

Laboratoire des Biomatériaux et Polymères pour la Santé

Unité de recherche CSPBAT UMR7244

Institut Galilée, Université Paris XIII, Sorbonne Paris-Cité

Thèse présentée par

Hamza CHOUIRFA

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

SORBONNE PARIS-CITE

Discipline : Chimie

Spécialité : Biomatériaux

Evaluation du greffage de polymères bioactifs à architectures variées sur la réponse biologique *in vitro* pour une diminution des infections bactériennes et une amélioration de l'ostéointégration

Soutenue le mardi 10 octobre 2017 à Villetaneuse devant le jury composé :

Rapporteurs :

M. Coudane Jean : Pr. à l'Université de Montpellier I

M. Humblot Vincent : Chargé de recherche à l'Université Pierre et Marie Curie

Examineurs :

Mme Crémieux Anne-Claude : Pr. à l'Université Versailles Saint Quentin

Mme Falentin-Daudré Céline : Maître de conférence à l'Université Paris XIII (Co-encadrante de thèse)

Mme Galtayries Anouk : Maître de conférence à l'Université ParisTech

Mme Migonney Véronique : Pr. à l'Université Paris XIII (Directrice de thèse)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biomatériaux et Polymères pour la Santé LBPS au sein de l'unité de Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT, CNRS UMR 7244) à l'Institut Galilée, Université Paris XIII.

Je voudrais remercier tout d'abord le Pr. V. Migonney, ancienne directrice du CSPBAT et actuelle chef du LBPS, pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse sous sa direction éclairée. Elle a su malgré ses fonctions de directrice d'unité et de chef d'équipe me consacrer du temps et être toujours disponible.

Je tiens également à remercier le Dr. C. Falentin-Daudré de m'avoir co-encadré durant ces trois années. Elle a su m'encadrer et me donner toute la liberté afin d'acquérir l'autonomie nécessaire pour mener ce projet de thèse de façon sereine.

Le Pr. Migonney et le Dr. Falentin-Daudré ont su grâce à leurs conseils et leurs expériences me permettre de pouvoir effectuer une thèse très enrichissante. Sans aucun doute, je ressors de cette thèse avec de nombreuses connaissances supplémentaires et je les remercie de la confiance qu'elles m'aient accordé.

Je tiens à présent à remercier le Pr. J. Coudane de l'Université de Montpellier I et le Dr. V. Humblot de l'Université Pierre et Marie Curie d'avoir accepté d'être membre de ce jury en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Pr. A. C. Crémieux de l'Université Versailles Saint Quentin et le Dr. A. Galtayries d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Je remercie également les membres de mon équipe le LBPS notamment Gabriela Frînculet qui a été un soutien sans failles au début de ma thèse avant qu'elle ne parte vers de nouveaux horizons. Mon collègue et ami doctorant Gana Amokrane qui m'a accompagné durant cette fin de thèse. Il a été un soutien indispensable à la bonne tenue de cette thèse et je rajoute Danielle Geldwerth qui a toujours eu la bonne petite parole et le sourire. Je voudrais également remercier Emmanuela Pasquet Di Dio Busa pour les moments passés à échanger et son aide sur les démarches administratives.

Je remercie les autres membres du LBPS, le Pr. S. Ramtani, le Dr. J. S. Baumann et Amélie Leroux pour leurs aides durant ma thèse au sein du laboratoire. Je remercie également les stagiaires qui ont été de passage au sein du LBPS : Dyhia (Kersani et Zerrar), Mélanie, Saïd, Amrane, ...

Je remercie les autres membres du CSPBAT, je pense notamment à mes camarades doctorants (Nicolas, Raymond, Shivalika) et anciens doctorants (Corentine et Margery) avec qui j'ai pu apprécié nos échanges sur nos expériences de thèses respectifs. Je complète ma liste de remerciements à Agnès, Didier, Géraldine, Julia, Nadia, Philippe, Sylvie, ... Ma thèse a également été une expérience où j'ai pu rencontrer des gens formidables.

Je tiens à signaler que cette thèse a eu la chance d'être un travail collaboratif entre plusieurs équipes à travers le monde. De ce fait, je remercie le Pr. D. G. Castner de l'Université de Washington de Seattle pour son aide dans les analyses XPS et Tof-Sims. Je remercie aussi le Dr. M. D. M. Evans et Madame P. Bean du CSIRO de Sydney pour leurs aides dans l'étude cellulaire osseuse. Je remercie également les Dr. Galtayries et Dr. Mercier de l'Université ParisTech pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire afin d'effectuer des essais par QCM-D et PM-IRRAS notamment. J'allais presque oublier le Dr. A. Saleh-Mghir qui m'a permis de faire mes tests bactériens dans des conditions exceptionnelles et je remercie le Dr. H. Bouloussa avec qui j'ai pu apprécié de collaborer avec lui. La chance que j'ai eu de pouvoir travailler avec différentes équipes, je le dois au Pr. V. Migonney qui a su me faire partager son réseau. Cela a été un réel plaisir de pouvoir écrire mes articles scientifiques avec eux, j'ai su apprendre de leurs expériences tout au long de nos échanges. Cette thèse je la dois également à eux.

Je remercie également le Dr. F. Tétard pour son encadrement lors de mon monitorat au sein du département des Sciences des Procédés et des Matériaux de l'IUT de la Plaine Saint Denis.

Enfin, je remercie toute ma famille, mes amis extraordinaires qui savent que cette thèse a été un vrai challenge, je pense notamment à Julien et à mes amis de l'IUP : Magid (sa femme Maude), Ilyes, Hiba, Sofiane, Fares, Sandie, Aurélien, Cécile, Laëtitia,

Je vais conclure mes remerciements en remerciant mes amis de l'association Prémices, Shamir, Siam, Saliha, Sabrina, Aïcha, Sofiane, Karim, Rafik, ... et mes élèves. Je tiens à remercier Ibrahim et Lamine avec qui j'ai pu faire énormément de futsal, je remercie mon ami Ali pour sa joie de vivre, une personne simple qui se contente du minimum, sans artifices.

Pour finir, je remercie Safae qui m'a accompagné durant cette fin de thèse et qui m'accompagnera encore longtemps je l'espère.

Ces trois années n'ont pas été facile mais j'ai appris autant que possible et je remercie tout ceux qui m'ont aidés de près ou de loin. Je tiens à souligner le professionnalisme de ma directrice de thèse le Pr. V. Migonney et de ma co-encadrante le Dr. C. Falentin-Daudré. J'ai beaucoup appris à leurs côtés, Merci pour ces 3 ans !!! J'espère n'avoir oublié personne et il est temps pour moi d'aller commencer un nouveau challenge. J'espère que les lecteurs de cette thèse pourront apprécier ce travail de trois ans qui est le fruit d'un réel projet collaboratif entre plusieurs équipes internationales.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
ABBRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
PREMIER CHAPITRE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	22
REVIEW OF TITANIUM SURFACE MODIFICATION TECHNIQUES FOR ANTIBACTERIAL APPLICATIONS: PHYSICAL MODIFICATION, COATING, “GRAFTING FROM” AND “GRAFTING TO”	22
I. Introduction.....	23
II. Physical modification.....	26
1. Bacteriostatic materials	26
1.1. Polycations and polysaccharide coatings	26
1.2. « Smart » polymers.....	28
1.3. Nano-structures and surface structuring.....	29
2. Bactericidal materials.....	31
2.1. Polymer coating.....	31
2.2. Antimicrobial peptide coatings.....	31
2.3. Antibiotic and antiseptic coatings	32
i. Antibiotics	32
ii. Silver	33
iii. Chlorexidine	34
2.4. Ion-implanted surfaces	35
2.5. Photoactivable bioactive titanium.....	36
2.6. Nanomaterials	38
2.7. Nitride coatings	39
2.8. Citric acid	39
III. Chemical modification.....	40
1. Grafting from	40
2. Grafting to.....	41
2.1. Silane anchor	41
2.2. Catechol anchor.....	42
2.3. Phosphor-based anchor.....	43
IV. Discussions	46
V. Conclusion	47

VI. References.....	51
DEUXIÈME CHAPITRE : GRAFTING BIOACTIVE POLYMERS ONTO TITANIUM IMPLANTS BY UV IRRADIATION	57
I. Introduction.....	58
II. Experimental section.....	59
1. Materials	59
2. Grafting polyNaSS onto titanium surfaces	60
3. Instrumentation and measurements	60
4. Surface characterization	61
III. Results and discussions	62
IV. Conclusions.....	69
V. References.....	70
TROISIÈME CHAPITRE : GRAFTING POLY(STYRENE SODIUM SULFONATE) ONTO TITANIUM SURFACES USING BIO-ADHESIVE MOLECULES: SURFACE CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES	112
I. Introduction.....	116
II. Experimental Methods.....	118
1. Materials	118
2. Analytical Methods	119
3. Biological Assays	120
III. Results & Discussions	121
1. Preparation of Thiolated polyNaSS Macromonomer.....	121
2. Grafting of polyNaSS-SH onto the DA Functionalized Ti Surfaces.....	123
3. In vitro biological response	130
3.1. Protein Adsorption	130
3.2. Initial cell adhesion (spreading and morphology)	132
3.3. Cell proliferation.....	132
3.4. Cell differentiation and mineralization at day 25	135
IV. Conclusions.....	136
V. References.....	138
QUATRIÈME CHAPITRE : RAFT BASED GRAFTING OF POLYNASS ON TITANIUM DIRECTED AT BIOACTIVITY TO INHIBIT BACTERIAL ADHESION AND PROMOTE THE RESPONSE OF HUMAN BONE CELLS FOR IMPROVED OUTCOMES WITH ORTHOPEDIC DEVICES.....	140

I. Introduction.....	142
II. Materials and Methods	144
1. Materials	144
2. Methods.....	144
3. Characterization.....	146
4. Cell culture	147
5. Bacteria adhesion.....	148
III. Results and Discussions	149
1. Surface characterization	149
2. Evaluation of cell response	152
2.1. Initial cell adhesion (spreading and morphology)	152
2.2. Cell proliferation.....	154
2.3. Cell differentiation and mineralization at day 25	156
3. Bacteria adhesion - analysis	158
IV. Conclusions.....	162
V. References	164
CONCLUSION GÉNÉRALE	166
PERSPECTIVES.....	170
ANNEXE : SUPPLEMENTARY MATERIAL	171
Deuxième chapitre : Grafting Poly(Styrene Sodium Sulfonate) onto Titanium Surfaces using Bio-adhesive Molecules: Surface Characterization and Biological Properties	171

ABBREVIATIONS

AA : *A. actinomycetemcomitans*

AAPH : 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

ACVA : 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid)

Ag : Silver

Alb : Albumin

ALP : Alkaline phosphatase

Amo : Amoxicillin

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ATB : Antibiotic

ATR-FTIR : Attenuated total reflectance - fourier transform infrared

ATRP : Atom transfer radical polymerization

BF : *Bacteroides fragilis*

BHI : Brain heart infusion

BSA : Bovine serum albumin

CA : *Candida albicans*

Carbe : Carbenicillin

CAS : Caspofungin

Cefa : Cefamandol

Cepha : Cephalothin

CH : Chitosan

CMCS : Carboxymethyl chitosan

CRP : Controlled radical polymerization

CSIRO : Commonwealth scientific and industrial research organisation

CTG : cell tracker green

\mathcal{D} : Dispersity

D₂O : Deuterium oxide

DA : Dopamine acrylamide

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

dH₂O : Distilled water

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DP_n : Degré de polymérisation en nombre

dPPP : depleted poor platelet plasma
EH : *Enterococcus hirae*
E. coli (EC) : *Escherichia coli*
FBS : Fetal bovine serum
Fg : Fibrinogen/fibrinogène
Fn : Fibronectin/Fibronectine
FN : *Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)*
Fn-BPA : Fibronectin-binding protein A
Fn-BPB : Fibronectin-binding protein B
Genta : Gentamicin
GPC-SEC : Gel permeation chromatography – Size exclusion chromatography
HA : Hyaluronic acid
H.A.I : hospital-acquired infections
HBVP-co-DMMEP : 4-vinyl-*N*-hexylpyridinium bromide-co-dimethyl(2-methacryloyloxyethyl)
IP6 : Myo-inositol hexaphosphate
LBPS : Laboratoire de biomatériaux pour la santé
LCST : Low critical solution temperature
LI : *Listeria ivanovii*
LS : *Lactobacillus salivarius*
Mag I : Magainin I
MAPC1 : Dimethyl(2-methacryloyloxy-ethyl) phosphonate
Meli : Melimine
Mino : Minocycline
ML : *Micrococcus lylae*
Mn : Number average molar mass
MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaSS : Sodium styrene sulfonate ou styrene sulfonate de sodium
NESAC Bio : National electron spectroscopy for chemical analysis and surface analysis center for biomedical problems
NIPAM : *N*-isopropylacrylamide
NMP : Nitroxide mediated polymerization
NMR : Nuclear magnetic resonance
PA : *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*
PBS : Phosphate buffered saline

PDMS : Poly(dimethyl siloxane)

PEG : Polyethylene glycol

PEI : Polyethylenimine

PG : *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

PLL : Poly(L-lysine)

PM-IRRAS : Phase modulation infrared reflection ansoption spectroscopy ou spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)

pNPP : p-Nitrophenyl phosphate

PolyMA : Poly(methacrylic acid)

PolyNaSS : Poly(sodium styrene sulfonate)

PolyNIPAM : poly(*N*-isopropylacrylamide)

PPP : Poor platelet plasma

PRC : Polymérisation radicalaire contrôlée

PTH : Prothèse totale de hanche

QCM-D : Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring

RAFT : Reversible addition fragmentation transfer

ROS : Reactive oxygen species

rt : Room temperature

SA : *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Saos-2 : Sarcoma osteogenic

SATT IdF : Sociétés d'accélération du transfert de technologie d'Ile de France

SDM : Standard deviation mean

SE : *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

SEC : Size exclusion chromatography

SEM-EDS : Scanning electron microscopy - Energy dispersive X-ray spectroscopy

SF : *Shigella flexneri*

SPI031 : *N*-alkylated 3, 6-dihalogenocarbazol 1-(sec-butylamino)-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propan-2-ol

StG : *Streptococcus gingivalis* (*Strep. gingivalis*)

StGo : *Streptococcus gordonii* (*Strep. gordonii*)

StM : *Streptococcus mutans* (*Strep. mutans*)

StO : *Streptococcus oralis* (*Strep. oralis*)

StP : *Streptococcus pneumoniae* (*Strep. pneumoniae*)

StS : *Streptococcus salivarius* (*Strep. salivarius*)

StSa : *Streptococcus sanguinis* (*Strep. sanguinis*)

TB : Toluidin Blue

TCPS : Tissue culture polystyrene

TCS : Trypto-Caseine-Soja

Tet213 : Antimicrobial peptide (KRWWKWWRRRC)

Tetra : Tetracyclin

Ti : Titanium

Ti6Al4V : Alliage de titane composé essentiellement de titane, 6% d'aluminium et 4% de vanadium

TiN : Titanium nitride

Ti-PR : Greffage contrôlé sur titane

Ti-TH : Greffage thermique sur titane

Ti-UV : Greffage UV sur titane

TNT : Titanium nanotubes

Tobra : Tobramycin

Tof-SIMS : Time-of-flight secondary ion mass spectrometry

UMR : Unité mixte de recherche

UP13 : Université Paris XIII

UV : Ultraviolet

VAN : Vancomycin

VBP : Vinylbenzylphosphonate

VP : *Vibrio parahaemolyticus*

XPS : X-ray photoelectron spectroscopy

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans le domaine des biomatériaux et des dispositifs médicaux, l'utilisation du titane et de ses alliages tout comme celle des polymères connaît un essor considérable. En effet, avec le vieillissement croissant de la population, les besoins médicaux augmentent au même rythme que l'exigence des patients qui souhaitent conserver un degré de confort élevé. Les prothèses et tous les dispositifs médicaux implantables répondent aux nombreuses pathologies liées à l'âge. C'est dans cette optique que l'équipe du « Laboratoire de Biomateriaux Pour la Santé » (LBPS) dirigée par le Pr. V. Migonney s'est intéressée depuis une vingtaine d'années au greffage de polymères d'intérêt thérapeutique tel que le poly(styrène sulfonate de sodium) (polyNaSS) sur des surfaces prothétiques métalliques en titane ou en alliage de titane, polymères en poly(téréphtalate d'éthylène glycol), silicone ou même poly(caprolactone). Pour mettre au point des prothèses innovantes, l'équipe LBPS collabore depuis de nombreuses années avec des partenaires industriels. Dans le cas des prothèses de hanche en alliage de titane Ti6Al4V une collaboration étroite s'est établie avec la société CERAVÉR afin de proposer une prothèse de hanche capable de favoriser l'ostéointégration et de diminuer voire de prévenir l'infection bactérienne. En effet, la société CERAVÉR est spécialisée dans le domaine des prothèses articulaires (épaule, genou, hanche) et travaille depuis plus de 15 ans avec l'équipe du Pr. V. Migonney pour proposer une prothèse de hanche innovante « ACTISURF » qui améliore la biointégration dans les tissus osseux et prévient l'infection : la prothèse ACTISURF est en phase d'étude clinique chez l'homme depuis quelques mois.

L'articulation de la hanche permet la jonction entre le tronc et le membre inférieur en mettant en relation l'os iliaque et le fémur (**Figure 1**). Sa stabilité en tant que support du poids est renforcée par de puissants ligaments et la texture torsadée de sa capsule. Toutefois, sa fragilité est dominée par son col trop long en porte-à-faux et peut aboutir à la fracture du col du fémur, fracture la plus fréquente chez les personnes âgées puisqu'elle touche des dizaines de milliers de personnes chaque année en France.¹ Cette fracture est dans la plupart des cas favorisée par l'ostéoporose, c'est-à-dire la perte de densité et de résistance de la matière osseuse. Cette fracture qui touche le col du fémur survient le plus souvent après une chute et entraîne une impotence fonctionnelle. L'arthroplastie de la hanche, ou la mise en place d'une prothèse totale de hanche (PTH), consiste à remplacer la hanche malade par une articulation artificielle. Le but de cette chirurgie est de soulager la douleur et d'améliorer les mobilités de l'articulation endommagée. L'arthroplastie totale de hanche est devenue une intervention orthopédique de routine, avec environ 140 000 PTH implantées par an en France ; on compte par ailleurs plus de 14 000 révisions de prothèse.¹

Les deux problèmes majeurs consécutifs à l'arthroplastie de hanche sont : i) la complication septique pouvant aller jusqu'au descellement septique, qui est un phénomène commun à tout type d'intervention chirurgicale et ii) le descellement aseptique. La complication septique est redoutée par le chirurgien car si l'infection est un phénomène rare elle est toujours grave ; son incidence actuelle est estimée à 1,5 à 2% selon la littérature.² Le traitement de l'infection sur prothèse est à la fois médical et chirurgical. Le traitement médical est axé sur l'utilisation d'antibiotiques alors que le traitement chirurgical est varié et sera toujours lié au traitement médical. En cas d'infection précoce (durant le 1^{er} mois après l'opération), un lavage sans changement de la prothèse peut être efficace. En revanche, en cas d'infection dite tardive, il est nécessaire dans la majorité des cas d'effectuer un retrait de la prothèse puis une réintervention pour poser une prothèse de deuxième intention.

Le descellement aseptique est aujourd'hui la première cause d'échec d'une arthroplastie totale de hanche. Remplacer de façon définitive une partie du corps par un matériau artificiel demeure une utopie et la PTH n'échappe pas à la règle. La durée de vie espérée des prothèses actuelles varie de 15 à 25 ans (25 ans pour 95% des PTH) et une prothèse sur dix devra être remplacée.¹ Ce nombre ne pouvant qu'augmenter car les patients sont de plus en plus jeunes et de plus en plus actifs. La cause principale d'échec est l'usure des surfaces tête de prothèse et cotyle ; même si des progrès ont été réalisés sur les couples de frottement, l'usure nulle n'existe pas. La pièce la plus dure use la plus souple, libérant dans l'articulation des « particules d'usure ». Ces particules de tailles et de natures différentes sont à l'origine de réactions inflammatoires aiguës puis chroniques dite « à corps étranger ». La taille de ces particules joue un rôle majeur sur le contrôle de la réponse inflammatoire. En effet, lorsque les particules sont peu nombreuses et de petite taille, elles peuvent être naturellement « phagocytées » par l'organisme, par le biais d'une réaction inflammatoire naturelle de défense contrôlée. Cependant dès lors que leur taille et leur nombre augmentent, la phagocytose ne peut pas se produire et la réaction inflammatoire chronique conduit à une fibrose, voire une ostéolyse et à un descellement dit aseptique qui limite la durée de vie de la prothèse. Des progrès majeurs ont été obtenus avec l'utilisation du couple Alumine/Alumine qui permet de diminuer significativement le nombre et la taille des débris ; ce couple de frottement constitue le « gold standard » pour la PTH.

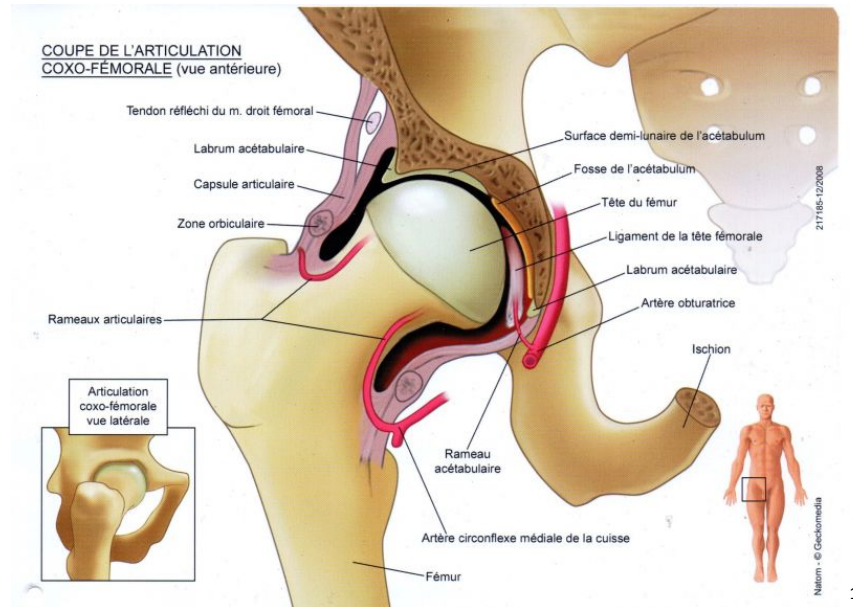


Figure 1 : Représentation anatomique de l'articulation de la hanche (vues latérale et antérieure).

