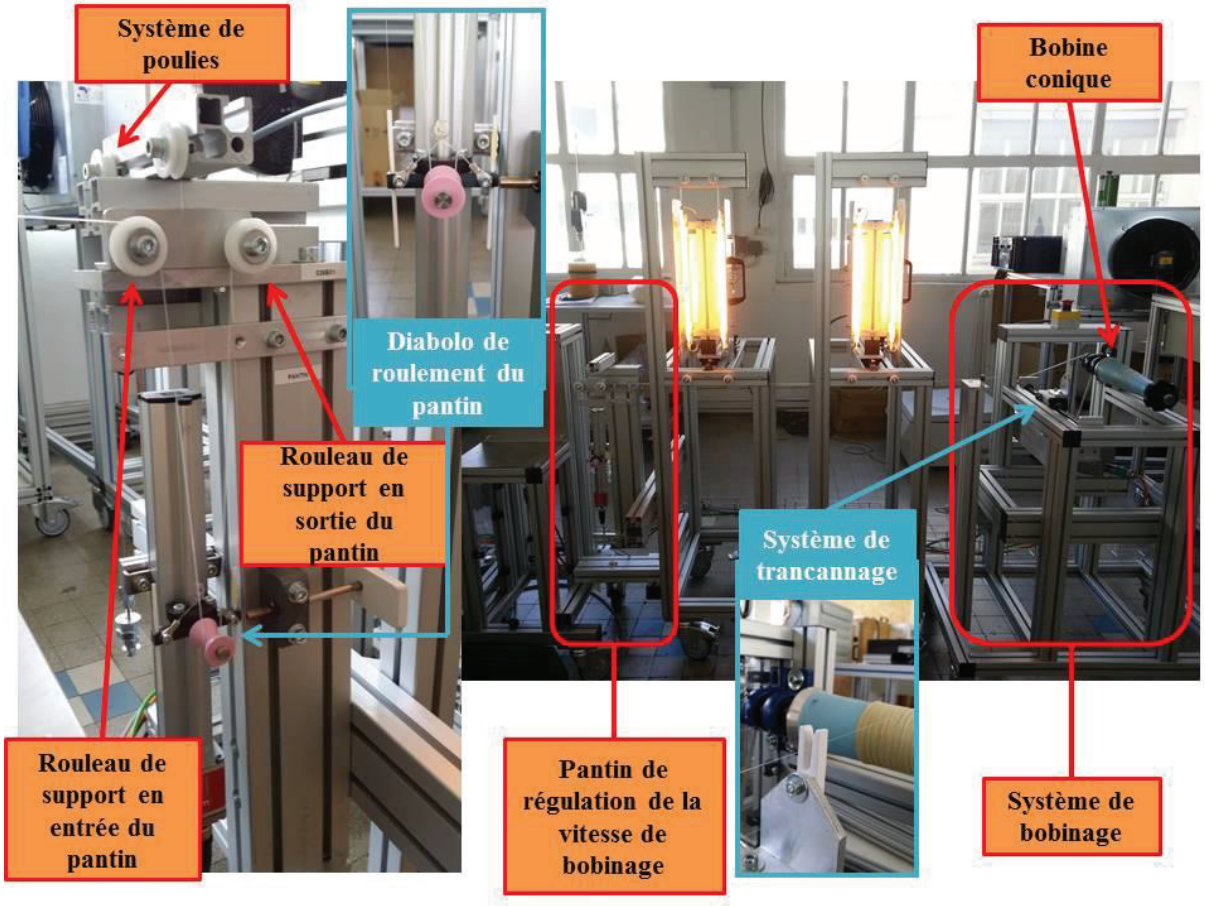


Figure 43: Module de bobinage et de son pantin

3.9 Armoire électrique

L'ensemble de la chaîne de filage est commandé depuis l'armoire de commande située en amont de la ligne, sur un châssis commun aux dispositifs de remplissage et de filage. L'armoire électrique de la machine intègre les protections électriques ainsi que tous les équipements de commande agissant sur les différents actionneurs. L'armoire est composée des éléments suivants (Figure 44) :

- Un bouton poussoir « Arrêt d'urgence » : celui-ci est en série avec ceux des boitiers situés sur chaque module de la machine
- Un bouton poussoir « Mise en service de la ligne » : effectue la mise en énergie de la ligne
- Un voyant bleu indiquant la mise en énergie effectuée
- Un bouton poussoir « Départ procédé de filage »
- Un voyant vert indiquant que le procédé de filage est en cours
- Un bouton poussoir « Arrêt procédé de filage »

- Un bouton poussoir « Mémorisation événement » : enregistre le défaut signalé
- Un bouton poussoir « Acquittement défaut » : supprime de l'écran l'annonce du défaut
- Un voyant rouge indiquant par un allumage fixe quand un défaut est présent
- Un panel-PC SIEMENS comme écran tactile pour la commande des éléments de la ligne



Figure 44: Armoire électrique et écran synoptique de pilotage de l'appareil

4 Le procédé d'enduction à l'échelle du laboratoire, transposable à l'échelle pilote

4.1 Introduction

Après avoir développé des métiers à filer à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote, un procédé d'enduction a été développé à l'échelle du laboratoire afin de fabriquer des fibres mixtes composées d'alginate de calcium et de chitosane.

L'idée de conception de ces fibres mixtes est de fabriquer un fil d'alginate de calcium et de l'enduire d'une fine couche de chitosane afin d'apporter à la fibre des propriétés antimicrobiennes tout en gardant les propriétés hémostatiques et cicatrisantes de l'alginate de calcium. D'un point de vue industriel, il est important de prendre en compte le coût de revient de la fabrication de cette fibre. Dans ce contexte, il a été envisagé de pouvoir fabriquer la fibre sur une seule et même chaîne de production. L'idée est de produire une fibre d'alginate de calcium par coagulation dans un bain de chlorure de calcium, puis de la laver dans des bains d'eau déionisée pour ensuite l'immerger dans un bain d'une solution de chitosane et au final la sécher. Deux voies d'enduction ont été développées. La première consiste à neutraliser par séchage le chitosane enduit autour de la fibre, juste après son immersion dans le bain d'enduction. La seconde diffère par sa méthode de neutralisation du chitosane qui implique un neutralisant chimique. Après le passage de la fibre d'alginate de calcium dans le bain d'une solution de chitosane où se forme la pellicule enduite, la fibre est alors immergée dans un bain coagulant le chitosane (bain alcalin), puis est lavée de nouveau dans des bains d'eau déionisée avant d'être séchée et bobinée. Cette chaîne de production nécessite d'avoir au moins cinq bains. Ce procédé a d'abord été étudié à l'échelle du laboratoire. A cette échelle, il n'a pas été développé de systèmes d'étirage entre les bains. Seul le moteur de bobinage en bout de chaîne impose la vitesse de filage. Or, en ayant cinq bains, beaucoup de frottements sont créés et il est difficile de mener le filage jusqu'au bobinage sans cassure de la fibre. C'est pourquoi, à l'échelle du laboratoire, il a été choisi de fabriquer la fibre mixte en deux étapes distinctes. La première consiste à fabriquer la fibre d'alginate de calcium et la seconde à enduire cette fibre de chitosane. Comme il a été vu dans les deux chapitres précédents, la fibre d'alginate de calcium est fabriquée grâce aux pilotes de filage développés et décrits précédemment (*Cf*. Chapitre 3, paragraphes 2 et 3). La fabrication des fibres d'alginate de calcium à l'échelle pilote a permis de pouvoir les fabriquer dans les quantités nécessaires à leur caractérisation, et

de façon reproductible. La seconde étape est l'enduction des fibres d'alginate par du chitosane.

L'étape d'enduction à l'échelle du laboratoire nécessite un module de débobinage, un module d'enduction, puis de manière facultative un module de coagulation et de lavage, et enfin un module de séchage et un module de bobinage. Un schéma fonctionnel et une photographie du procédé d'enduction sont présentés sur les Figures 45 et 46. L'enduction à l'échelle du laboratoire permet d'étudier l'influence de la concentration de la solution de chitosane, des conditions de coagulation (nature et concentration du bain de coagulation) dans le cas où il y a une étape de coagulation et du séchage (nature et température) sur la morphologie des fibres ainsi produites. Cette échelle permet également de déterminer les limites du procédé de fabrication en contrôlant l'ensemble de ces paramètres physico-chimiques.

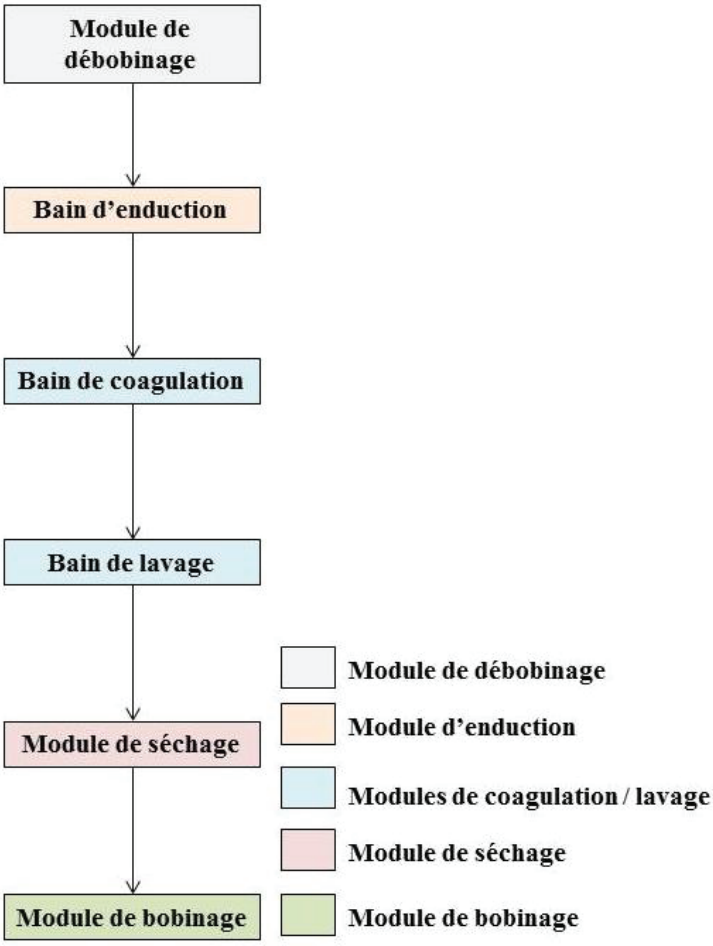


Figure 45: Schéma fonctionnel du procédé d'enduction

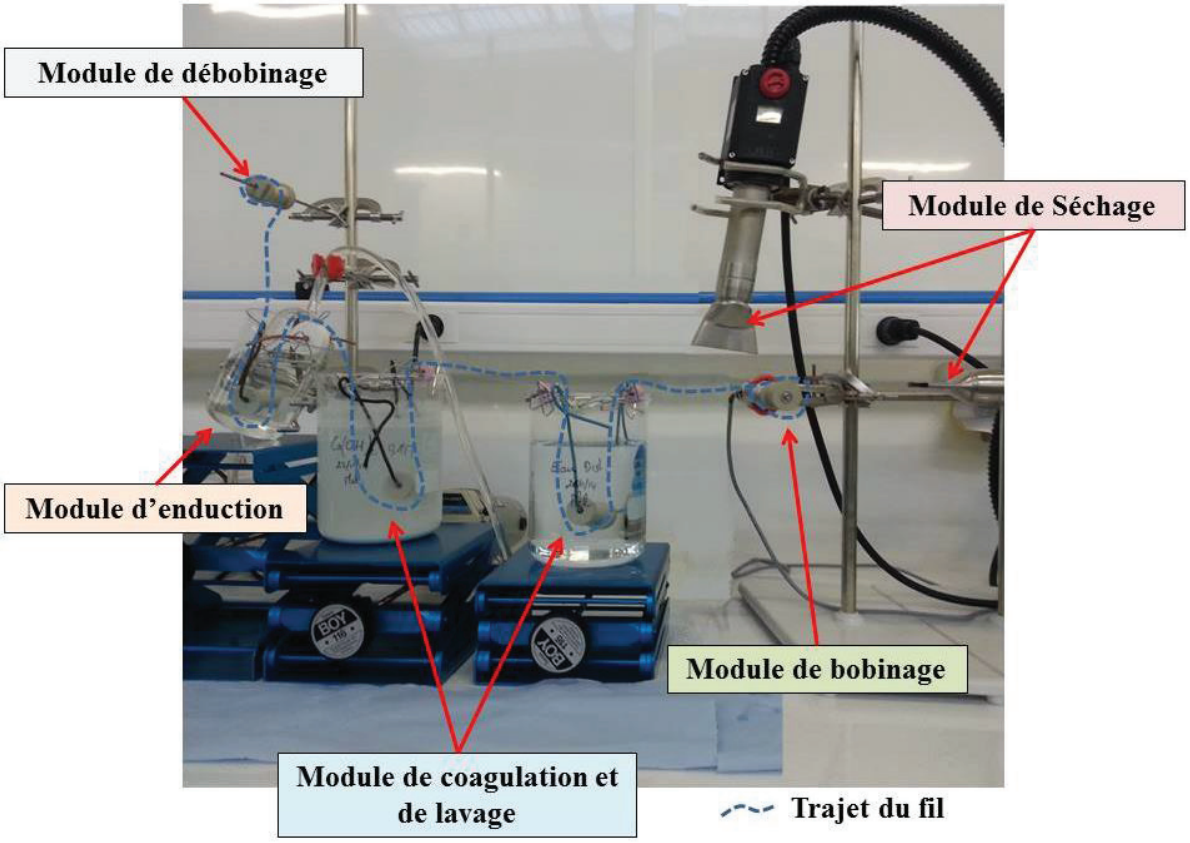


Figure 46: Procédé d'enduction

4.2 Module de débobinage

Le module de débobinage permet de dérouler la fibre d'alginate de calcium préalablement fabriquée. Ce module est constitué d'un arbre en acier fixe sur lequel vient se glisser le même type de bobine utilisée pour le MAF à l'échelle du laboratoire. L'arbre en acier ayant un diamètre bien inférieur au diamètre interne de la bobine, celle-ci peut alors effectuer des rotations librement sans trop de frottements. Un buttoir est ajouté afin que la bobine reste positionnée sur l'axe au cours du procédé de débobinage. Ce module est non motorisé. La bobine se déroule librement sous l'action du moteur du module de bobinage en fin de chaîne, seul module motorisé de ce procédé d'enduction à l'échelle du laboratoire (Figure 46).

4.3 Module d'enduction

Le module d'enduction est constitué d'un bécher de 600 mL, d'un diabolo ou d'une bobine de roulement au fond et en sortie de bain. Les diabolos sont soutenus à l'aide de gaines amovibles (Figure 46). Le challenge à relever lors de cette étape d'enduction est de n'avoir aucun frottement en sortie de bain avant que le chitosane ne soit séché ou coagulé afin de ne

pas risquer d'enlever la couche enduite. Pour cela, il a été ajouté un système de projection de la solution de chitosane sur le diabolo de sortie du bain. A l'aide d'une pompe péristaltique, il a été mis au point un système de circulation en circuit fermé de la solution de chitosane. Cette dernière est prélevée dans le bain d'enduction et projetée sur le diabolo de sortie. De plus, pour éviter tout frottement contre le bord des béchers, le bain d'enduction est maintenu incliné à l'aide d'une pince et est surélevé à l'aide d'un support élévateur (Figure 47).

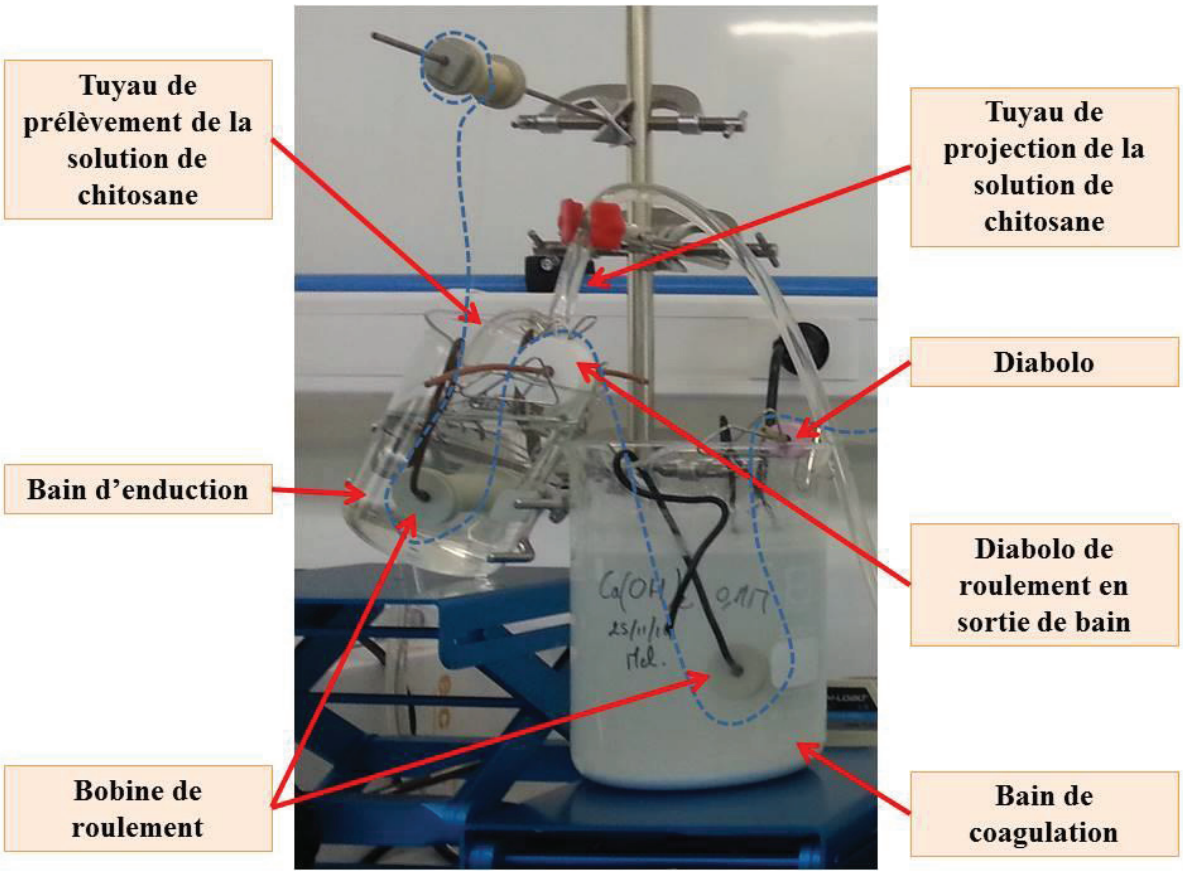


Figure 47: Module d'enduction

4.4 Module de coagulation et de lavage

Tout comme pour le filage de l'alginate à l'échelle du laboratoire, le bain de coagulation et le bain de lavage sont contenus dans des béchers de 3 L, et sont munis d'un diabolo ou d'une bobine de roulement en entrée (sauf pour le bain de coagulation) et en sortie de bain, ainsi qu'au fond de chaque bain. Les diabolos sont soutenus à l'aide de fils métalliques gainés amovibles permettant ainsi la modulation du temps de séjour dans les bains (Figures 30 et 46).

Ce module ne concerne que le procédé de fabrication de fibres enduites avec coagulation du chitosane par un neutralisant chimique (*Cf.* Chapitre 3, paragraphe 4.1). Après enduction du

fil d'alginate de calcium en l'immergeant dans le bain contenant une solution de chitosane, ce dernier est neutralisé dans un bain contenant un milieu aqueux alcalin. Plusieurs bases ont été testées : l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium et le dihydroxyde de calcium. Au cours de cette étude, ces deux dernières bases se sont montrées efficaces contrairement à l'hydroxyde de sodium qui engendrait une re-solubilisation de la fibre d'alginate de calcium et donc des ruptures dans la filature. Après son passage dans le bain de neutralisation, la fibre doit ensuite être lavée pour ôter l'excès de base. Le bain de lavage est constitué d'eau déionisée.

4.5 Module de séchage

Le module de séchage est le même que celui utilisé lors du filage de l'alginate de calcium à l'échelle du laboratoire (*Cf.* Chapitre 3, paragraphe 2.4). Un appareil d'air soufflé chaud Leister est placé juste à la sortie du dernier bain et un second est placé derrière le module de bobinage afin que l'air chaud soufflé soit à contre-courant du déplacement du fil (Figure 46).

4.6 Module de bobinage

Le module de bobinage est le même que celui utilisé lors du filage de l'alginate de calcium à l'échelle du laboratoire (*Cf*. Chapitre 3, paragraphe 2.5 et Figure 46).

Chapitre 4 :
Caractérisation des fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane

1 Introduction

Ce chapitre présente les différentes fibres qui ont été fabriquées au cours de cette étude et leurs caractérisations. Dans un premier temps, il sera présenté l'ensemble des lots de fibres fabriquées, les paramètres du procédé de fabrication et les caractéristiques des polymères utilisés.

Puis, dans un second temps, l'ensemble des caractérisations effectuées sur ces fibres seront décrites. La caractérisation des fibres repose sur leur caractérisation structurale en microscopie optique et électronique, ainsi que sur le dosage qualitatif et quantitatif du revêtement de chitosane autour des fibres d'alginate de calcium. Enfin, il a également été réalisé diverses évaluations des propriétés des fibres telles que les propriétés mécaniques, les propriétés d'absorption et les propriétés antibactériennes qui seront aussi présentées dans ce chapitre.

2 Fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane

L'ensemble des fibres fabriquées au cours de cette étude sont répertoriées dans le Tableau 7. Les fibres n° 1 à 6 sont des fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane. La masse molaire moyenne en masse du chitosane (M_w), la concentration de la solution d'enduction en chitosane et la voie de neutralisation varient en fonction des fibres. La voie de neutralisation indique si le chitosane enduit fut coagulé, et si oui, le neutralisant utilisé est indiqué. Les fibres n° 7 à 18 sont des fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane greffé au FITC. Elles ont été utilisées pour la caractérisation de la couche enductrice de chitosane. Le DA, la M_w, la concentration de la solution d'enduction en chitosane et la voie de neutralisation varient en fonction des fibres.

N° fibre	Nom de la fibre	DA (%)	M_w (kg/mol)	Greffage FITC	c (m/m) (%)	Voie de neutralisation
1	DA0M50c2Ca(OH)$_2$	0	50	Non	2	Ca(OH)$_2$
2	DA0M50c2KOH	0	50	Non	2	KOH
3	DA0M50c2SN	0	50	Non	2	Sans neutralisant
4	DA0M180c1Ca(OH)$_2$	0	180	Non	1	Ca(OH)$_2$
5	DA0M180c1KOH	0	180	Non	1	KOH
6	DA0M180c1SN	0	180	Non	1	Sans neutralisant
7	DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC	0	180	Oui	1	Ca(OH)$_2$
8	DA0M180c1KOH-FITC	0	180	Oui	1	KOH
9	DA0M180c1SN-FITC	0	180	Oui	1	Sans neutralisant
10	DA0M180c3SN-FITC	0	180	Oui	3	Sans neutralisant
11	DA0M180c2SN-FITC	0	180	Oui	2	Sans neutralisant
12	DA0M180c0.7SN-FITC	0	180	Oui	0.7	Sans neutralisant
13	DA0M180c0.4SN-FITC	0	180	Oui	0.4	Sans neutralisant
14	DA0M180c0.1SN-FITC	0	180	Oui	0.1	Sans neutralisant
15	DA0M20c2SN-FITC	0	20	Oui	2	Sans neutralisant
16	DA0M20c2Ca(OH)$_2$-FITC	0	20	Oui	2	Ca(OH)$_2$
17	DA17M180c2SN-FITC	17	180	Oui	2	Sans neutralisant
18	DA17M180c2Ca(OH)$_2$-FITC	17	180	Oui	2	Ca(OH)$_2$

Tableau 7: Fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane fabriquées au cours de cette étude. DA= degré d'acétylation (%), M_w = masse molaire moyenne en masse (kg/mol), c = concentration massique (%, m/m)

3 Caractérisations structurales

3.1 Microscopie optique

Les images de stéréomicroscopie optique des fibres d'alginate enduites de chitosane sont présentées sur la Figure 48. Les fibres n° 1 à 6 ont été analysées par cette méthode. Il est impossible de distinguer le revêtement de chitosane du cœur d'alginate sur ces images. Des vaguelettes transversales sur les fibres sont observées qui peuvent être dues aux frottements au niveau de la filière d'extrusion et des bobines de roulement. Un jaunissement est constaté pour les fibres ayant une couche de chitosane coagulé par un neutralisant. Ce jaunissement est assez faible voire inexistant après une neutralisation au dihydroxyde de calcium et est fortement prononcé après une neutralisation à l'hydroxyde de potassium. Les fibres fabriquées ne sont pas parfaitement circulaires diminuant la précision de mesure de leur diamètre. Néanmoins, le diamètre moyen mesuré est proche de 200 µm ± 20 µm (5 répétitions) pour l'ensemble des fibres. Bien que la fibre d'alginate présente un diamètre

légèrement plus faible, il n'y a pas de différence significative entre les fibres revêtues et non revêtues laissant ainsi suggérer que l'épaisseur du revêtement est inférieure à 10 µm.

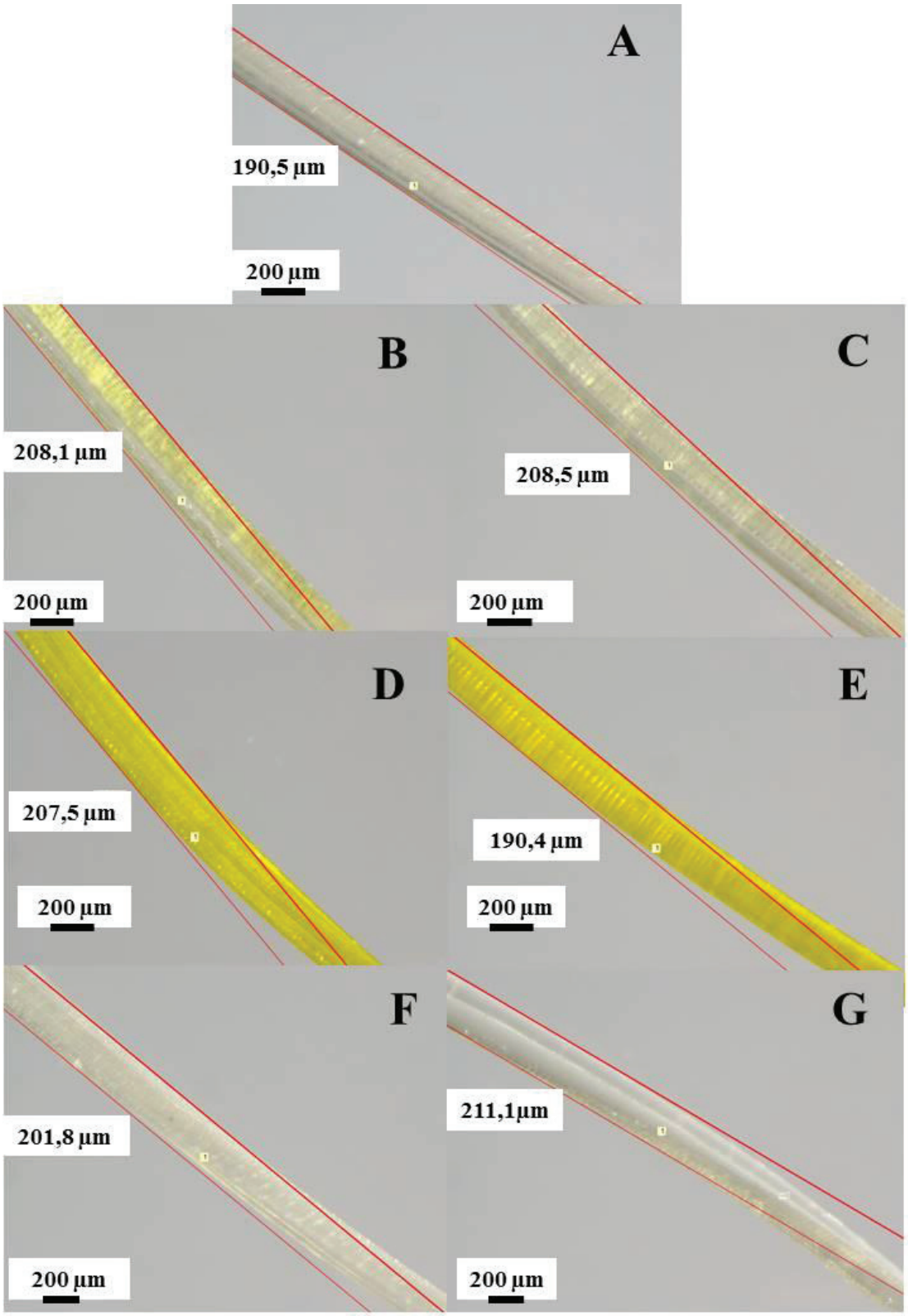


Figure 48: Photos de stéréomicroscopie optique en vue longitudinale des fibres (A) d'alginate de calcium et des fibres enduites (B) DA0M50c2Ca(OH)$_2$, (C) DA0M180c1 Ca(OH)$_2$, (D) DA0M50c2KOH, (E) DA0M180c1KOH, (F) DA0M50c2SN et (G) DA0M180c1SN

Afin de comprendre ce jaunissement après neutralisation au KOH, quelques essais complémentaires ont été réalisés. Une fibre d'alginate de calcium et une fibre de chitosane ont été immergées dans du KOH durant une 15 secondes, temps habituel moyen d'immersion pour la neutralisation du chitosane lors de l'enduction des fibres d'alginate. Les fibres testées ont ensuite été lavées et séchées par le même procédé utilisé pour l'enduction. Les observations en microscopie otique de ces fibres sont présentées sur la Figure 49. Il est observé que la fibre d'alginate de calcium jaunit fortement au contact du KOH alors qu'il est seulement observé un léger jaunissement pour la fibre de chitosane. Par ces observations, il est possible de penser que le jaunissement est dû à une complexation de l'alginate avec l'ion potassium (l'ion hydroxyde est également présent dans la solution de dihydroxyde de calcium qui induit seulement une faible coloration).

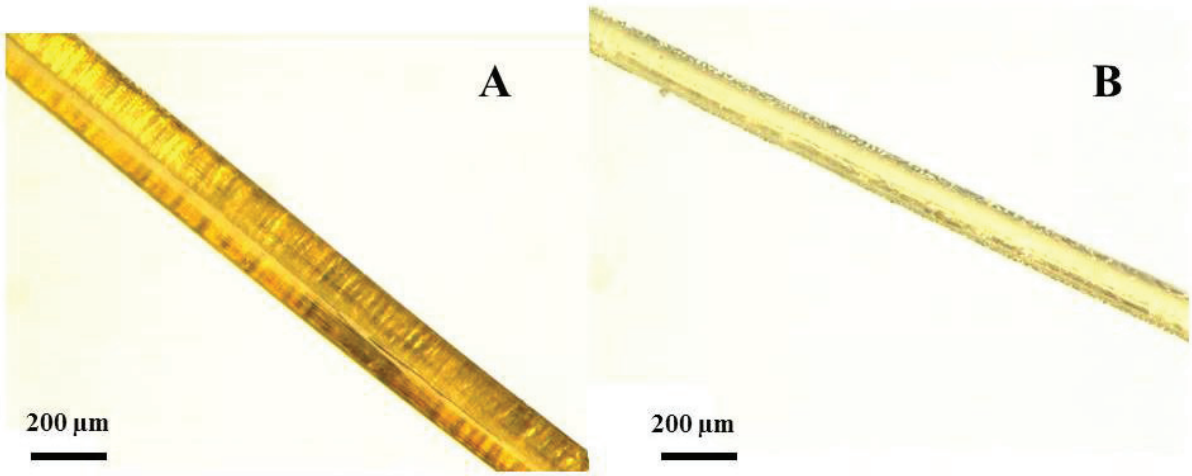


Figure 49: Observation en stéréomicroscopie optique (A) d'une fibre d'alginate de calcium et (B) d'une fibre de chitosane après une immersion dans du KOH

Les fibres enduites ont ensuite été remises dans 2 mL d'une solution tampon d'acétate d'ammonium pH 4.5 enrichit à 2 % (m/v) en chlorure de calcium (solvant classiquement utilisé tout au long des caractérisations). Il s'agit d'un solvant favorable à la solubilisation du chitosane mais l'enrichissement en ions calcium ne permet pas la solubilisation de l'alginate de calcium. Le système est laissé sous agitation magnétique à température ambiante durant une nuit (15 h). Les observations réalisées par microscopie optique de ces fibres sont représentées sur la Figure 50. Il est possible de s'apercevoir qu'après trempage dans le tampon enrichit en ions calcium, la couleur jaune disparaît. Le complexe de l'ion potassium avec l'alginate est donc un complexe réversible. Les ions calcium du milieu pourraient entrer en compétition avec les ions potassium et dissocier le complexe.

Les conclusions principales apportées par cette méthode d'analyse sur la structure des fibres sont que les fibres possèdent un diamètre de 200 µm ± 20 µm, qu'elles soient enduites ou non. Ce résultat montre que l'épaisseur de la couche d'enduction est inférieure ou égale à 10 µm (soit un volume de chitosane représentant au maximum 19 % de la fibre). Enfin, le procédé de neutralisation du chitosane impliquant le KOH engendre une complexation réversible des ions potassium avec l'alginate (et légèrement avec le chitosane) se caractérisant par une couleur jaunâtre. Effectivement, il est indiqué que l'alginate de potassium peut se présenter sous la forme de poudre blanche à jaunâtre dans la base de données européenne des additifs alimentaires[3].

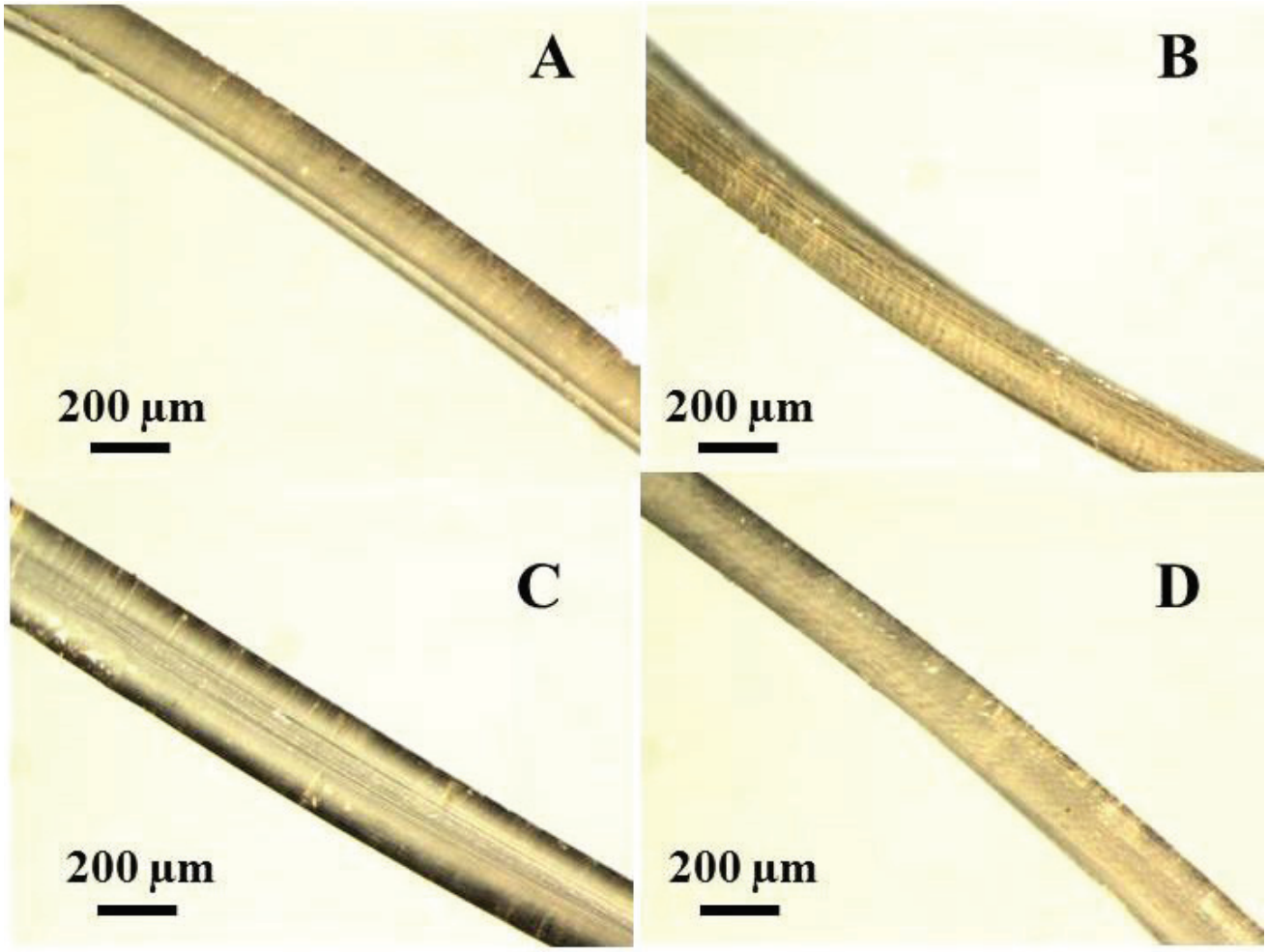


Figure 50: Observation en stéréomicroscopie optique de fibres enduites après trempage dans le tampon enrichi en calcium (A) DA0M50c2KOH, (B) DA0M180c2KOH, (C) DA0M50c1SN et (D) DA0M180c1SN

[3] https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/index.cfm?event=substance.view&identifier=149
http://www.les-additifs-alimentaires.com/E402-alginate-de-potassium.php

3.2 Etude morphologique par Microscopie Electronique à Balayage

Les clichés obtenus par MEB permettent d'identifier la morphologie de surface des fibres à l'échelle du micron (fibres n° 1 à 6). Les observations sur la fibre témoin d'alginate de calcium sont présentées sur la Figure 51, les fibres enduites avec un chitosane de M_w = 50 kg/mol sont sur la Figure 52 et les fibres enduites avec un chitosane de M_w = 180 kg/mol sont sur la Figure 53.

Pour l'ensemble des fibres, comme observé par stéréomicroscopie optique, il y a toujours les vaguelettes transversales (d'une largeur d'environ 25 µm). Par cette analyse, il est en plus observé des stries longitudinales (d'une largeur d'environ 5 µm) qui pourraient être dues à une rétractation de l'alginate de calcium lors du séchage. Enfin, les fibres revêtues de chitosane présentent une surface plus hétérogène avec des zones moins lisses que les fibres d'alginate, résultant du procédé d'enduction lui-même.

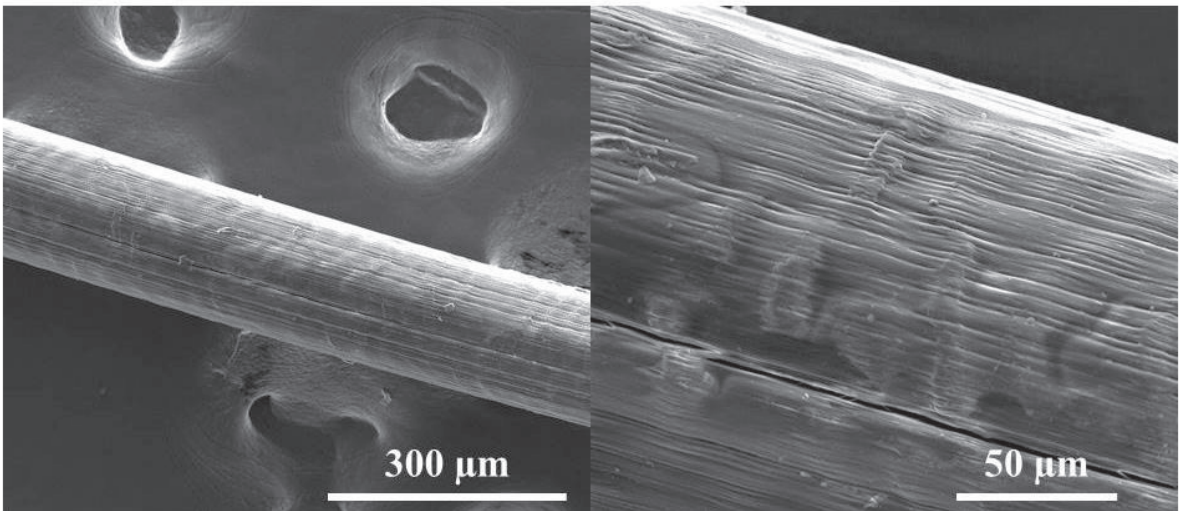


Figure 51: Photos de MEB en vue longitudinale des fibres d'alginate de calcium (sans revêtement). Haut-vide, tension d'accélération : 10 kV

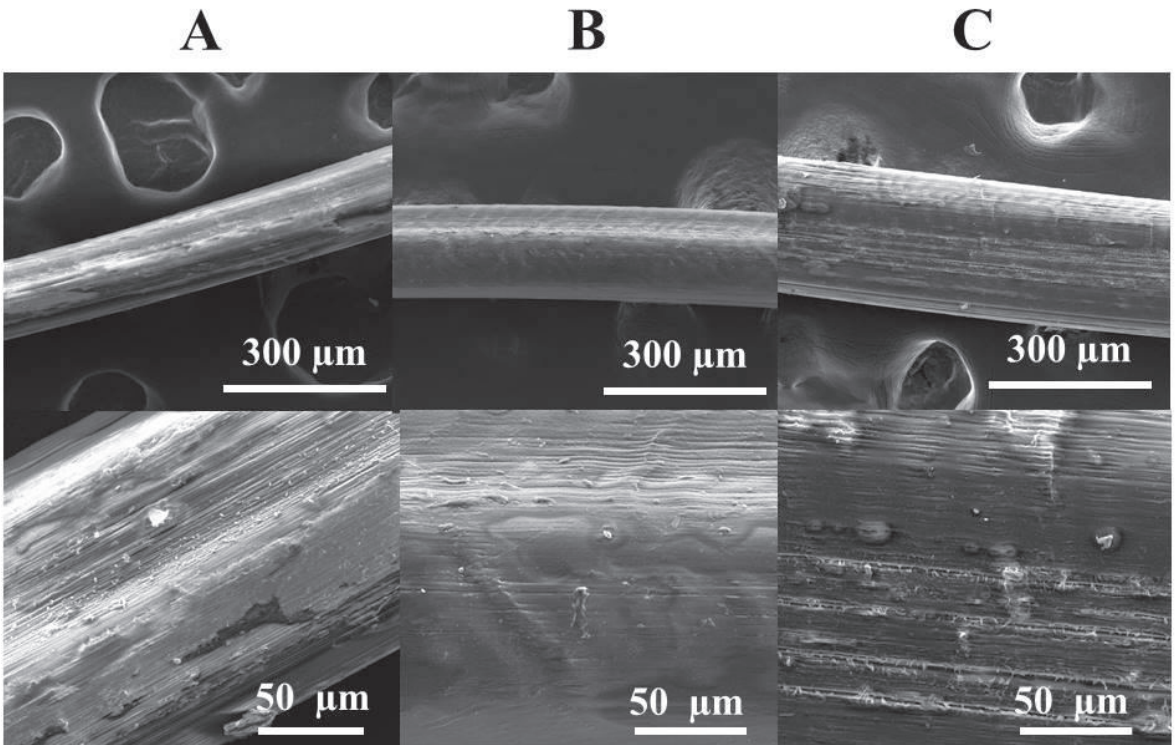


Figure 52: Photos de MEB en vue longitudinale des fibres d'alginate enduits de chitosane ; (A) DA0M50c2Ca(OH)$_2$, (B) DA0M50c2KOH, (C) DA0M50c2SN. Haut-vide, tension d'accélération : 10 kV

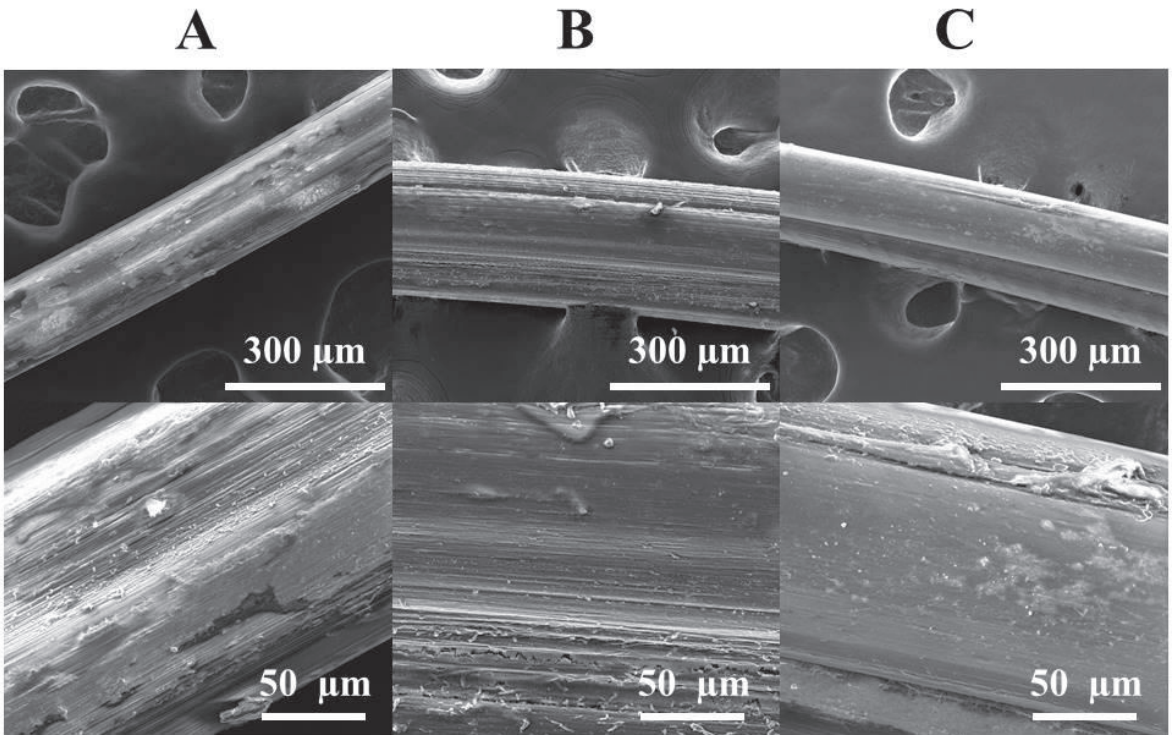


Figure 53: Photos de MEB en vue longitudinale des fibres d'alginate enduits de chitosane ; (A) DA0M180c1Ca(OH)$_2$, (B) DA0M180c1KOH, (C) DA0M180c1SN. Haut-vide, tension d'accélération : 10 kV

4 Caractérisation du revêtement de chitosane

4.1 MEB associée à une microanalyse EDX

Les spectres EDX des fibres d'alginate de calcium et des fibres revêtues de chitosane ont été enregistrés à 5 kV et 10 kV (Figure 54). Dans le cas des fibres d'alginate de calcium, l'analyse EDX met en évidence les pics des atomes de carbone, d'oxygène, de calcium, de sodium et de chlore. Le sodium ($K_{\alpha1,2}$+$K_{\beta2,3}$ à 1.06 keV), le chlore ($K_{\alpha1,2}$ à 2.62; $K_{\beta2,3}$ à 2.82 keV) et les pics de calcium ($K_{\alpha1,2}$ à 3.69 keV, et $K_{\beta2,3}$ à 4.01 keV) [140] sont plus visibles sur les spectres EDX obtenus avec une tension d'accélération des électrons de 10 kV. L'énergie cinétique incidente des électrons étant plus forte que celle à 5 kV, elle favorise l'excitation de niveaux énergétiques plus profonds (ici jusqu'à 4 keV). Les rapports de concentrations atomiques ont été calculés en utilisant le programme IDFix (SAMx) à l'aide de la matrice de correction PAP [141]. Ils sont reportés dans le Tableau 8.