L'utilisation d'un revêtement de PTH constitué d'un polymère bioactif greffé par liaison covalente sur la surface prothétique en titane est une des solutions permettant d'éviter les descellements septiques et/ou aseptiques de la prothèse et d'augmenter la durée de vie d'une PTH. L'équipe LBPS travaille depuis de nombreuses années sur ce sujet et a mis au point dès les années 2000, le greffage radicalaire de polymères anioniques sur la surface du titane et de ses alliages par voie dite « thermique ».³⁻⁷ Le greffage par voie thermique s'effectue en deux étapes : activation de la surface par oxydation pour créer des hydroperoxydes de titane qui par augmentation de la température se décomposent pour créer des radicaux libres en surface. Ces derniers permettront l'amorçage de la polymérisation radicalaire du styrene sulfonate de sodium (NaSS) à partir de la surface (technique du « grafting from »). Les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* des surfaces de titane et d'alliage de titane Ti6Al4V greffées de polyNaSS montrent l'amélioration sensible de l'ostéointégration et la prévention de l'infection ce qui a conduit à l'accord de l'ANSM pour la réalisation par la société CERAVÉR d'une étude clinique multicentrique chez l'Homme.⁸⁻¹⁰ La technologie du greffage thermique du polyNaSS sur des implants de titane (et ses alliages) a été brevetée par le LBPS/UP13 et la société Ceraver a pris une licence sur ce brevet afin de pouvoir commercialiser le procédé dès la fin des essais cliniques (2 ans). Depuis, le LBPS continue à étudier et travailler sur le greffage radicalaire du polyNaSS sur le titane dans le but de comprendre et d'améliorer le processus. En effet, cette innovation repose sur le greffage de polymères bioactifs à la surface du titane par amorçage thermique qui est très efficace et reproductible mais par forcément

¹ Image provenant d'internet

« idéal » pour une réalisation à l'échelle industrielle : le procédé (**Schéma 1**) est coûteux en termes de temps de polymérisation (15 hrs) et de quantité de réactif (monomère).

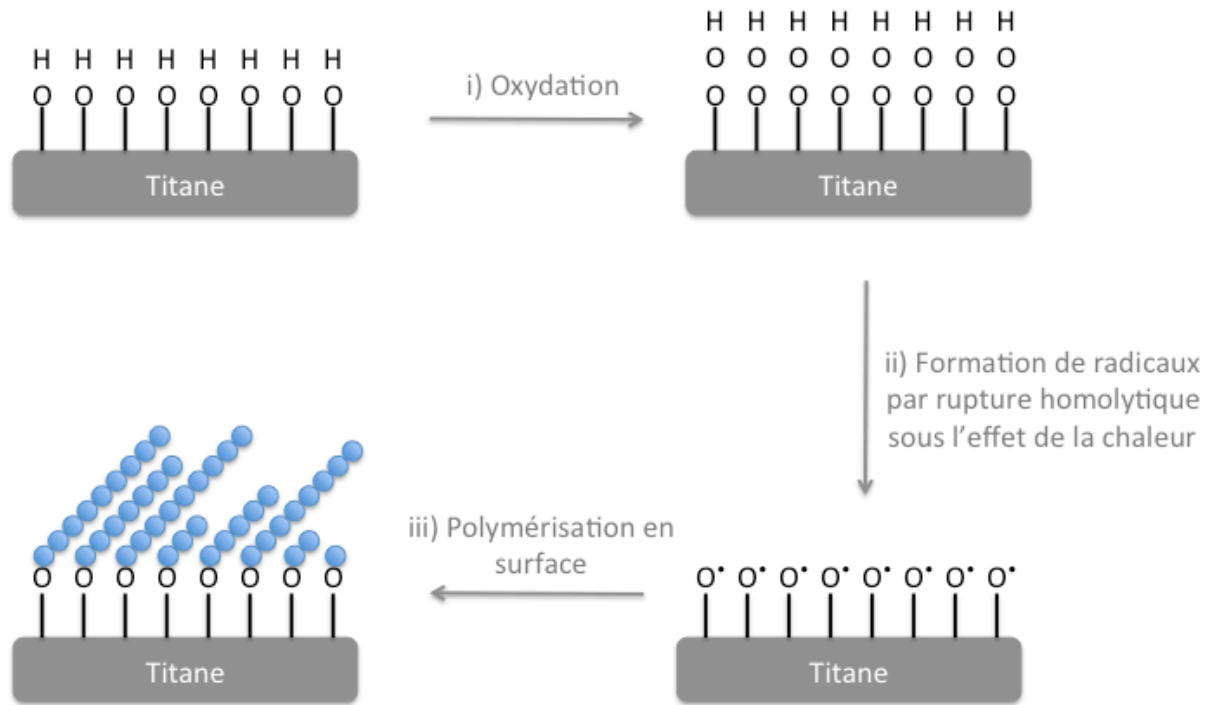


Schéma 1 : Représentation schématique de la technique de « grafting from » ou greffage à partir de la surface par voie thermique.

Afin d'améliorer le procédé de greffage du polyNaSS sur le titane, nous avons substitué l'énergie apportée par la chaleur par l'énergie apportée par le rayonnement ultraviolet (UV). C'est la technique de greffage radicalaire du polyNaSS sur le titane en utilisant les rayonnements UV qui fait l'objet d'une partie des travaux de ce manuscrit. Le procédé qui sera décrit de façon extensive a fait l'objet d'un brevet LBPS/UP13 qui a été déposé par la SATT IdF Innov en août 2015 avec une demande d'extension européenne en 2016¹¹ et d'une publication scientifique dans *RSC Advances* en 2016.¹²

Les technologies développées par le LBPS permettent de greffer des polymères bioactifs à la surface du titane par voie radicalaire « classique » c'est à dire radicalaire non contrôlée ce qui conduit en principe à la polymérisation de chaînes de tailles variables. Il est difficile voire impossible avec les techniques existantes de déterminer précisément la taille des chaînes macromoléculaires greffées. Cependant, la collaboration établie entre le LBPS (Pr. V. Migonney) et le centre NESAC/Bio (Pr. D. G. Castner) nous a permis d'évaluer par XPS et ToF-SIMS la valeur moyenne de la taille des

chaînes à quelques Angstrom (DP_n très faible, domaine des oligomères) les chaînes de polyNaSS sont donc très courtes. Afin de déterminer si la taille des chaînes de polyNaSS a une influence sur la réponse biologique, nous avons entrepris - c'est la majeure partie de cette thèse - de développer une technique permettant de greffer des chaînes de polyNaSS de tailles précises et définies sur ces mêmes surfaces pour comparer *in fine* les réponses biologiques des surfaces de titane greffées de polyNaSS selon des techniques de greffages différentes.

Le procédé que nous avons choisi pour réaliser le greffage de chaînes de polyNaSS définies et contrôlées sur les surfaces de titane est un procédé de « grafting to » qui consiste à fixer les chaînes de polyNaSS préalablement synthétisées par polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) par une réaction de thiol-ène click entre la surface de titane préalablement modifiée par l'ancrage d'un dérivé de la dopamine porteur d'un groupement « alcène » avec le polyNaSS porteur d'un groupement « thiol » .

Pour rappel, à la différence de la polymérisation radicalaire classique, la PRC permet la synthèse de systèmes polymères de compositions variées (**Figure 2**), d'architectures macromoléculaires complexes (**Figure 3**) ou la mise en place de fonctionnalités particulières (**Figure 4**).

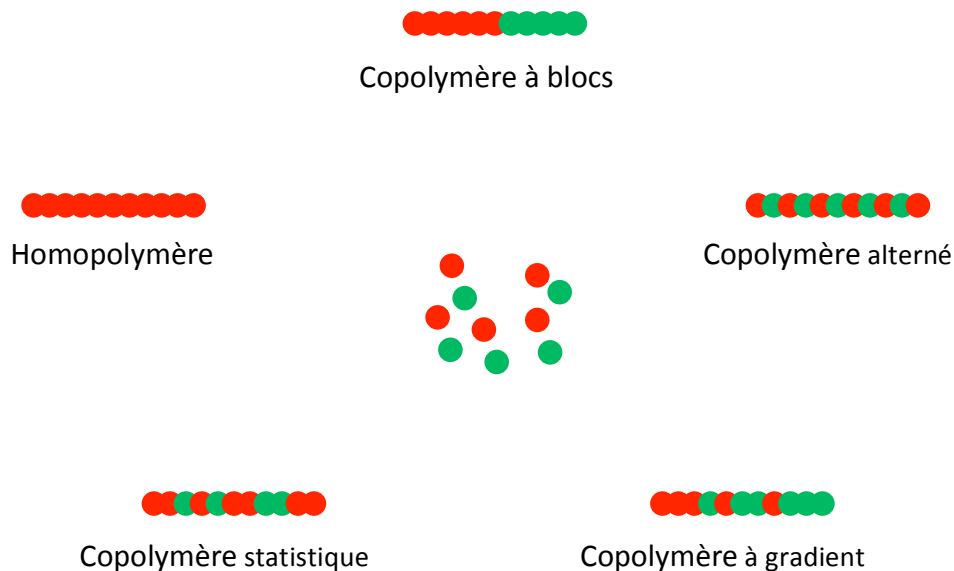


Figure 2 : Différents polymères envisageables par PRC.

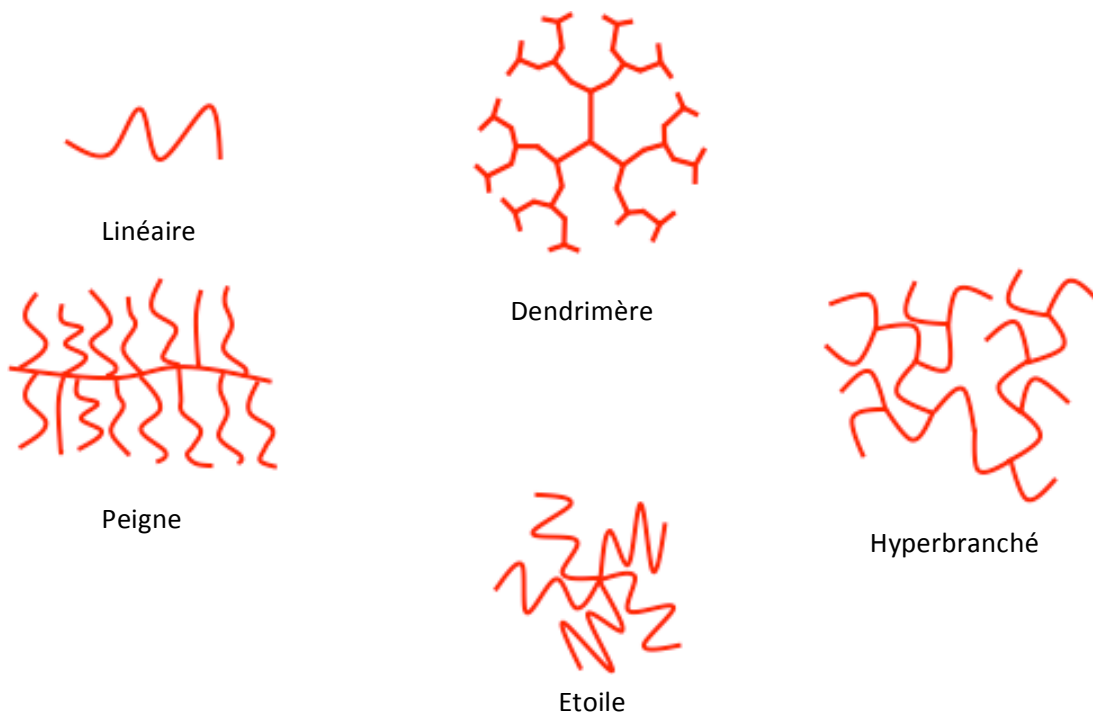


Figure 3 : Quelques exemples d'architectures possibles en PRC.

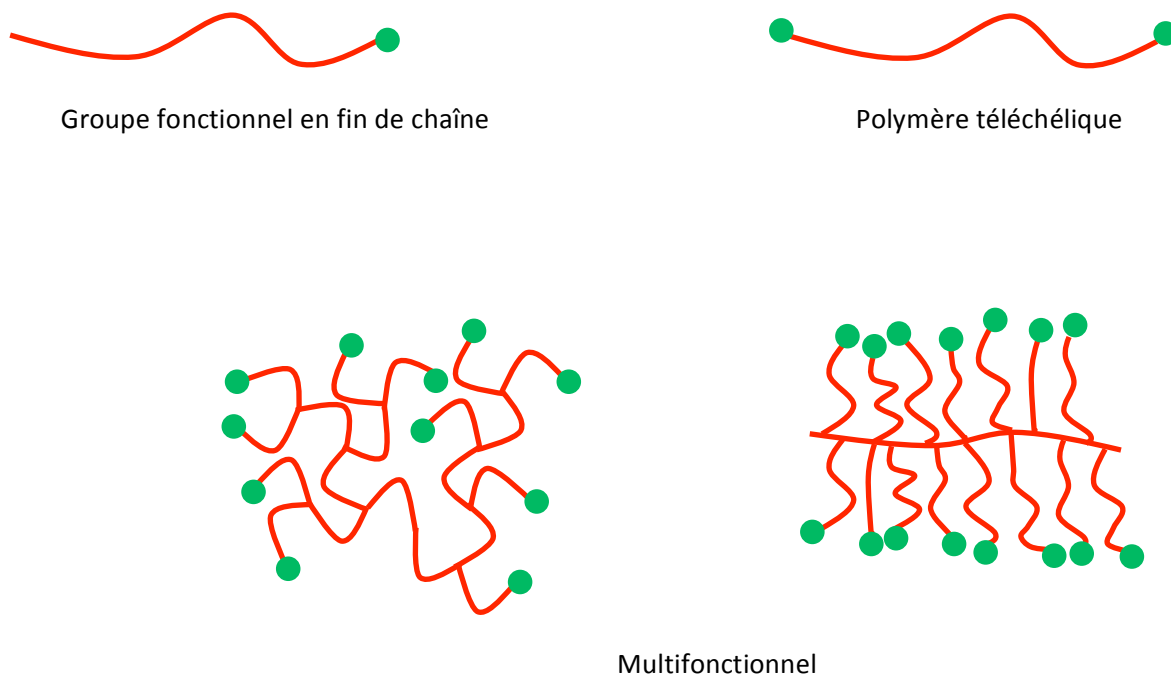


Figure 4 : Quelques exemples de polymères fonctionnels par PRC.

Parmi les techniques de polymérisation de la PRC, on en distingue 3 principales : i) la polymérisation par transfert d'atomes ou Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP), ii) la polymérisation en présence de nitroxyde ou Nitroxyde Mediated Polymerization (NMP) et iii) la polymérisation radicalaire par transfert de chaînes réversibles ou Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT). Notre choix parmi ces techniques, s'est porté sur la polymérisation de type RAFT pour les raisons suivantes :

- l'ATRP¹³⁻¹⁵ présente un désavantage lié à la présence nécessaire d'un catalyseur métallique ou de ligands à base d'amine, qu'il convient d'éliminer pour certains domaines d'application.
- la NMP nécessite des températures de réaction importantes et des temps de polymérisation long.¹⁶ De plus, il est difficile de contrôler les réactions de polymérisation avec des espèces dite de méthacrylate.¹⁶
- la polymérisation RAFT est plus simple et plus versatile ; elle offre des cinétiques de polymérisation plus rapides, des températures de polymérisation plus faibles et permet l'utilisation d'un plus grand nombre de monomères et ne nécessite par l'utilisation de composés métalliques.¹⁶

Durant cette thèse, nous avons donc utilisé la polymérisation RAFT pour synthétiser des polyNaSS modèles car elle nous a paru la plus adaptée pour le greffage de polymères bioactifs d'architecture contrôlées sur des surfaces de titane destinées à des applications médicales .

Dans ce manuscrit, nous allons pouvoir comparer deux techniques distinctes de greffage de polyNaSS à la surface du titane: le « grafting from » et le « grafting to ».

Le « grafting from » est une méthode directe qui permet d'amorcer la polymérisation du NaSS à partir de la surface du titane (voir **Schéma 1**). Pour cela nous avons utilisé deux types d'énergie pour générer les radicaux, la chaleur pour le greffage par voie « thermique » et le rayonnement pour le greffage par voie « UV ». L'utilisation des UVs nous a permis d'optimiser les conditions du greffage de type « grafting from » - en diminuant le temps de polymérisation de 15 h (voie thermique) à 1 h (voie UV).

Le « grafting to » est une méthode de greffage indirecte puisque les polymères sont synthétisés par polymérisation RAFT avant d'être greffés à la surface du titane.

L'étude des réponses biologiques des différentes surfaces de titane greffées de polyNaSS par les techniques de greffage « from » et « to » permet de mettre en évidence un effet de l'architecture

du polymère greffé sur la réponse biologique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont divisés en quatre chapitres constitués par des articles scientifiques - une revue¹⁷ et trois articles^{12,18,19} - et un brevet français et européen.¹¹

Le premier chapitre est une revue¹⁷ dédiée à l'état de l'art des techniques de modification de la surface du titane permettant d'obtenir une activité anti-bactérienne. C'est une revue non exhaustive divisée en deux parties : i) les modifications physiques de la surface du titane et ii) les modifications chimiques de la surface du titane et leurs influence sur la réponse bactérienne.

Dans le deuxième chapitre, c'est la technique de « grafting from » par amorçage UV qui est présentée sous la forme d'un article scientifique publié dans *RSC Advances*¹² et d'un brevet français et européen¹¹ en détaillant le mécanisme d'amorçage par voie UV et les paramètres étudiés pour proposer un protocole optimisé du greffage de polyNaSS sur le titane par comparaison au greffage par voie thermique.

Le troisième chapitre, regroupe les travaux réalisés pour mettre au point la technique de « grafting to » sur la surface du titane : la synthèse par polymérisation RAFT de polyNaSS de tailles variables et contrôlées et la fixation des chaînes polymériques à la surface du titane par l'intermédiaire d'une molécule d'ancrage dérivée de la dopamine.

Le quatrième chapitre, présente les résultats des études biologiques *in vitro* réalisées au CSIRO par le Dr. M. D. M. Evans pour la partie « réponse cellulaire d'ostéoblastes » (ostéointégration) et à l'hôpital Raymond Poncaré de Garches en collaboration avec le Dr A. Saleh Mghir pour la partie réponse bactérienne (inhibition de l'adhésion bactérienne souche clinique méthicilline résistante de *S. aureus*). Ces études de la réponse biologique des surfaces greffées de polyNaSS par « grafting from » (thermique et UV) et par « grafting to » montrent l'influence de la structure du polymère greffé.

- 1 OCDE, Panorama de la santé 2013 : Les indicateurs de l'OCDE, Éditions OCDE (2013).
- 2 HAS, Recommandation de bonne pratique. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation (2014).
- 3 A. Michiardi, et *al.*, *Acta Biomaterialia* 6, 647-675 (2010).
- 4 F. Anagnostou, et *al.*, *Biomaterials* 27, 3912-3919 (2006).
- 5 V. Migonney, G. Hélyary, F. Noirclere, "Method for grafting bioactive polymers on prosthetic materials", WO patent 2007/141460 A3, 2006.
- 6 G. Hélyary, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
- 7 G. Hélyary, F. Noirclere, J. Mayingi, B. Bacroix, V. Migonney, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 655-663 (2010).
- 8 H. Felgueiras, M. D. M. Evans, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 28, 225-233 (2015).
- 9 H. Felgueiras, V. Migonney, *IRBM* 37, 165-171 (2016).
- 10 H. Felgueiras, A. Decambron, M. Manassero, L. Tulasne, M. D. M. Evans, V. Viateau, V. Migonney, *J. of Coll. and Int. Sci.* 491, 44-54 (2017).
- 11 V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudré, H. Chouirfa, WO/2017/025519 (2016).
- 12 H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, *RSC Advances* 6, 13766-13771 (2016).
- 13 J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *Journal of the American Chemical Society* 117, 20, 5614-5615 (1995).
- 14 J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* 28, 23, 7901-7910 (1995).
- 15 M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* 28, 1721-1723 (1995).
- 16 R. B. Grubbs, *Polymer Reviews* 51, 104-137 (2011).
- 17 H. Chouirfa, H. Bouloussa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, not yet submitted.
- 18 H. Chouirfa, et *al.*, *Biointerphases* 12, 02C418 (2017).
- 19 H. Chouirfa, et *al.*, not yet submitted.

PREMIER CHAPITRE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

REVIEW OF TITANIUM SURFACE MODIFICATION TECHNIQUES FOR ANTIBACTERIAL APPLICATIONS: PHYSICAL MODIFICATION, COATING, “GRAFTING FROM” AND “GRAFTING TO”

Les infections bactériennes et parmi celles-ci les infections sur matériels prothétiques encore appelées infections à corps étrangers, représentent un problème majeur de santé publique, contre lequel l'antibiothérapie reste la solution la plus utilisée. Néanmoins, le recours systématique aux antibiotiques a conduit à l'apparition de mutations bactériennes et au développement de souches résistantes aux antibiotiques. Les solutions permettant de lutter contre ce fléau de plus en plus difficile à juguler sont limitées et font l'objet de nombreuses études et/ou de recherches. Ainsi pour lutter contre les infections à corps étranger et réduire le recours aux antibiotiques, des solutions innovantes telles que la modification de surface des implants par des molécules actives vis à vis des bactéries sont proposées.

Le chapitre qui suit est une revue des travaux récents développés sur ce sujet de l'infection à corps étranger circonscrit aux infections utilisant un matériau en titane. Il regroupe les principales techniques de modification de surface capables de conférer une activité antibactérienne à la surface du titane. Cette activité peut être de type « bactériostatique » lorsqu'elle permet de stopper l'adhésion et la prolifération bactérienne ou bactéricide lorsqu'elle conduit à la mort des bactéries. Parmi les moyens permettant de lutter contre les bactéries responsables des infections sur prothèses, on trouve le recouvrement de la surface du titane par différentes structures actives (antibiotiques, polymères, fonctions chimiques) a montré des résultats prometteurs. Une liste des principaux moyens permettant à une surface de titane d'avoir une propriété anti-bactérienne est proposée.