Pour les fibres d'alginate de calcium, le calcium et le chlore proviennent du bain de coagulation ($CaCl_2$) des fibres. Le sodium est encore détecté et montre un échange incomplet avec le calcium résultant probablement de la formation de sels de chlorure de sodium à l'état sec. Après analyse quantitative du spectre EDX obtenu à 10 kV (Figure 54A), la quantité de calcium présent dans la fibre est suffisante pour induire une complexation complète avec l'alginate (2 résidus -M ou -G pour l'ion calcium soit Ca/O ≈ 8 %), bien que la formation de sel de chlorure de calcium ne puisse pas être exclue. De tels sels peuvent être éliminés par des lavages supplémentaires à l'eau déionisée.

Pour les fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane, les mêmes pics ont été détectés (C, O, Ca, Cl et Na). Néanmoins, un pic supplémentaire de l'atome d'azote est détecté (K_α+K_β à 0.39 keV), prouvant la présence de chitosane à la surface des fibres. La contribution de l'azote est plus apparente à une tension d'accélération des électrons de 5 kV, et n'a pas été détecté dans des travaux précédents à une tension d'accélération de 20 kV [142]. Avec le logiciel Electron Flight Simulator (http://www.small-world.net), il a été estimé que la profondeur de l'analyse est proche de 1 µm à 5 kV et environ 3 µm à 10 kV. La présence de Ca, Cl et Na dans les spectres obtenus aux deux tensions d'accélération pourrait indiquer que la largeur du revêtement de chitosane est inférieure à 1 µm sur une fraction importante de la surface des fibres revêtues. Ceci est également en accord avec la diminution de la concentration apparente d'atome N lorsque la tension d'accélération d'électrons augmente

(une fraction d'alginate plus grande étant sondée). Néanmoins, étant donné que les concentrations atomiques de Ca, Na et Cl en présence de chitosane sont significativement plus élevées que dans les fibres d'alginate de calcium, un second mécanisme intervient pour enrichir le revêtement de chitosane avec des sels. L'enduction étant réalisée par immersion dans une solution de chitosane, la réhydratation de la fibre d'alginate de calcium pourrait induire une solubilisation des sels et leur accumulation à la surface des fibres enrobées après séchage à l'air chaud.

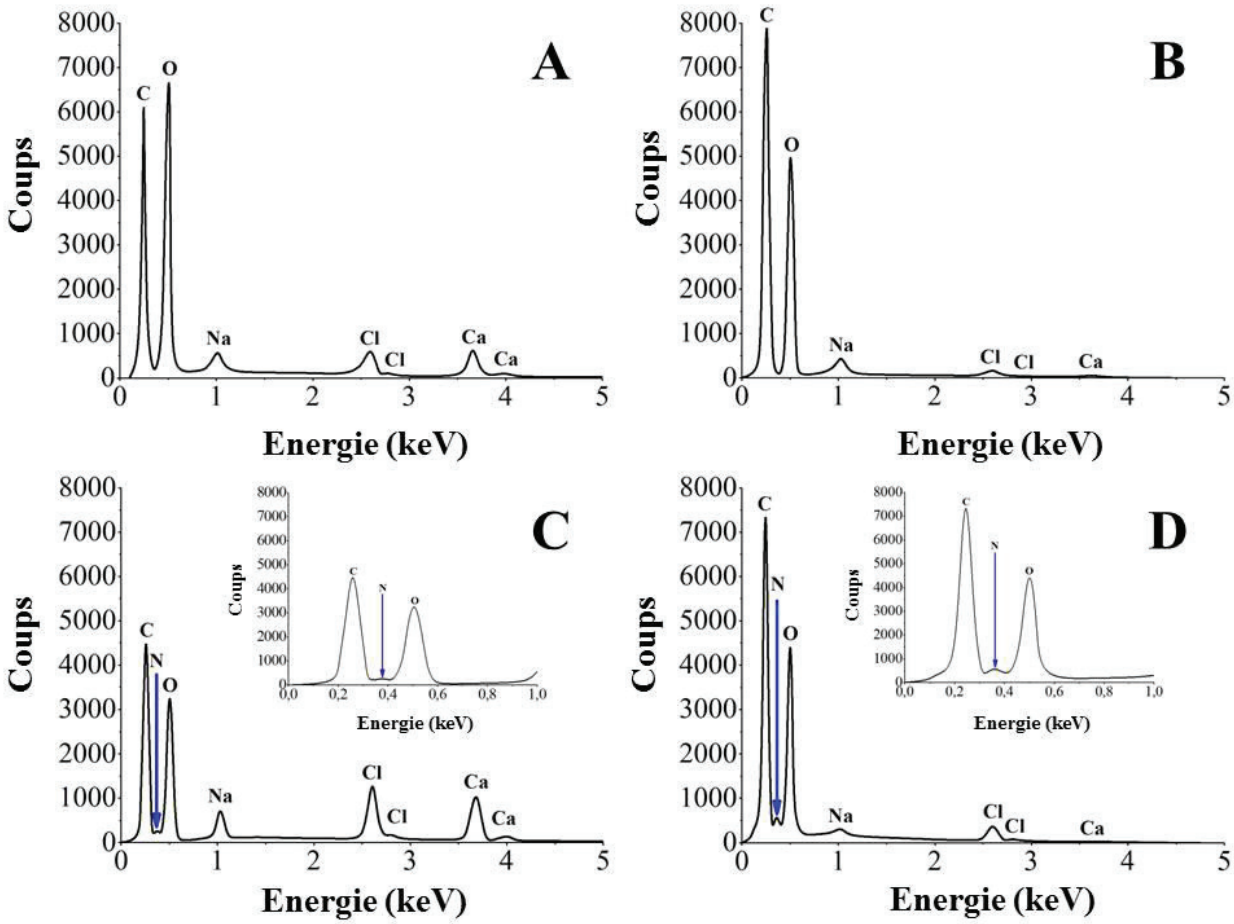


Figure 54: Spectres EDX (A) des fibres d'alginate de calcium (tension d'accélérations des électrons de 10 kV), (B) des fibres d'alginate de calcium (tension d'accélérations des électrons de 5 kV), (C) des fibres DA0M180c1SN (tension d'accélérations des électrons de 10 kV), et (D) des fibres DA0M180c1SN (tension d'accélérations des électrons de 5 kV)

Echantillon	Conditions d'analyse	C/O	Na/O	Cl/O	Ca/O	N/O
AlgCa	**Structure chimique de l'AlgCa**	1	0	0	0.083	0
Chitosane	**Structure chimique du chitosane neutralisé**	1.5	0	0	0	0.25
Acétate de Chitosane	**Structure chimique du chitosane acétate**	1.333	0	0	0	0.167
AlgCa (Figure 54A)	Surface analyse: 8000 µm² V = 10 kV	1.150	0.038	0.043	0.080	0
AlgCa (Figure 54B)	Surface analyse: 2000 µm² V = 5 kV	1.921	0.070	0.093	0.154	0
DA0M180c1SN (Figure 54C)	Surface analyse: 8000 µm² V = 10 kV	1.869	0.064	0.134	0.191	0.167
DA0M180c1SN (Figure 54D)	Surface analyse: 2000 µm² V = 5 kV	2.338	0.043	0.197	0.031	0.215

Tableau 8: Ratios de la composition atomique des fibres d'alginate de calcium et des fibres d'alginate revêtues de chitosane à différentes tension d'accélération des électrons

4.2 Dosage par microscopie confocale

Les fibres n° 7 à 18 ont été analysées par cette méthode. Les images de microscopie à fluorescence révèlent le revêtement du chitosane fonctionnalisé par FITC sur les fibres d'alginate de calcium. De plus, un traitement d'image sur le logiciel LSM, a permis d'estimer la teneur en chitosane des fibres enduites. L'ensemble des résultats de dosage du chitosane sont inscrits dans le Tableau 9 et en Annexe 2.

Un exemple est donné en Figure 55. L'image A montre une vue longitudinale d'une fibre enduite de chitosane-FITC. Il est constaté un revêtement discontinu pouvant permettre d'assurer un bon échange ionique entre l'alginate de calcium constituant le cœur de la fibre et les ions sodium présents dans l'exsudat des plaies. Cet échange est important pour le maintien de l'activité de l'alginate de calcium dans la cicatrisation de la plaie. L'image B montrant une fibre enduite en coupe transversale, confirme la non-uniformité du revêtement de chitosane autour de la fibre d'alginate illustré par un contour vert discontinu.

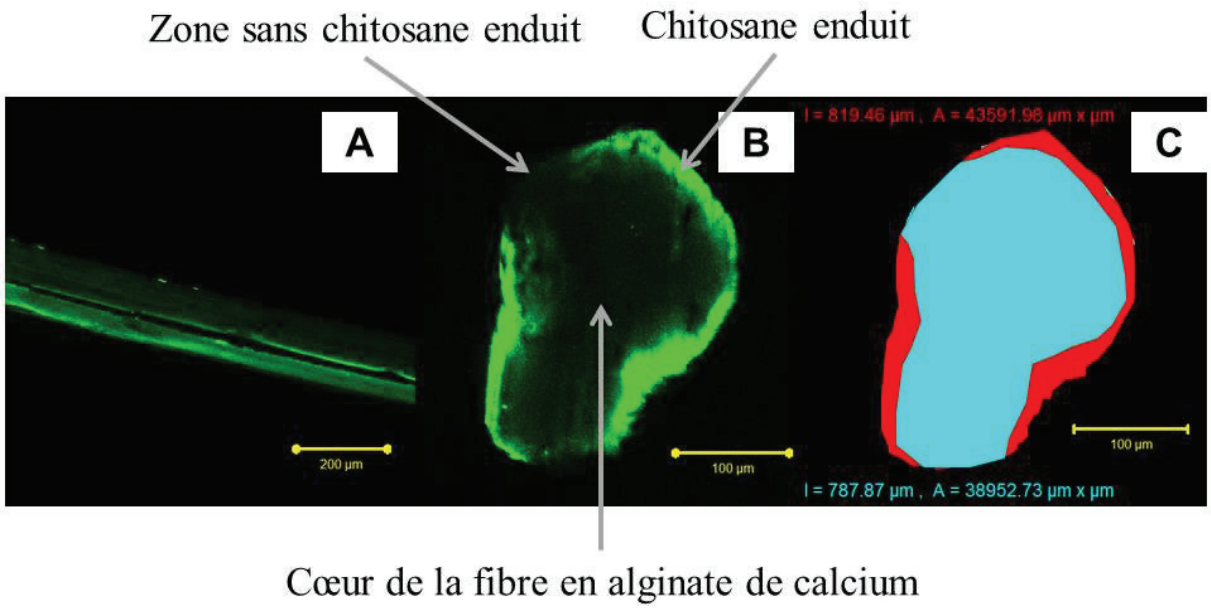


Figure 55: Images d'une fibre DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC en (A) vue longitudinale, (B) vue transversale avec un excès de gain pour une meilleure visualisation de l'enduit et (C) vue transversale avec le traitement d'image pour quantifier la taux de chitosane enduit

Pour mesurer la teneur en chitosane sur les fibres, il a été mesuré l'aire totale de la section de la fibre comprenant la couche externe fluorescente verte (z_t) et l'aire de la section interne de la fibre constituant le cœur en alginate (zone noire) (z_c). La teneur (c_{cs}) en chitosane a été calculée grâce à l'équation suivante :

Équation 10:

$$c_{cs} = \frac{z_t - z_c}{z_t}$$

La teneur en chitosane des fibres a été estimée à environ 10 % quel que soit la voie de neutralisation employée (neutralisation du chitosane par séchage ou par une base : Ca(OH)$_2$ ou KOH) pour les fibres enduites d'un chitosane ayant les caractéristiques suivante : DA = 0 %, M_w = 180 kg/mol et un bain d'enduction concentré à 1 % (m/m) (soit une viscosité de ≈ 0.2 Pa.s). Il est donc possible de conclure que la méthode de neutralisation utilisée n'influe pas sur la quantité de chitosane enduit. En outre, ce résultat est conforme aux résultats du diamètre des fibres où il a été déduit que le volume du revêtement de chitosane représentait au maximum 19 % de la fibre (*Cf.* Chapitre 4, paragraphe 3.1). Ce résultat est également proche de ceux obtenus lors de l'analyse EDX. Effectivement, 10 % de chitosane sur la couche externe de la fibre correspond à un revêtement d'une épaisseur d'environ 5 µm et l'analyse EDX montrait une épaisseur d'enduction du même ordre de grandeur avec une épaisseur proche de 1 µm.

Il n'en est pas de même lorsque la concentration du bain d'enduction varie. En effet, les résultats ont montré une teneur en chitosane décroissante lorsque la concentration du bain diminue. Effectivement, la teneur en chitosane (DA = 0 %, M_w = 180 kg/mol, sans neutralisant) des fibres enduites s'échelonne de 18.99 à ≤ 5.57 % pour des concentrations de bain d'enduction respectives de 3 à 0.4 % (m/m) (soit une viscosité d'environ 10 à 0.03 Pa.s). La teneur en chitosane pour la concentration du bain à 0.1 % (m/m) (viscosité d'environ 0.008 Pa.s) est même trop faible pour pouvoir être déterminée par cette technique d'analyse. La concentration du bain d'enduction est directement liée à sa viscosité. Plus le bain est concentré et plus la solution de chitosane est visqueuse ce qui favorise un dépôt plus épais autour de la fibre d'alginate de calcium [143]. La faible enduction des fibres avec le chitosane ayant les caractéristiques suivantes : DA = 0 %, M_w = 20 kg/mol et un bain d'enduction concentré à 1 % (m/m) (viscosité de 0.004 Pa.s) s'explique également par la faible viscosité de la solution de chitosane.

Enfin, il a été montré par cette technique d'analyse qu'il était possible d'enduire les fibres d'alginate par du chitosane à plus haut degré d'acétylation (DA = 17 %, M_w = 180 kg/mol). Concentré à 2 % (m/m), le bain d'enduction de ce chitosane possède une viscosité (1.5 Pa.s) proche de celle d'un chitosane de DA = 0 %, M_w = 180 kg/mol (2 Pa.s), pour une concentration de 2 % (m/m) également. Les fibres obtenues avec le chitosane ayant un DA = 17 %, auraient une teneur en chitosane proche de 10 % (Tableau 9) alors que leurs homologues (DA = 0 %) auraient une teneur en chitosane avoisinant 15 % (équivalant à une épaisseur d'enduction proche de 8 µm). Ce dernier résultat laisse suggérer qu'en plus de la viscosité, le DA jouerait un rôle sur l'enduction du chitosane autour de la fibre d'alginate de calcium. En augmentant le DA du chitosane, le polymère possède moins de charges positives susceptibles d'interagir avec les charges négatives de l'alginate, ce qui pourrait limiter la quantité de chitosane enduite.

La viscosité de la solution d'enduction influence directement la quantité de matière enduite : la quantité de chitosane enduite est croissante avec une augmentation de la viscosité. De plus, l'utilisation d'un chitosane à faible DA faciliterait son interaction avec l'alginate et augmente la viscosité de la solution d'enduction générant ainsi une plus grande quantité de chitosane enduit. La masse molaire du chitosane semble, quant à elle, influencer seulement de manière indirecte la quantité de matière enduite en ayant un impact sur la viscosité.

Par cette méthode d'analyse, il a été prouvé la bonne enduction des fibres d'alginate de calcium par du chitosane greffé au FITC. Par ces résultats, il a été montré que le facteur déterminant dans la quantité de chitosane enduit est la viscosité de la solution d'enduction. Néanmoins, la viscosité de cette solution dépend de la masse molaire et du DA du chitosane, ainsi que de sa concentration. En utilisant une solution de chitosane concentrée à 2 ou 3 % (m/m) (M_w = 180 kg/mol), la quantité de chitosane enduite est plus importante (grâce à une viscosité de la solution plus élevée) mais l'enduction devient irrégulière, comprenant des imperfections visibles à l'œil nu. C'est pourquoi, les fibres d'alginate enduites de chitosane à partir d'une solution concentrée à 1 % (m/m) (M_w = 180 kg/mol, DA = 0 %) ont été sélectionnées dans la suite de cette étude. Elles offrent le compromis le plus optimal entre la quantité de chitosane enduit et les qualités du revêtement de la fibre.

Type de fibre	Taux de chitosane enduit	Viscosité du bain d'enduction, constitué d'une solution de chitosane (Pa.s)
DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC	10.00 ± 5.86	0.2
DA0M180c1SN-FITC	10.80 ± 4.02	0.2
DA0M180c1KOH-FITC	9.68 ± 3.41	0.2
DA0M180c3SN-FITC	18.99 ± 8.68	10
DA0M180c2SN-FITC	15.48 ± 4.10	2
DA0M180c0.7SN-FITC	≤ 6.08	0.08
DA0M180c0.4SN-FITC	≤ 5.57	0.03
DA0M180c0.1SN-FITC	Trop faible quantité pour être quantifié	0.008
DA0M20c1SN-FITC	Trop faible quantité pour être quantifié	0.004
DA0M20c1Ca(OH)$_2$-FITC	Trop faible quantité pour être quantifié	0.004
DA17M180c2SN	11.05 ± 1.10	1.5
DA17M180c2Ca(OH)$_2$-FITC	10.09 ± 3.03	1.5

Tableau 9: Résultats des dosages du chitosane greffé au FITC sur les fibres enduites par traitement d'image de microscopie à fluorescence

4.3 Dosage par spectroscopie de fluorescence

Les fibres n° 7 à 9 ont été analysées par cette méthode dont les résultats sont indiqués dans le Tableau 10. La courbe d'étalonnage est présentée en Annexe 3.

	DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC	DA0M180c1KOH-FITC	DA0M180c1SN-FITC
Ratio CS/AlgCa (%)	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02

Tableau 10: Résultats du dosage du chitosane greffé par le FITC enduit sur les fibres d'alginate de calcium

Les résultats indiquent une teneur en chitosane dans le surnageant d'environ 0.10 % pour une solution de chitosane initiale concentrée à 1 % (m/m) et un chitosane ayant les caractéristiques suivantes : DA = 0 %, M_w = 180 kg/mol et quel que soit la voie de neutralisation. Ces résultats sont bien inférieurs à ceux obtenus par la méthode précédente (*Cf.* Chapitre 4, paragraphe 4.2) où la teneur en chitosane enduit était estimée à environ 10 %. L'observation des fibres revêtues par microscopie confocale après immersion dans la solution tampon d'acétate d'ammonium pH 4.5 enrichit à 2 % (m/v) en chlorure de calcium fait l'objet de la Figure 56. Une émission dans la fluorescence est encore visible et montre alors que tout le chitosane ne s'est pas totalement re-solubilisé dans le tampon et qu'une part importante est restée fixée à la fibre d'alginate de calcium. Ceci explique donc le faible taux de chitosane mesuré dans le surnageant. D'après les résultats obtenus, seulement 1 % du chitosane enduit serait libéré dans le milieu tamponné, pourtant favorable à la solubilisation du chitosane, peut-être en raison de la complexation alginate/chitosane. Il est possible de conclure, qu'après enduction, le chitosane est fortement lié à l'alginate et seulement ≈ 1 % du chitosane est libéré dans ce milieu, pourtant favorable à sa remise en solution.

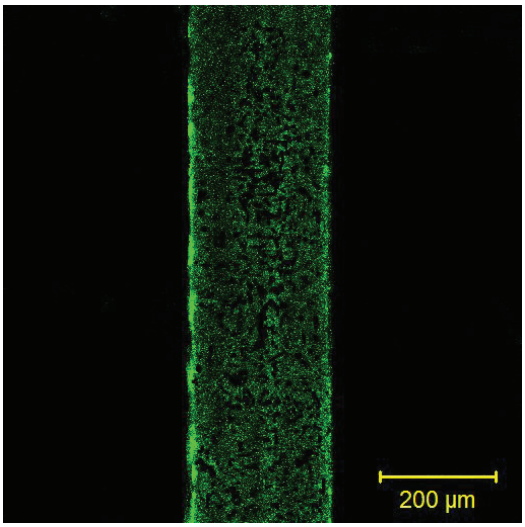


Figure 56: Images d'une fibre DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC en vue longitudinale après remise en solution du chitosane de la fibre dans un tampon acétate d'ammonium pH 4.5 enrichit à 2 % (m/v) en chlorure de calcium

5 Evaluation des propriétés d'absorption

Les propriétés d'absorption des fibres d'alginate sont importantes pour le traitement des plaies en absorbant l'exsudat en excès. Les analyses de propriétés d'absorption des fibres n° 1 à 6 montrent que l'ajout de la couche enductrice de chitosane ne modifie pas la capacité d'absorption des fibres d'alginate. En effet, comme le montre les résultats illustrés sur la Figure 57, il n'y a pas de différences significatives de la capacité d'absorption entre les fibres d'alginate de calcium témoins et les fibres enduites. Toutes les fibres présentent une capacité d'absorption d'environ 178 ± 20 %. Ainsi, la présence d'un revêtement de chitosane n'empêche pas l'absorption de l'exsudat par le cœur de la fibre en alginate, probablement grâce à une réhydratation de la gaine de chitosane elle-même. C'est donc un atout d'avoir pu enduire les fibres d'alginate de calcium tout en conservant leurs propriétés d'absorption.

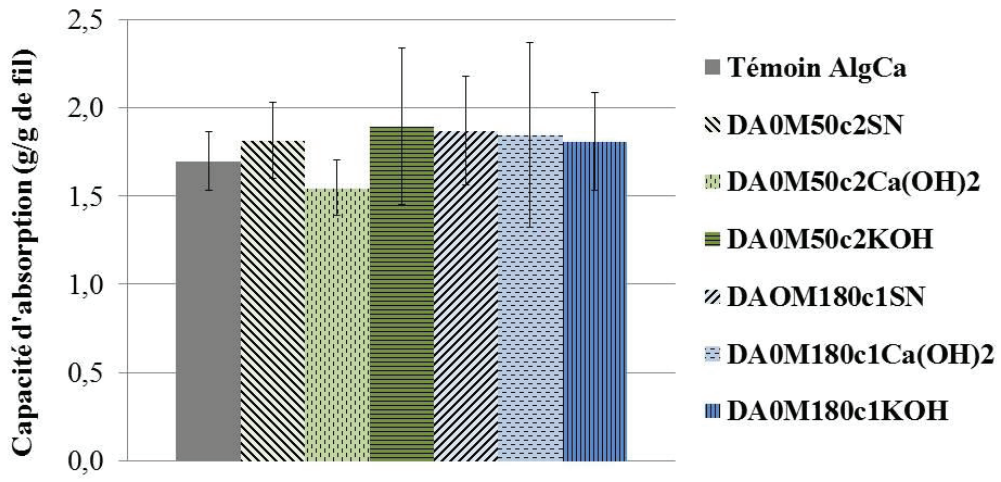


Figure 57: Capacité d'absorption des fibres produites

6 Evaluation des propriétés mécaniques

Les essais ont permis d'obtenir les courbes de traction des fibres. La méthode de traitement de données des courbes de traction a été appliquée pour l'ensemble des fibres, mais seul un exemple (fibres témoins d'alginate de calcium) va être présenté dans ce paragraphe afin d'appréhender la méthode d'analyse (Figure 58). Néanmoins, toutes les propriétés de résistance à la traction et les paramètres de Weibull pour chaque fibre testée sont résumées dans le Tableau 12. Il s'agit de fibres ductiles avec une zone d'élasticité et une zone de plasticité. Pour toutes les lois de comportement obtenues, $n \geq 5$ répétitions sont effectuées.