Implanted biomaterials play a key role in the current success of orthopaedic and dental procedures. Pure titanium and its alloys are the most commonly used materials for permanent implants in contact with bone. However, implant-related infections remain among the leading reasons for failure. The most critical pathogenic event in the development of infection on biomaterials is biofilm formation, which starts immediately after bacterial adhesion. In the last decade, numerous studies reported the ability of titanium surface modifications to minimize bacterial adhesion, inhibit biofilm formation and provide effective bacterial killing to protect implanted biomaterials. In the present review, the different strategies to prevent infection onto titanium surfaces are reported: surface modification by antibiotics, antimicrobial peptides, inorganic antibacterial metal elements and antibacterial polymers.

I. Introduction

Titanium (Ti) was discovered in 1790 and was firstly used as paint additive to obtain white color. Following the second half of the twentieth century, titanium and its alloys started to be widely used in industry as well as in the biomedical field, particularly in bone fusion, bone fixation and joint replacement surgery (arthroplasty). Due to their physical and chemical properties, their good corrosion resistance and biocompatibility, these materials have been, for decades successfully employed as artificial implants in dental and orthopaedic surgery.¹⁻³

Various etiologies of instrumentation failure related to the use of titanium are reported, all of which represent a heavy burden on patient health and healthcare costs nationwide.⁴⁻⁶ Microbial infection is one of the main causes of implant failure.^{4,5} Despite tremendous advances in the quality of healthcare, the probability of infection during a surgical procedure is still high. Currently, the global infection risk is <5% in orthopaedic surgery.⁷ Orthopaedic biomaterials are diverse and used in high volumes, which made hospital-acquired infections (H.A.I or nosocomial infections) a public health priority in developed countries. During the course of surgery, implants are susceptible to bacterial contamination from both skin and mucous membranes.⁶ These device-associated infections can rapidly progress as planktonic bacteria first adhere to an implant interface and ultimately evolve into biofilms.⁸ Bacteria cause various forms of nosocomial infections. *S. aureus* is responsible for H.A.I of surgical wounds and, together with *Staphylococcus epidermidis*, causes infections associated with indwelling medical devices.^{9,10} Biofilm-associated infections represent a medical and surgical challenge by the destruction of the adjacent tissue leading to poor vascularization, implant loosening, detachment or even dislocations.¹¹ Difficulties raised by the diagnosis of implant-related bone infections account for the systematic need to rule it perioperatively, especially in the setting of

any aggressive treatment addressing implant failure.

Bacterial adhesion is generally described by two stages resulting in mature biofilm formation, as illustrated in **Figure 1**. Stage I is the initial interaction which is rapid and reversible between the bacterial cell surfaces and the material surfaces, while stage II involves specific and nonspecific interactions between proteins on the bacterial surface structures (fimbriae or pili) and binding molecules on the material surface. Stage II is slowly reversible and often termed as irreversible. Thus, it is critical to suppress and eventually eradicate implant-related infections. However, once a mature biofilm has developed on any implant surface, bacterial eradication becomes highly challenging despite the use of antibiotic therapy and repeated surgical irrigation and debridement. Poor penetration of antibiotics due to the biofilm exopolysaccharidic matrix, scarce vascularization, high implant surface, small colony variants or persister cells through mutations of metabolic genes account for the necessity to perform hardware removal whenever simple irrigation and debridement procedures fail to cure infections related to implanted devices. The emergence of resistant strains potentially represents an additional issue whenever antibiotics are administered. To date, no treatment can guarantee rapid and complete biofilm destruction or prevent infection recurrence. Therefore, long-term clinical success depends upon the antimicrobial properties of the implanted materials. Currently, implanted medical devices are still unable to actively resist bacterial adhesion, colonization, and biofilm formation.

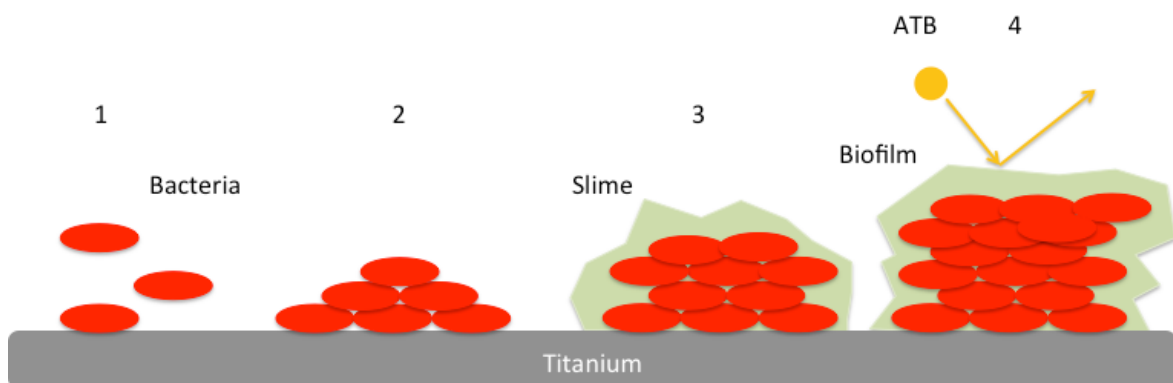


Figure 1: Illustration of the process of titanium surface colonization starting from individual bacterial adhesion across micro-colonies towards formation (1 + 2) and maturation of biofilm (3) which protects against host immune response and antibiotics (ATB).

The prevention of biofilm formation by antimicrobial surfaces is the best way to avoid both the spread of pathogens and material deterioration. To this end, materials must prevent primary adhesion of living planktonic microbial cells from their environment. In general, this can be achieved by either repelling or killing approaching bacteria (**Figure 2**). Surface modification of implanted devices is an effective way to reduce the occurrence of implant-associated infections. Surface

functionalization is a relatively straightforward method to modify interfacial properties of medical devices without disrupting bulk properties of materials.

Numerous antibacterial macromolecules,^{12,21-27} antimicrobial peptides,²⁸⁻³⁶ inorganic antibacterial metal elements (silver, copper, zinc, ...) ^{44,46-87,96-120} and antibiotics^{7,37-45} were used to immobilize antimicrobial molecules onto implant interfaces. Furthermore, various strategies, including physical adsorption and chemical covalent conjugation (“grafting to” and “grafting from” approaches) were applied to immobilize antimicrobials onto titanium surfaces.¹³³⁻¹⁵⁴

The aim of this review is to collect and compare studies reporting titanium surface modification in order to confer antibacterial properties on implants by using antibacterial coatings, introducing inorganic antibacterial agents or grafting bioactive molecules.

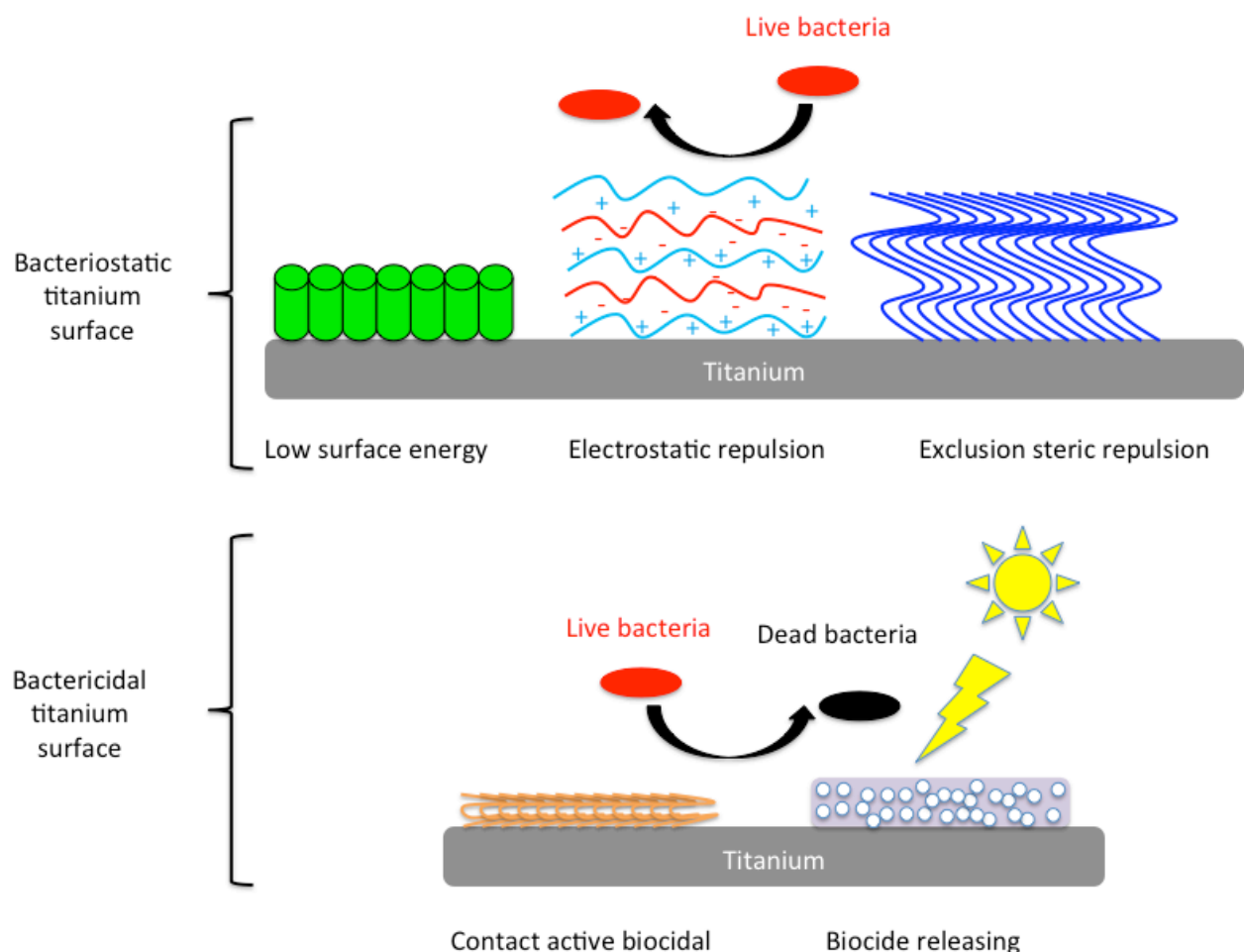


Figure 2: Various examples of antimicrobial surfaces according to mechanism of action: bacteriostatic or bactericidal surfaces.

II. Physical modification

1. Bacteriostatic materials

Bacteriostatic titanium surfaces can be designed by hydrogel coatings mostly based on PEG or similar hydrogel forming polymers, by highly negatively charged polymers or ultrahydrophobic modifications. Besides, a change in the surface chemistry and/or structure of the bulk implant can be achieved either by chemically or physically altering the TiO₂ surface layer (e.g., oxidation or mechanical modifications such as roughening/polishing/texturing).

1.1. Polycations and polysaccharide coatings

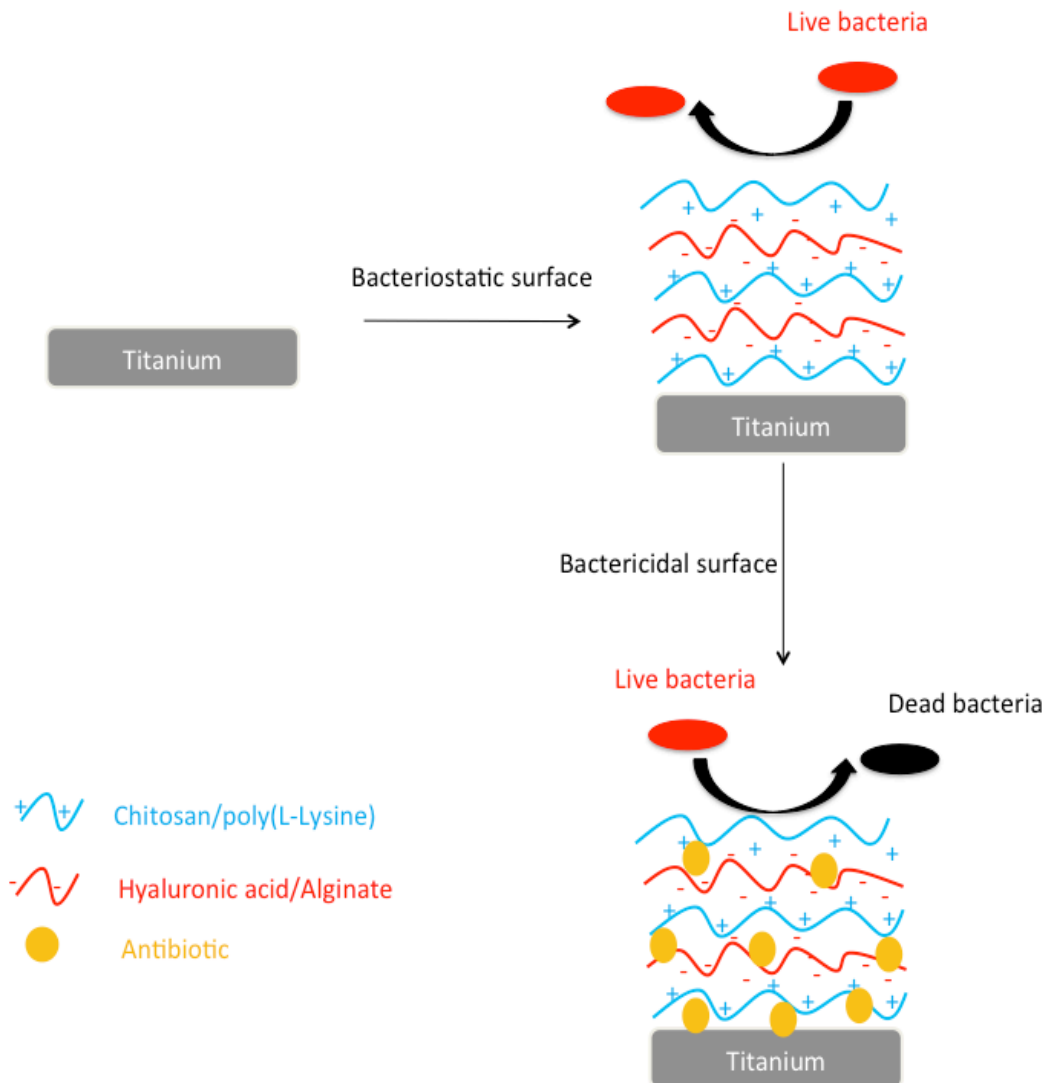
Several authors¹²⁻¹⁴ associated the RGD peptide with a macromolecule such as a polycation (poly(L-lysine) PLL), a polysaccharide (chitosan), a polymer (poly(ethylene glycol) PEG). Harris et al.¹² designed an innovative macromolecule PLL-*g*-PEG-RGD which was coated on the titanium surface. The amount of reduction for both *S. aureus* and *S. epidermidis* was 98%, 93-95% for *S. mutans*, and 88% for *P. aeruginosa*.¹³ Yet, this was essentially the result of the PLL-*g*-PEG and not the RGD peptide. Indeed, longer polymer chains reduce Lifshitz-Van der Waals forces and permit bacterial adhesion decrease (*S. aureus*). This observation was also found by Chua et al.¹⁴ following the coating of titanium surfaces with several layers of two polysaccharides (hyaluronic acid (HA) and chitosan (CH)). Their strategy was to incorporate RGD peptides into the layers. The antibacterial effect resulted from the combined effect of the two polysaccharides and averaged an adhesion reduction of 80% on *S. aureus*.

Chua et al.¹⁵ showed an adherence decrease of *E. coli* and *S. aureus* using different layers of chitosan and hyaluronic acid. Bacterial adhesion is increased on hydrophobic materials. The rationale was that coating with hydrophilic polymers as HA and CH rendered treated surfaces more hydrophilic (water contact angle \approx 33-44°). Thus, the inhibitory effects of HA/CH layers against bacterial adhesion may be attributed to the increased surface hydrophilicity.

Tamerler et al.¹⁶ designed bifunctional peptides with a high-affinity Ti-binding property on the one end and an antimicrobial (AMP) motif on the other end. AMP is composed of several Arg and Lys units which are well-known for cationic properties. Surfaces modified with both chimeric peptides were found to significantly reduce bacterial adhesion against *S. mutans*, *S. epidermidis*, and *E. coli* compared to pure titanium.¹⁶

Polysaccharides such as chitosan and hyaluronic acid could inhibit the adhesion of bacteria to titanium^{17,18} since they were claimed to interfere with surface linkage between titanium and biofilm. In fact, in one study, antibacterial multilayer coatings loaded with minocycline, which is a broad-spectrum tetracycline antibiotic, on Ti surface substrates using chitosan and alginate were made based upon a layer-by-layer (LbL) self-assembly technique.¹⁹ Regarding chitosan and alginate coatings, they are thought to have a surface charge and hydrophilicity that could be biostatic, hence maintaining the antibacterial ability after the complete release of minocycline. This also resulted in an improved sustainability of minocycline release. Thus, the antibacterial activity was improved. This type of strategies could inhibit the immediate colonization of bacteria onto implant surfaces in the course of dental implant surgery, and thereby prevent and reduce the occurrence of peri-implantitis.¹⁹ Such coatings, similar to numerous polymeric coatings, have unknown effects under mechanical constraints. Thus, if such coatings are applied on implants, a careful insertion without screwing is recommended to preserve the coating . Nevertheless, this is deemed to be impractical for implant application.

Scheme 1 represents the concept of the LbL with bacteriostatic or bactericidal purposes just by introducing an antibiotic. By layering different appropriate polymers, titanium surfaces are functionalized accordingly and display new features.



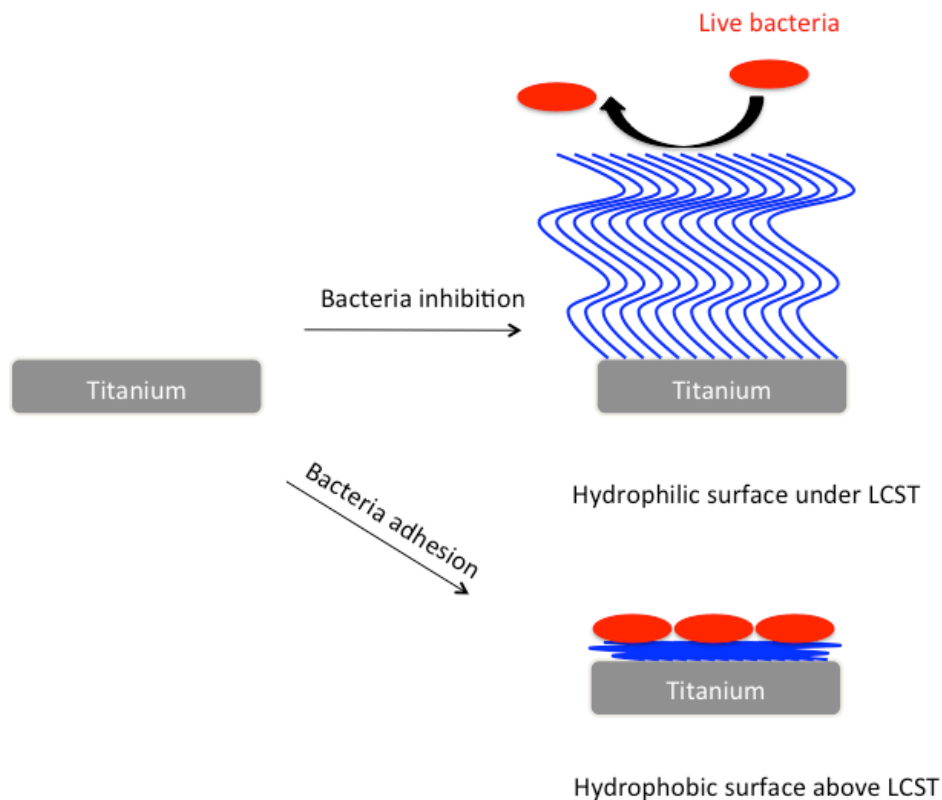
Scheme 1: Layer by layer coating of polycationic and polyanionic polymers to make bacteriostatic surfaces. Then, thanks to the introduction of an antibiotic, titanium surfaces become both bacteriostatic and bactericidal.

1.2. « Smart » polymers

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (polyNIPAM) is one of the most studied and widely-used environmentally sensitive (smart) polymers for controlling wettability of surfaces. PolyNIPAM is a thermoresponsive polymer that exhibits a lower critical solubility temperature (LCST) in water at 32°C. At temperatures below LCST, polyNIPAM is soluble in water and is hydrophilic with an extended coil conformation. On the other hand, at temperatures above LCST, polyNIPAM undergoes a phase transition to water-insoluble and displays a collapsed hydrophobic structure. In the initial reports on the use of polyNIPAM as a biofouling-release agent, Ista et al.²⁰ exploited the stimuli-responsive wettability of polyNIPAM for the preparation of fouling-release surfaces.

Lee et al.²¹ coated titanium surfaces with a thermo-responsive polymer (polyNIPAM) which can change polymer length and properties according to temperature variations. PolyNIPAM is a mean of controlling bacterial attachment prevention (*P. gingivalis* and *S. aureus*). Indeed, Ti surfaces coated with polyNIPAM can detach bacteria when temperature decreases.

Scheme 2 represents the role of polyNIPAM variable properties according to temperature. Thus, polyNIPAM-coated titanium surfaces prevent bacterial adhesion below LCST.



Scheme 2: PolyNIPAM below LCST swells and hinders bacterial adhesion, at the contrary above its LCST polyNIPAM shrinks and the bacteria adhesion is permitted.

1.3. Nano-structures and surface structuring

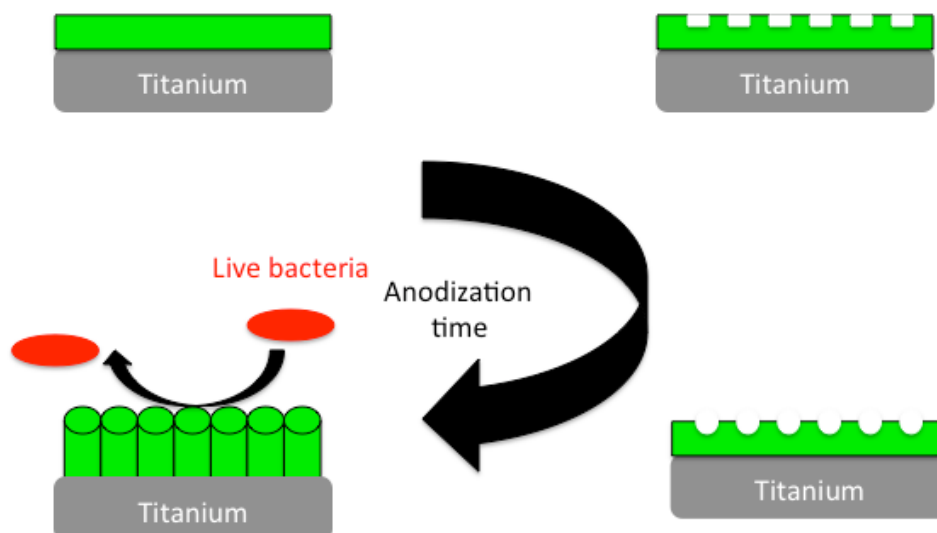
Nanostructured surfaces are currently of great interest.²²⁻²⁶ Consequently, nanoscale surface patterning methods have been applied to fabricate different nanopatterns (e.g., ordered stripes, pits, pillars or squares). Recently Narendrakumar et al.²² reported TiO₂ nanotubes coating onto titanium surfaces, and such anodized nanostructures have demonstrated a certain degree of antibacterial properties associated with their diameter and contact angle. In addition, for a given diameter, nanopores might have less bacterial adhesion than nanotubes. In this study, the authors

used two *Streptococcus* strains: *Strep. mutans* and *Strep. sanguinis*. The same conclusions were observed by Ercan et al.²³ and showed that surface nanomodification of Ti significantly changed bacterial response. According to the authors,²³ several parameters are implied such as: surface chemistry, Ti crystallinity and nanotube size. Heat treatment significantly decreased the number of dead *S. aureus* and *S. epidermidis* bacteria adhering to Ti surfaces, while larger Ti nanotubes (60 and 80 nm diameters) consistently decreased the number of live bacteria when each was compared to conventional Ti. Combining these two treatments (heat treatment and controlled Ti nanotube formation through anodization) decreased adhesion of both live and dead bacteria for both *S. aureus* and *S. epidermidis*.²³ These results indicated that controlled anodized Ti nanotube formation and heat treatment are strong candidates for the design of future implantable materials with improved tissue growth properties and antimicrobial behavior.

Barbour et al.²⁴ studied the effect of titanium crystal structures on the capacity of *Strep. gordonii* to adhere onto surfaces. Bacterial coverage was reduced more significantly on anatase surfaces than rutile surfaces.

This titanium modification concerns numerous bacteria: *Strep. mutans*,^{22,25} *Strep. salivarius*,²⁵ *Strep. sanguinis*,^{22,25} *Strep. gordonii*,²⁴ *S. aureus*,²³ *S. epidermidis*,²³ *P. aeruginosa*.²⁶

Scheme 3 presents the different possible architectures of TiO₂ layers according to the anodization time.



Scheme 3: Formation process of nanotubes on titanium surfaces. Before anodization, a nanoscale TiO₂ passivation layer is present on Ti surfaces and whenever a constant voltage is applied, pits are formed on the TiO₂ layer. As anodization time increases, pits grow longer and larger resulting in nanopore formation. After a specific anodization time, nanotubes are formed on the Ti surface.

2. Bactericidal materials

Bactericidal elements permit to kill bacteria by many ways such as perturb the bacteria membrane, block the ATP synthase, empeach the cell respiration, etc... thanks to different molecule. The antibiotics are the most known but there are not the only ones.

2.1. Polymer coating

Microbial cells generally carry a negative net charge at their surface due to their membrane proteins, teichoic acids of Gram-positive bacteria, and negatively charged phospholipids at the outer membrane of Gram-negative bacteria. This way, polycations are attracted and if they have a proportionate amphiphilic character, they are able to disrupt the outer as well as the cytoplasmic membrane and enable lysis of the cell resulting in cell death. Schaer et al.²⁷ studied the effect of a hydrophobic polycation *N,N*-dodecyl,methyl-PEI (PEI: polyethylenimine) on *S. aureus*. The presence of the polymer coating on titanium surfaces was effective by preventing biofilm formation.

2.2. Antimicrobial peptide coatings

Kazemzadeh-Narbat et al.²⁸ used a cationic peptide called Tet213 (KRWWKWWRRRC) on both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. In this case, the antimicrobial peptide (AMP) was loaded inside calcium phosphate (CaP-AMP) which was coated on titanium surfaces. According to the authors, CaP-AMP kills both *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria within 30 min *in vitro*.

Another AMP called GL13K, derived from parotid secretory protein (PSP), has been shown to be both bactericidal and bacteriostatic.^{18,29} *In vitro* antimicrobial studies have found that a GL13K peptide coating is bactericidal and inhibits biofilm growth for pathogens related to peri-implantitis, such as *P. gingivalis*, *Strep. gordonii* and *P. aeruginosa* under static growth conditions.^{30,31} Furthermore, AMP surfaces displayed antimicrobial activity under dynamic growth conditions against *Strep. gordonii*³² and under static growth conditions against *S. epidermidis* and *E. coli*.³³ This passive antimicrobial coating resisted hydrolytic and mechanical challenges and exhibited no significant release of peptides from the modified titanium surface. A multifunctional streptococcal collagen-mimetic protein coating reduced the bacterial adherence of *S. aureus* and *S. epidermidis*.³⁴ As a result, costly design of synthetic peptides becomes necessary in order to fabricate bioactive coatings immobilized with active AMPs.³⁵

Titanium substrates can be functionalized with the hLf1-11 peptide as a potent AMP by physical adsorption. An outstanding reduction in bacterial adhesion and biofilm formation of *Strep. sanguinis* and *Lactobacillus salivarius* was observed on the biofunctionalized surfaces compared to the control group.³⁶

2.3. Antibiotic and antiseptic coatings

One of the approaches to avoid bacterial infection on implants, and hence prevent biofouling, is to cover them with the coatings that can release antibiotics or antiseptics in the local niche. Such coatings can be prepared either by soaking the carrier material in a solution containing antibiotics/antiseptics or by directly impregnating antibiotics/antiseptics onto the coating material.

i. Antibiotics

Local delivery of antibiotics at the implant site might be an efficient strategy against biofilms which can display several advantages. Firstly, in case high local doses do not cause any systemic toxicity, high efficacy can be achieved at the specific local site. Additionally, local delivery of antibiotics allows targeting specific peri-implantitis pathogens, preventing potential antibiotic resistance. Various surface coatings have been developed to achieve the effect of controlled release of antibiotics *in vitro*. Some requirements concern both antibiotics and coating materials. In regard to antibiotics, a broad antibacterial spectrum and thermostable properties represent the most critical requirements, since coating procedures are usually conducted at high temperatures. Gentamicin is a commonly used antibiotic in such applications partly due to its relatively broad antibacterial spectrum. Furthermore, it is one of the rare kinds of thermostable antibiotics and is one of the most widely used antibiotics for titanium coating. Besides, cephalothin, carbenicillin, amoxicillin, cefamandol, tobramycin, and vancomycin have also been used in coatings on bone implants.⁷ On the other hand, the drug incorporation strategy into coatings as well as drug release rates from coatings are two important aspects, for they can highly influence the effectiveness of antibiotics. Materials such as polyurethane, biodegradable polymers and calcium phosphates (including carbonated hydroxyapatite and porous hydroxyapatite) are presented as representative examples of coatings which can meet these requirements.³⁷ Yet, to this date no titanium implants with antibiotic-loaded coatings have been found for clinical use. A major drawback of this approach is that every drug delivery method has intrinsic limitations. The positive effect will disappear since drug elution is finite. Moreover, the local toxicity on surrounding tissues needs to be fully investigated.

Systemic antibiotics are administered as adjuncts to mechanical irrigation and debridement and/or additional surgical procedures on affected dental implants heavily colonized by putative bacterial pathogens. As a result, systemic antibiotic therapy is often advised as a part of peri-implantitis treatment protocols, similar to the use of systemic antibiotics in periodontitis treatment, despite an absence to date of strong supporting scientific data.³⁸

The drugs investigated included conventional antibiotics such as amoxicillin, vancomycin, gentamicin, tetracycline, minocycline or cephalotin, which were incorporated in controlled release devices. Antibiotics were capable of reducing bacterial colonization with *Strep. mutans*,^{39,40} *S. epidermidis*¹⁹ and *S. aureus*,⁴¹ *P. aeruginosa*⁴² and *E. coli*⁴³⁻⁴⁵ on titanium surfaces.

ii. Silver

Silver is an inorganic antimicrobial agent which has long been known for its antiseptic effects, although the use of silver decreased with the dissemination of antibiotics. The urgent need for effective strategies to fight the growing number of multi-resistant bacteria has recently revived interest in silver and numerous studies have reported the use of silver-coated materials to reduce bacterial infections associated with orthopaedic and dental implants. Inorganic antibiotic materials have several advantages compared to traditional organic agents; these include chemical stability, thermal resistance and protracted action.⁴⁴ In addition, silver has a wide spectrum of antibacterial susceptibility, a low propensity for bacterial resistance, and the ability to inhibit polymicrobial colonization.⁴⁶

The main antibacterial effect of silver is mediated by the release of biocidal Ag⁺ ions, which interact with the bacterial cell wall and disturb its permeability, inactivate essential proteins and cause DNA condensation.⁴⁷ Silver exhibits a rather broad spectrum of antimicrobial activity and has not yet increased the risk of bacterial resistance. Pathogens found at infected oral implant sites, including *Strep. mutans*,⁴⁸ *S. aureus*,^{49,50} *Strep. oralis*,⁴⁷ *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*⁵² were killed or significantly reduced upon contact with silver-implanted surfaces. All tested silver surfaces, such as hydroxyapatite (HA)-silver-surfaces^{46,52-60} or plasma sprayed silver-implanted HA shared good antimicrobial activity.

Li et al.⁶¹ elaborated silver loaded gelatin microspheres and incorporated them into porous titanium to produce antibacterial implants. The silver loaded samples were able to inhibit bacterial

growth (*S. aureus* and *E. coli*). Gelatin microsphere vectors can control the silver release rate to reach high antibacterial efficacy.

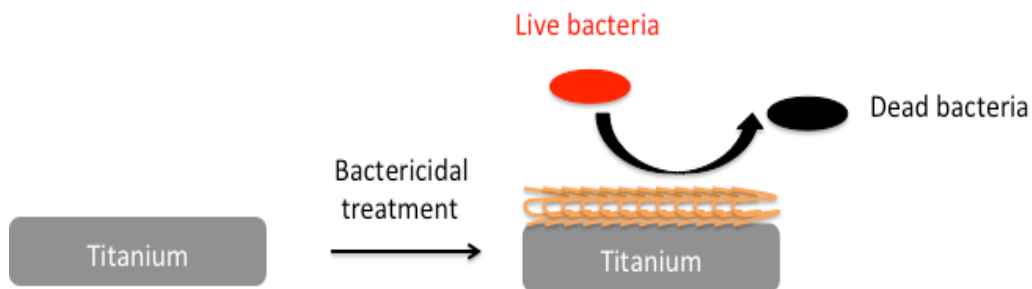
Silver is certainly the most commonly used metal to confer anti-infective properties to biomedical devices for its oligodynamic antibacterial activity, *i.e.* exhibiting bactericidal/bacteriostatic activity at very low concentrations. However, since its early identification as a convenient anti-infective biomaterial, the use of silver as bulk material in medical devices has progressively been ceasing over time. Following an opposite trend, the utilization of this element in thin nanocoatings, in doped solid or hydrogel materials, in the formulation of bioactive alloys and glasses, and in form of micro- and nanoparticles has progressively been flourishing. At present silver has become one of the most widely used anti-infective substances, especially utilized in impregnated catheters, skin dressings and revision implants for oncologic orthopaedic reconstructive surgery. Controversially, a debate still persists over the possible inactivation of silver mediated antibacterial activity in physiological fluids and over the low biocompatibility index of silver determined by the low threshold concentration for cytotoxic effects, especially when in the form of nanoparticles.^{62,47}

iii. Chlorexidine

Chlorhexidine (CHX) has been believed to be effective in the therapy of mucositis and peri-implantitis.⁶³ It was found that, with the additional use of 2% CHX, more anaerobic bacteria on the implant surface were killed than using mechanical debridement alone. In fact, 2% c CHX was shown to be the most effective concentration previously, achieving a total viable biofilm reduction ranging from 96.2% to more than 99.99%, depending on the time of exposure and the stage of biofilm development.⁶⁴ It was also reported that an oral irrigator combined with 0.2% CHX is effective in reducing biofilms attached to rough titanium surfaces immediately after cleaning.⁶⁵ However, there seemed to be no significant difference in bleeding reduction, suppuration, probing pocket depth and radiographic bone loss.⁶⁶ It was also reported that CHX can be adsorbed by the titanium surface,⁶⁷ due to fact that CHX is a positively-charged biguanide compound.

Another study realized by Barbour et al.²⁴ showed the bactericidal effect of the CHX on *Strep. gordonii*. Titanium surfaces (anatase and rutile) were immersed in a solution of CHX (100 mg/L) for 1 min, after which time CHX adsorption is believed to be maximal. Adsorption with CHX resulted in a greater proportional reduction in bacterial coverage (80% for anatase and 40% for rutile).

Scheme 4 summarizes the existing bactericidal coatings with their different substrates such as polycationic polymers, AMP, ATB and antiseptics.



Polycationic polymer/AMP/ATB/antiseptic/ions

Scheme 4: Bactericidal treatment of a titanium surface by polycationic polymers, antimicrobial peptides (AMP), antibiotics (ATB), antiseptics or ions.

2.4. Ion-implanted surfaces

Elements such as fluorine (F), zinc (Zn) calcium (Ca), chlorine (Cl), iodine (I), copper (Cu), cerium (Ce) or selenium (Se) may be incorporated into titanium or hydroxyapatite coatings by anodic oxidation of the corresponding ions. The bactericidal activity of these ions seems to depend on their gradual release from specimens into surrounding tissues. One mechanism of bacteriostasis is hydroxylation into highly reactive components, such as HCl, HOCl, TiOH, hydrogen peroxide (H₂O₂) or superoxide (O²⁻), as these cause oxidation of bacterial cell membranes, resulting in increased cell permeability and ultimately in cell death. Additionally, ion-implanted surfaces may act bactericidally, as the ions may inhibit bacterial metabolism.⁶⁸⁻⁷⁹ To this date, a single ion candidate has been extensively tested in clinical trials with good clinical outcome despite gradual leaching over time: iodine-supported titanium implants as described initially by Shirai et al.⁷⁶

Chemical modification of anodically oxidized titanium by incorporation of ions reduces growth of biofilm in one, two and three species models of *E. coli*,⁸⁰ *P. gingivalis*,⁸¹ *Strep. mutans*,⁸² *S. aureus*⁸³ and *A. acti nomycetemcomitans*.^{61,62,84} Bacterial counts on ion-implanted surfaces were reduced by 55-80% compared to pure titanium.⁶⁹ However, it is unclear how anodic oxidation without ion-implantation influences bacterial adhesion to titanium.⁸⁴⁻⁸⁶ Titanium samples treated with cold atmospheric plasma display strong antimicrobial activity against *E. coli*.⁸⁷

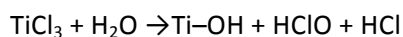
2.5. Photoactivable bioactive titanium

Titanium oxide (titania, TiO₂) is a typical non-toxic photo-chemically active semiconductor with high photo activity, which use is being explored to produce biomaterial surfaces with self-disinfecting properties.⁸⁸ TiO₂ surfaces undergo photo-activation when, under aerobic conditions, they are irradiated with appropriate photon energies. The principles and mechanisms of TiO₂ photocatalysis have been reviewed in detail by Hashimoto et al.⁸⁹

Ultraviolet A (UVA) light is electromagnetic radiation with a wavelength between 315 and 380 nm that causes chemical reactions and biological effects by interacting with organic molecules. UV light-induced photo-functionalization of titanium dioxide (TiO₂) removes hydrocarbon contamination and results in a super-hydrophilic surface, which decomposes adsorbed organic impurities by oxidation. Secondary oxidation initiated by reactive oxygen species (ROS) seems to be the necessary step to achieve antimicrobial activity (**Scheme 5**).⁷⁵ ROS are chemically reactive molecules containing oxygen, such as superoxide or hydrogen peroxide. The bactericidal action of irradiated titania surfaces is due to reactions of photo oxidation that involve O₂ and H₂O with the formation of hydroxyl radicals (HO^{*}) and the direct and indirect oxidation of organic substances. Other reactive oxygen species, such as H₂O₂ and O₂ produced by photo oxidation, have also been implicated in bacterial inactivation, with H₂O₂ acting at a greater distance from the photoactive surface than hydroxyl radicals. It has been confirmed that these active oxygen species can destroy the outer membrane of bacterial cells.^{90,91}

After 120 min of UVA illumination, the survival rate of *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* on a photocatalytic TiO₂ surface was reduced to less than 1% compared to a commercially pure titanium control surface.⁹² Visai et al.⁸⁸ found a transitory increase in hydrophilicity and significantly increased Zn binding capacity, which in turn led to a significant reduction in three oral streptococcal strains on TiO₂ surfaces illuminated with UV light. In an *in vitro* study under static and dynamic conditions, UVA illumination prior to bacterial colonization induced a reduction in adhesion rates and a significant decrease in the adhesion strength of *S. epidermidis* and *S. aureus*, without altering biocompatibility.⁹³ In a multispecies study authors found a positive effect on the attachment and biofilm formation of complex oral microbial communities to UV treated titanium.⁹⁴

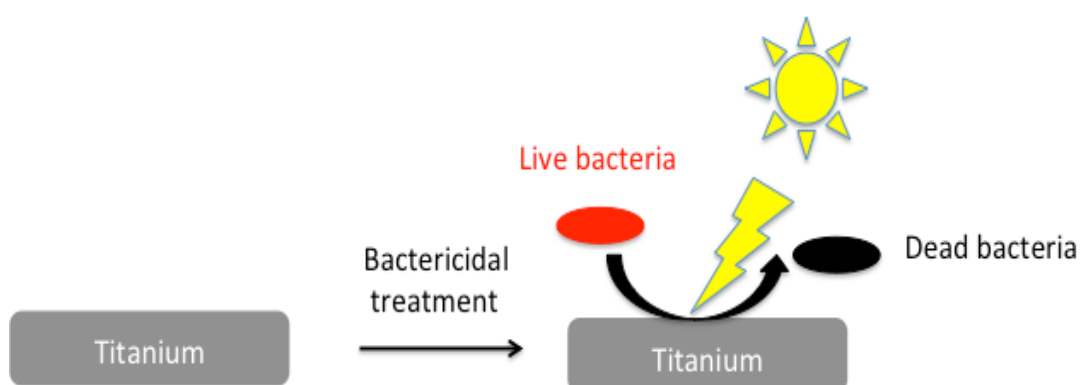
Discharging the surface of a titanium implant in sodium chloride solution anodizes the titanium surface by forming a superficial layer of TiCl₃. Subsequently, the modified surface is gradually hydrolyzed, which leads to the formation of Ti-OH and the bactericidal hypochlorous acid:



Associated with the hydrolysis, the hydrophilicity of the titanium implant is increased by the formation of Ti-OH on the surface. The slow-released hypochlorous acid induces antibacterial properties to the modified titanium surface, while the remaining Ti-OH increases the hydrophilicity.⁹⁵

Table 1: Some photoactivable bioactive biomaterials.⁴⁷

Photoactivable material	<i>In vitro</i> tested efficacy
TiO ₂	Very broad spectrum
TiO ₂ nanoparticles	<i>E. Coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i>
Sulfur-doped nanocrystalline titania	<i>Micrococcus lylae</i>
Nitrogen-doped TiO ₂	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>



Scheme 5: Bactericidal treatment by UV light.

2.6. Nanomaterials

Nanoparticles (NP) are defined as clusters of atoms of size ranging from 1-100 nm, with a very large surface area to volume ratio. Copper, zinc, magnesium and especially silver and gold NPs display antimicrobial activity⁹⁶ and are therefore possible candidate molecules for antimicrobial implant surface modifications. Nanomaterials are used to create unique surfaces with altered physical and chemical characteristics.

Because ion release is the main action of metallic silver, silver NPs are used to enlarge the available silver specific surface. Hence, using silver NPs amplifies silver ion release and consequently the antimicrobial effect of a surface. The overall antimicrobial efficiency of nanomaterials is however controversial. Some authors did not find a convincing decrease or even an increase in bacterial colonization on nanomaterials in comparison to untreated titanium.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Others found reductions in bacterial counts *in vitro* up to 90% compared to commercially pure titanium on nano-Ti surfaces and up to 100% for nano-AgHA when tested against *E. coli*, *S. epidermidis* and *S. aureus*.¹⁰¹⁻¹⁰⁷ It has recently been shown that a titanium nanotube surface exhibited antimicrobial properties and down-regulated the glycosyltransferase genes of *Strep. mutans*.¹⁰⁸ All studies that tested surfaces with a combination of nanostructures and organic or inorganic antimicrobial chemical compounds on the nano-level found reduced bacterial adhesion and viability.^{97,99,106,45,109-113} Surfaces containing Ag NPs show excellent biocidal activity towards *P. aeruginosa*, *Strep. oralis*, *Strep. mutans*, *P. gingivalis*, *S. aureus*,^{114,115} *Strep. pneumoniae* and *E. coli*.^{44,69,95,97,110-113}

Zhao et al.¹¹⁶ demonstrated that nAg could act longer on bacteria than most antibiotics, possibly due to the release of nAg from the coating. A study has described a method to modify Ti/TiO₂ surfaces with citrate-capped nAg. These nanoparticles spontaneously adsorb on Ti/TiO₂, forming nanometer sized aggregates consisting of individual nAg that homogeneously cover the surface. The modified nAg–Ti/TiO₂ surface exhibits a good resistance to colonization by *P. aeruginosa*.¹¹⁷ Though silver is able to kill bacteria and has no cytotoxic effect on osteoblasts and epithelial cells¹¹⁸ at low doses, this could not be guaranteed at high doses.¹¹⁹ Therefore, a suitable coating is necessary to load and release silver.