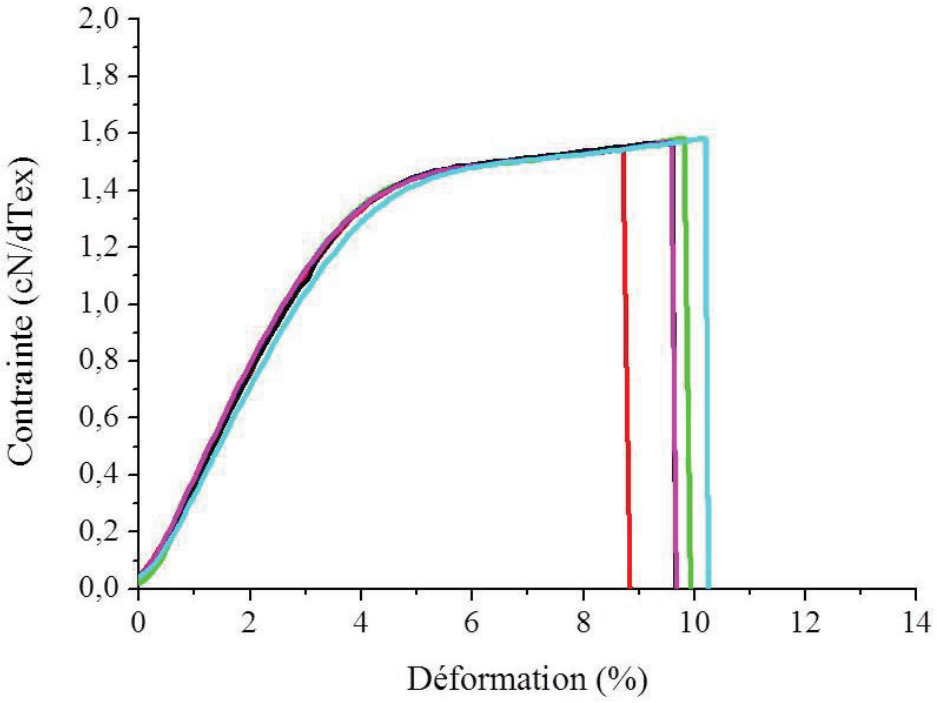


Figure 58: Courbes des essais de traction obtenues pour les fibres témoins d'alginate de calcium

Chaque courbe est traitée indépendamment des autres afin de déterminer les moyennes pour le module de Young, la déformation et la contrainte à la rupture ainsi que la déformation et la contrainte limite d'élasticité (*Cf.* Chapitre 2, paragraphe 4.4, Figures 19 et 59).

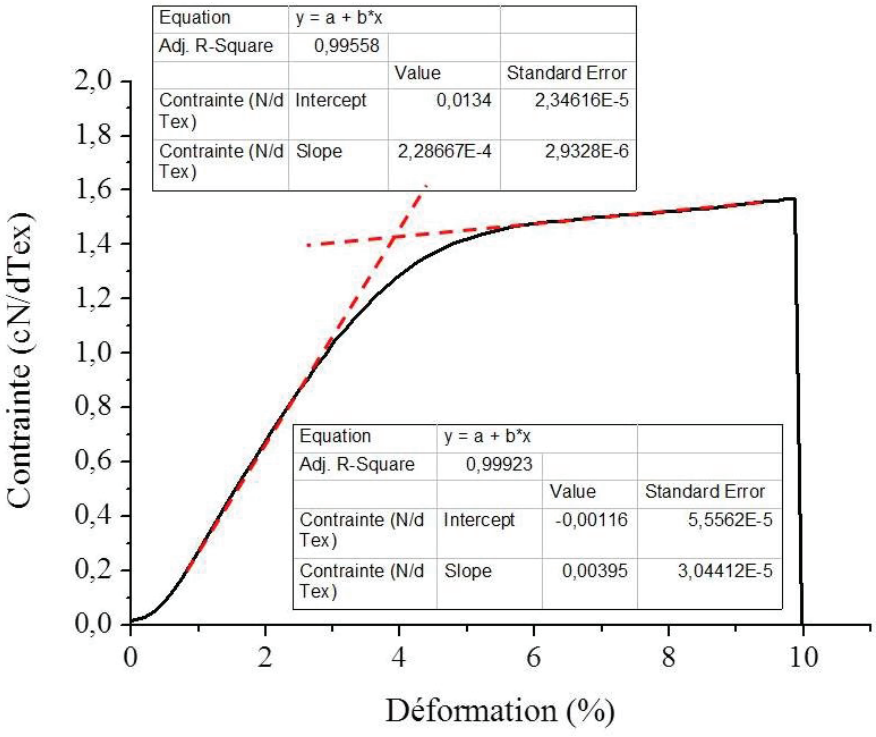


Figure 59: Courbe de traction d'une fibre d'alginate de calcium (en noir) avec les régressions linéaires (en rouge)

Après le traitement de chacune des courbes de traction, une moyenne des différents paramètres peut être calculée. Les résultats pour les fibres d'alginate de calcium sont résumés dans le Tableau 11.

	F1	F2	F3	F4	F5	Moyenne	Ecartype	Ecartype relatif (%)
Module de Young (cN/Dtex)	0,376	0,383	0,372	0,395	0,348	0,375	$1{,}73.10^{-2}$	4,63
Déformation à la rupture (%)	8,72	9,80	9,61	9,58	10,2	9,58	0,539	5,62
Contrainte à la rupture (cN/Dtex)	1,55	1,58	1,57	1,57	1,58	1,57	$1{,}49.10^{-2}$	0,95
Déformation plastique (%)	3,83	3,69	3,87	3,62	4,13	3,83	0,197	5,15
Contrainte de plasticité (cN/Dtex)	1,35	1,36	1,34	1,31	1,35	1,34	$1{,}92.10^{-2}$	1,43

Tableau 11: Résultats des paramètres de traction pour les fibres témoin d'alginate de calcium

A partir des contraintes à la rupture de chaque fibre testée, les résultats ont été analysés selon une statistique de Weibull. Il est noté P la probabilité de survie d'une fibre à une contrainte σ. Si les fibres suivent la statistique de Weibull, il existe K, le module de Weibull et une constante $\sigma_0(V_0)^{1/K}$, représentative de la contrainte caractéristique de Weibull, tel que :

Équation 11:

$$ln(ln(\frac{1}{1-P})) = Kln(\sigma_r) + \left[ln(\frac{V_0}{V}\sigma_0^K)\right]$$

Les résultats sont exposés sur la Figure 60. La courbe obtenue (où $y = ln(ln(1/(1-P))$ en fonction de $x = ln(\sigma_r)$) est sensiblement une droite en ayant un coefficient de linéarité de $R^2 = 0.95$, proche de 1. Ceci valide le fait que les fibres suivent bien une statistique de Weibull. L'équation de cette droite est y = 106.17x – 48.334, le module de Weibull est donc K = 106.17 et la constante représentative de la contrainte caractéristique de Weibull est $\sigma_0(V_0)^{1/K} = -48.334$.

Numéro d'ordre	Contrainte (cN/dTex)	Probabilités cumulées			
i	σ_r	P (i-0,3/n+0,4)	1-P	ln(-ln(1-P))	Ln σ_r
1	1,5467	0,1296	0,8704	-1,9745	0,4361
2	1,5659	0,3148	0,6852	-0,9727	0,4485
3	1,5683	0,5000	0,5000	-0,3665	0,4500
4	1,5819	0,6852	0,3148	0,1448	0,4586
5	1,5838	0,8704	0,1296	0,7145	0,4598

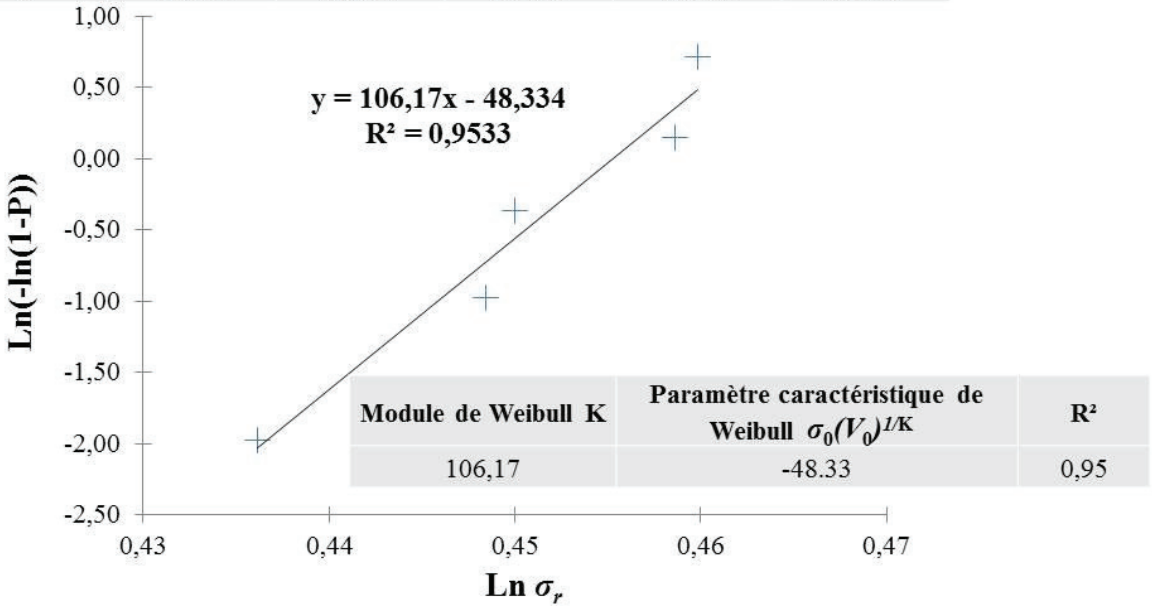


Figure 60: Méthode de calcul des paramètres de Weibull

Toutes les fibres enduites testées gardent leurs propriétés mécaniques après enduction (Tableau 12). En outre, la contrainte à la rupture est augmentée après enduction des fibres lorsqu'une neutralisation du chitosane a eu lieu avec du $Ca(OH)_2$. La masse molaire du chitosane enduit ne semble pas avoir d'influence sur les propriétés mécaniques des fibres revêtues. La neutralisation du chitosane au dihydroxyde de calcium semble augmenter la déformation à la rupture, rendant les fibres plus ductiles, propriété importante dans le cas où ces fibres pourraient subir un procédé de mise sous forme de textiles cicatriciels (tissés ou non-tissés).

Dans tous les cas, et indépendamment de l'étape de neutralisation, l'impact du revêtement de chitosane est significatif sur le module de Weibull *K*. En comparaison à d'autres fibres naturelles [137], les fibres d'alginate non enduites présentent un module de Weibull *K* proche de 100 indiquant une distribution bien plus étroite des paramètres à rupture, en accord avec la bonne reproductibilité des tests de traction de la fibre témoin. Les fibres enduites possèdent un module de Weibull *K* compris entre 26 et 40, ce qui montre encore une bonne homogénéité du comportement à rupture mais une plus forte dispersion que les fibres témoins.

Il serait intéressant d'effectuer un traitement statistique sur un plus grand nombre d'essais afin d'augmenter la significativité de l'analyse et d'obtenir des tendances mieux définies. De plus, il serait intéressant de faire une mesure précise de la masse linéique, facteur influant sur les propriétés mécaniques. Les mesures de longueur et de masse des fibres sont faites manuellement sur des quantités limitées, pouvant entraîner de grandes incertitudes de mesures. De plus, les alginates comme les chitosanes sont des polysaccharides sensibles à leur environnement (température et humidité). Il serait préférable de les stocker dans une zone aux paramètres environnementaux contrôlés afin que chaque fibre possède le même taux d'humidité au moment des caractérisations. Néanmoins, les conditions expérimentales dans lesquelles ont été effectués ces essais étaient suffisamment stables pour montrer que les propriétés mécaniques globales sont préservées et sont compatibles avec le procédé de mise en forme de tissus cicatriciels qu'ils soient tissés ou non-tissés.

Fibres testées	Nombre d'essais, *N*	Masse linéique (dTex)	Module de Young (cN/dTex)*	Déformation à la rupture (%)*	Contrainte à la rupture (cN/dTex)*	Déformation limite d'élasticité (%)*	Contrainte limite d'élasticité (cN/dTex)*	Module de Weibull *K*	Contrainte caractéristique de Weibull, $\sigma_0(V_0)^{1/K}$
AlgCa	5	640	0.38 ± 0.02	9.58 ± 0.54	1.57 ± 0.01	3.83 ± 0.20	1.34 ± 0.02	106.17	-48.33
DA0M50c2Ca(OH)$_2$	5	680	0.41 ± 0.02	7.69 ± 0.53	1.69 ± 0.06	3.81 ± 0.25	1.40 ± 0.03	26.48	-14.51
DA0M180c1Ca(OH)$_2$	7	680	0.43 ± 0.04	10.00 ± 1.15	1.77 ± 0.05	3.91 ± 0.21	1.50 ± 0.14	39.42	-23.05
DA0M50c2SN	6	730	0.36 ± 0.02	11.60 ± 1.91	1.60 ± 0.05	3.92 ± 0.21	1.20 ± 0.14	31.22	-15.17
DA0M180c1SN	5	730	0.35 ± 0.02	12.30 ± 1.19	1.50 ± 0.04	3.77 ± 0.10	1.11 ± 0.08	34.58	-15.58

* Les résultats sont présentés de la sorte : moyenne ± écart-type.

Tableau 12: Propriétés mécaniques et paramètres de Weibull pour les tests de traction des fibres testées

7 Evaluation des propriétés antibactériennes

7.1 Propriétés antibactériennes des fibres d'alginate de calcium

Après un temps d'immersion de 6 h des fibres d'alginate de calcium dans un bouillon de culture de MSSA et de HA-MRSA, le nombre d'ufc est d'environ 1000 pour ces deux souches bactériennes (Figure 61). Quel que soit la longueur, il y a autant de bactéries dans le bouillon avec des fibres que dans le bouillon sans fibres. Ces résultats montrent que les fibres d'alginate de calcium ne réduisent pas la croissance bactérienne par rapport au bouillon sans fibres. Des tests supplémentaires ont été effectués sur CA-MRSA, *S. epidermidis* et *E. coli*,

montrant qualitativement les mêmes résultats. Par conséquent, il est donc possible de conclure que les fibres pures d'alginate de calcium ne possèdent pas d'activité antibactérienne.

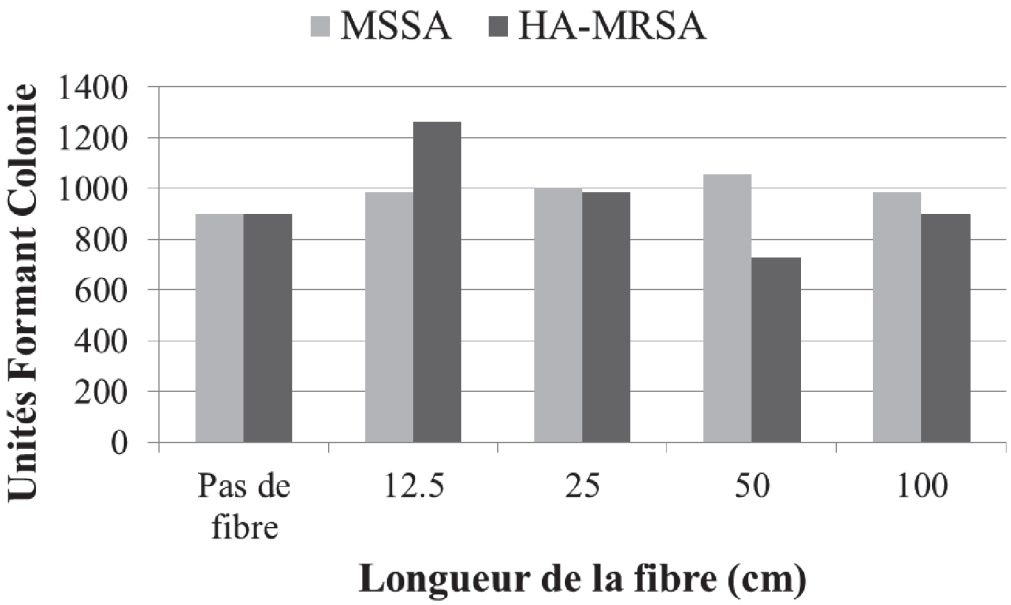


Figure 61: Nombre d'unités formant colonie de MSSA et HA-MRSA après un contact avec plusieurs longueurs de fibres non stérilisées d'alginate de calcium ($m_{chitosane}$ = longueur de la fibre x 0.055)

7.2 Activité antibactérienne des fibres enduites

Les fibres n° 1 et 4 ont été testées au cours de cette étude.

7.2.1 Résultats des masses caractéristiques de chitosane

Les courbes représentant Ln(1-BRR) en fonction de la concentration de chitosane, comme illustré sur les Figure 62 ont permises de déterminer les masses caractéristiques du chitosane, quantité massique de chitosane par unité de volume nécessaire pour induire la mort de 63 % des bactéries. Il s'agit d'une valeur représentative de la capacité antibactérienne des fibres sur les souches testées. Les masses caractéristiques des fibres sur chaque souche testée sont reportées dans le Tableau 13.

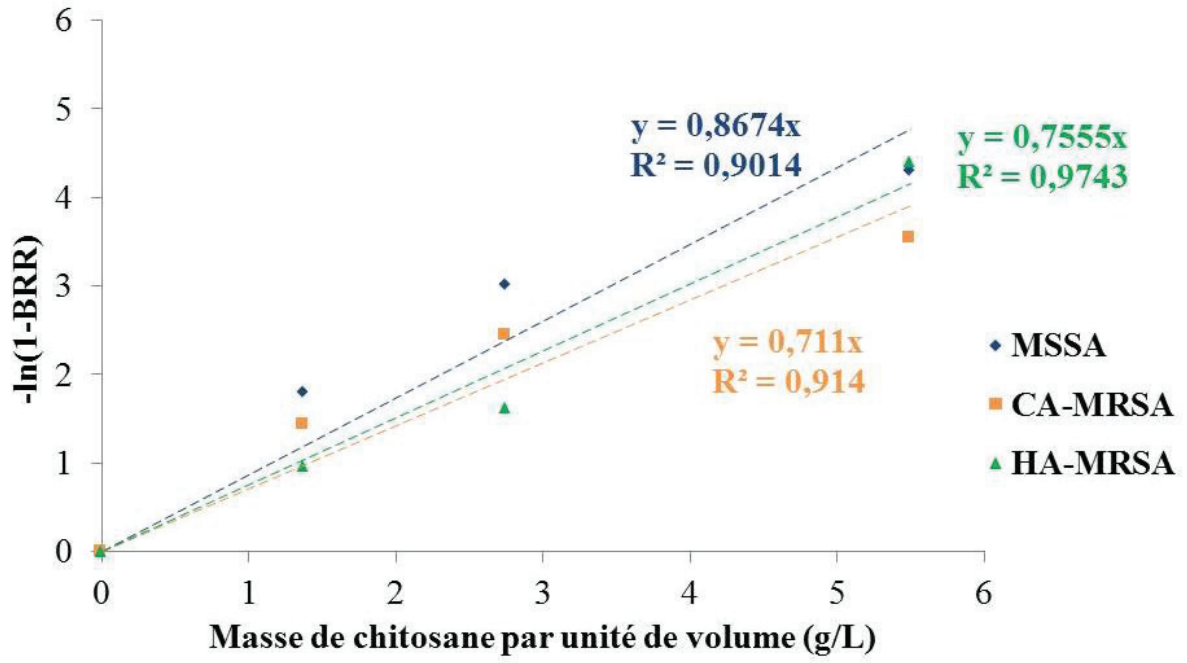


Figure 62: Méthode de détermination de la masse caractéristique de chitosane de la fibre DA0M50c2Ca(OH)$_2$ non-stérilisée contre MSSA, CA-MRSA et HA-MRSA

Espèce bactérienne		MSSA	MSSA*	CA-MRSA	CA-MRSA*	HA-MRSA	*Staph. epidermidis*	*Staph. epidermidis**	*E. coli*	*E. coli**
Masse caractéristique par unité de volume (g/L)	DA0M50c2Ca(OH)$_2$	1.15	0.61	1.41	-	1.32	3.29	-	12.42	-
	DA0M180c1Ca(OH)$_2$	0.50	0.62	1.13	0.49	-	-	0.17	-	7.05

*: fibres stérilisées

- : non déterminée

Tableau 13: Masses caractéristiques de chitosane par unités de volume pour chaque fibre et espèce bactérienne testées

7.2.2 Preuve de concept des fibres enduites par leurs activités antibactériennes

7.2.2.1 Résultats obtenus pour Staphylococcus aureus

Comme le montrent la Figure 63 et le Tableau 13, les fibres n° 1 (DA0M50c2Ca(OH)$_2$) diminuent la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* (MSSA et CA-MRSA). Effectivement, plus la masse de fibre introduite est importante et plus le nombre d'ufc est faible, atteignant même un BRR de plus de 98 % pour 50 cm de fibre (correspondant à 5.5 g/L de chitosane) et une inhibition complète de souches bactériennes (BRR 100 %) pour 100 cm de fibre (correspondant à 11 g/L de chitosane) contre MSSA et CA-MRSA. Néanmoins, pour des longueurs de fibre de 12.5 et 25 cm, CA-MRSA résiste plus que MSSA avec

respectivement un BRR de 76 et 91 % (12.5 et 25 cm, CA-MRSA) contre 83 % et 95 % (12.5 et 25 cm, MSSA). Pour ces deux souches, il y a une inhibition significative de la croissance des bactéries par rapport aux deux suspensions témoins de bactérie (sans fibre et avec des fibres d'alginate de calcium). De plus, cette inhibition est retrouvée pour HA-MRSA avec une masse caractéristique de 1.32 g/L (DA0M50c2Ca$(OH)_2$) (Tableau 13).

Ces résultats, répétés trois fois, permettent d'avoir une première tendance et de montrer l'activité antibactérienne des fibres sur les souches MSSA, HA-MRSA et CA-MRSA. Ces trois souches demeurent sensibles à la fibre enduite avec un BRR de 100 % pour seulement une concentration en chitosane d'environ 11 g/L de chitosane.

L'inhibition de la croissance des souches MRSA par le chitosane prouve que le mécanisme d'action du chitosane sur les bactéries diffère des β-lactamines. Ces antibiotiques (ATB) agissent en dehors de la cellule bactérienne, sur des protéines de la membrane, connues sous le nom de penicillin binding proteins (PBPs). Ces protéines sont des enzymes qui catalysent la formation des liaisons entre les chaînes peptidiques de la membrane. La fixation de l'ATB sur ces protéines empêche leur activité et donc la synthèse de la membrane engendrant la mort cellulaire. Les souches MRSA expriment une protéine spécifique, la PBP-2a, qui assure la fonctionnalité de plusieurs PBPs en gardant une affinité faible avec les antibiotiques de type péniciline. L'inhibition de la croissance des souches MRSA pourrait s'expliquer par l'interaction du chitosane avec d'autres familles de protéines que les PBPs.

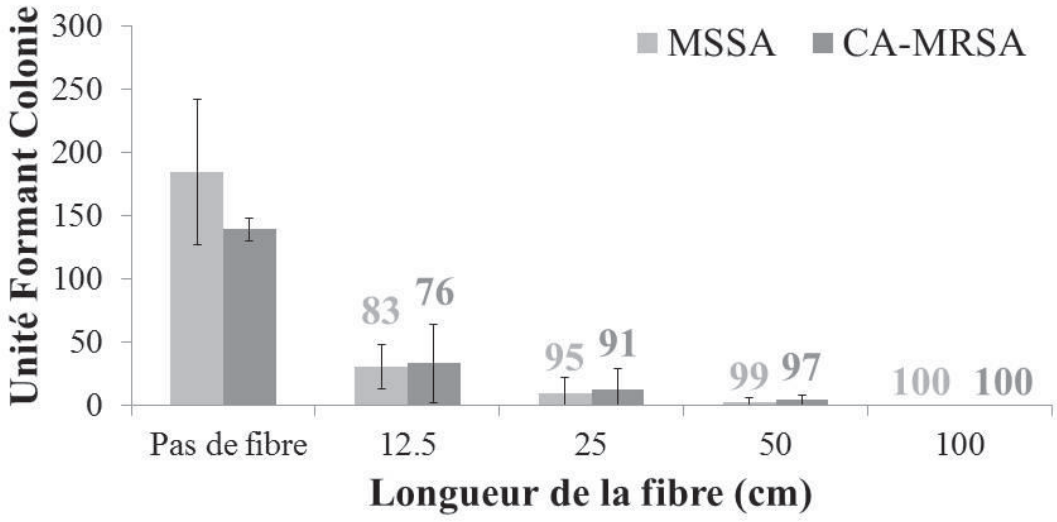


Figure 63: Nombre d'unité formant colonie de MSSA et CA-MRSA après un contact avec plusieurs longueurs de la fibre pour la fibre DA0M50c2Ca$(OH)_2$ non stérilisée et les BRR correspondants ($m_{chitosane}$ = longueur de la fibre x 0.055)

7.2.2.2 Résultats obtenus pour Staphylococcus epidermidis

Les résultats obtenus sur la souche *Staphylococcus epidermidis* montrent qu'elle est également sensible aux fibres enduites de chitosane avec une masse caractéristique de 3.29 g/L pour le chitosane de masse molaire 50 kg/mol (DA0M50c2Ca$(OH)_2$, fibre n° 1) et de 0.17 g/L pour les fibres stérilisées n° 4 (DA0M180c2Ca$(OH)_2$) (Tableau 13). Ces résultats permettent donc d'avoir une première tendance et de montrer l'activité antibactérienne des fibres sur la souche *Staphylococcus epidermidis* ; preuve de concept essentielle puisque cette souche est importante dans un contexte de plaie aiguë ou chronique.