The antimicrobial properties of a nanocomposite coating formed by polysaccharide 1-deoxylactit-1-yl chitosan (Chitlac) and silver nanoparticles (nAg) on methacrylate thermosets were analyzed. Methacrylate thermoset is a kind of biomaterials which is commonly employed for orthopedic and dental applications. The Chitlac-nAg system showed satisfying anti-bacterial and anti-biofilm activity. *In vitro* observation, a steady silver release accompanied by anti-microbial

ability lose was detected in physiological conditions as time went on. However, there was still effective protection against bacterial colonization after 3 weeks which could be explained by the residual silver. The sufficiently high level of silver content released at the beginning can kill the bacteria rapidly to prevent the development of resistant pathogens.¹²⁰ Although the silver concentration decreased after several weeks, the bactericidal effect was still effective in this system.

2.7. Nitride coatings

Titanium nitride (TiN) is a material used to improve the surface properties and esthetics of metal tools. It has been documented that TiN is of excellent chemical stability and is resistant to high temperatures and to corrosion. Moreover, its biocompatibility has been confirmed. Thanks to its characteristic golden color, it may help to camouflage the implant in areas with thin gingival tissues better than can be achieved with common titanium surfaces, which are grey.¹¹⁹

TiN is characterized as a surface with a very high chemical inertness, hardness, low friction coefficient and corrosion resistance. These reduced surface interaction characteristics may be one reason for the antimicrobial effect of TiN, thus the overall antibacterial effect of nitride surfaces is a matter of discussion. Studies on nitride surfaces are sparse and the results are controversial. Some authors found unaltered or increased bacterial adhesion on nitride titanium surfaces, but others found reduced biofilm formation.¹²²⁻¹²⁸ Ji et al.¹²⁸ found TiN to show antimicrobial effects against *Strep. mutans* but not against *P. gingivalis*.

2.8. Citric acid

To assess the effectiveness of different chemotherapeutic agents on biofilm contaminated titanium surfaces, *Strep. mutans* biofilms and polymicrobial biofilms were grown on titanium discs and treated by various chemical agents. Study has found H₂O₂, Ardox-X (atopical teeth whitening gel) and citric acid (CA) killed significantly more *Strep. mutans* compared with the other treatments.¹²⁹ H₂O₂ and CA removed significantly more protein than water, whilst CA and the combination treatments of Ardox-X followed by CA, H₂O₂ followed by CA were significantly more effective against the polymicrobial biofilms than chlorhexidine, H₂O₂ and Ardox-X. Among the chemicals tested, CA demonstrated the greatest decontamination capacity with respect to both the killing and the removal of biofilm cells. Moreover, the combination of effects is clinically desirable because it promotes biocompatibility and healing around a previously contaminated implant surface.¹³⁰ Although the mechanism of biofilm removal is unknown, it could be due to the adsorption of CA on

titanium surface under certain pH could form “acid clusters” (*i.e.* aggregation of molecules),¹³¹ that enable the disruption of calcium-ion bridges which is the chemical binding sites within the biofilm connecting the EPS polymeric chains.¹³²

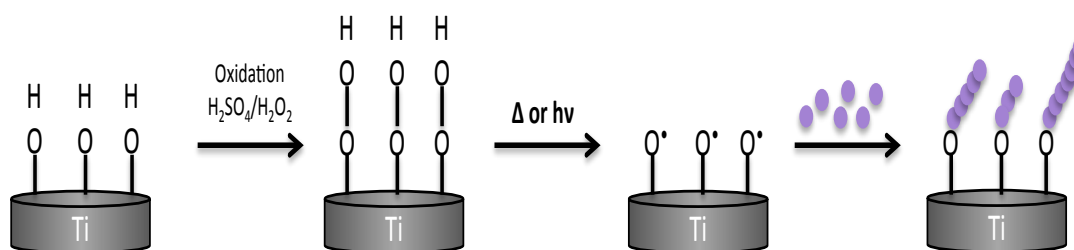
III. Chemical modification

1. Grafting from

Biochemical methods of surface modification are promising approaches to modify and induce an antibacterial effect onto titanium surfaces. Difficulties, however, may be found when it comes to the stability of the immobilized biomolecules. Besides, physical adsorption of the molecules may not be successful for long-term implantation due to possible desorption. On the other hand, the covalent binding may require the use of different chemical reactions, which can be aggressive towards the molecules reducing their bioactive potential.¹³³

Covalent grafting is one type of surface modification that offers a strongest link between biomaterial implant and its coating, producing a more durable interface.¹³⁴ Several techniques for covalently graft biomolecules or/and bioactive molecules onto titanium surfaces have been developed, including the covalent attachment of end-functionalized polymers incorporating an appropriate anchor (“grafting to”) or the in situ polymerization initiated from the surface (“grafting from”).

The “grafting from” approach (**Scheme 6**) has attracted considerable attention in recent years in the preparation of tethered polymers on a solid substrate surface.¹³⁵ The direct grafting of an ionic polymer model such as the poly(sodium styrene sulfonate (polyNaSS)) (**Scheme 6**) in a two-step reaction procedure onto titanium and alloy titanium surfaces was reported.¹³⁵⁻¹⁴² Treatment of the titanium surface by a mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide helps in the formation of titanium hydroxide and titanium peroxide. In the second reaction step, heating of surfaces, placed in a concentrated styrene sulfonate of sodium (NaSS) monomer induces the decomposition of titanium peroxides with the formation of radicals capable of initiating the polymerization of NaSS.¹³⁶⁻¹⁴² A great advantage of the PNaSS grafting relies on its bioactivity, which could be in part due to its moderate hydrophilic character. Bacterial adhesion study showed that titanium and titanium alloy graft surfaces exhibited high inhibition of *S. aureus* adhesion at levels greater than 70% when compared to ungrafted titanium and titanium alloy surfaces.^{136,138,139}



Scheme 6: “Grafting from” onto titanium surfaces

2. Grafting to

The “grafting to” strategy permits an indirect grafting thanks to anchor molecules (silane,¹⁴³⁻¹⁴⁶ catechol,¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ phosphate¹⁵¹⁻¹⁵⁴). It enables titanium functionalization with various molecules in order to confer customized properties (**Figure 7**).

2.1. Silane anchor

Silanization has been successfully used to functionalize metallic biomaterials with bioactive molecules. This method of surface modification allows the covalent attachment of various molecules such as peptides, proteins and polymers through the use of organofunctional alkoxy silane molecules that react with hydroxyl groups present at the surface of the material. The binding of these biomolecules onto aminosilanized samples often requires the reaction with crosslinking agents (*i.e.* glutaraldehyde, maleimide-based molecules) to ensure appropriate chemical reactivity.

Chen et al.¹⁴³ used a silane anchor to graft Melimine, a synthetic antimicrobial peptide onto titanium surfaces.¹⁴⁴ Melimine has broad spectrum activity against bacteria, fungi and protozoa and has been considered as a promising candidate for further development as an antimicrobial coating for biomedical devices and implants. In this study, the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of melimine-coated titanium was tested. Titanium surfaces were amine-functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) followed by reaction with a bifunctional linker 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic 3-sulfo-*n*-hydroxysuccinimide ester (Sulfo-SMCC) to yield a maleimide functionalized surface. Melimine was then tethered to the surface via a thioether linkage through a Michael addition reaction of the cysteine at its *N*-terminus with the maleimide moiety. Melimine coating significantly reduced *in vitro* adhesion and biofilm formation of *P.*

aeruginosa (up to 62%) and *S. aureus* (up to 84%) on titanium substrates compared to blank surfaces ($p < 0.05$). The coating was also challenged in both mouse and rat subcutaneous infection models and was able to reduce bacterial load by up to 2 log₁₀ compared to uncoated surfaces ($p < 0.05$). Melimine coatings therefore present several characteristics that make it a promising candidate for development as a surface antimicrobial agent that can withstand industrial sterilization while ensuring good biocompatibility.

Gerits et al.¹⁴⁵ developed titanium substrates on which the recently discovered antibacterial agent SPI031, a *N*-alkylated 3, 6-dihalogenocarbazol 1-(sec-butylamino)-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propan-2-ol, was covalently linked (SPI031-Ti) via a silane anchor (3-aminopropyl-triethoxy silane). They found that SPI031-Ti substrates prevent biofilm formation of *S. aureus* and *P. aeruginosa in vitro*. To test the effectiveness of SPI031-Ti substrates *in vivo*, they used an adapted *in vivo* biomaterial-associated infection model in mice in which SPI031-Ti substrates were implanted subcutaneously and subsequently inoculated with *S. aureus*. A significant reduction in biofilm formation was observed (up to 98%) on SPI031-Ti substrates compared to control substrates. In a different study,¹⁴⁶ the same team grafted vancomycin (VAN) and caspofungin (CAS) onto Ti substrates using a silane anchor too. Resistance of the VAN-coated Ti (VAN-Ti) and CAS-coated Ti (CAS-Ti) substrates was tested against *in vitro S. aureus* and *C. albicans* biofilms. The efficacy of coated Ti substrates was also tested *in vivo* using an adapted biomaterial-associated murine infection model in which control-Ti, VAN-Ti or CAS-Ti substrates were implanted subcutaneously and subsequently challenged with the respective pathogens. *In vitro* biofilm formation of *S. aureus* and *C. albicans* on VAN-Ti and CAS-Ti substrates, respectively, was significantly reduced compared with biofilm formation on control-Ti. VAN-Ti substrates and CAS-Ti substrates showed a 99.9% biofilm reduction against respectively *S. aureus* and *C. albicans* compared with control titanium.

2.2. Catechol anchor

A different strategy is to graft polymers with a catechol group onto titanium surfaces, catechol acting as the anchor for chemical linkage. A distinction is commonly made between three different approaches. The first one is the direct polymerization from the substrate surface by using an initiator bringing a catechol group. Another approach is to functionalize a polymer with a molecule loading a catechol group and subsequently anchor the polymer onto the desired surface as used by Chourifa et al.¹⁴⁷ In a third type of approach, catechol is first anchored to the surface of TiO₂, then, by click reaction with a functionalized polymer, the latter is grafted onto the titanium surface¹⁴⁷. Recently, Chourifa¹⁴⁸ grafted polyNaSS (polyanion) onto titanium surfaces *via* a dopamine anchor and showed

a positive response against *S. aureus*. Various molecular weights of polyNaSS were studied and it was shown that the bulkier polyNaSS was, the higher the bacteriostatic effect was: 36, 58 and 65% of *S. aureus* growth inhibition for respectively 5, 10 and 35 kDa polyNaSS.

In one *in vitro* study,¹⁴⁹ Ti substrates were functionalized by first covalently grafting either dopamine followed by carboxymethyl chitosan (CMCS) or hyaluronic acid-catechol (HAC). Antibacterial assays with *S. aureus* showed that the polysaccharide-modified substrates significantly decreased bacterial adhesion. CMCS-functionalized Ti demonstrated better antibacterial property than HAC-functionalized Ti since CMCS is bactericidal while HA only inhibits the adhesion of bacteria without killing them. The number of viable *S. aureus* cells on Ti-CMCS and Ti-HAC decreased to 16% and 54% compared with control titanium, respectively.

An antimicrobial peptide, Magainin I (Mag), was grafted to a titanium oxide surface, via 3 steps: i) the binding of the catechol group (Cat), ii) coupling with PEG and iii) functionalization with Magainin I peptide.¹⁵⁰ In this strategy, PEG is both antiadhesive and enables covalent peptide immobilization. The antiadhesive properties of PEG, and antibacterial activity of the anchored Magainin I, were individually tested against Gram-positive bacteria, *Listeria ivanovii*. The results reveal that bacterial adhesion was considerably reduced, accompanied by a growth inhibition of remaining adhered bacteria, 70% on Ti-Cat-PEG and 90% on Ti-Cat-PEG-Mag. CFU count, after adhesion onto clean Ti, was higher than on any of the modified surfaces. A slight decrease was observed on Ti-Cat whereas, on Ti-Cat-PEG, the number of live bacterial cells was divided by tw. The most drastic reduction was observed on Ti-Cat-PEG-Mag compared with control Ti.

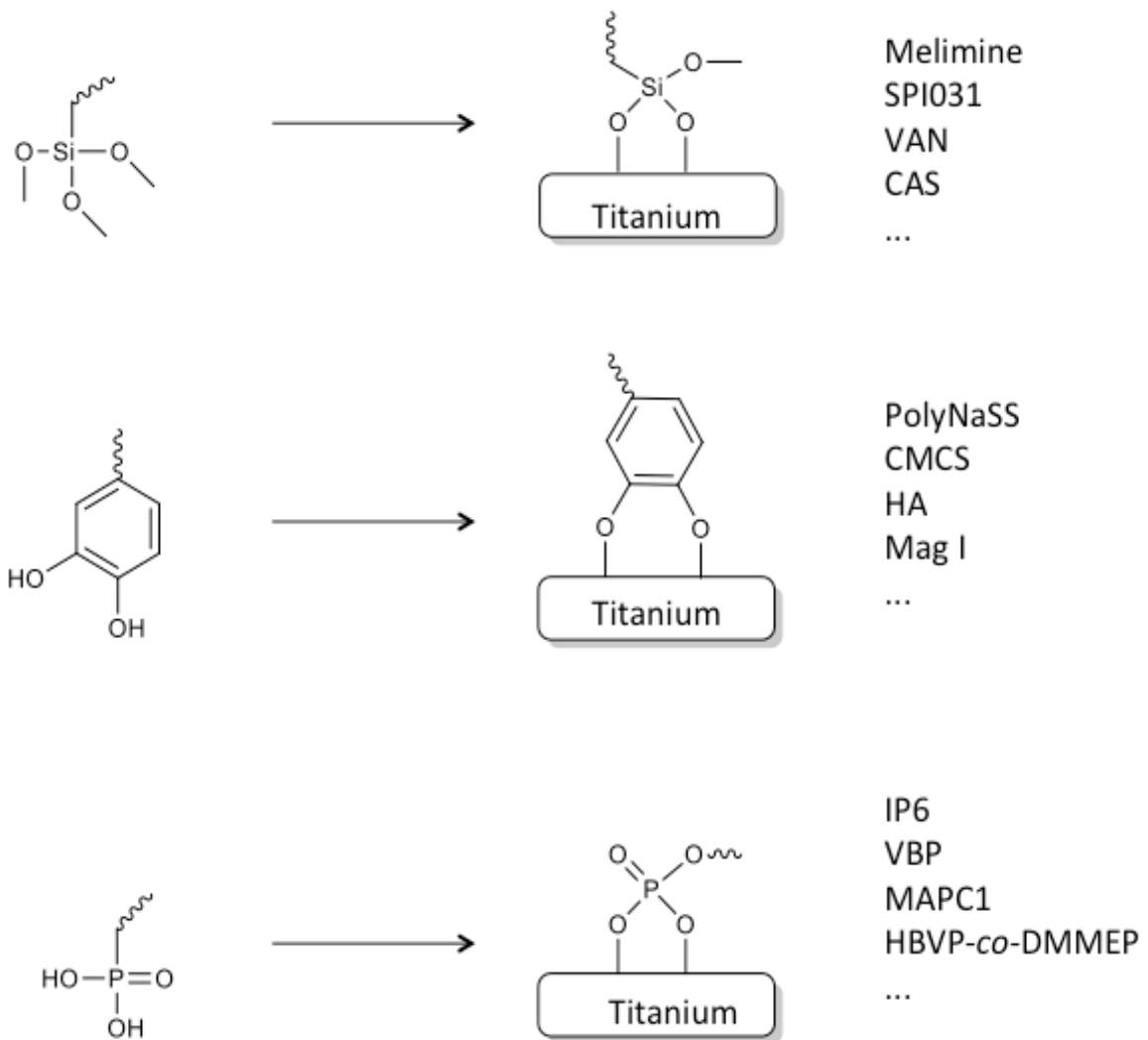
2.3. Phosphor-based anchor

Phosphates and phosphonates can covalently link to metal oxide surfaces such as TiO₂ and are commonly used as crosslinker agents to functionalize surfaces with other molecules to tune surface properties to those of interest. Phosphonate linkers present the advantage of being more stable than other commonly used coupling agents like silanes, which suffer from hydrolytic instability in aqueous environments at physiological pHs. The use of robust and stable coatings under physiological conditions in biomedical applications is of high interest, and phosphates or phosphonates bound to metal oxides are stable in these conditions.

Córdoba et al.¹⁵¹ presented a method to directly functionalize Ti surfaces covalently with Myo-inositol hexaphosphate (IP6), without using a crosslinker molecule, through the reaction of the

phosphate groups of IP6 with the TiO₂ layer of Ti substrates. The effect of the grafted surfaces on the adhesion and biofilm viability of oral microorganism *S. sanguinis* was studied. It appeared that Ti-IP6 surfaces decreased the adhesion of *Strep. sanguinis*. These results indicate that the functionalization of titanium surfaces with IP6 protected the material against bacterial adhesion. Besides, some bactericidal effect of IP6 could be expected, as found by Moon et al.¹⁵² on *P. gingivalis*.

Other examples of the use of phosphonate, such as 4-vinylpyridine with vinylbenzylphosphonate or dimethyl(2-methacryloyloxyethyl) phosphonate are found in the literature with a preparation by free radical polymerization. Calliess et al. showed a reduction of adherent bacteria up to 95% compared with blank titanium controls.¹⁵³ In their study, they demonstrated *in vitro* that polymer surface coatings can be antimicrobial against *S. epidermidis* and *S. aureus*. Similarly with phosphonate, Pfaffenroth et al.¹⁵⁴ synthesized copolymers of 4-vinyl-N-hexylpyridinium bromide (HBVP) and dimethyl(2-methacryloyloxyethyl) (DMMEP) phosphonate self-assemble to form ultrathin layers on titanium surfaces that show antimicrobial activity and biocompatibility. Antibacterial activity was assessed by investigating *Strep. Mutans* adherence. The antimicrobial effect of the surface is enhanced by an increase in the content of DMMEP within the copolymer. The introduction of hydrophilic monomers improved the antibacterial effect of the copolymers compared to poly(HBVP) homopolymer and in particular compositions with low amounts of HBVP showed strong effects.



Scheme 7: A selection of anchors on titanium surfaces with different functionalizations to achieve an antimicrobial surface.

IV. Discussions

The quest for active surfaces

The tremendous varieties strategies aiming at functionalizing titanium surfaces *in vitro* and in few *in vivo* models clearly show no standard has established a wide consensus in the scientific and medical community. Depending on the desired effect, it is now certain that specific functionalized surfaces will be achieved on medical implants. However, at this point, it seems illusory to believe that a cheap and scalable engineered implantable surface can promote cell adhesion, guarantee biocompatibility and ensure over a 99.9% non-selective biocidal effect. Multiple barriers are yet to overcome. First, obviously most studies report strictly *in vitro* results. Secondly, *in vivo* studies using relevant animal models that correspond to the actual application of studied biomaterials are scarce. Thirdly, no study has to this date assessed the interaction with animal or human immune cells.

Device-associated infection complexity

In fact, one should not believe that even if this Graal biomaterial was ever built, it would necessarily automatically solve the problem of implantable device-associated infections. Indeed, the pathogenesis of these infections remains highly complex and misunderstood. Every biofilm is different and the pathogenesis varies depending on the affected tissue in which the device was implanted. Biofilms on orthopaedic and dental implants are reputedly harder to eradicate due to the poor environing vascular supply and bulkiness of the devices. Indeed, such surfaces are extremely high and remain unexposed to blood supply hence the difficulty of the immune system to combat these infections. Catheter-related biofilms develop in nutrient-rich environments and classically raise fewer clinical issues. Indeed, antibiotics have a choice access to catheters and catheter removal presents little morbidity. Contaminated implants do not always lead to infections and it is safe to believe that auto-sterile implants will not eradicate nosocomial infections in the surgical setting. Conceptually, the goal of an auto-sterile implant would be to display a non-selective effect on pathogens (bacteria, fungi, viruses) to prevent antibiotic resistance, prevent mature biofilm formation on implants in the mid- or long-term follow-up, facilitate the efficacy of a classic combined therapy of antibiotic use, surgical irrigation and debridement and eventually render hardware removals unnecessary.

Most advanced candidates to this date

In the orthopaedics field, silver has been used for more than a decade with toxicity issues that

restricted its use in patients with a very high anticipated postoperative infectious risk. Iodine coatings gained significant interest in Japan due to their innocuity and successful initial clinical trials during the past five years. Gold, palladium and other nanoparticles are used in complex coatings that will be soon available to surgeons. pNaSS has been extensively Antibiotic or antiseptic-impregnated implants are progressively abandoned due to the lack of clinical evidence supporting their use and justifying their price in daily practice.

Costs and scientific dispersion represent barriers to scalability of active surfaces

This remains a central topic for industrialized societies with ever-increasing healthcare-related budgets: will the surface treatment be cost-effective? Indeed, most of the molecules described in this review are hardly scalable and could significantly raise the price of implants with little or no clinical benefit. Interactions between active surfaces and abrasion in clinical practice are yet to be investigated for most candidates. There is also scarce data on the residual amount of most coatings or active surfaces long after implantation. In theory a permanently treated implant would prevent further bacterial or fungal graft originating from hematogeneous dissemination. With dozens of different surface treatments available to render titanium antibacterial, we deemed it necessary to clarify and classify their various synthesis, mechanism of action and pathogenic targets. Given the complex challenges raised by the translation of such research to clinical practice, we believe that the dispersion of scientific efforts directed towards the discovery of new molecules may blind us from further animal and clinical developments of existing solutions that would radically change the shape of healthcare and nosocomial infections.

Other areas of research on antibacterial surfaces

Rather than coating, multiple other approaches were proposed. Among them, the most popular nowadays is nanosurface modeling on bulk materials. Indeed, engineering uncoated surfaces which physical surface characteristics would both promote cell adhesion hence facilitating biocompatibility or tissue integration and repel bacteria has been extensively described and is now a mature technology that is currently available to clinicians. A seducing idea would be to combine these nanostructures with increase surface contact and active coatings or grafted molecules.

V. Conclusion

Numerous solutions exist to render titanium surfaces antibacterial (**Table 2**). Their different

mechanisms and targets were listed in the present study for further clarification of an ever-increasing science that will change the shape of health-care associated infections. The increasingly popular research topic of active surfaces has permitted the flourishing development of new molecules that have not yet reached maturity. Improvements in scalability, animal and clinical testing are to be expected in the coming years before any standard arises.

Table 2: Overview of the main strategies to make an antimicrobial titanium surfaces.

Strategy	Features	Bacteriostatic/Bactericidal	Exples	Concerned bacteria	Ref.
Coating	Polycation		PLL- <i>g</i> -PEG,		
	Polysaccharides	Bacteriostatic/Bactericidal	LbL HA/CH, polyNIPAM,	<i>EC, PG, SA, SE, StM</i>	12-21, 27
	Polymer		PEI		
	Nanostructures			<i>EC, PA, SA, SE, StO,</i>	
	/	Bacteriostatic/Bactericidal	TNT	<i>StG, StGo,</i>	22-26, 96, 120
	Nanomaterials			<i>StM, StrP, StS, StSa</i>	
	Antimicrobial peptide	Bacteriostatic/Bactericidal	Tet213, GL13K, hLf-11	<i>EC, LS, PA, PG, SA, SE, StGo, StSa</i>	18, 28-36
	ATB/Antiseptic	Bactericidal	Amo, Carbe, Cefa, Cepha Genta, Mino, Tobra, Tetra, VAN,Ag, CHX	<i>AA, EC, SA, SE, StO, StGo, StrM, StSa</i>	7, 37-68
Ion-implanted	Bactericidal	Ca, Ce, Cl, Cu, F, I, Se, Zn	<i>AA, EC, PG, SA, StM</i>	69-87	

	Photoactivable bioactive	Bactericidal	ROS	AA, BF, EH, FN, ML, SA, SE, SF, VP	48, 88-95
	Nitride/Citric acid	Bactericidal		PG, StrM	121-132
Grafting from	Polymer	Bacteriostatic	PolyNaSS	SA, SE	133-142
Grafting to	Silane anchor	Bacteriostatic/Bactericidal	CAS, Meli, SPI031, VAN	CA, PA, SA	143-146
	Catechol anchor	Bacteriostatic/Bactericidal	CMCS, HA, Mag I, PEG, polyNaSS	LI, SA	147-150
	Phosphate anchor	Bacteriostatic/Bactericidal	IP6, MAPC1, VBP, HBVP- co-DMMEP	SA, SE, PG, StrM, StSa	151-154

A. actinomycetemcomitans (AA), Bacteroides fragilis (BF), Candida albicans (CA), E. coli (EC), Enterococcus hirae (EH), F. nucleatum (FN), Lactobacillus salivarius (LS), Listeria ivanovii (LI), Micrococcus lylae (ML), P. aeruginosa (PA), P. gingivalis (PG), Shigella flexneri (SF), S. aureus (SA), S. epidermidis (SE), Strep. gingivalis (StG), Strep. gordonii (StGo), Strep. mutans (StM), Strep. oralis (StO), Strep. pneumoniae (StP), Strep. salivarius (StS), Strep. sanguinis (StSa), Vibrio parahaemolyticus (VP).

Amoxicillin (Amo), carbenicillin (Carbe), carboxymethyl chitosan (CMCS), Caspofungin (CAS), cefamandol (Cefa), cephalothin (Cepha), chitosan (CH), dimethyl(2-methacryloyloxy-ethyl) phosphonate (MAPC1), gentamicin (Genta), hyaluronic acid (HA), magainin I (Mag I), melimine (Meli), minocycline (Mino), Myo-inositol hexaphosphate (IP6), *N*-alkylated 3, 6-dihalogenocarbazol 1-(sec-butylamino)-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propan-2-ol (SPI031), polyethylene glycol (PEG), polyethylenimine (PEI), poly(L-lysine) (PLL), poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS), reactive oxygen species (ROS), Silver, (Ag), Tet213 (KRWWKWWRR), tobramycin (Tobra), tetracyclin (Tetra),

Titanium nanotubes (TNT), vancomycin (VAN), 4-vinyl-*N*-hexylpyridinium bromide-co-dimethyl(2-methacryloyloxyethyl) (HBVP-co-DMMEP), vinylbenzylphosphonate (VBP)

VI. References

1. M. Long, H. J. Rack, *Biomaterials* 19, 1621-1639 (1998).
2. E. O. Carew, F. W. Cooke, et al. Chapter 1, Properties of Materials. In: Biomaterials Science. Elsevier Academic Press, 23-65 (2004).
3. D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications, Springer: Berlin (2001).
4. J. Mouhyi, D. M. Dohan Ehrenfest, T. Albrektsson, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 14, 170-183 (2012).
5. S. Lischer, et al., *J. R. Soc. Interface* 8, 1019-1030 (2011).
6. N. Broggini, et al., *J. Dent. Res.* 85, 473-478 (2006).
7. R. O. Darouiche, *N. Engl. J. Med.* 350, 1422-1429 (2004).
8. R. Wang R., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 109, 336-345 (2012).
9. F. Gomes, P. Teixeira, R. Oliveira, *Biofouling* 30, 131-141 (2014).
10. L. A. Proia, et al., *Clin. Infect. Dis.* 39, 373-379 (2004).
11. D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* 27, 2331-2339 (2006).
12. L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, R. G. Richards, *Biomaterials* 25, 4135-4148 (2004).
13. R. R. Maddikeri, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 84, 425-435 (2008).
14. P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang, W. Wang, *Biomaterials* 29, 1412-1421 (2008).
15. P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang, *Inc. J. Biomed. Mater. Res. A* 87, 1061-1074 (2008)
16. H. Yazici, et al., *ACS Applied Metrials & Interfaces* 8, 5070-5081 (2016).
17. A. Han, J. K. H. Tsoi, F. P. Rodrigues, J. G. Leprince, W. M. Palin, *International Journal of Adhesion & Adhesives* 60, 58-71 (2016).
18. L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 91, 470-80 (2009).
19. H. Lv, Z. Chen, X. Yang, L. Cen, X. Zhang, P. Gao, *J. Dent.* 42, 1464-72 (2014).
20. L. K. Ista, V. H. Pérez-Luna V, G. P. López, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4), 1603-1609 (1999).
21. S. J. Lee, et al., *J. Mater. Chem. B.* 3, 5161-5165 (2015).
22. K. Narendrakumar, et al., *Dent. Mater.* 31, 1460-8 (2015).
23. B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, T. J. Webster, *Nanotechnology* 22, 295102 (11pp) (2011).
24. M. E. Barbour, N. Gandhi, A. El-Turki, D. J. O'Sullivan, D. C. Jagger, *J. of Biomed. Mat. Res. A* 90, 993-998 (2009).
25. B. Del Curto, et al., *Int. J. Artif. Organs* 28, 718-30 (2005).

26. S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T. J. Webster, *Biomaterials* 31, 706-13 (2010).
27. T. P. Schaer, S. Stewart, B. B. Hsu, A. M. Klibanov, *Biomaterials* 33, 1245-1254 (2012).
28. M. Kazemzadeh-Narbat, et al., *Biomaterials* 31, 9519-9526 (2010).
29. K. V. Holmberg, et al., *Acta Biomater.* 9, 8224-31 (2013).
30. L. Zhou, et al., *Colloids Surf. B Biointerfaces* 128, 552-560 (2015).
31. M. Yoshinari, T. Kato, K. Matsuzaka, T. Hayakawa, K. Shiba, *Biofouling* 26, 103-110 (2010).
32. X. Chen, H. Hirt, Y. Li, S. U. Gorr, C. Aparicio, *PLoS ONE* 9, e111579 (2014).
33. D. T. Yucesoy, et al., *JOM* 67, 754-766 (2015).
34. J. K. Bronk, et al., *Acta Biomater.* 10, 3354-3362 (2014).
35. S. Gruenheid, H. Le Moual, *FEMS Microbiol. Lett.* 330, 81-89 (2012).
36. M. Godoy-Gallardo, et al., *Biomacromolecules* 16, 483-96 (2015).
37. T. E. Rams, J. E. Degener, A. J. Van Winkelhoff, *Clin. Oral Implants Res.* 25, 82-90 (2014).
38. M. K. Kang, S. B. Lee, S. K. Moon, K. M. Kim, K. N. Kim, *Dent. Mater. J.* 31, 98-105 (2012).
39. S. He, et al., *J. R. Soc. Interface* 11, 20140169 (2014).
40. K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. La Tempa, C. A. Grimes, T. A. Desai, *Biomaterials* 28, 4880-4888 (2007).
41. S. W. Park, et al., *Appl. Surf. Sci.* 303, 140-146 (2014).
42. J. H. Lee, S. K. Moon, K. M. Kim, K. N. Kim, *Acta Odontol. Scand.* 71, 168-174 (2013).
43. B. Jose, V. Jr. Antoci, A. R. Zeiger, E. Wickstrom, N. J. Hickok, *Chem. Biol.* 12, 1041-1048 (2005).
44. H. Davidson, et al., *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 103, 1381-1389 (2015).
45. B. Cabal, et al., *PLoS ONE* 7, e42393 (2012).
46. W. Chen, et al., *Biomaterials* 27, 5512-5517 (2006).
47. D. Campoccia, L. Montanaro, C. R. Arciola, *Biomaterials* 34, 8533-8554 (2013).
48. A. Cochis, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A* 103, 1176-1187 (2015).
49. T. Kizuki, T. Matsushita, T. Kokubo, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25, 1737-1746 (2014).
50. M. Chimutengwende-Gordon, C. Pendegrass, R. Bayston, G. Blunn, *Biointerphases* 9, 031010 (2014).
51. S. Mei, et al., *Biomaterials* 35, 4255-4265 (2014).
52. Z. Zhu, F. Zhang, Y. Xie, Y. Chen, X. Zheng, *Mater. Sci. Forum* 620 622, 307-310 (2009).
53. I. Noda, et al., *Bioceramics Devel. Appl.* 1, 101-102 (2011).
54. J. Qu, et al., *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 97, 40-48 (2011).
55. W. Chen, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A* 82, 899-906 (2007).
56. M. Jelínek, et al., *Appl. Phys A: Mater. Sci. Process* 101, 615-620 (2010).

57. M. Jelínek, M. Weiserová, T. Kocourek, M. Zedulová, J. Strnad, *Laser Phys.* 21, 1265-1269 (2011).
58. A. Jankovic, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 5333 (2015).
59. E. Unosson, D. Rodriguez, K. Welch, H. Engqvist, *Acta Biomater.* 11, 503-510 (2015).
60. X. Zheng, et al., *Mater. Sci. Forum* 544-545, 841-844 (2007).
61. M. Li, et al., *Surface & Coatings Technology* 286, 140-147 (2016).
62. M. Rosenberg, T. A. Petrie, *Nanotechnology* 23(5), 055103 (2012).
63. A. S. Bidra, *J. Prosthet. Dent.* 111, 96-100 (2014).
64. D. Ready, et al., *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 662-666 (2015).
65. A. Ioannidis, et al., *Clin. Oral Implants Res.* 26, 523-528 (2015).
66. Y. Waal, G. Raghoobar, H. Meijer, E. Winkel, A. Winkelhoff, *Clin. Oral Implants Res.* 26, 1015-23 (2014).
67. A. Kozlovsky, Z. Artzi, O. Moses, N. Kamin-Belsky, R. B. N. Greenstein, *J. Periodontol.* 77, 1194-1200 (2006).
68. J. Grischke, J. Eberhard, M. Stiesch, *Dental Materials Journal* 35, 545-558 (20016).
69. G. Jin, et al., *Biointerfaces* 117, 158-165 (2014).
70. B. H. Zhao, et al., *Surf. Coat. Technol* 228, S428-432 (2013).
71. J. Y. Deng, et al., *J. Biomater. Appl.* 25, 178-189 (2010).
72. X. Ge, et al., *J. Biomed. Mater. Res A* 95, 588-599 (2010).
73. M. K. Kang, et al., *Thin Solid Films* 517, 5390-5393 (2009).
74. C. Rodriguez-Valencia, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 853-861 (2013).
75. Y. Shibata, et al., *Biomaterials* 31, 8546-8555 (2010).
76. T. Shirai, et al., *Acta Biomater.* 7(4), 1928-1933 (2011).
77. J. Xu, et al., *Appl. Surf. Sci.* 256, 7540-7544 (2010).
78. P. Petrini, et al., *Int. J. Artif. Organs* 29, 434-442 (2006).
79. Inoue D., et al., *International Orthopaedics* 41(6), 1093-1099 (2017).
80. H. Cheng, et al., *Biomater. Sci.* 3, 665-680 (2015).
81. J. Fang, et al., *J. Hard Tissue Biol.* 23, 35-43 (2014).
82. D. J. Lin, et al., *J. Biomater. Appl.* 27, 553-563 (2013).
83. X. Zhao, G. Liu, H. Zheng, H. Cao, X. Liu, *J. Therm. Spray Technol.* 24, 401-409 (2015).
84. V. Fröjd, et al., *Mol. Oral Microbiol.* 26, 241-252 (2011).
85. L. G. Harris, R. G. Richards, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 311-314 (2004).
86. J. Li, Y. Zhao, *J. Coat. Technol. Res.* 9, 223-228 (2012).
87. F. Teng, et al., *Biosci. Trends* 8, 260-265 (2014).
88. L. Visai, et al., *Int. J. Artif. Organs* 34(9), 929e46. (2011)

89. K. Hashimoto, H. Irie, A. Fujishima, *Jpn J. Appl. Phys.* 44(12), 8269e85 (2015).
90. T. Monetta, F. Bellucci, *Plasma Chem. Plasma Process* 34, 1247-1256 (2014).
91. H. A. Foster, I. B. Ditta, S. Varghese, A. Steele, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90(6), 1847e68 (2011).
92. N. Suketa, et al., *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 7, 105-111 (2005).
93. A. M. Gallardo-Moreno, et al., *Acta Biomater.* 5, 181-192 (2009).
94. E. D. De Avila, et al., *Biomaterials* 67, 84-92 (2015).
95. Y. Shibata, T. Miyazaki, *Handbook of oral biomaterials* p.317 (2014).
96. C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J. W. Costerton, *Biomaterials* 33, 5967-5982 (2012).
97. K. Das, S. Bose, A. Bandyopadhyay, B. Karandikar, B. L. Gibbins, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater* 87, 455-460 (2008).
98. A. Almaguer-Flores, R. Olivares-Navarette, A. Lechuga-Bernal, L. A. Ximenez-Fyvie, S. E. Rodil, *Diam. Relat. Mater.* 18, 1179-1185 (2009).
99. E. Westas, M. Gillstedt, J. Lonn-Stensrud, E. Bruzell, M. Andersson, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 1063-1070 (2014).
100. E. Elizabeth, G. Baranwal, A. G. Krishnan, D. Menon, M. Nair, *Nanotechnology* 25, 115101 (2014).
101. D. H. Song, et al., *Mater. Res. Bull.* 47, 2994-2998 (2012).
102. M. R. Mofarreh, S. A. Shojaosadati, *Int. J. Nano. Biomater.* 4, 281-289 (2012).
103. N. Ren, et al., *J. Mater. Chem.* 22, 19151-19160 (2012).
104. F. A. Sheikh, et al., *J. Ceram. Process Res.* 11, 685-691 (2010).
105. Z. Wang, Y. Sun, D. Wang, H. Liu, R. I. Boughton, *Int. J. Nanomed.* 8, 2903-2916 (2013).
106. X. Lu, et al., *J. Royal Soc. Interface* 8, 529-539 (2011).
107. J. Huang, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 491-496 (2011).
108. W. Liu, et al., *Nanomedicine* 10, 713-723 (2015).
109. X. Shi, et al., *RSC Adv.* 5, 34237-34242 (2015).
110. R. Torrecillas, et al., *J. Nanomater.* 2009, 498505 (2009).
111. D. V. Shtansky, et al., *Appl. Surf. Sci.* 285, 331-343 (2013).
112. D. V. Shtansky, et al., *Surf. Coat. Technol.* 205, 728-739 (2010).
113. W. Liu, et al., *Nanoscale* 6, 9050-9062 (2014).
114. Yao X., et al., *Appl. Surf. Sci.* 292, 944-947 (2014).
115. Y. Huang, et al., *Sci. Rep.* 4, 6172 (2014).
116. L. Zhao, et al., *Biomaterials* 32, 5706-16 (2011).
117. C. Y. Flores, et al., *J. Colloid Interface Sci.* 350, 402-8 (2010).

118. A. Ewald, S. K. Glücker mann, R. Thull, U. Gbureck, *Biomed. Eng. Online* 5, 22 (2006).
119. J. Harges, et al., *Sarcoma* 2007, 26539 (2007).
120. J. D. Bumgardner, P. Adatrow, W. O. Haggard, P. A. Norowski, *Int. Journal Oral Maxillo. Fac. Implants* 26, 553-60 (2010).
121. M. Annunziata, et al., *J. Dent.* 39, 720-728 (2011).
122. N. Lin, et al., *Surf. Coat. Technol.* 209, 212-215 (2012).
123. A. Scarano, M. Piattelli, G. Vrespa, S. Caputi, A. Piattelli, *J. Oral. Implantol.* 29, 80-85 (2003).
124. B. Groessner-Schreiber, M. Hannig, A. Dück, M. Griepentrog, D. F. Wenderoth, *Eur. J. Oral. Sci.* 112, 516-522 (2004).
125. B. Größner-Schreiber, et al., *Clin. Oral Implants Res.* 12, 543-551 (2001).
126. B. Größner-Schreiber, et al., *Clin. Oral Implants Res.* 20, 817-826 (2009).
127. Lin N., et al., *Appl. Surf. Sci.* 258, 7047-7051 (2012).
128. M. K. Ji, et al., *J. Adv. Prosthodont.* 7, 166-171 (2015).
129. V. Ntrouka, M. Hoogenkamp, E. Zaura, F. Van der Weijden, *Clin. Oral Implants Res.* 22, 1227-34 (2011).
130. A. Mudunkotuwal, V. H. Grassian, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 14986-94 (2010).
131. P. Wu, D. W. Grainger, *Biomaterials* 27, 2450-67 (2006).
132. F. Faot, et al., *Bmc. Oral Health* 14 (2014).
133. R. Müller, et al., *Biomaterials* 27, 4059-4068 (2006)
134. T. D. Sargeant, M. S. Rao, C. Y. Koh, S. I. Stupp, *Biomaterials* 29, 1085-1098 (2008).
135. C. Falentin-Daudré, V. Migonney, "Functionalization of biomaterials and applications" Chapter, *Biomaterials*, Ed. Wiley (2014).
136. A. Alcheikh, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1745-1754 (2013).
137. A. Michiardi, et al., *Acta Biomaterialia* 6, 667-675 (2010).
138. G. Hé lary, F. Noirclère, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
139. D. M. Vasconcelos, et al., *Materials Science and Engineering C* 45, 176-183 (2014).
140. H. P. Felgueiras, I. Ben Aissa, M. D. M. Evans, V. Migonney, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26(261), 1-14 (2015).
141. H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, *RSC Advances* 6, 13766-13771 (2016).
142. V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudré, H. Chouirfa H., *Process for grafting bioactive polymers onto metallic materials* WO201702219 (2016).
143. R. Chen, M. D. P. Willcox, K. Ka Kit Ho, D. Smyth, N. Kumar, *Biomaterials* 85, 142-151 (2016).
144. R. Rasul, et al., *Int. J. Antimicrob. Agents* 35(6), 566-572 (2010).
145. E. Gerits, et al., *Orthopaedic Research Society* 34, 2191-2198 (2016).
146. S. Kucharíková, et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 71(4), 936-45 (2016).

147. H. Chourifa *et al.*, *Biointerphases* 12, 02C418 (2017).
148. H. Chourifa, thesis report not yet submitted.
149. X. Hua, *et al.*, *Biomaterials* 31, 8854-8863 (2010).
150. J. Peyre, V. Humblot, C. Méthivier, J. M. Berjeaud, C. M. Pradier, *J. Phys. Chem. B* 116, 13839-13847 (2012).
151. A. Córdoba, *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8(18), 11326-11335 (2016).
152. J. H. Moon, J. H. Park, J. Y. Lee, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 806-812 (2011).
153. T. Calliess, *et al.*, *Biomed. Tec.* 57, 467-471 (2012).
154. C. Pfaffenroth, *et al.*, *Macromol. Biosci.* 11, 1515-1525 (2011).

DEUXIÈME CHAPITRE : GRAFTING BIOACTIVE POLYMERS ONTO TITANIUM IMPLANTS BY UV IRRADIATION

Ce second chapitre décrit le greffage de polymères bioactifs sur le titane en utilisant les rayonnements UVs. Au sein du laboratoire LBPS, la technique de greffage « direct » de polymères bioactifs sur des surfaces de titane a été développée et mise au point dans les années 2000.¹⁻³ Ce greffage est réalisé en deux étapes :

1) Les surfaces sont activées par une étape d'oxydation chimique permettant de créer des hydroperoxydes de titane à la surface,

2) Sous l'effet de la chaleur, les hydroperoxydes sont clivés et forment des radicaux qui amorceront la polymérisation du monomère.

Ce procédé de greffage radicalaire a fait l'objet d'un brevet³ et de nombreuses publications^{1,2} et est actuellement utilisé par la société CERAVÉR pour fonctionnaliser la surface des prothèses de hanches ACTISURF. L'ensemble des résultats des études biologiques *in vitro* et *in vivo* réalisées sur les prothèses ACTISURF étant positifs, l'ANSM a donné à la société CERAVÉR son accord en novembre 2016 pour réaliser une étude clinique multicentrique sur cette prothèse de titane bioactive.

Ce procédé de greffage radicalaire qui répond aux exigences de biocompatibilité et de réduction de l'adhérence bactérienne nécessite néanmoins un temps de polymérisation de 15 h, ce qui présente un surcoût pour la réalisation à l'échelle industrielle. Un des objectifs de cette thèse était d'améliorer ce processus de greffage en réduisant le temps de polymérisation. L'idée a été d'utiliser l'irradiation UV au lieu de l'action de la chaleur pour amorcer la polymérisation à la surface du titane.