Il est possible de conclure que les fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane possèdent une activité inhibitrice de la croissance bactérienne sur différentes souches : *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*. Néanmoins, le mécanisme d'action des chitosanes à faible DA sur ces souches du genre *Staphylococcus* reste encore à être élucidé.

7.2.2.3 Résultats obtenus pour Escherichia coli

Pour l'espèce *Escherichia coli* (Figure 64), il y a encore une diminution de la croissance bactérienne avec une BRR de 56 % pour 100 cm de fibres non stérilisées n° 1 (DA0M50c2Ca$(OH)_2$). C'est l'espèce bactérienne qui montre la plus grande résistance avec une masse caractéristique de 12.42 g/L (fibre n°1, non stérilisées) et de 7.05 g/L (fibre n° 4, stérilisées). La vitesse de reproduction rapide d'*E. coli* (environ 20 min) génère dans un délai court, un grand nombre de souches et peut expliquer la difficulté du chitosane à lutter contre cette espèce bactérienne. En outre, *E. coli* est une bactérie à Gram-négatif c'est-à-dire qu'elle dispose d'une membrane cellulaire globalement neutre contrairement aux autres espèces testées qui possèdent une paroi cellulaire globalement chargée négativement (Gram-positif) et qui pourraient avoir davantage d'interactions électrostatiques avec le chitosane. Cela appuie l'hypothèse déjà publiée par quelques auteurs dans la littérature [144-146] que la mort bactérienne induite par du chitosane est plus importante sur des bactéries à Gram-positif que sur des bactéries à Gram-négatif. Il y aurait une plus grande fuite des éléments de la cellule des bactéries ayant une paroi cellulaire chargée négativement (Gram positif) par interactions avec les charges positives du chitosane. Ces interactions engendreraient des perturbations au sein de la paroi bactérienne, provoquant des ouvertures de cette dernière. Les éléments cellulaires seraient alors libérés provoquant la mort de la cellule.

La conclusion intéressante est que les fibres d'alginate revêtues de chitosane sont capables d'inhiber la croissance d'*E. coli*, bactérie fréquemment responsable d'infections, notamment chez les patients immunodéprimés.

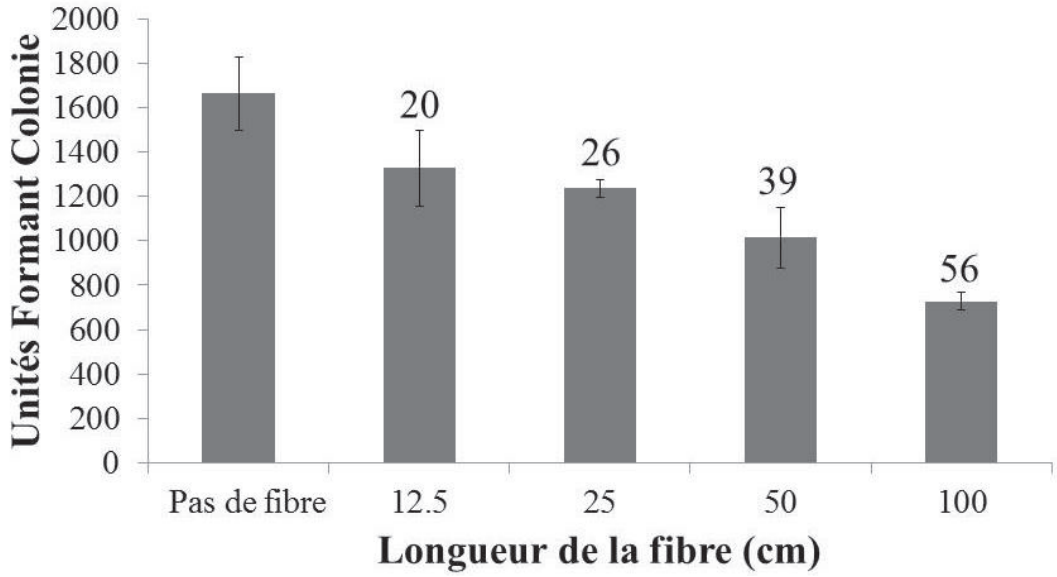


Figure 64: Nombre d'unité formant colonie d'*Escherichia coli* après un contact avec plusieurs longueurs de la fibre DA0M50c2Ca(OH)$_2$ non stérilisées et les BRR correspondants ($m_{chitosane}$ = longueur de la fibre x 0.055)

7.2.2.4 Conclusion

Ces résultats permettent de montrer une inhibition de la croissance bactérienne en présence des fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane (n = 3). Il serait préférable de réitérer ces essais afin de diminuer les écartypes et d'avoir des caractérisations quantitatives plus précises. Cependant, ces résultats permettent d'avoir une tendance et d'apporter la preuve de concept que les fibres développées présentent un pouvoir d'inhibition de la croissance bactérienne sur plusieurs types de bactéries.

En effet, ces fibres enduites de chitosane inhibent la croissance des bactéries à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif. Ceci laisse penser que le chitosane possède plusieurs mécanismes d'action sur les souches bactériennes, ou un mécanisme d'action commun aux souches à Gram-positif et à Gram-négatif.

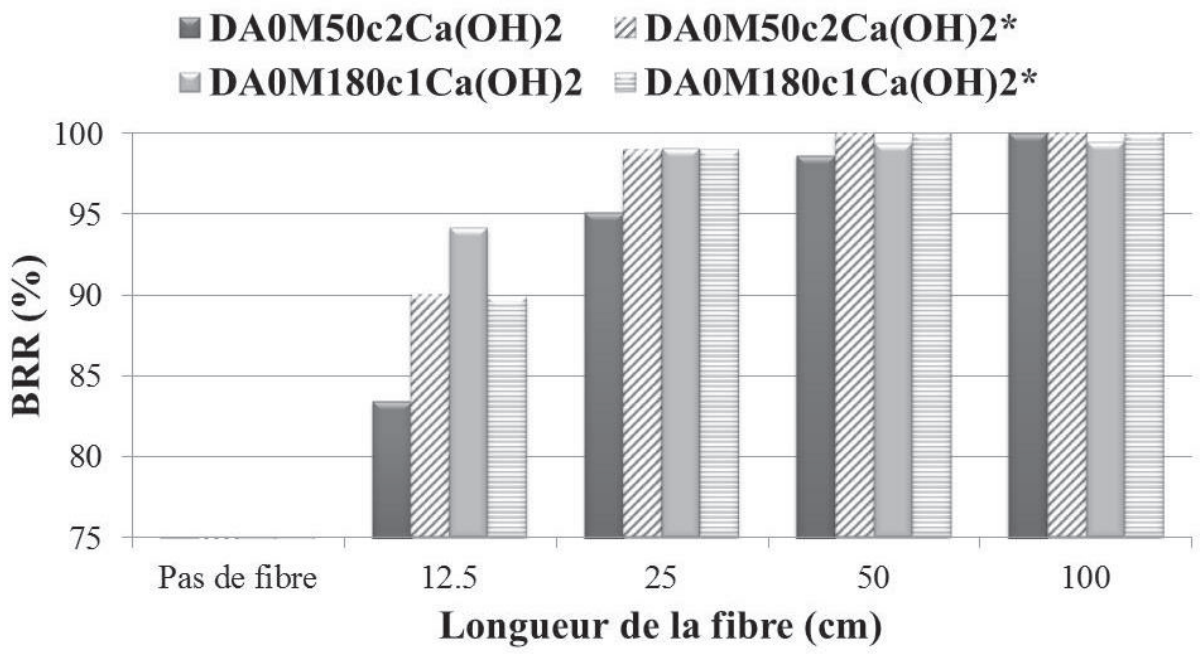
Enfin, il serait intéressant de tester les fibres revêtues sur d'autres souches Gram-négatif que *E. coli* afin de vérifier si de manière générale les bactéries à Gram-négatif possèdent une plus grande résistance que celles à Gram-positif face aux fibres d'alginate enduites de chitosane, et de relier ces résultats à la structure de la paroi bactérienne et à la nature des protéines présentes au niveau de cette membrane.

7.2.3 Influence de la stérilisation sur l'activité antibactérienne des fibres enduites

Concernant l'influence de la stérilisation, comme illustré sur la Figure 65, les fibres d'alginate revêtues de chitosane diminuent toujours la croissance bactérienne de MSSA après stérilisation en présentant un profil inhibiteur similaire. Le profil antibactérien est même légèrement plus puissant pour les fibres n° 1 (DA0M50c2Ca$(OH)_2$) stérilisées que celles non stérilisées avec respectivement des masses caractéristiques de 0.61 et 1.15 g/L (Tableau 13). Il en est de même pour les fibres n° 4 (DA0M180c1Ca$(OH)_2$) où les masses caractéristiques sont de 0.49 et 1.13 g/L (Tableau 13), respectivement pour les fibres stérilisées et non-stérilisées contre CA-MRSA. Néanmoins, il serait préférable de réitérer ces essais (n = 1) et d'avoir des caractérisations quantitatives plus précises. Par conséquent, il est préférable de conclure que la stérilisation par rayonnement bêta conserve les propriétés antibactériennes de fibres revêtues contre MSSA et CA-MRSA et laisse penser qu'il en est de même pour les autres souches bactériennes.

La stérilisation des fibres engendre certainement une diminution de la masse molaire moyenne en masse des polysaccharides. Ceci pourrait engendrer une mobilité des chaines de chitosane plus grande à la surface des fibres, comme cela a été décrit pour des revêtements de surface à base de polyarginine [147]. En conséquence, pour conclure sur l'effet de la stérilisation, il est important de connaitre l'impact de cette stérilisation sur la masse molaire du chitosane. C'est pourquoi, de la poudre de chitosane (DA = 0, M_w = 180 kg/mol) a été stérilisée, puis sa masse molaire a de nouveau été mesurée. Après stérilisation, la masse molaire de la poudre de chitosane était de 75 kg/mol, diminuant ainsi la masse molaire de plus de la moitié (≈ 58 %). L'amélioration des propriétés antibactériennes des fibres revêtues et stériles pourrait donc être dûe à la diminution de la masse molaire du chitosane.

Il pourrait être intéressant de comparer plusieurs techniques de stérilisation (rayonnement gamma, autoclave) pour mieux comprendre l'effet de la stérilisation sur les propriétés fongistatiques et bactériostatiques.



*: fibres stérilisées

Figure 65: BRR des fibres DA0M180c1Ca(OH)$_2$ et DA0M50c2Ca(OH)$_2$ stérilisées et non-stérilisées contre Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) ($m_{chitosane}$ = longueur de la fibre x 0.055)

7.2.4 Influence de la masse molaire sur l'activité antibactérienne des fibres enduites

Il a été testé deux masses molaires initiales du chitosane : 50 et 180 kg/mol. Néanmoins, des évaluations bactériennes ont été faites sur des fibres non-stérilisées et sur des fibres stérilisées. Bien qu'il ait été montré sur MSSA et CA-MRSA que la stérilisation aux rayonnements bêta n'avait pas d'impact néfaste sur l'activité antibactérienne des fibres, cette stérilisation diminue la masse molaire des chaines polymériques : la masse molaire moyenne en masse de la poudre de chitosane (DA = 0) passe de M_w = 180 kg/mol à M_w = 75 kg/mol après la stérilisation. En se basant sur une hypothèse de dépolymérisation aléatoire avec le même nombre de rupture de chaines, il a été estimé que le chitosane initialement de M_w = 50 kg/mol n'aurait qu'une masse de 39 kg/mol après stérilisation. Autrement dit, la masse molaire moyenne en masse des fibres n° 1 (DA0M50c1Ca(OH)$_2$) stérilisées serait théoriquement d'environ 39 kg/mol et celles des fibres n° 4 d'environ 75 kg/mol.

Les résultats illustrés sur la Figure 65, montrent un profil d'inhibition de la croissance de MSSA similaire quel que soit la masse molaire moyenne en masse du chitosane enduit. Les masses molaires testées dans ces travaux inhibent la croissance bactérienne de MSSA, CA-MRSA, HA-MRSA, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*. Des études antérieures rapportent que la masse molaire moyenne en masse a un impact significatif sur l'activité antibactérienne du chitosane [109]. Plusieurs auteurs ont étudié cet effet sur

Escherichia coli. Ils ont montré globalement que les chitosanes de faible M_w ont une plus forte activité antibactérienne que les chitosanes de haute M_w [106, 110, 111]. Liu et al. [104] avaient observé que lorsque la M_w est ≤ 92 kg/mol, l'activité antibactérienne du chitosane augmentait avec la M_w. Quand la M_w est ≥ 92 kg/mol, les liaisons hydrogènes intramoléculaires favorisent une structure réticulée dont les groupes amine ne sont plus disponibles pour interagir avec la membrane des bactéries ou les éléments nutritifs du milieu de culture. Ainsi, au-dessus de 92 kg/mol, l'activité antibactérienne du chitosane diminue avec la M_w. Or, dans cette étude, il est démontré qu'il n'y a pas de différence de l'activité antibactérienne contre MSSA et CA-MRSA pour un chitosane ayant une M_w = 50 et 180 kg/mol, mais une méthodologie de recherche plus systématique serait nécessaire pour vérifier la pertinence des masses molaires discriminantes.

De manière générale, il est possible de conclure que les fibres d'alginate de calcium revêtues de chitosane inhibent la croissance des bactéries Gram-positif MSSA, CA-MRSA, HA-MRSA et *Staphylococcus epidermidis* dans les conditions expérimentales testées et les DA et masses molaires de chitosane utilisés. En outre, bien que l'inhibition soit plus faible, les fibres ont aussi une capacité d'inhibition sur la croissance de la bactérie Gram-négatif *E. coli.* Le chitosane a donc un effet antibactérien à la fois sur les bactéries Gram-négatif et Gram-positif. Par la spectroscopie de fluorescence, il a été montré que seulement ≈ 1 % du chitosane enduit se solubilisait dans le milieu tamponné conçu pour éviter la solubilisation de l'alginate (*Cf.* Chapitre 4, paragraphe 4.3). Pour mieux connaître le mécanisme d'action du chitosane, il est donc nécessaire de savoir si ce relargage est également limité dans le milieu de culture bactérien. Dans ce cas, l'activité antibactérienne du chitosane serait principalement sous sa forme solide (« Contact-Killing effect » [147]) et non en solution. L'activité antibactérienne serait alors due à des interactions de surface entre le chitosane et la bactérie [108], comme vu dans l'étude bibliographique. Dans cette optique, la quantification de la croissance bactérienne doit aussi être effectuée en fonction de la superficie totale du revêtement de chitosane par unité de volume du milieu de culture (ce qui donnerait qualitativement les mêmes résultats indiqués dans le Tableau 13, en utilisant une zone caractéristique de revêtement par unité de volume $V_c = k.m_c$, avec k = 5.7 m²/g). Ainsi, pour aller plus loin, il a été étudié l'adhésion bactérienne sur des fibres d'alginate de calcium et des fibres de chitosane non revêtues. Des analyses microbiologiques spécifiques ont donc été utilisées pour quantifier cette adhésion bactérienne. En parallèle, la microscopie électronique à balayage a été utilisée pour voir les interactions entre les bactéries et la surface des fibres.

7.2.5 Adhésion bactérienne sur les fibres et microscopie électronique à balayage

L'essai a été effectué contre MSSA et CA-MRSA et les résultats sont présentés sous forme de ratio entre le nombre d'ufc des fibres de chitosane sur le nombre d'ufc des fibres d'alginate obtenu pour chaque souche testée. Les ratios pour MSSA et CA-MRSA sont respectivement de 0.7 ± 0.4 et 0.6 ± 0.4. Ces résultats préliminaires pourraient montrer que le chitosane présente une modeste capacité à limiter l'adhésion bactérienne sur les fibres. L'adhérence bactérienne sur les fibres enduites et non enduites a été visualisée par microscopie électronique à balayage (Figure 66).

Les fibres de chitosane et d'alginate présentent les mêmes propriétés d'adhésion: les bactéries adhèrent aux fibres, mais sans formation d'un biofilm, confirmant ainsi les résultats de dénombrement des bactéries adhérentes précédemment présentés. Les détails des images des fibres revêtues fournissent des informations supplémentaires au sujet du comportement des bactéries en contact avec les fibres revêtues de chitosane. En présence de BHI et de bactéries, le revêtement chitosane se décolle du noyau d'alginate (Figure 66C) et des fragments solides de chitosane sont libérés en augmentant ainsi la surface totale d'interaction entre le chitosane et les bactéries. Des essais complémentaires ont été réalisés afin de déterminer si la fragmentation de la couche de chitosane enduite était provoquée par le milieu BHI ou par les bactéries. Pour cela, les fibres ont été immergées dans du milieu BHI en suivant la même procédure que celle du test d'adhésion bactérienne (*Cf.* Chapitre 2, paragraphe 4.5.5.2) mais sans bactérie. Les observations en microscopie à balayage n'ont pas montré de fragmentation de la couche de chitosane. Il est donc possible de conclure que la libération de fragments de chitosane est due à la présence des bactéries.

Cependant, la libération de fragments solides de chitosane n'est pas obligatoire pour que le chitosane ait une activité inhibitrice sur la croissance bactérienne, puisqu'il n'est pas observé le même phénomène de fragmentation sur les fibres de chitosane pur, bien qu'elles inhibent la croissance bactérienne. En effet, l'analyse quantitative de l'inhibition bactérienne des fibres de chitosane pur n'a pas été réalisée mais une analyse qualitative par observation visuelle de la suspension du bouillon de culture contenant ces fibres a clairement montré, par un bouillon limpide, que les bactéries se développaient peu. Pour résumer, l'inhibition bactérienne par les fibres revêtues peut être expliquée principalement par des interactions de surface entre les bactéries et/ou avec des nutriments essentiels dont la surface d'interaction est augmentée par une libération de fragments solides de chitosane [100, 105-107, 111, 148]. Le relargage de

chitosane dans le milieu de culture est faible, si ce mécanisme est actif, alors des doses de chitosane très faibles en solution sont suffisantes pour induire une inhibition.

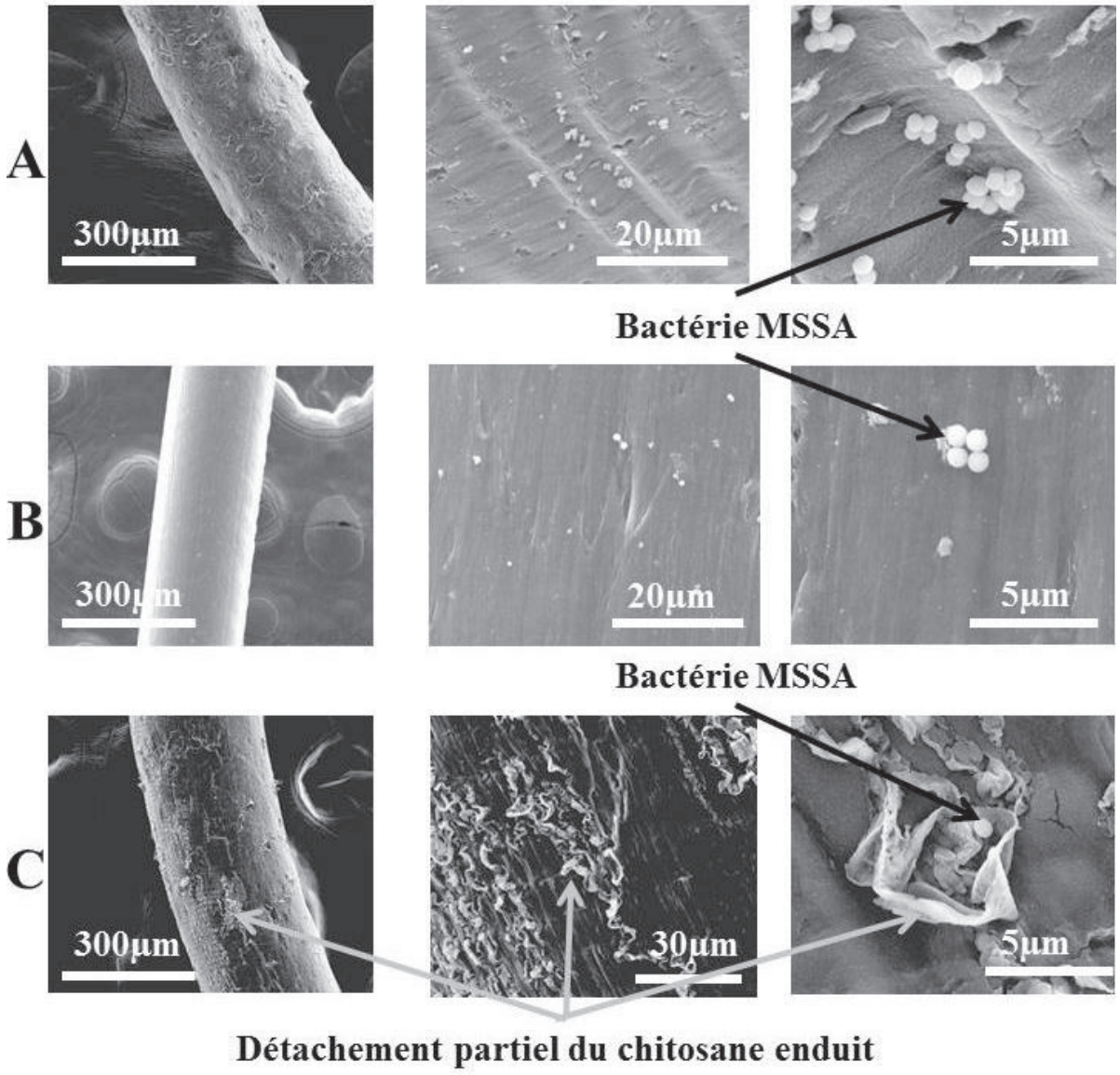


Figure 66: Images MEB de (A) fibre d'alginate de calcium, (B) fibre de chitosane et (C) fibre DA0M180c1Ca(OH)$_2$. Haut-vide, tension d'accélération : 10 kV

Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'effectuer ces essais microbiologiques sur des fibres d'alginate enduites de chitosane greffé au FITC. Visualiser le chitosane dans son milieu permettrait d'avoir plus d'indice sur sa localisation et ses interactions, et donc sur son mécanisme d'action. La localisation du chitosane au niveau de la paroi bactérienne pourrait être particulièrement instructive. Il serait également enrichissant de tester d'autres souches bactériennes, notamment des souches à Gram-négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, l'une des principales bactéries responsables d'infections

nosocomiales avec *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les bactéries à Gram-négatif, à cause de la neutralité globale de leur paroi cellulaire, interagiraient moins par complexation ionique avec le chitosane. Cela apporterait de nombreuses réponses sur l'identification du ou des mécanismes d'action bactériostatique du chitosane.

8 Conclusion

Des fibres d'alginate ont été obtenues par une technique de filage au mouillé en utilisant le métier à filer à l'échelle pilote. Un revêtement de chitosane a été ajouté par un procédé d'enduction à l'échelle du laboratoire, transposable à l'échelle pilote. Les conditions optimales d'enduction (compromis entre la quantité de chitosane enduit et la qualité du revêtement) sont : **une concentration de la solution d'enduction de 1 %** (m/m), correspondant à une viscosité de 0.2 Pa.s pour un chitosane présentant les caractéristiques suivantes : **DA = 0 % et M_w = 180 kg/mol**.

Avec ce dernier, les fibres revêtues comportent environ 10 % de chitosane (soit ≈ 5.5 mg de chitosane/m de fibres enrobées et une épaisseur de ≈ 5 µm). Grâce au procédé d'enduction mis au point, les propriétés mécaniques et la capacité d'absorption des fibres d'alginate sont conservées après leur enduction.