Ce chapitre est dédié à la réalisation du procédé de greffage radicalaire amorcé par irradiation UV, que nous avons appelé « greffage UV ». Nous montrerons qu'avec ce procédé UV, il est possible d'améliorer non seulement le temps de polymérisation en le réduisant de 15 à 1 h, mais également de diminuer la concentration du monomère afin d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus par le greffage par voie thermique. Cette nouvelle technologie a été protégée par un brevet français en août 2015, une extension européenne en août 2016⁴ et a fait l'objet d'une publication en janvier 2016.⁵

1. G. H elary, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
2. G. H elary, F. Noirclere, J. Mayingi, B. Bacroix, V. Migonney, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 655-663 (2010).
3. V. Migonney, G. H elary, F. Noirclere, "Method for grafting bioactive polymers on prosthetic materials", *WO/2007/141460* A3 (2006).
4. V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudr e, H. Chouirfa, *WO/2017/025519* (2016).
5. H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudr e, *RSC Advances* 6, 13766-13771 (2016).

The anchorage failure of titanium implants in human body is mainly due to biointegration problems. The use of bioactive polymers bearing anionic groups (such as sulfonates) in combination with titanium-based materials has been shown to be an excellent solution. In this paper, we report the grafting of an ionic polymer poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS), in two-step reaction procedure using UV irradiation. First, the titanium surfaces were chemically oxidized to allow the formation of titanium hydroxide and titanium peroxide. Then, titanium samples were immersed in a solution of sodium styrene sulfonate (NaSS) and were placed under UV irradiations to induce the decomposition of titanium peroxides with the formation of radicals able of initiating the polymerization of the monomer NaSS. Various parameters, such as polymerization time, monomer concentration and lamp power were studied in order to optimize the yield of polyNaSS grafting. Fourier-transform infrared spectra recorded in attenuated total reflection mode (ATR-FTIR), scanning electron microscopy with Oxford energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS) and contact angle measurements were applied to characterize the poly(NaSS) grafting. The amount of the poly(NaSS) grafted onto the titanium surfaces were determined by the toluidine blue colorimetric method.

I. Introduction

Titanium is widely used as implantable biomaterials for its good corrosion resistance, its excellent mechanical properties and "acceptable" biocompatibility with human tissues,¹⁻³ but insufficient integration into surrounding bone often occurs. This rejection is due to an uncontrolled inflammation process which induces fibrous capsule formation, causing the implant to poorly bind to the host tissue and consequently the implants can fail under shear stress, requiring revision surgery.⁴ In order to overcome this problem, different techniques have been proposed over the years to modify the surface of titanium. These approaches vary from mechanical to thermal and electrochemical methods.⁵⁻⁸ An alternative method that is gaining popularity, is the grafting of biomolecules and/or bioactive polymers.⁵

Previous studies carried out in our laboratory have shown that anionic polymers or copolymers such as poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS), poly(methacrylic acid) (polyMA), poly(methacryloyl phosphate) can favor osteoblast cell adhesion and differentiation.⁹⁻¹⁰ The distribution of these ionic groups along the molecular chains creates active sites which can interact with extracellular proteins, such as fibronectin, implicated in cell response. Recently, the grafting of polyNaSS was successful by using radicals issued from titanium peroxides able to initiate the radical polymerization of sodium styrene sulfonate (NaSS) monomer.¹¹⁻¹⁴ Oxidation of titanium creates titanium peroxides at the surface; which, under heating, produce radicals to initiate the polymerization of ionic monomer NaSS. The drawback of this method is the long polymerization times (15 hrs). To this end, this study demonstrates the use of UV irradiation to decrease the polymerization time.

UV irradiation has been used to initiate radical graft polymerization of bioactive compounds on polymer surfaces.¹⁵⁻¹⁹ When exposed to UV light, polymer surfaces generate reactive sites which can be used to initiate graft polymerization. For example, UV irradiation has been used to introduce carboxylic acid functionality to PMMA²⁰, as well as to activate polystyrene surfaces for cell tissue.²¹

Chemical modification using UV irradiation is an easy process that can also be used as a suitable alternative due to its low cost and fast reaction rate. In this paper, we describe a simple method to graft sulfonate groups to the titanium implant surface by using UV radiation. This new method is the object of a patent.²² To demonstrate the success of the procedure, modified surfaces were characterized by various techniques including colorimetric method, contact angle analysis, ATR-FTIR and SEM (EDS).

II. Experimental section

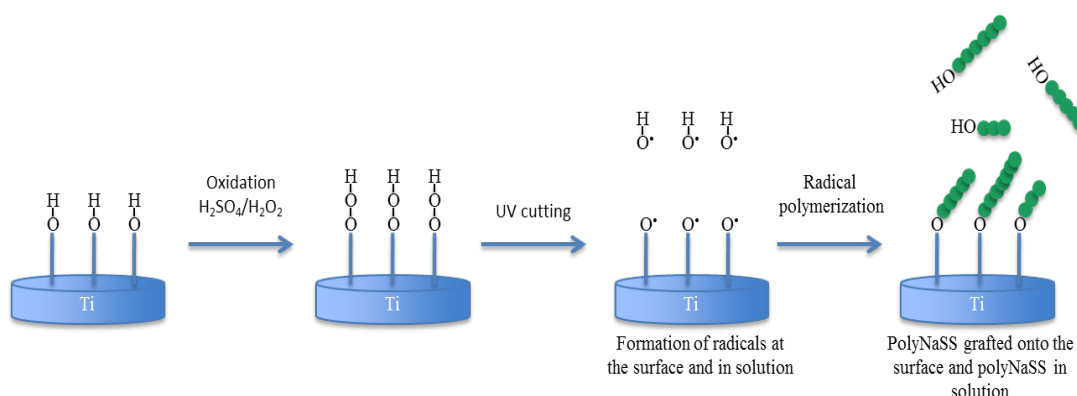
1. Materials

Titanium (Grade 2) disks were obtained from Goodfellow, the surfaces of 1.5 cm diameter were polished. The two disk faces were polished with two SiC consecutive papers 500 and 1200. After polishing, the surfaces were cleaned in acetone overnight under stirring. The following day, the surfaces were successively cleaned once in acetone bath and three times in distilled water (dH₂O) bath with sonication for 15 min. Then, the disks were put in Kroll's reagent (2% HF, Sigma; 10% HNO₃, Acros and 88% dH₂O) for one minute with stirring followed by five consecutive dH₂O baths with

sonication for 15 min each time. Sodium styrene sulfonate (NaSS, Sigma) used for the grafting process was purified by recrystallization in a mixture of water/ethanol (10:90 v/v).^{11,22-25} The purified NaSS was then dried under atmospheric pressure at 50°C overnight and then stored at 4°C.

2. Grafting polyNaSS onto titanium surfaces

After washing the surface with Kroll's reagent, the surfaces were immersed in a Piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 50:50 v/v) in a controlled and inert atmosphere (> 99% argon) (**Scheme 1**). First, the surfaces were immersed in sulfuric acid for one minute with stirring, then hydrogen peroxide was added resulting in a color change and an exothermic reaction. The disks were amply rinsed with dH_2O before putting them into a round bottom flask containing an aqueous solution of NaSS (0.32 M or 0.7 M). The round bottom flask containing NaSS and the titanium surfaces was irradiated with UV light (365 nm) at ambient temperature with stirring. The grafted surfaces were then rinsed for 48 h with dH_2O and dried overnight at 37 °C before characterization.



Scheme 1: UV grafting process of polyNaSS onto the titanium surface. The surface is oxidized with peroxide formation and the UV irradiation give radicals by homolytic cleavage which initiates the polymerization.

3. Instrumentation and measurements

UV lamp: The UV device used from Lot Quantum Design generated a power from 200 W to 500 W (arc light source). All experiments were done at 365 nm at ambient temperature.

Gel permeation chromatography - Size exclusion chromatography (GPC-SEC): GPC-SEC was performed on a Shimadzu Prominence instrument equipped with a SIL-20A auto sampler and a Shimadzu RID-10A differential refractive index detector. The system was fitted with an

Ultrahydrogel™ (Waters) gel guard column (6 × 40 mm) and two Ultrahydrogel™ (Waters) analytical columns (7.8 × 300 mm). NaNO₃ (0.1 M) was used as the mobile phase, eluting at 0.7 mL/min at 40°C. Samples were dissolved in an aqueous solution of NaNO₃ (0.1 M). Prior to injection, the samples were filtered through cellulose acetate membranes (0.45 μm pore size). The molecular weights of the polymers were determined using LCsolution GPC software by a conventional calibration obtained from poly(NaSS) standards (Sigma-Aldrich) ranging from $\approx 4 \times 10^3$ to $\approx 150 \times 10^3$ g/mol.

4. Surface characterization

The grafting of poly(NaSS) was confirmed using the toluidine blue (TB) colorimetric method, contact angle, Fourier-transform infrared (FTIR) spectra, recorded in an attenuated total reflection (ATR) mode and scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy analysis (SEM-EDS).

Toluidine blue colorimetric method: For the toluidine blue (CARL ROTH) test, 3 titanium disks were used for each different grafting. The grafted disks were immersed in a toluidine blue solution (5×10^{-4} M) at 30°C for 6 hrs to allow complexation of toluidine blue with the surface grafted polymers. It is assumed that 1 mol of toluidine blue forms a complex with 1 mol of carboxylate groups or 1 mol of sulfonate groups.²⁶⁻²⁷ Non-complexed TB molecules were removed by gentle rinsing of the sample with a NaOH aqueous solution (1×10^{-3} M). Decomplexation of the toluidine blue was done by soaking the samples in 10 mL mixture of acetic acid/dH₂O (50:50 v/v, Fisher) for 24 hrs at ambient temperature. Concentration of decomplexed toluidine blue was measured by visible spectroscopy at 633 nm using a Perkin Elmer lambda 25 spectrometer. Ungrafted Ti samples were used as controls and were found not to react with the toluidine blue solution. 3 titanium disks were used per analysis.

Contact angle measurements: Static solvent contact angles were measured using a DSA10 contact angle measuring system from KRUSS GmbH. A droplet of solvent was suspended from the tip of a microliter syringe supported above the sample stage. The image of the droplet was captured and the contact angle was measured using DSA drop shape analysis program from KRUSS. The contact angle of distilled water (2 μL) on the surface was recorded 10 s after contact, 3 measurements were taken and averaged.

Analyses by ATR-FTIR: The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra, recorded in an

attenuated total reflection (ATR), were obtained using a Perkin Elmer Spectrum Two Spectrometer. A diamond crystal (4000 cm^{-1} - 500 cm^{-1}) with a resolution of 4 cm^{-1} was applied. The disks were uniformly pressed against the crystal and for each surface, 128 scans were acquired.

SEM-EDS analyses: The surface micro-topography of the grafted titanium disks were analyzed by scanning electron microscopy (SEM, Hitachi TM3000) with Oxford energy dispersive spectroscopy (EDS) without sample preparation, the instrument operated at 5 kV to 15 kV.

III. Results and discussions

The grafting of polymers (polyNaSS) onto titanium (Ti) surfaces can be achieved by radical polymerization.²³ This method involves the immersion of titanium surfaces in a mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide (30%) produces a surface layer of titanium hydroxide and titanium peroxide species. The existence of the Ti-peroxide radicals was proposed independently by different research groups based on the vibrational modes in the range of $890 - 900\text{ cm}^{-1}$ of H_2O_2 -oxidized Ti powder.²³ Takemoto et al.²⁸ have shown that the amount of Ti peroxide present decreases upon heating.

Immersion of the titanium samples in a heated aqueous solution of the NaSS monomers induces decomposition of the Ti-peroxide radicals and initiates polymerization of the monomers, as shown previously on pure titanium.^{11,23} Here, we expand on the concept to replace source of radicals from a thermal source to a UV source to reduce reaction times.

We expected that the grafting efficiency of polyNaSS onto titanium surfaces would be strongly dependent on the power of the UV source. Keeping the concentration of NaSS constant (at 0.7 M), we tested several powers (from 75 to 220 mW/cm^2) of the UV source. At each power, the sample was irradiated for the same duration (45 min) and we found that a maximum grafting efficiency could be obtained at 160 mW/cm^2 , $1.75 \pm 0.1\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ (**Figure 1**). With this optimized power we carried out a kinetic study (**Figure 2**) where we observed that the curve followed a “Gaussian curve” with an optimum at one hour, $2.48 \pm 0.3\text{ }\mu\text{g/cm}^2$.

The optimization of power and a kinetic study at the optimum power further had also been done at 0.32 M (**Figures 1, 2**). The optimum power was found to be at 220 mW/cm^2 ($1.27 \pm 0.1\text{ }\mu\text{g/cm}^2$), stronger than 0.7 M and we observed at one hour a grafting maximum ($4.35 \pm 0.1\text{ }\mu\text{g/cm}^2$).

Indeed, the polymerizations are significantly faster (complete in 1 h) over previous studies using thermal initiation (complete in 15 hrs).^{11,23-25} Furthermore, a comparable grafting efficiency ($4.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ compared to $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) can be achieved at a lower monomer concentration (less wastage). With a weak concentration, it's necessary to increase the power to have a good quantity of grafted polyNaSS while a short time reaction. Beside, with both a high concentration and power, we had weak results because the viscosity increased. We have studied various parameters to optimize the conditions, the balance of the concentration, the power, the viscosity and the exposure time is important. All these parameters had been analysed to allow an excellent result: a high grafted polyNaSS rate in a few time.

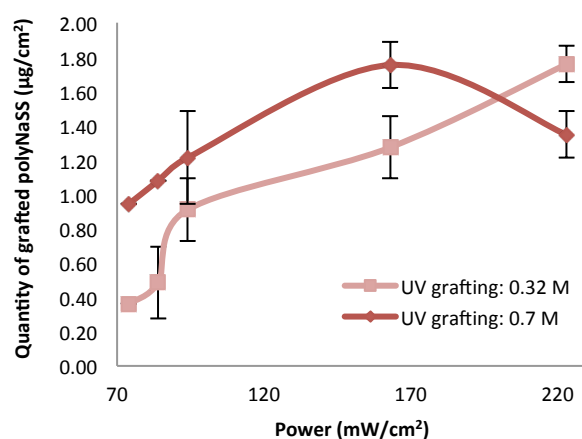


Figure 1: UV Grafting at 0.32 M and at 0.7 M according to the power at 45 min.

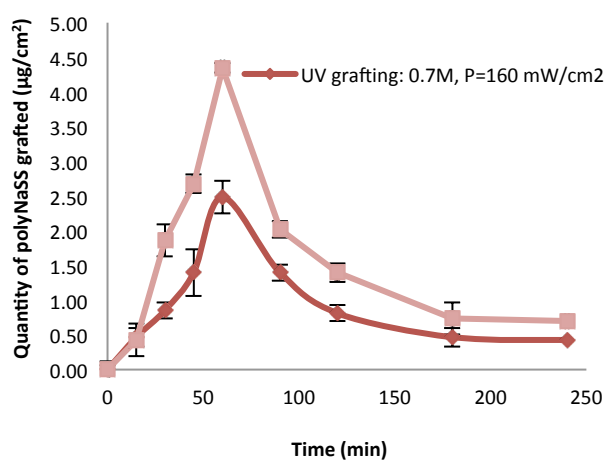
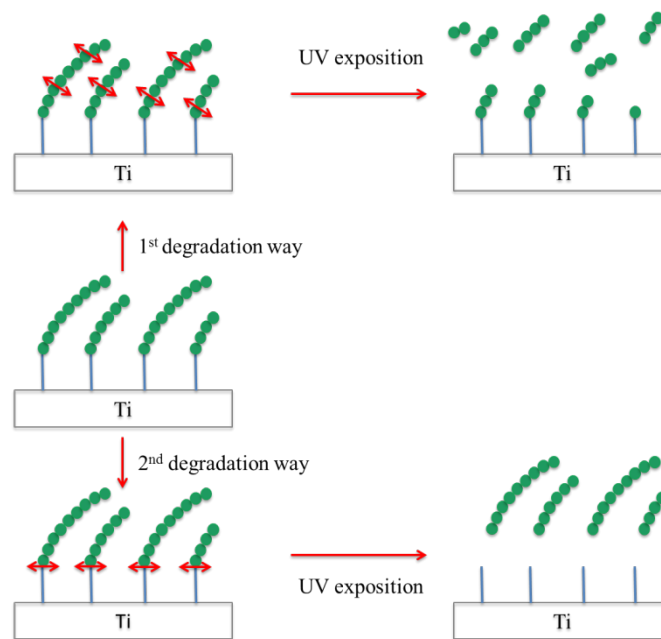


Figure 2: Kinetic study of grafting polymerization at 0.32 M and at 0.7 M at $220 \text{ mW}/\text{cm}^2$ and at $160 \text{ mW}/\text{cm}^2$ respectively.

With a UV initiated grafting, we observed a decreasing quantity of grafted poly(NaSS) if the surface was irradiated for longer than 60 min. To explain this observation, two scenarios are possible (**Scheme 2**): the scission of polyNaSS chains or entire removal of polyNaSS chains from the surface.



Scheme 2: UV degradation of the polyNaSS according to possible ways.

To test the extend of chain scission, a polyNaSS standard from Sigma Aldrich (≈ 10 kDa) was been exposed for 4 hours under UV light at 220 mW/cm^2 . The chromatograms before and after irradiation showed no change, suggesting no chain scission takes place under the reaction conditions (**Figure 3**). Thus the second scenario, involving the entire removal between the polyNaSS and the titanium, was studied in more details. A grafted surface was exposed for 4 hrs with the UV light (220 mW/cm^2) in distilled water analysed with TB. The results showed a decrease of more than 90%. We can conclude that the second hypothesis is checked: an important UV exposition is going to break the bound between the polyNaSS and the titanium.

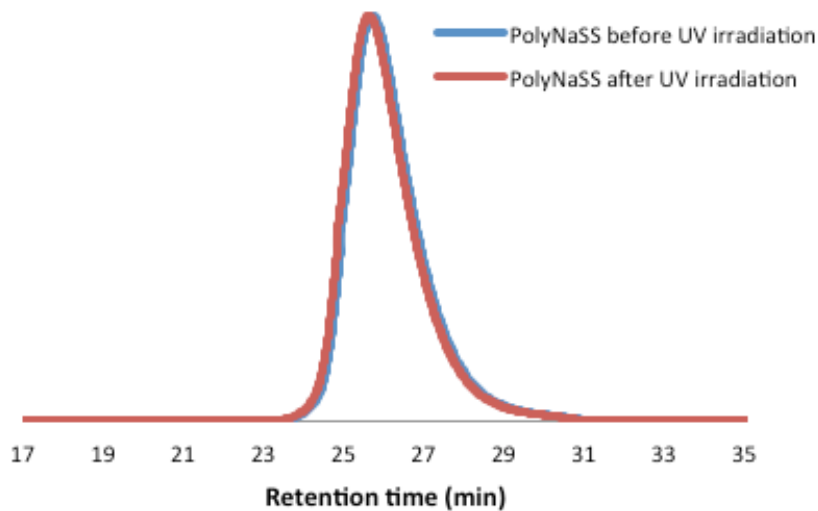


Figure. 3: GPC-SEC chromatogram of polyNaSS before and after UV irradiations.

Indeed, a long UV irradiation time does not degrade the polyNaSS but the bond between the polymer and the Ti surface is easily cleaved.

Moreover, others analysis were done to check the presence of polyNaSS on the surface. Firstly, we evaluated the contact angle: the contact angle (θ) is a measure of the wettability of a solid by a liquid. In the case of complete wetting, the contact angle is close to 0° (super-hydrophilic surface), between $[0^\circ - 90^\circ]$, the surface is wetting and above 90° , the surface is hydrophobic (**Figure 4**).^{29,30}

The two different graftings (thermal and UV), gave a contact angle around 15° suggesting the presence of polyNaSS which is known to be a hydrophilic polymer. In contrast the control sample (polished Ti disk, cleaned with Kroll's reagent and oxidized with Piranha solution) gave a contact angle of 57° . Absolutely, the polyNaSS is an anionic polymer bearing sulfonate groups, allowing when it is grafted to give to the surface a hydrophilic property (interesting wetting, θ inferior at 45°).



Figure 4: No grafted surface (left) and grafted surface (right).

The FTIR spectra showed in the two UV initiated graftings, the presence of specific peaks of the polyNaSS at the surface of the titanium disk. The spectra (**Figure 5**) shows the titanium surface ungrafted and grafted with polyNaSS between 900 and 1800 cm^{-1} .

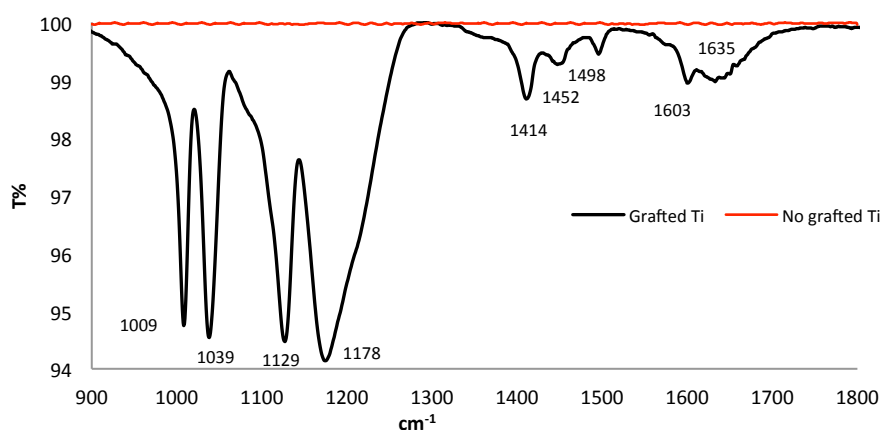


Figure 5: Enlargement of FTIR-ATR spectrum of grafted polyNaSS onto titanium surface.

The aromatic ring and the symmetric vibrations of the SO_3^- groups generated a NaSS doublet ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) located at 1009 and 1039 cm^{-1} (**Table 1**). The absorption of the sulfonate was detected by the peaks between 1130 - 1185 cm^{-1} , which is also associated with asymmetric vibrations (**Table 1**). Asymmetric vibrations are also found for the group SO_2 at 1414 cm^{-1} . Finally, the series of peaks between 1635 and 1452 cm^{-1} are attributed to stretching vibrations of bonds ($\text{C}=\text{C}$) of the benzene ring (**Table 1**). Whereas, the ungrafted titanium was not IR active.