De plus, les fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane inhibent la croissance bactérienne de l'espèce *Escherichia coli* (Gram négatif) mais aussi quelques espèces bactériennes du genre *Staphylococcus* (Gram positif) tels que MSSA, CA-MRSA, HA-MRSA et *Staphylococcus epidermidis*. Par ailleurs, deux masses molaires moyennes en masse de chitosane ont été testées (M_w = 50 et 180 kg/mol) et les deux ont montré la même activité antibactérienne. Il a également été démontré que la stérilisation par rayonnement bêta des fibres enduites n'altérait pas leurs propriétés antibactériennes. Ces analyses préliminaires permettent de penser que le mécanisme d'action du chitosane sur les bactéries serait principalement le résultat d'interactions de surface entre le matériau et les bactéries, d'où une nécessité de quantifier les effets bactériostatiques en fonction de la surface de contact, ce qui est très peu fait dans la littérature.

L'ensemble de ces résultats constitue une preuve de concept pour utiliser des fibres d'alginate revêtues de chitosane dans la conception de tissus cicatriciels. Ces fibres combinent une activité hémostatique et cicatrisante grâce à leur cœur constitué d'alginate de calcium, tout en

assurant une activité antibactérienne grâce au revêtement externe de chitosane. La conception de textiles à partir de ces fibres peut être une avancée technologique pour lutter contre les souches bactériennes responsables d'infection, en particulier contre les souches résistantes aux antibiotiques. Ils permettraient, en association aux soins, de lutter contre les infections nosocomiales.

L'enduction de chitosane sur des fibres synthétiques devrait aboutir au même résultat biologique, et permettre le développement de tricots ou tissus à propriétés bactériostatiques pour d'autres applications.

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de recherche avaient pour objectif de développer des fibres mixtes alginate/chitosane destinées à la conception de dispositifs médicaux pour la cicatrisation des plaies et ayant la capacité de prévenir les infections nosocomiales.

Ces recherches ont nécessité une étude bibliographique en amont afin d'identifier les matériaux pouvant répondre à cet objectif. Le choix s'est porté sur deux polysaccharides aux propriétés physico-chimiques et biologiques remarquables, les alginates et les chitosanes. Dans une idée de développer des fibres textiles pour l'élaboration de compresses, il a également été identifié dans cette étude bibliographique quelques procédés de filage et de conception de fibres mixtes. Le procédé de fabrication retenu fut un filage au mouillé de l'alginate, suivi d'une enduction de chitosane par trempage.

Pour cela, il a été développé de nouveaux procédés de filage et d'enduction à l'échelle du laboratoire et à une échelle pilote. Ces travaux de développement se sont déroulés en trois phases : la définition du cahier des charges, l'élaboration et la conception des outils de filage et la validation des procédés avant de pouvoir les utiliser pour l'élaboration des fibres. Dans le cadre du métier à filer à l'échelle pilote, ces étapes ce sont faites par un travail collaboratif avec le constructeur.

Les fibres ont été élaborées à partir d'une solution d'alginate de sodium par un filage au mouillé qui consiste en une gélification physique du polymère par réticulation ionique (complexation) dans un bain de chlorure de calcium. Après la gélification, le filament dont la forme est imposée par la filière d'extrusion est lavé et séché pour conduire à la fibre solide finale d'alginate de calcium. Puis, cette fibre a été enduite par immersion dans une solution de chitosane.

L'obtention des fibres d'alginate de calcium élaborées sur le métier à filer à l'échelle pilote demandait une solution de filage concentrée à 10 % (m/m) en alginate de sodium qui était extrudée et gélifiée dans un bain de chlorure de calcium à 8 % (m/v). Ensuite, les fibres étaient séchées par quatre émetteurs à rayonnement infrarouge et un système d'air chaud soufflé.

Les conditions optimales d'enduction sont une concentration en chitosane de la solution d'enduction de 1 % (m/m), correspondant à une viscosité de 0.2 Pa.s pour un chitosane ayant un degré d'acétylation proche de 0 % et une masse molaire moyenne en masse de 180 kg/mol.

Dans ces conditions, les fibres revêtues comporteraient environ 10 % de chitosane (≈ 5.5 mg de chitosane/m de fibres enrobées et ≈ 5 µm d'épaisseur). Néanmoins, l'analyse de la couche

superficielle de la fibre revêtue par EDX a montré que la couche d'enduction était inférieure à 1 µm sur certaines zones. Il est donc plus juste de penser que la couche de chitosane enduite possède une épaisseur variant entre 0 et 5 µm. Grâce au procédé d'enduction mis au point, les propriétés mécaniques et la capacité d'absorption des fibres d'alginate sont conservées après leur enduction.

De plus, les fibres d'alginate de calcium enduites de chitosane inhibent la croissance bactérienne de l'espèce *Escherichia coli* (Gram négatif) mais aussi quelques espèces bactériennes du genre *Staphylococcus* (Gram positif) tels que MSSA, CA-MRSA, HA-MRSA et *Staphylococcus epidermidis*. Par ailleurs, deux masses molaires moyennes en masse de chitosane ont été testées (M_w = 50 et 180 kg/mol) et les deux ont montré la même activité antibactérienne. Il a également été démontré que la stérilisation par rayonnement bêta des fibres enduites n'altérait pas leurs propriétés antibactériennes. Ces analyses permettent de penser que le mécanisme d'action du chitosane sur les bactéries serait principalement le résultat d'interactions de surface entre le matériau et les bactéries.

Bien que ces expériences microbiologiques nécessiteraient d'être répétées pour affiner la précision des masses caractéristiques (masse de chitosane nécessaire pour tuer 63 % des bactéries), ces premiers résultats permettent de prouver l'activité inhibitrice du chitosane sur la croissance bactérienne. Cela confère à ce système, par le développement d'un textile cicatrisant, un fort potentiel dans la lutte contre les infections nosocomiales, d'autant plus que ce système est actif sur des souches bactériennes résistantes à la méticilline.

Les perspectives de ce travail sont très nombreuses. A court terme, il serait important de comprendre davantage le mécanisme d'action du chitosane sur les bactéries et sur les microorganismes de manière générale. Pour cela, il pourrait être vérifié que les propriétés antibactériennes du chitosane soient conservées lorsqu'il est greffé avec du FITC. Ce dernier permettrait, par une observation en microscopie confocale, de pouvoir suivre le chitosane afin de comprendre ses interactions avec les bactéries dans le milieu de culture.

Connaitre les interactions du chitosane, ainsi que les paramètres optimaux (M_w, DA, quantité de chitosane, etc.) pour obtenir la meilleure activité antibactérienne est essentiel pour pouvoir développer un dispositif médical adapté et capable de répondre aux besoins. Cela permettrait également de pouvoir anticiper l'activité du chitosane sur les germes et d'identifier des « familles » sur lesquelles il peut être actif sans pour autant faire l'ensemble des tests microbiens de manière empirique. Elargir le champ d'action du chitosane à l'ensemble des microorganismes tels que les champignons (ex. : *Candida albicans*) pourrait également être

envisagé pour répondre à d'autres problématiques médicales. En d'autres termes, identifier et comprendre les interactions du chitosane en présence de microorganismes permettrait d'évaluer l'ensemble des opportunités d'innovation et de développement pour répondre à diverses applications dans le domaine biomédical.

De plus, ce mécanisme d'enduction pourrait être étendu à d'autres fibres afin de viser aussi d'autres applications. Effectivement, l'enduction de chitosane sur des fibres synthétiques devrait aboutir au même résultat biologique, et permettre le développement de tricots adaptés pour d'autres applications.

D'un point de vue procédé de fabrication, le procédé d'enduction développé à l'échelle du laboratoire pourrait maintenant être développé à plus grande échelle et être transposé au métier à filer à l'échelle pilote. Un bain de lavage pourrait être remplacé par un bain d'enduction adapté avec un système de circulation de la solution de chitosane pour qu'il y ait une projection de cette solution sur les points de contact entre la fibre et la machine.

Dans une optique d'avoir le filage de l'alginate et l'étape d'enduction sur une même chaine de fabrication, l'enduction sur le métier à filer doit se faire sur une fibre d'alginate de calcium humide, que ça soit juste après le bain de coagulation de l'alginate ou après un bain de lavage. La fibre mixte subira ensuite l'étape de séchage et de bobinage en fin de chaine de production. L'interaction du chitosane avec de l'alginate devra alors être étudiée pour parvenir aux mêmes quantités enduites qu'à l'échelle du laboratoire. Néanmoins, ayant montré que la quantité de chitosane enduite dépendait essentiellement de la viscosité de la solution d'enduction, l'enduction d'une fibre d'alginate humide ne devrait pas trop diverger d'une fibre sèche.

Enfin, d'autres procédés de filage pourraient également être envisagés pour fabriquer une fibre mixte alginate/chitosane. L'alginate et le chitosane ayant des charges opposées en solution, il est envisagé de créer une fibre mixte par formation de complexes poly-électrolytes. Dans des conditions ioniques particulières ces deux polysaccharides pourraient être solubles pour former un collodion mixte pouvant être extrudé à travers une filière (tout comme la solution d'alginate de sodium lors du filage) dans un bain (ex. : un bain d'eau ou un bain basique contenant du calcium) venant perturber l'équilibre ionique du collodion et engendrant la complexation entre les deux polymères et donc leur gélification. Ce procédé de fabrication de fibres mixtes alginate/chitosane pourrait permettre d'incorporer une plus grande quantité de chitosane que le procédé d'enduction.

Références bibliographiques

[1] Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Résultats. Institut de veille sanitaire ed: Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin); 2012. 181 p. ISBN NET : 978-2-11-131146-6, nvs.santepubliquefrance.fr/ Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012.

[2] Strodtbeck F. Physiology of wound healing. Newborn and Infant Nursing Reviews. 2001;1:43-52.

[3] Faure C. Les pansements. Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations; 2008.
Exposé présenté lors des Journées d'actualisation sur la prise en charge des plaies, 14 Avril 2008, http://www.sffpc.org/download.php?file=connaiss_traitement6.pdf.

[4] HAS. Bon usage des technologies médicales. Les pansements : indications et utilisations recommandées: Haute Autorité de Santé; 2011, Fiche BUTS, http://www.has-sante.fr/portail/jcms/r_1438004/fr/les-pansements-indications-et-utilisations-recommandees-fiche-buts.

[5] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science. 2012;37:106-26.

[6] Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;97:2892-923.

[7] Jones VJ. The use of gauze: will it ever change ? Int Wound. 2006;3:79-86.

[8] Atelier Hydrocolloide/Hydrocellulaire. Euro-pharma; Journées Nationales sur les dispositifs ; Toulouse 12-14 Octobre 2010. http://www.euro-pharmat.com/ documents/Formation_europharmat/pansement/3formationspansement.pdf.

[9] Heenan A. Hydocolloids: Frequently asked questions. World Wide Wounds. 1998;1:1-17.

[10] Thomas S, Loveless P. A comparative study of twelve hydrocolloid dressings. World Wide Wounds. 1997;1. ISSN 1369-2607 http://www.worldwidewounds.com/1997/ july/Thomas-Hydronet/hydronet.html.

[11] Wichterle O, Lim D. Hydrophilic gels for biological use. Nature. 1960;185:117-8.

[12] Convatec. http://www.convatec.com/wound-skin/aquacel-dressings/hydrofiber-technology/. 2016.

[13] HAS. Evaluation des pansements primaires et secondaires. Révision des descriptions génériques de la liste des produits et prestations remboursables: Haute Autorité de Santé; 2007. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_evaluation_ pansements _.pdf.

[14] Atelier 2 : Tulles et Interfaces. Europharmat; Journées Nationales sur les dispositifs ; Toulouse 12-14 Octobre 2010. http://www.euro-pharmat.com/documents/ Formation_europharmat/pansement/2formationspansement.pdf.

[15] Momoh FU, Boateng JS, Richardson SCW, Chowdhry BZ, Mitchell JC. Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing. International Journal of Biological Macromolecules. 2015;81:137-50.

[16] Munch P, Ethgen-Bonnet M, Monteiro M-C, Wisniewski S, Beretz L. Hémostase : quels pansements choisir ?: Hemostasis: which are the most appropriate dressings? Le Pharmacien Hospitalier. 2007;42:193-9.

[17] Blair SD, Backhouse CM, Harper R, Matthews J, McCollum CN. Comparison of absorbable materials for surgical haemostasis. British Journal of Surgery. 1988;75:969-71.

[18] Doyle JW, Roth TP, Smith RM, Li Y-Q, Dunn RM. Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. Journal of Biomedical Materials Research. 1996;32:561-8.

[19] Thomas A, Harding KG, Moore K. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-α. Biomaterials. 2000;21:1797-802.

[20] Queen D, Orsted H, Sanada H, Sussman G. A dressing history. International Wound Journal. 2004;1:59-77.

[21] Sansot C. Pansements : Aspects réglementaires. 2013. http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=2754181.

[22] Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. Biomaterials. 2001;22:511-21.

[23] Walker M, Hobot JA, Newman GR, Bowler PG. Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (AQUACEL®) and alginate dressings. Biomaterials. 2003;24:883-90.

[24] Venkatesan J, Lowe B, Anil S, Manivasagan P, Kheraif AAA, Kang K-H, et al. Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. Starch - Stärke. 2015;67:381-90.

[25] Clark D, Green H. Alginic acid and process of making same. Google Patents; 1936.

[26] McHugh DJ. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries technical Paper 441; FAO edt. Rome 2003. 218p, ISSN 0429-9345, ISBN 92-5-104958-0.

[27] Fisher FG, Dorfel H. Die Polyuronsauren der Braumalgalgen. zeitschrift für physiologische chemie. 1955;302:186-203.

[28] Ertesvag H, Valla S. Biosynthesis and applications of alginates. Polymer Degradation and Stability. 1998;59:85-91.

[29] Harding SE, Varum KM, Stokke GT, Smidsrod O. Molecular weight determination of polysaccharides. Advances in Carbohydrate Analysis. 1991;1:63-144.

[30] Haug A, Larsen B, Smidsrod O. Alkaline degradation of alginates. Acta Chem Scand. 1967;21:2859-70.

[31] Haug A. Fractionation of alginic acid. Acta Chem Scand. 1959;13:601-3.

[32] Guenet J-M. Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Toronto, Tokyo; 1992. 278 p, ISBN 0-12-305380-5.

[33] Joanny JF. The sol-gel transition. Physica B: Condensed Matter. 1989;156-157:381-5.

[34] Agulhon P, Robitzer M, David L, Quignard F. Structural Regime Identification in Ionotropic Alginate Gels: Influence of the Cation Nature and Alginate Structure. Biomacromolecules. 2012;13:215-20.

[35] Topuz F, Henke A, Richtering W, Groll J. Magnesium ions and alginate do form hydrogels: a rheological study. Soft Matter. 2012;8:4877-81.

[36] Palluault V. Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables - Application à la préparation des surfaces d'usage dans le secteur aéronautique. Bordeaux: Université de Bordeaux 1; 2010. 171p, N° d'ordre: 4196.

[37] Martinsen A. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional properties. Biotechnology and Bioengineering. 1992;39:186-94.

[38] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008;29:2941-53.

[39] Chan G, Mooney DJ. Ca2+ released from calcium alginate gels can promote inflammatory responses in vitro and in vivo. Acta Biomaterialia. 2013;9:9281-91.

[40] Kellar R.S., Lancaster J.J., Goldman S., McAllister T.N., L'Heureux N. Cardiovascular Tissue Engineering. In: P. Ducheyne, K.E. Healy, D.W. Hutmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (eds.) Comprehensive Biomaterials, vol. 5, pp. 361-376. Elsevier 2011., ISBN: 978-0-08-055294-1.

[41] Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. Biomaterials. 2002;23:3825-31.

[42] Lee J, Lee KY. Local and sustained vascular endothelial growth factor delivery for angiogenesis using an injectable system. Pharmaceutical Research. 2009;26:1739-44.

[43] Taskin AK, Yasar M, Özaydin I, Kaya B, Bat O, Ankarali S, Yildirim Ü, Aydin M. The hemostatic effect of calcium alginate in experimental splenic injury model. Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery. 2013;19:195-9.

[44] Thomas S. Alginate dressings : Do they influence wound healing ? Journal of Wound Care. 2000;9. http://www.urgomedical.com/wp-content/uploads/Urgosorb%20article.pdf.

[45] Otterlei M, Ostgaard K, Skjakbraek G, Smidsrod O, Soonshiong P, Espevik T. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. Journal of Immunotherapy. 1991;10:286-91.

[46] Zimmermann U, Klöck G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG, Horcher A, Entenmann H, Sieber U, Zekorn T. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. Electrophoresis. 1992;13:269-74.

[47] Klöck G, Franck H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Wöhrle M,Federlin K, Zimmermann U. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. Applied Microbiology and Biotechnology. 1994;40:638-43.

[48] Qin Y. Absorption characteristics of alginate wound dressings. Journal of Applied Polymer Science. 2004;91:953-7.

[49] Roberts GAF. Chitin chemistry. London: Macmillan Education UK; 1992. 350 p. ISBN: 978-1-349-11547-1.

[50] Malaise S, Rami L, Montembault A, Alcouffe P, Burdin B, Bordenave L, Delmonde S, David L. Bioresorption mechanisms of chitosan physical hydrogels: a scanning electron microscopy study. Materials Science and Engineering C. 2014;42:374-84.

[51] Jeuniaux C, Voss-Foucart M-F, Poulicek M, Bussers J-C. Sources of chitin, estimated from new data on chitin biomass and production. In: Chitin and Chitosan, Skjak-Braek, Anthonsen, sandford, editors. London, New-York: Elsevier Applied Science; 1988. p3-11.

[52] Varům KM, Ottoy MH, Smidsrod O. Water-soluble of partially N-acetylated chitosans as a function oh pH - effect of chemical-composition and depolymerization. Carbohydrate Polymers. 1994;25:65-70.

[53] Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. Biomacromolecules. 2003;4:641-8.

[54] Popa-Nita S, Alcouffe P, Rochas C, David L, Domard A. Continuum of Structural Organization from Chitosan Solutions to Derived Physical Forms. Biomacromolecules. 2010;11:6-12.

[55] Amiji MM. Pyrene fluorescence study of chitosan self-association in aqueous solution. Carbohydrate Polymers. 1995;26:211-3.

[56] Anthonsen MW, Varum KM, Hermansson AM, Smidsrod O, Brant DA. Aggregates in acidic solutions of chitosans detected by static laser light scattering. Carbohydrate Polymers. 1994;25:13-23.

[57] Philippova, Evgenii, Volkov, Sitnikova, Khokhlov. Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. Biomacromolecules. 2001:482-90.

[58] Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. Journal of Controlled Release. 1996;39:17-25.

[59] Shu XZ, Zhu KJ. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. International Journal of Pharmaceutics. 2002;233:217-25.

[60] Luo YC, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. International Journal of Biological Macromolecules. 2014;64:353-67.

[61] Kulig D, Zimoch-Korzycka A, Jarmoluk A, Marycz K. Study on Alginate-Chitosan Complex Formed with Different Polymers Ratio. Polymers. 2016;8.

[62] Simsek-Ege FA, Bond GM, Stringer J. Polyelectrolye complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. Journal of Applied Polymer Science. 2003;88:346-51.

[63] Lee KY, Park WH, Ha WS. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. Journal of Applied Polymer Science. 1997;63:425-32.

[64] Montembault A, Viton C, Domard A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. Biomacromolecules. 2005;6:653-62.

[65] Moore GK, Roberts GAF. Chitosan gels .1. Study of reaction variables. International Journal of Biological Macromolecules. 1980;2:73-7.

[66] Moore GK, Roberts GAF. Chitosan gels .2. Mechanism of gelation. International Journal of Biological Macromolecules. 1980;2:78-80.

[67] Boucard N, Viton C, Domard A. New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. Biomacromolecules. 2005;6:3227-37.

[68] Vachoud L, Zydowicz N, Domard A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. Carbohydrate Research. 1997;302:169-77.

[69] Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2010;56:290-9.

[70] Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews. 2010;62:3-11.

[71] Baquey C, Dupuy B, Janvier G, Bordenave L, Caix J, Bassecathalinat B. Rationale for the design of biomaterials and the evaluation of their biocompatibility. Biorheology. 1991;28:463-72.

[72] Montembault A, Tahiri K, Korwin-Zmijowska C, Chevalier X, Corvol MT, Domard A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. Biochimie. 2006;88:551-64.

[73] Denost Q, Adam JP, Pontallier A, Montembault A, Bareille R, Siadous R, Siadous R, Delmond S, Rullier E, David L, Bordenave L. Colorectal tissue engineering: A comparative study between porcine small intestinal submucosa (SIS) and chitosan hydrogel patches. Surgery. 2015;158:1715-24.

[74] Ladet SG, Tahiri K, Montembault AS, Domard AJ, Corvol MTM. Multi-membrane chitosan hydrogels as chondrocytic cell bioreactors. Biomaterials. 2011;32:5354-64.

[75] Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. Biomaterials. 2001;22:2959-66.

[76] Nandi SK, Kundu B, Basu D. Protein growth factors loaded highly porous chitosan scaffold: A comparison of bone healing properties. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications. 2013;33:1267-75.

[77] Vasconcelos DP, Fonseca AC, Costa M, Amaral IF, Barbosa MA, Aguas AP, Macrophage polarization following chitosan implantation. Biomaterials. 2013;34:9952-9.

[78] Vasconcelos DP, Costa M, Amaral IF, Barbosa MA, Aguas AP, Barbosa JN. Development of an immunomodulatory biomaterial: Using resolvin D1 to modulate inflammation. Biomaterials. 2015;53:566-73.

[79] Domard A, Domard M. D. Chapter 9: Chitosan : Structure-properties relationship and biomedical applications. In: Polymeric Biomaterials, S Dumitriu editor. 2002. p. 187-212. DOI: 10.1201/9780203904671.ch9.

[80] Hon D-S. Chap 21 Chitin and Chitosan : medical applications. In: Polysaccharides in Medicinal Applications, S. Dumitiu editor, Marcel Dekker. New York 1996. p. 631-49. ISBN 0-8247-9540-7.

[81] Malette WG, Quigley HJ, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG. Chitosan - A new hemostatic. Annals of Thoracic Surgery. 1983;36:55-8.

[82] Hirano S, Seino H, Akiyama Y, Nonaka I. Chitosan: A biocompatible Material for Oral and Intravenous Administrations. Progress in Biomediacl Polymers. Charles G. Gebelein, Richard L. Dunn ed: Springer US; 1990. p. 283-90.

[83] Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 1999;57:49-52.

[84] Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. Journal of Biomedical Materials Research. 1997;34:21-8.

[85] Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydrate Polymers. 2009;76:167-82.

[86] Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnol Adv. 2011;29:322-37.

[87] Domard A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. Carbohydrate Polymers. 2011;84:696-703.

[88] Dupasquier F. Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1; 2013, NNT 011LYO10078/ N° d'ordre : 78-2011.

[89] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosic L, Calabro D, Avallone B, Balsamo G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. Biomaterials. 1994;15:1215-20.

[90] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001;52:105-15.

[91] Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. Biomaterials. 2001;22:2125-30.

[92] Nishimura K, Nishimura S-I, Seo H, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. Journal of Biomedical Materials Research. 1986;20:1359-72.

[93] Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. Biomaterials. 1999;20:1407-14.

[94] Mi F-L, Shyu S-S, Wu Y-B, Lee S-T, Shyong J-Y, Huang R-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. Biomaterials. 2001;22:165-73.

[95] Shin Y, Yoo DI, Min K. Antimicrobial finishing of polypropylene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer. Journal of Applied Polymer Science. 1999;74:2911-6.

[96] Strand SP, Vandvik MS, Varům KM, Ostgaard K. Screening of Chitosans and Conditions for Bacterial Flocculation. Biomacromolecules. 2001;2:126-33.

[97] Jarry C, Chaput C, Chenite A, Renaud MA, Buschmann M, Leroux JC. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. Journal of Biomedical Materials Research. 2001;58:127-35.

[98] Raafat D, von Bargen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Applied and Environmental Microbiology. 2008;74:3764-73.

[99] Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential - a critical literature survey. Microbial Biotechnology. 2009;2:186-201.

[100] Goy RC, de Britto D, Assis OBG. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. Polimeros-Ciencia E Tecnologia. 2009;19:241-7.

[101] Hadwiger LA, Kendra DF, Fristensky BW, Wagoner W. Chitosan Both Activates Genes in Plants and Inhibits RNA Synthesis in Fungi. In: Chitin in Nature and Technology Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW, editors. Chitin in Nature and Technology. Boston, MA: Springer US; 1986. p. 209-14.

[102] Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnology. 1992;6:257-72.

[103] Sebti I, Martial-Gros A, Carnet-Pantiez A, Grelier S, Coma V. Chitosan polymer as biloactive coating and film against Aspergillus niger contamination. Journal of Food Science. 2005;70:100-4.

[104] Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, De Yao K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of Applied Polymer Science. 2001;79:1324-35.

[105] Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal of Food Microbiology. 1999;47:67-77.

[106] Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli. Journal of Food Protection. 1999;62:239-43.

[107] Masson M, Holappa J, Hjalmarsdottir M, Runarsson OV, Nevalainen T, Jarvinen T. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. Carbohydrate Polymers. 2008;74:566-71.

[108] Kara F, Aksoy EA, Yuksekdag Z, Hasirci N, Aksoy S. Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties. Carbohydrate Polymers. 2014;112:39-47.

[109] Sekiguchi S, Miura Y, Kaneko H, Nishimura SI, Nishi N, Iwase M, Toruka S. Molecular Weight Dependency of Antimicrobial Activity by Chitosan Oligomers. In: Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions Nishinari K, Doi E, editors. Plenium Press New York:1994. p. 71-6. ISBN: 978-1-4613-6059-9.

[110] Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson HB, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV,. Avdienko ID, Varlamov VP. Bactericidal and

antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. Carbohydrate Polymers. 2006;64:66-72.

[111] Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL. Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. Journal of Food Protection. 2004;67:396-8.

[112] Zivanovic S, Basurto CC, Chi S, Davidson PM, Weiss J. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. Journal of Food Protection. 2004;67:952-9.

[113] Notin L, Viton C, Lucas J-M, Domard A. Pseudo-dry-spinning of chitosan. ActaBiomaterialia. 2006;2:297-311.

[114] Struszczyk H. Alginate and Chitosan Fibers for Medical Uses. In: Wallenberger FT, Weston NE, editors. Natural Fibers, Plastics and Composites. Boston, MA: Springer US; 2004. p. 95-104.

[115] Knill CJ, Kennedy JF, Mistry J, Miraftab M, Smart G, Groocock MR, et al. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. Carbohydrate Polymers. 2004;55:65-76.

[116] Sibaja B, Culbertson E, Marshall P, Boy R, Broughton RM, Solano AA, Esquivel M, Parker J, De La Fuente L, Auad ML. Preparation of alginate-chitosan fibers with potential biomedical applications. Carbohydr Polym. 2015 ;134:598-608.

[117] Knaul JZ, Creber KAM. Coagulation rate studies of spinnable chitosan solutions. Journal of Applied Polymer Science. 1997;66:117-27.

[118] Knaul J, Hooper M, Chanyi C, Creber KAM. Improvements in the drying process for wet-spun chitosan fibers. Journal of Applied Polymer Science. 1998;69:1435-44.

[119] Yudin VE, Dobrovolskaya IP, Neelov IM, Dresvyanina EN, Popryadukhin PV, Ivan'kova EM, et al. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils. Carbohydr Polym. 2014;108:176-82.

[120] Steplewski W, Wawro D, Niekraszewicz A, Ciechanska D. Research into the process of manufacturing Alginate-Chitosan fibres. Fibres & Textiles in Eastem Europe. 2006;14:25-31.

[121] Tamura H, Tsuruta Y, Tokura S. Preparation of chitosan-coated alginate filament. Materials Science and Engineering: C. 2002;20:143-7.

[122] Sweeney IR, Miraftab M, Collyer G. Absorbent alginate fibres modified with hydrolysed chitosan for wound care dressings - II. Pilot scale development. Carbohydr Polym. 2014 ;102:920-7.

[123] Mirabedini A, Foroughi J, Romeo T, Wallace GG. Development and Characterization of Novel Hybrid Hydrogel Fibers. Macromolecular Materials and Engineering. 2015;300:1217-25.

[124] Watthanaphanit A, Supaphol P, Tamura H, Tokura S, Rujiravanit R. Wet-spun alginate/chitosan whiskers nanocomposite fibers: Preparation, characterization and release characteristic of the whiskers. Carbohydrate Polymers. 2010;79:738-46.

[125] Osorio-Madrazo A, David L, Trombotto S, Lucas JM, Peniche-Covas C, Domard A. Kinetics Study of the Solid-State Acid Hydrolysis of Chitosan: Evolution of the Crystallinity and Macromolecular Structure. Biomacromolecules. 2010;11:1376-86.

[126] Osorio-Madrazo A, David L, Trombotto S, Lucas JM, Peniche-Covas C, Domard A. Highly crystalline chitosan produced by multi-steps acid hydrolysis in the solid-state. Carbohydrate Polymers. 2011;83:1730-9.

[127] Osorio-Madrazo A, David L, Peniche-Covas C, Rochas C, Putaux JL, Trombotto S, Alcouffe P, Domard A. Fine microstructure of processed chitosan nanofibril networks preserving directional packing and high molecular weight. Carbohydrate Polymers. 2015;131:1-8.

[128] Allan GG, Peyron M. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. Carbohydrate Research. 1995;277:257-72.

[129] Allan GG, Peyron M. Molecular-weight manipulation of chitosan .2. Prediction and control of extent of depolymerization by nitrous-acid. Carbohydrate Research. 1995;277:273-82.

[130] Hirai A, Odani H, Nakajima A. Determination od degree of deacetylation of chitosan by H-1-NMR spectroscopy. Polymer Bulletin. 1991;26:87-94.

[131] ASTM. Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy. ASTM F2259-10 (2012) e1.

[132] Ma Z, Lim TM, Lim L-Y. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. International Journal of Pharmaceutics. 2005;293:271-80.

[133] Brunel F, Véron L, David L, Domard A, Delair T. A novel synthesis of chitosan nanoparticles in reverse emulsion. Langmuir. 2008;24:11370-7.

[134] Test methods for primary wound dressings. Part 1: Aspects of absorbency. Ref. No. EN 13726-1:2002. The Official Journal of the European Union, Comité Européen De Normalisation 2003. ISBN 0 580 39510 3, ICS 11.120.2.

[135] Thomason JL. On the application of Weibull analysis to experimentally determined single fibre strength distributions. Composites Science and Technology. 2013;77:74-80.

[136] Tinschert J, Zwez D, Marx R, Anusavice KJ. Structural reliability of alumina-, feldspar-, leucite-, mica- and zirconia-based ceramics. Journal of Dentistry. 2000;28:529-35.

[137] Wang F, Shao JX. Modified Weibull Distribution for Analyzing the Tensile Strength of Bamboo Fibers. Polymers. 2014;6:3005-18.

[138] Weibull W. A Statistical DIstribution Function of Wide Applicability. Journal of Applied Mechanics-Transactions of the Asme. 1951;18:293-7.

[139] Desorme M. Filage de chitosane pour l'élaboraton de textiles biomédicaux innovants: Claude Bernard Lyon1; 2011. 302p., NNT 2011LYO10112.

[140] G.W.C Kaye,T.H Laby, Tables of Physical & Chemical Constants and some mathematical functions. Longmans,Green and Co eds 1911, 153p http://www.kayelaby.npl.co.uk/; https://archive.org/details/tablesofphysical004093mbp.

[141] Pouchou JL, Pichoir F. Les éléments très légers en microanalyse X - Possibilités des modèles récents de quantification. Microsc Spectrosc. 1986;11:229-50.

[142] Larnoy E, Eikenes M, Militz H. Detection of chlorine-labelled chitosan in Scots pine by energy-dispersive X-ray spectroscopy. Wood Science and Technology. 2011;45:103-10.

[143] Quere D. Fluid coating on a fiber. Annual Review of Fluid Mechanics. 1999;31:347-84.

[144] Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. Bioresource Technology. 2008;99:2806-14.

[145] Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Malcata FX. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Ultramicroscopy. 2008;108:1128-34.

[146] Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2001;71:235-44.

[147] Ozcelik H, Vrana NE, Gudima A, Riabov V, Gratchev A, Haikel Y, Metz-Boutigue MH, Carradò A, Faerber J, Roland T, Klüter H, Kzhyshkowska J, Schaaf P, Lavalle P. Harnessing the Multifunctionality in Nature: A Bioactive Agent Release System with Self-Antimicrobial and Immunomodulatory Properties. Advanced Healthcare Materials. 2015;4:2026-36.

[148] Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology, fifth Edition. McGraw-Hill Education, Boston 2002. 1026p, ISBN-13: 978-0072320411, ISBN-10: 0072320419.

[149] Winter GD. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. Nature. 1962;193:293-4.

Annexes

Annexe 1: Etude bibliographique sur la plaie et la cicatrisation

1 La plaie

Une plaie est définie par la Société de Cicatrisation des Plaies (Wound Healing Society, *woundheal.org*) comme une interruption anormale de la structure anatomique et physiologique d'un tissu ; elle représente un danger pour les barrières naturelles de défense en rendant les tissus plus accessibles à l'invasion par les microorganismes. Les plaies peuvent être classées en deux catégories qui sont basées sur la nature du procédé de réparation : plaies aiguës ou chroniques [2].

En l'absence de facteur local ou général pouvant retarder la cicatrisation, on parle de plaie aiguë. Les plaies aiguës sont des blessures des tissus causées par une coupe ou une incision chirurgicale que le procédé de cicatrisation des plaies va réparer dans un délai imparti. Les causes de plaies aiguës incluent notamment les brûlures, les gelures, les morsures, les greffes et les prises de greffes, les dermabrasions profondes, les plaies à cicatrisation dirigée post-chirurgicale et les sinus pilonidaux opérés.

D'un autre côté, les plaies chroniques sont des blessures des tissus qui guérissent lentement à cause d'agressions répétées sur les tissus et/ou autre physiopathologie sous-jacente qui interfère avec le procédé de cicatrisation des plaies. Une plaie est considérée comme chronique après 4 à 6 semaines d'évolution, selon son étiologie. Les causes de plaies chroniques incluent notamment les ulcères de jambe, les escarres, les plaies du diabétique et les moignons d'amputation [4].

2 La cicatrisation

La cicatrisation est définie par la Société de Cicatrisation des Plaies comme un procédé dynamique complexe dont le résultat est la restauration des fonctions et de la continuité anatomique du tissu. Il s'agit d'un procédé physiologique impliquant une série d'étapes qui se chevauchent. Il y a entre 3 et 5 étapes de cicatrisation des plaies.

La première étape, l'hémostase, intervient immédiatement après la blessure et dure généralement quelques heures. La seconde étape, l'inflammation, commence rapidement

après le début de l'hémostase et se termine entre 24 et 72 h après la blessure. La prolifération et la réparation des tissus correspondent à la troisième étape. Celle-ci s'achève 1 à 3 semaines après la blessure. La quatrième et dernière étape est le remodelage des tissus. Elle commence approximativement 3 semaines après la blessure et peut prendre plusieurs mois voire années pour atteindre l'achèvement physiologique. De plus, il est important de noter que bien que la peau soit reconstruite dans les jours ou semaines qui ont suivi la blessure, elle reste vulnérable aux dommages qu'elle subit jusqu'à la dernière étape de cicatrisation des plaies [2]. Enfin, il est conseillé de respecter l'écosystème bactérien. Les antiseptiques ne doivent pas être utilisés de manière systématique et il est souvent préférable d'éviter les antibiotiques [3].

2.1 L'hémostase

Lors de la blessure, il se produit en général un saignement qui sert à évacuer les microorganismes et/ou les antigènes de la plaie. Ce saignement active le processus d'hémostase par une variété de facteurs libérés par les cellules de la peau lésée. Ces facteurs activent la cascade de coagulation extrinsèque, tout comme l'agrégation plaquettaire et l'exposition du collagène de la peau endommagée. Ces deux derniers déclenchent également la vasoconstriction. Cette vasoconstriction empêche la perte de sang pendant que le caillot de fibrine forme un joint temporaire sur le site de la lésion et empêche l'afflux des micro-organismes.

Le caillot de fibrine est une matrice provisoire servant d'appui pour l'afflux des fibroblastes et des kératinocytes. Il contient aussi de la fibronectine, protéine d'adhésion ayant de multiples propriétés. Cette protéine participe à la réparation tissulaire par différentes voies. Elle sert de facteur chimiotactique pour la migration des cellules réparatrices et de modèle pour le dépôt des fibres de collagène. Elle participe également au désencombrement des plaies en dégradant les déchets de la matrice extracellulaire (MEC) et en activant les propriétés phagocytaires des macrophages [2].

2.2 L'inflammation

La seconde étape dans la cicatrisation des plaies est l'inflammation. La réponse inflammatoire est amorcée par divers médiateurs provenant de sources différentes telles que les tissus cellulaires et capillaires, l'activation des plaquettes et leurs cytokines et les produits de l'hémostase. Seulement quelques minutes après la lésion, les neutrophiles arrivent pour contenir les microorganismes présents au niveau de la plaie. Ils initient aussi la réparation

tissulaire par activation des fibroblastes locaux et des cellules épithéliales. Bien que d'autres globules blancs comme les monocytes, les lymphocytes et les cellules du plasma migrent sur le site de lésion, les neutrophiles sont les globules blancs qui prédominent les premiers jours et disparaissent ensuite de la plaie lorsqu'il n'y a plus de traces d'infection. A l'inverse, en présence d'infection, les neutrophiles continuent leur infiltration jusqu'à ce que l'infection soit sous contrôle.

En l'absence d'infection, les monocytes se différencient en macrophages et deviennent les principales cellules phagocytaires sur le site de lésion. De plus, ils sont capables d'ingérer les microorganismes survivants, les neutrophiles morts, le caillot de fibrine et d'autres débris cellulaires. Les macrophages fabriquent de l'oxyde nitrique et sécrètent des cytokines pour initier la réparation tissulaire. Bien que la nature exacte d'implication de l'oxyde nitrique dans la réparation tissulaire ne soit pas bien identifiée, il a été montré par des études sur animaux que cette molécule jouait un rôle important dans la régulation des kératinocytes. Le macrophage est la cellule indicatrice de la transition entre l'état inflammatoire et le stade de réparation de la plaie. L'importance du macrophage est soulignée par des études qui ont montré que les plaies pouvaient être réparées en l'absence de neutrophiles mais pas en l'absence de macrophages. Comme les plaquettes, les macrophages synthétisent diverses cytokines dont des facteurs de croissance impliqués dans la migration, la prolifération et l'organisation de nouvelles connections entre les lits vasculaires et les tissus au sein de la plaie. Par contre, à l'inverse des plaquettes qui ne sécrètent que des cytokines stockées, les macrophages sont capables de synthétiser des cytokines tout le temps et assurent ainsi une bonne continuité du procédé de réparation tissulaire.

Les macrophages produisent aussi des enzymes spécifiques appelées métallo-protéases (ou métallo-protéinases). La plus connue est nommée collagénase, qui joue un rôle central dans le nettoyage (débridement) des plaies et l'ancrage d'un nouveau tissu conjonctif.

Un autre mécanisme important dans l'étape inflammatoire est l'activation de substances vaso-actives comme la sérotonine, la bradykinine, les prostaglandines et l'histamine. Ces substances augmentent la perméabilité de l'endothélium vasculaire au niveau du site lésé et augmente ainsi la perfusion du site à réparer. Effectivement, augmenter la perméabilité facilite l'infiltration des cellules réparatrices et immunitaires mais cela permet aussi d'augmenter la circulation sanguine et donc l'apport en oxygène. Cela a pour conséquence d'augmenter la température du site lésé. La chaleur et l'environnement humide ainsi créé au

sein de la plaie sont essentiels pour passer à la prochaine étape de cicatrisation. A la fin de l'étape inflammatoire du processus de cicatrisation de la plaie, le saignement est contrôlé et le lit de la plaie est propre. Ceci créait un environnement propice pour la prochaine étape de réparation et de prolifération cellulaire [2].

2.3 La prolifération et la réparation

Les mécanismes spécifiques de cette troisième étape ont pour but de recouvrir la surface de la plaie avec un nouvel épiderme (ré-épithélialisation), reconstruire un nouveau derme par la restauration de l'intégrité vasculaire de la région (néo-vascularisation), et par le remplissage de la zone lésée par un tissu conjonctif (granulation). Les cellules clés de ce procédé sont les fibroblastes (derme) et les kératinocytes (épiderme).

La chaleur et l'environnement humide de la plaie facilitent aussi la prolifération et la réparation tissulaire. L'exsudat libéré est riche en cytokines qui stimulent la croissance d'un nouveau tissu.

2.3.1 La néo-vascularisation ou le bourgeonnement

Une part importante des procédés de réparation dépendent de la capacité à fournir les nutriments nécessaires à cette réparation. Le procédé de restauration du réseau vasculaire est nommé néo-vascularisation ou angiogenèse. La néo-vascularisation est stimulée par des facteurs de croissance et par les tissus en hypoxie. Au départ du procédé de cicatrisation de la plaie, les parties les plus viables sont celles qui sont encore nourries par le réseau vasculaire : les bords de la plaie en contact avec le lit vasculaire cutané sous-jacent. L'augmentation de la perméabilité de l'endothélium permet aux nutriments de s'échapper du lit vasculaire intact et d'accéder aux zones lésées non vascularisées. Ceci crée un microenvironnement riche en nutriments. La fermeture de la surface de la plaie est nécessaire pour créer un environnement hypoxique qui favorise la néo-vascularisation et la sécrétion de collagène. L'hypoxie est nécessaire pour induire la sécrétion de facteurs de croissance de l'angiogenèse par les macrophages. L'acide lactique libéré dans la plaie stimule aussi l'angiogenèse. Les facteurs de croissance dérivés des plaquettes et des macrophages sont libérés par les cellules endothéliales et ils stimulent l'angiogenèse sur les bords de la plaie. De nouveaux vaisseaux sanguins bourgeonnent ou germent à partir des vaisseaux intacts dans le derme sous-jacent. Les nouveaux bourgeons capillaires se rejoignent pour former des boucles capillaires établissant ainsi l'écoulement de sang dans la plaie [2].

2.3.2 La Ré-épithélialisation

La ré-épithélialisation d'une plaie se produit quand les kératinocytes ont totalement recouvert la surface de la peau lésée. Dans l'épiderme, les kératinocytes qui sont le long des bords de la plaie subissent une activité mitotique intense. Les kératinocytes, stimulés pas la libération locale de facteurs de croissance, prolifèrent et commencent leur migration dans les 12 à 24 heures après la lésion. La chaleur et l'environnement humide de la plaie facilite la ré-épithélialisation. Effectivement, celle-ci est deux fois plus rapide dans les plaies mises en milieu humide que dans les plaies laissées à l'air : la préservation de la température corporelle améliore l'irrigation sanguine et la migration cellulaire. La reconstruction cellulaire est ainsi favorisée [8, 149].

La première étape de la migration implique la séparation des kératinocytes entre eux mais aussi de la membrane des cellules sous-jacentes. Ces kératinocytes de la migration subissent ensuite une transformation en s'allongeant dans le sens dont la croissance est nécessaire. Le bord d'attaque de l'élongation des kératinocytes se fixe sur une nouvelle place dans le lit de la plaie. La cellule se contracte ensuite et tire alors vers elle le bord opposé de la plaie (Figure 67). Au point de contact, la migration cesse dans un processus appelé inhibition de contact.

Comme les kératinocytes prolifèrent et migrent à travers la plaie, ils participent aussi à la mise en forme de la MEC par l'expression de marqueurs de surface qui améliorent la migration dans l'ensemble de la matrice. Les supports de la structure sont sélectivement dégradés puis resynthétisés pour produire les ancres temporaires durant la phase de migration. La première migration est complète lorsque les kératinocytes sont stabilisés par des liens entre eux et à la nouvelle base membranaire.

Quand la surface de la peau est complètement couverte avec de nouvelles cellules épidermiques, la plaie est considérée fermée. La fermeture anticipée d'une plaie ouverte avec un épiderme viable est essentielle, car elle induit de remodelage du tissu sous-jacent. En outre, plus la plaie sera fermée rapidement et moins la cicatrice sera marquée.

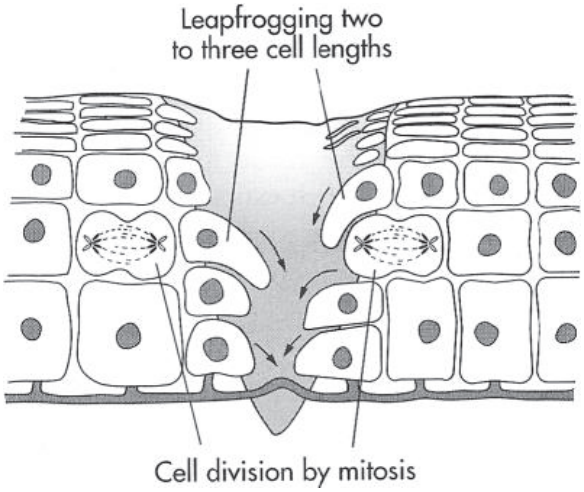


Figure 67 : Schéma de la migration des cellules épidermiques [2]

2.3.3 La Granulation

La troisième étape de prolifération et de réparation est le développement du tissu de granulation, un tissu transitoire qui remplace la matrice de fibrine/fibronectine. Il commence à apparaitre environ 4 jours après la lésion. La granulation remplace le caillot de fibrine par un nouveau tissu riche en acide hyaluronique, fibronectine et autres composants de la MEC. Le tissu de granulation possède un métabolisme très actif et supporte ainsi la prolifération d'une grande variété de cellules et de protéines. Ce tissu est également fortement vascularisé.

Les fibroblastes sont les cellules prédominantes dans le tissu de granulation. Ce sont des cellules du derme qui produisent du collagène et de nombreuses autres substances contenues dans la MEC. La migration et la prolifération des fibroblastes sont dirigées par des signaux émis par :

- des dérivés de facteurs de croissance des plaquettes
- des facteurs de croissance transformés
- des facteurs de croissance de fibroblastes
- le complément C5a libéré par les cellules activées de la réponse immunitaire

L'afflux de fibroblastes engendre la dégradation de la matrice provisionnelle de fibrine/fibronectine qui est remplacée par une nouvelle matrice. Après leur migration au niveau de la plaie, les fibroblastes commencent à synthétiser les protéines hyaluroniques et la fibronectine. Cette nouvelle matrice est composée de fibronectine et de collagène qui forment un réseau facilitant l'organisation et la migration des cellules.

Les fibroblastes de derme normal et les fibroblastes impliqués dans la formation du tissu de granulation diffèrent au niveau de leur structure et de leur fonction. Les fibroblastes de la plaie sont autant impliqués dans la synthèse du collagène que dans la prolifération. Ces fibroblastes produisent et libèrent des protéoglycanes, glycosaminoglycanes et du collagène. Ils participent aussi dans le procédé de contraction de la plaie après leur différenciation en myofibroblastes.

Cette différenciation des fibroblastes en myofibroblastes se distingue par l'apparition de protéines contractiles comme l'actine. Les myofibroblastes sont organisés en groupe. Cet arrangement, en plus de leurs propriétés contractiles permet aux myofibroblastes de pouvoir tirer sur les bords de la plaie pour les rapprocher. Ce procédé de contraction diminue le temps de cicatrisation puisqu'il diminue la taille de la plaie et réduit la quantité de MEC nécessaire pour réparer les tissus lésés. La contraction facilite aussi la ré-épithélialisation en raccourcissant la distance de migration que doivent effectuer les kératinocytes.

La structure et la composition du tissu de granulation subit des changements constants lors de sa maturation. Bien que le collagène devienne la protéine prédominante, il y a au moins dix-neuf types de collagène différents. Le type de collagène présent dans le tissu varie avec le tissu. Le collagène de la peau est composé à 80 % de type I et 20 % de type III. Le nouveau tissu de granulation contient des fibres de collagène de type I, III et V. A 3 semaines après la lésion, la peau de la plaie a approximativement 20 % de sa force finale.

2.3.4 Le remodelage ou la maturation

La dernière étape de la cicatrisation de la plaie est le remodelage ou la maturation du tissu de granulation en un tissu conjonctif mature et/ou cicatrice. La cicatrice se renforce durant cette dernière étape. Les cellules clés pour le remodelage sont les macrophages et les fibroblastes. Le remodelage de la MEC par réticulation avec les collagènes, la maturation des cellules et l'apoptose (mort cellulaire) sont les mécanismes utilisés dans le remodelage de la plaie. Le pic de synthèse du collagène est environ 5 jours après la lésion mais continue durant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Bien que la cicatrice se renforce, le tissu ne récupère jamais 100 % de sa force initiale et ne dépassera pas les 80 %.

Le remodelage de la plaie commence à différents temps et régions différentes. Le collagène est sécrété dans un premier temps sous une forme de protéine à tripe hélice, appelée le procollagène. Ce dernier est ensuite transformé en fibres qui sont arrangées en parallèle puis

réticulées en brins plus épais et plus résistants. Ce procédé transforme la matrice du tissu de granulation en une MEC stable.

Durant ce temps, la fibronectine et l'acide hyaluronique sont remplacés, les faisceaux de collagène grandissent en taille et en force, la néo-vascularisation cesse, et l'activité métabolique diminue dans la MEC. Le collagène de type III diminue de 30 à 10 %, le tissu devient nettement plus résistant. La densité des cellules, comme les macrophages, les kératinocytes, les fibroblastes et les myofibroblastes est réduite par l'apoptose. Les kératinocytes sont les premières cellules à subir le programme de mort cellulaire et les myofibroblastes sont les seconds. Le remodelage est la balance entre la synthèse du nouveau collagène et la dégradation de l'ancien. Il est régulé par les fibroblastes à travers la synthèse des composants de la MEC et les métallo-protéases qui contrôlent la différentiation cellulaire. Quand le procédé de cicatrisation de la plaie se termine, le nouveau tissu conjonctif mature et passe d'une couleur rosé-rougeâtre à une couleur blanche.

Pour conclure, le procédé de régénération d'une plaie est une combinaison entre une destruction et une réorganisation de la matrice. Cela requière une bonne orchestration des différents procédés réparant les tissus lésés. Ces procédés correspondent à la succession d'évènements biologiques et moléculaires complexes tels que la migration cellulaire, la prolifération, le dépôt de la matrice extracellulaire et le remodelage des tissus cicatrisés [15].

Annexe 2 : Résultats et traitements d'image pour la quantification du chitosane enduit sur les fibres d'alginate de calcium par microscopie confocal

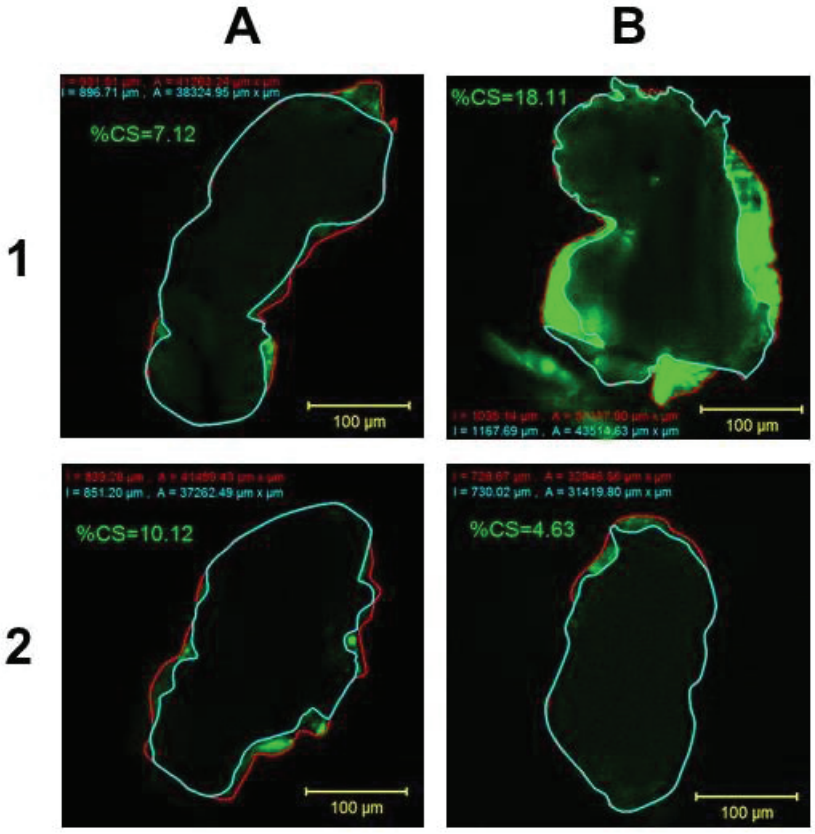


Figure 68: Photos en coupe transversale des fibres DA0M180c1Ca(OH)$_2$-FITC et dosage du chitosane par traitement d'image

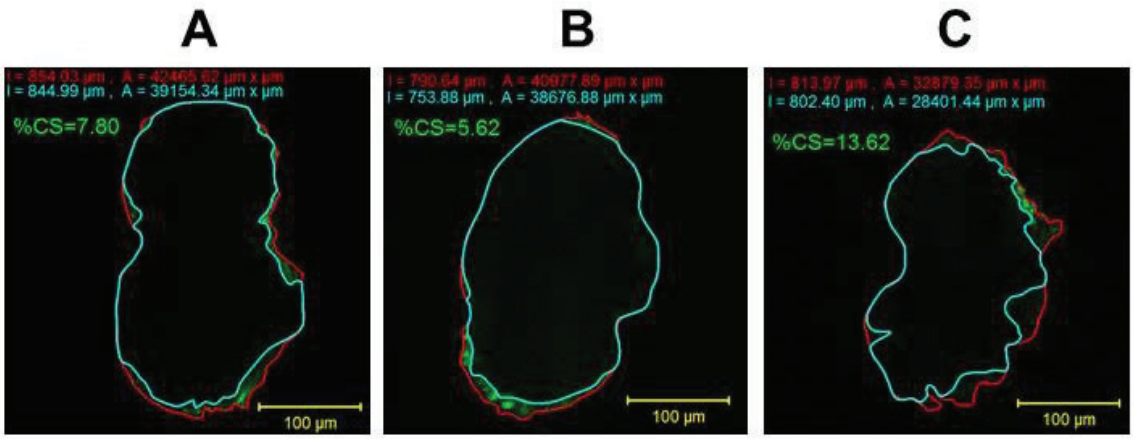


Figure 69: Photos en coupe transversale des fibres DA0M180c1KOH-FITC et dosage du chitosane par traitement d'image

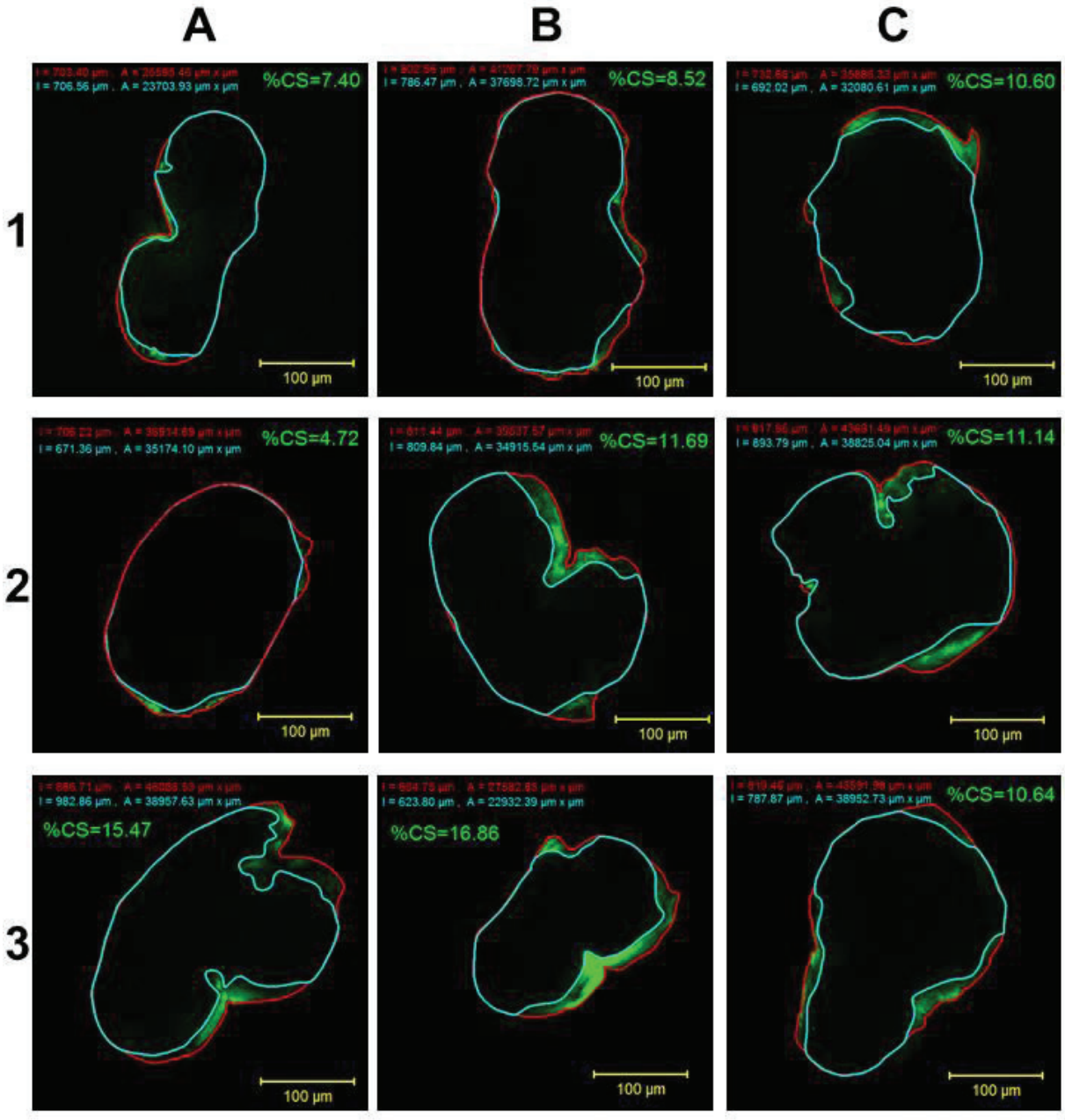


Figure 70: Photos en coupe transversale des fibres DA0M180c1SN-FITC et dosage du chitosane par traitement d'image

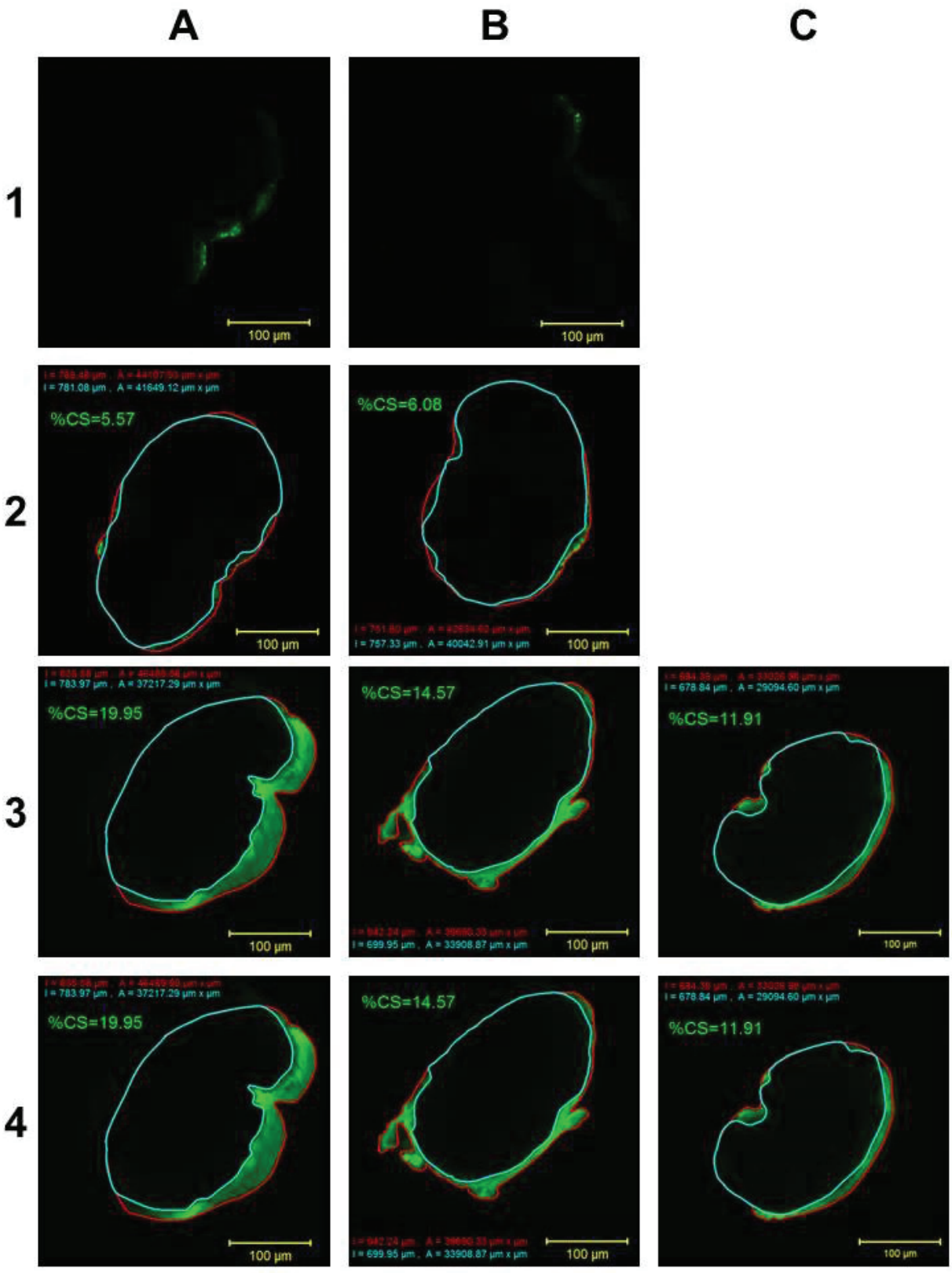


Figure 71: Photos en coupe transversale des fils d'alginate enduits de chitosane greffé au FITC et dosage du chitosane par traitement d'image ; (A1 et B1) DA0M180c0.1SN-FITC, (B1) DA0M180c0.4SN-FITC, (B2) DA0M180c0.7SN-FITC, (A3, B3 et C3) DA0M180c2SN-FITC et (A4, B4, C4) DA0M180c3SN-FITC

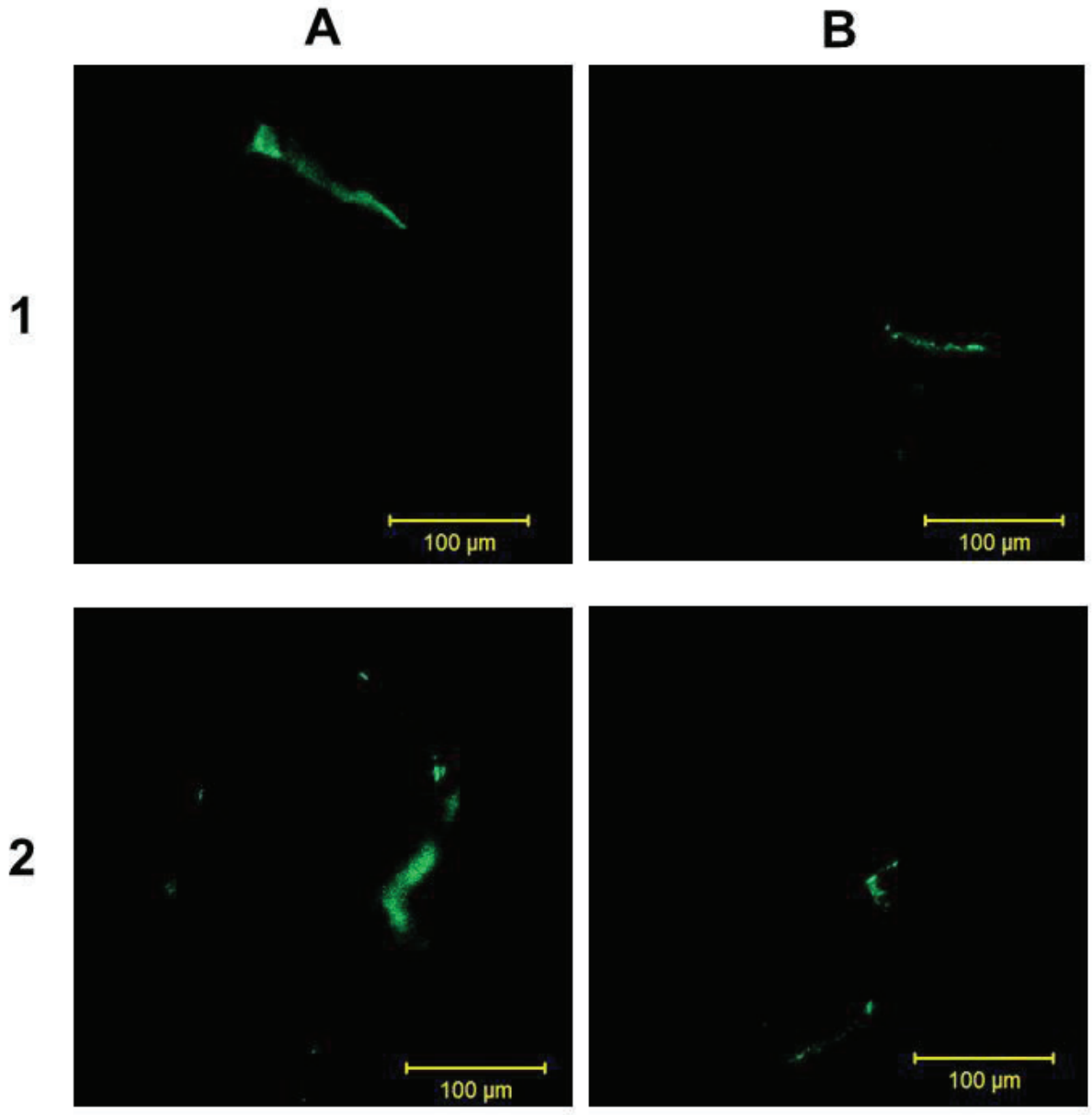


Figure 72: Photos en coupe transversale des fils d'alginate enduits de chitosane greffé au FITC et dosage du chitosane par traitement d'image : (A1 et B1) DA0M20c2SN-FITC et (A2 et B2) DA0M20c2Ca(OH)$_2$-FITC

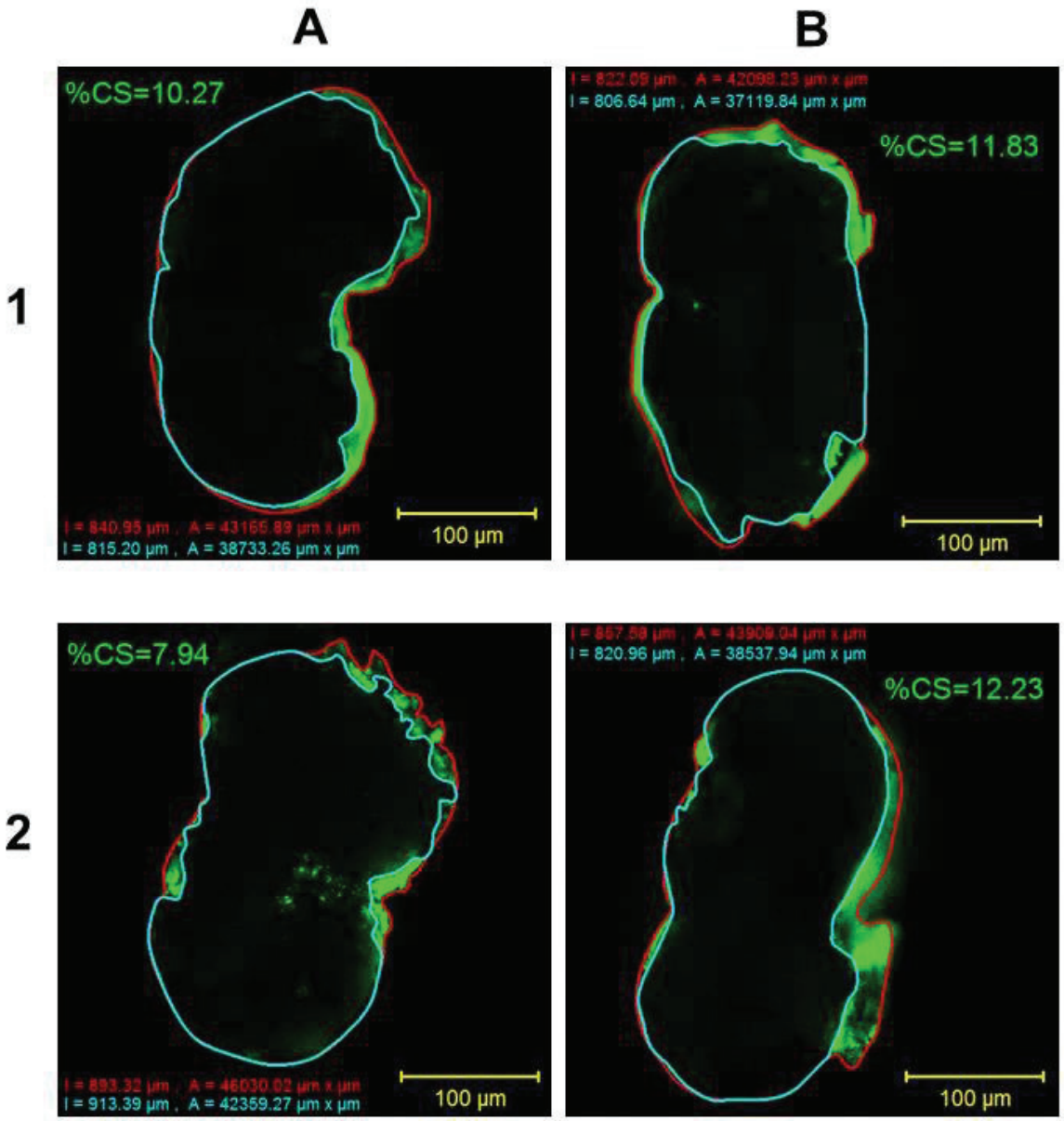


Figure 73: Photos en coupe transversale des fils d'alginate enduits de chitosane greffé au FITC et dosage du chitosane par traitement d'image : (A1 et B1) DA17M180c2SN-FITC et (A2 et B2) DA17M180c2Ca(OH)$_2$-FITC

Annexe 3 : Résultats de dosage du chitosane par spectroscopie dans la fluorescence

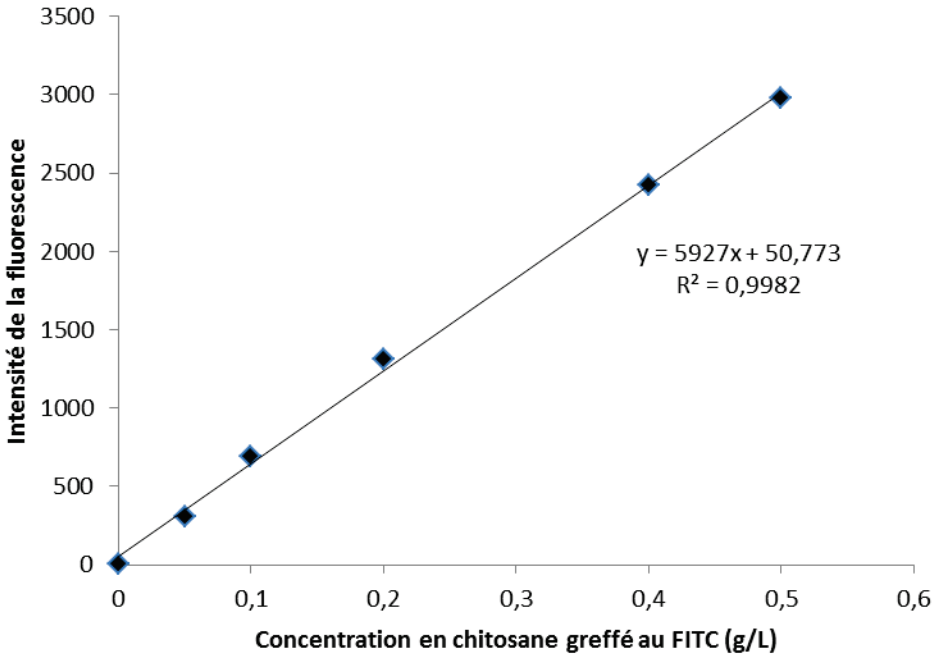


Figure 74: Courbe étalon pour le dosage du chitosane greffé au FITC par spectroscopie dans la fluorescence