Table 1: Adsorption bands characteristics of polyNaSS

Wavenumber (cm^{-1})	Peak intensity	Chemical groups & interactions
1635-1452	Weak	$\nu(\text{C}=\text{C})$ from the aromatic ring

1414	Medium	v(SO ₂)
1178-1129	Strong	SO ₃ ⁻ (Salt)
1039	Strong	v(O=S=O)
1009	Strong	Aromatic ring

The EDS element chemical analysis showed the presence of different atoms (C, O, Na, Ti, S), especially Na and S, essential compounds of the polyNaSS (**Table 2**). The percentage of oxygen is bigger after grafting because of one hand the oxidation step using peroxide hydrogen permitting to generate more oxygen atoms (Ti-OOH) and the other hand the grafting of polyNaSS (SO₃⁻). A higher carbon percentage is observed due to the grafting of the bioactive polymer.

Table 2: Analysis of atomic (%) of elements at the titanium surface.

	EDS atomic composition %				
	C	O	Na	S	Ti
Ungrafted	6.5 ± 0.2	8.0 ± 0.6	-	-	85.5 ± 0.6
Thermal grafted	20.8 ± 0.4	23.6 ± 0.8	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.3	52.2 ± 2.0
UV grafted 0.32 M	21.7 ± 1.5	19.7 ± 0.8	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.6	54.9 ± 3.2
UV grafted 0.7 M	20.9 ± 1.5	19.3 ± 1.5	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.4	56.6 ± 2.2

In order to have a clear view of the distribution of the elements at the surface of the grafted titanium and to confirm the homogeneity of the polyNaSS coating, elemental mapping was carried out using the EDS system on grafted samples (**Figure 6**). The same analysis has been done for an ungrafted titanium (**Figure 7**), we don't have any sodium and sulfur elements which are characteristic elements of polyNaSS.

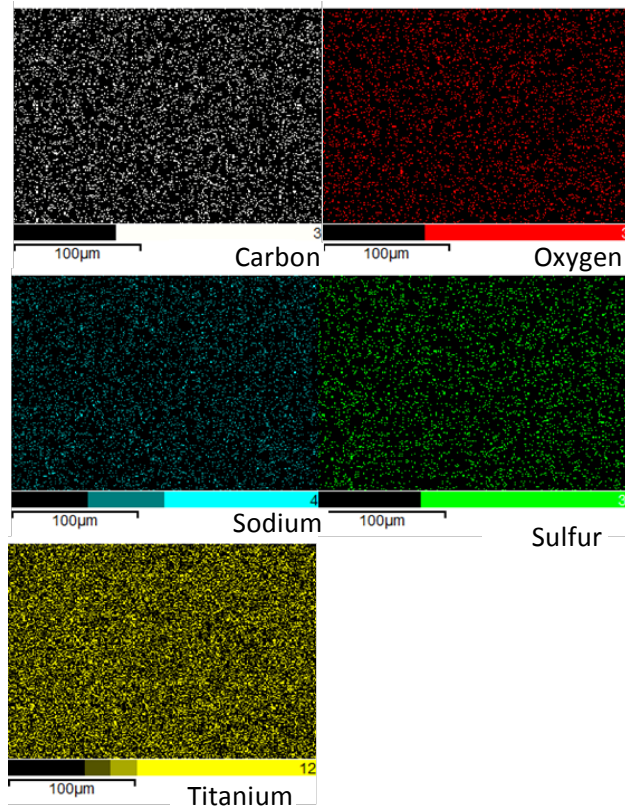


Figure 6: Element mapping/distribution on a grafted titanium surface.

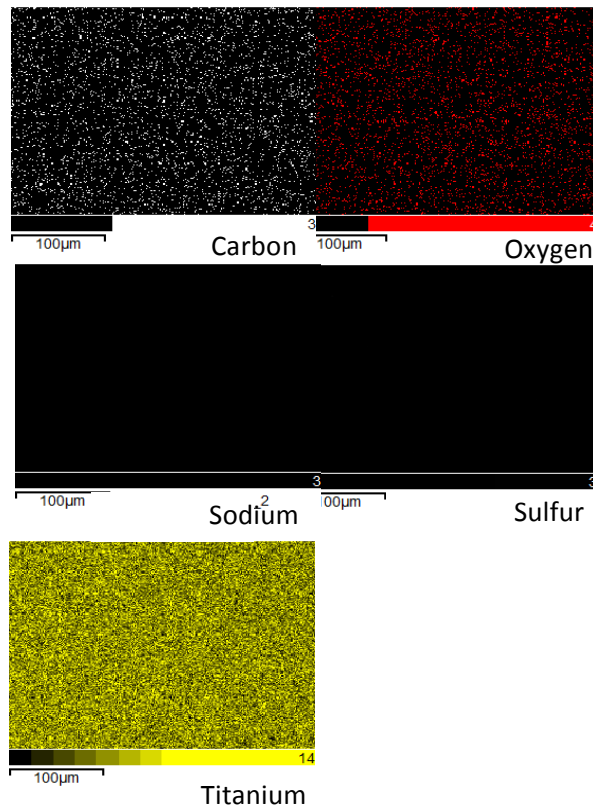


Figure 7: Element mapping/distribution on an ungrafted titanium surface.

IV. Conclusions

We have developed a new approach to graft bioactive polymers covalently to a titanium surfaces. UV irradiation was used to induce decomposition of titanium peroxide to radicals to initiate the polymerization of an aqueous solution of monomer (NaSS) in which oxidized titanium samples were immersed. Different parameters, such as the time of the irradiation exposure, the monomer concentration and the power of the lamp were found to influence the efficiency of the grafting. Using a range of different techniques to measure the presence of bioactive polymers at the surface of titanium samples, this study has shown a grafting maximum ($4.35 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) with a power lamp at $220 \text{ mW}/\text{cm}^2$, with 0.32 M of monomer concentration and an UV exposure of 1 h. Compared with other modification methods, surface graft polymerization induced by UV irradiation exhibit some advantages such as fast reaction rate, low cost processing, simple equipment, easy industrialization. So, this finding might be adapted to graft bioactive polymers on other metallic devices, such as titanium alloys implants, which are widely used in medical application.

V. References

- 1 M. Niimoni, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 1, 30-42 (2008).
- 2 M. Niimoni, *Metall. Mater. Trans. A.* 33A, 477-486 (2002).
- 3 M. Long, H. J. Rack, *Biomaterials* 19, 1621-1639 (1998).
- 4 M. Klabunde Windler, In Brunette DM T, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Eds.; *Titanium in medicine*. Berlin: Springer p.703 (2001).
- 5 A. Michiardi, et al., *Acta Biomater.* 6, 647-675 (2010).
- 6 Z. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, et al., *Mater. Sci. Eng. C* 23, 395-400 (2003).
- 7 A. Puelo, A. Nanci, *Biomaterials* 20, 2311-2321 (1999).
- 8 X. Liu, P. K. Chu, C. Ding, *Mater. Sci. Eng. R* 47, 49-121 (2004).
- 9 F. El Khadali, G. Hélarly, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, *Biomacromolecules* 3, 51-56 (2002).
- 10 F. Anagnostou, et al., *Biomaterials* 27, 3912-3919 (2006).
- 11 V. Migonney, G. Hélarly, F. Noirclere, "Method for grafting bioactive polymers on prosthetic materials", WO/2007/141460 A3 (2006).
- 12 G. Hélarly, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
- 13 G. Hélarly, F. Noirclere, J. Mayingi, B. Bacroix, V. Migonney, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 655-663 (2010).
- 14 S. Kerner, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 707-715 (2010).
- 15 B. Kordoghli, et al., *Colloids and surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects* 441, 606-613 (2014).
- 16 J. Deng, L. Wang, L. Liu, W. Yang, *Progress in Polymer Science* 34, 156-193 (2009).
- 17 J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, *Progress in Polymer Science* 32, 698-725 (2007).
- 18 K. Hato, E. Uchida, E. T. Kang, Y. Uyama, Y. Ikada, *Pogress in Polymer Science* 28, 209-259 (2003).
- 19 G. Oster, O. Shibata, *Journal of Polymer Science* 26, 233-234 (1957).
- 20 C. Situma, et al., *Anal. Biochem.* 340, 123-135 (2005).
- 21 A. Welle, S. Horn, J. Schimmelpfeng, D. J. Kalka, *Neurosci. Meth.* 142, 243-250 (2005).
- 22 V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudré, H. Chouirfa, WO/2017/025519 (2016)
- 23 G. Hélarly, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
- 24 H. Felgueiras, V. Migonney, *Mater. Sci. and Eng. C*, 39, 196-202 (2014).

- 25 D. M. Vasconcelos, et al., *Materials Science and Engineering C* 45, 176-183 (2014).
- 26 S. Sano, K. Kato, Y. Ikada, *Biomaterials* 14(11), 817-822 (1993).
- 27 K. Kato, Y. Ikada, *Biotechnology and Bioengineering* 47, 557-566 (1995).
- 28 S. Takemoto, T. Yamamoto, et al., *Biomaterials* 25, 3485-3492 (2004).
- 29 L. Feng, et al., *Adv. Mater.* 14(24) (2002).
- 30 Y. Yuan, T. R. Lee, *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences 51 (2013).

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2017/025519 A1

(43) Date de la publication internationale
16 février 2017 (16.02.2017)

WIPO | PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
A61L 27/04 (2006.01) *A61L 27/34* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2016/068909
- (22) Date de dépôt international :
8 août 2016 (08.08.2016)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1557621 7 août 2015 (07.08.2015) FR
- (71) Déposants : UNIV PARIS XIII PARIS-NORD VILLETANEUSE [FR/FR]; 99, avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, 75016 Paris (FR).
- (72) Inventeurs : MIGONNEY, Véronique; 33 Avenue Jeanne, 95600 Eaubonne (FR). BAUMANN, Jean-Sébastien; 133 Avenue Joffre, 93800 Epinay Sur Seine (FR). FALENTIN-DAUDRE, Céline; 9 Rue Chopin, 95170 Deuil La Barre (FR). CHOURIFA, Hamza; Appartement 4208 127 route de Saint Leu, 93800 Epinay Sur Seine (FR).
- (74) Mandataire : REGIMBEAU; 20, rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiens (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : PROCESS FOR GRAFTING BIOACTIVE POLYMERS ONTO METALLIC MATERIALS

(54) Titre : PROCEDE DE GREFFAGE DE POLYMERES BIOACTIFS SUR DES MATERIAUX METALLIQUES

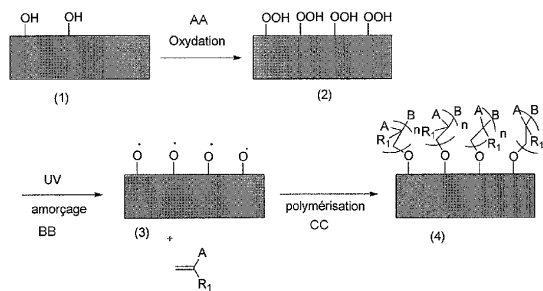


Figure 1

AA oxidation
BB initiation
CC polymerization

(57) Abstract : The present invention relates to a process for grafting polymers onto a metallic material, comprising the following steps: a) oxidation of the surface of the metallic material, resulting in an oxidized metallic material; b) grafting of a polymer at the surface of said oxidized metallic material by radical polymerization of a monomer, said radical polymerization comprising an initiation step and a propagation step, said initiation step being carried out by UV irradiation with a UV source diffusing a power at the surface of the material of greater than 72 mW.cm⁻², said UV irradiation being carried out for a duration greater than 15 minutes and less than 180 minutes, said process resulting in a grafted metallic material. The present invention also relates to the materials capable of being obtained by this process, and applications of the latter, in particular as articular or dental implants.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2017/025519 A1

Domaine de l'invention

La présente invention concerne un procédé de greffage de polymères sur un matériau métallique, les matériaux métalliques greffés susceptibles d'être obtenus par ce procédé et des applications de ces derniers. Plus spécifiquement, l'invention concerne un procédé de greffage direct de polymères à la surface de matériaux métalliques.

Arrière - plan technologique

L'implantation d'une prothèse articulaire ou dentaire dans un site osseux engendre une cascade de réactions tissus/implants intitulée « réponse de l'hôte » qui, si elle est contrôlée, permet d'aboutir in fine à « l'ostéointégration de l'implant », processus menant notamment à l'intégration de la prothèse dans le tissu osseux grâce à un contact intime tissu osseux/prothèse et à une minimisation de l'épaisseur du tissu fibreux à l'interface. Dans le cas contraire, ces réactions peuvent conduire à une nouvelle intervention chirurgicale, voire au retrait de la prothèse.

En effet, le matériau implanté est considéré comme un « corps étranger » par le système vivant, ce qui déclenche une réponse inflammatoire, pouvant conduire à une encapsulation fibreuse, et ainsi, au rejet de l'implant. De plus, lorsqu'un tissu « fibroinflammatoire » est produit autour de l'implant (tissu qui n'a ni les activités biologiques, ni les caractéristiques mécaniques du tissu osseux), la probabilité d'un descellement aseptique (désolidarisation de l'implant) ou d'une infection du site de l'implantation s'en trouve accrue.

Le matériau prothétique apparaît en effet comme un support privilégié pour l'adhésion et la colonisation par des bactéries (éventuellement par la formation d'un « biofilm » bactérien résistant notamment aux antibiotiques), étape initiatrice d'une infection pouvant conduire à une septicémie, une endocardite ou une ostéomyélite, notamment dans le cas d'infections aux staphylocoques.

Le processus d'ostéointégration peut ainsi être affecté par la technique chirurgicale et la présence de germes lors de l'implantation, mais aussi pour une grande partie par les propriétés physicochimiques du matériau, telles que la topographie de surface, sa rugosité, ou sa composition chimique.

Pour améliorer l'ostéointégration des implants, notamment métalliques, les revêtements « hydroxyapatite » sont encore aujourd'hui utilisés, car ils permettent un bon ancrage osseux tout en offrant de bonnes performances mécaniques dans un temps relativement court.

Par ailleurs, des matériaux prothétiques prometteurs, métalliques ou polymériques, dont la surface est modifiée par greffage de « polymères bioactifs », destinés à améliorer la biointégration (notamment par diminution de la réponse inflammatoire), ont été développés.

Plusieurs procédés ont été décrits pour la préparation de ces matériaux, procédés que l'on peut classer en deux catégories : les procédés par greffage « indirect » du polymère bioactif, et les procédés par greffage « direct ».

Au sens de la présente invention, un « procédé de greffage indirect » inclut une première étape de fonctionnalisation de la surface du matériau métallique à l'aide d'une molécule de faible poids moléculaire, qui sert de point d'ancrage pour greffer le polymère bioactif, le polymère étant soit préformé, soit formé in situ par polymérisation dans une étape subséquente. A titre d'exemple de greffage indirect, on peut citer notamment le procédé décrit dans l'article de Li et al. (Langmuir 2011, 27(8), 4848-4856). Le procédé divulgué dans ce document fait intervenir une première étape de greffage par réaction radicalaire d'un composé oléfinique (de préférence le TMG-C10) avec une initiation par irradiation UV d'une durée supérieure à 2h30. Toutefois, ces composés ne subissent pas de réaction de polymérisation. Ils sont bifonctionnels, et leur second groupe fonctionnel sert de point d'ancrage pour greffer le polymère à proprement parler. Ainsi, le composé oléfinique (ou coupleur), une fois greffé, sert de point d'ancrage dans un procédé de greffage « indirect », où le polymère en tant que tel est introduit par la suite via le second groupe fonctionnel.

Par opposition, un « procédé de greffage direct » s'entend, au sens de la présente invention, d'un procédé dans lequel le polymère est greffé directement à la surface du matériau métallique, sans molécule intermédiaire servant de point d'ancrage pour se lier au polymère. En d'autres termes, dans un matériau obtenu par un procédé de greffage direct, il n'existe aucune molécule intermédiaire entre la surface du matériau et le polymère bioactif greffé. Un tel procédé est notamment plus économique, plus rapide et plus efficace qu'un procédé de greffage indirect. A titre d'exemple, on peut citer le procédé décrit dans WO 2007/141460. Celui-ci comprend les étapes suivantes :

- des espèces actives donneurs de radicaux libres sont générées à la surface du matériau prothétique ; et

- le matériau prothétique sur lequel des espèces actives ont été générées est mis en présence d'au moins un monomère porteur d'une fonction permettant une polymérisation radicalaire, sa polymérisation radicalaire permettant, en l'absence d'oxygène, la formation d'un polymère bioactif.

Un tel procédé permet notamment de produire des matériaux prothétiques comprenant un taux de greffage particulièrement élevé, compris entre 3 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Toutefois, le procédé de WO 2007/141460, qui fait appel à une étape d'amorçage thermique de la polymérisation radicalaire, est particulièrement long : temps total de mise en oeuvre d'environ 14-15h (voir notamment l'exemple 1.4 de WO 2007/141460).

Il existe donc un besoin pour un procédé permettant d'obtenir des matériaux métalliques avec un taux de greffage de polymères élevé (notamment supérieur à 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en un temps raisonnable, par exemple inférieur à 2h30.

Résumé de l'invention

Les Inventeurs ont ainsi mis au point un procédé de greffage de polymères sur un matériau métallique conduisant à des taux de greffage élevés, tout en diminuant de manière spectaculaire (facteur supérieur à 10) la durée globale de mise en oeuvre du procédé selon WO 2007/141460.

Plus particulièrement, les inventeurs ont réduit la durée nécessaire pour effectuer l'étape de polymérisation radicalaire en ayant recours à une étape d'amorçage par irradiation UV, notamment avec une gamme de puissance d'irradiation spécifique.

Un premier aspect de l'invention concerne donc un procédé de greffage de polymères de préférence bioactifs sur un matériau métallique.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne les matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus par un tel procédé.

Selon un autre aspect, l'invention concerne les implants métalliques fabriqués à partir des matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention.

Dans un dernier aspect, la présente invention concerne les implants selon l'invention, pour leur utilisation dans le remplacement d'une articulation ou d'une dent, notamment par chirurgie.

Définitions

Sauf indication contraire, dans la présente description, les indices m, n, p, q, sont des nombres

entiers.

Par « matériau métallique », on entend au sens de la présente invention un matériau essentiellement constitué de métal ou un matériau dont la surface est essentiellement constituée de métal. Lorsque le matériau n'est pas essentiellement constitué de métal, l'épaisseur de la surface essentiellement constituée de métal est de préférence supérieure à 1 μm , de façon plus préférée supérieur à 10 μm .

Par « alliage », on entend au sens de la présente invention un matériau constitué d'une combinaison d'un élément métallique avec un ou plusieurs autres éléments chimiques. De préférence tous les éléments chimiques constituant l'alliage sont des métaux. Par exemple, l'alliage de titane selon l'invention peut être une combinaison de titane avec du vanadium et de l'aluminium (e.g. TA6V4Al comprenant 6% de Vanadium et 4% d'aluminium). Un alliage peut comprendre un métal en combinaison avec élément chimique représentant jusqu'à 45% en masse de l'alliage. Par exemple, un alliage Ti-25Nb-3Fe comprend jusqu'à 25% de Niobium et 3% de Fer et un alliage Ti-24,8Nb-40Zr comprend jusqu'à 24,8% de Niobium et 40,7% de Zirconium. Un alliage peut être la combinaison de nombreux éléments métalliques comme par exemple le Ti-10,1Ta-1,7Nb-1,6Zr qui est une combinaison de 4 éléments différents.

Par « matériau essentiellement constitué de X », on entend au sens de la présente invention un matériau comprenant uniquement X, X pouvant être un élément métallique ou un alliage, et éventuellement des traces d'autres constituants. Ainsi, un matériau essentiellement constitué de X comprend au moins 95% en poids, de préférence au moins 97% en poids de X, éventuellement en combinaison avec l'oxygène, par rapport au poids total du matériau. En effet, il est entendu qu'un matériau métallique peut comprendre une couche d'oxydation native en surface. Ainsi, un matériau métallique essentiellement constitué de X comprend au plus 5%, de préférence au plus 3%, en poids d'un élément différent de l'oxygène et de X, par rapport au poids total du matériau.

Par « matériau prothétique », on entend au sens de la présente invention un matériau utilisable dans la fabrication d'un implant médical tel qu'une prothèse, en particulier une prothèse de hanche ou un implant dentaire. De préférence, le matériau prothétique selon l'invention est essentiellement constitué de métal.

Par « composé pur », on entend au sens de la présente invention que le composé présente une pureté de 100%. Par « composé essentiellement pur » on entend au sens de la présente invention

que le composé est utilisé tel quel, sans être mélangé à un autre composé, et en particulier il n'est pas mis en solution. Un composé « essentiellement pur » peut néanmoins contenir jusqu'à 5% en poids (de préférence moins de 3%) d'impuretés par rapport au poids total du composé. Ainsi, un monomère tel que l'acide acrylique de grade technique commercial est un composé essentiellement pur.

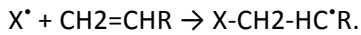
Par « polymère bioactif », on entend au sens de la présente invention un polymère permettant d'améliorer l'ostéointégration du matériau métallique, de préférence prothétique, sur lequel il est greffé. De préférence, un polymère bioactif est en particulier capable d'orienter les réponses cellulaires eucaryotes et/ou procaryotes au site d'intégration de l'implant prothétique fabriqué à partir d'un matériau métallique susceptible d'être obtenu selon le procédé de la présente invention, et de prévenir le développement d'une infection. Un tel polymère comporte de préférence des groupements ioniques. De façon plus préférée, le polymère bioactif comprend des groupements phosphonates, carboxylates et/ou sulfonates.

L'angle de contact d'un matériau se mesure selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. Par exemple, on peut utiliser une méthode de mesure de l'angle de contact à partir d'une goutte d'eau déposée à la surface du matériau (matériau métallique oxydé ou matériau métallique greffé) via l'appareil KRUSS : DSA100 qui permet de connaître les modifications du caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface.

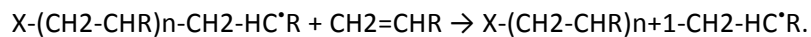
Au sens de la présente invention, une oléfine est un monomère comprenant au moins une insaturation carbone – carbone (double liaison carbone-carbone C=C ou triple liaison C≡C) non aromatique, de préférence une double liaison. Par monomères présentant au moins une insaturation carbone – carbone non aromatique, on entend selon l'invention des monomères présentant une ou deux, de préférence une, double ou triple liaison, avantageusement une double liaison, et plus particulièrement le motif CH₂=CH-.

Dans la présente description, l'acronyme « UV » est synonyme d'ultraviolet. Ainsi, lorsque l'on parle d'« irradiation UV », on entend « irradiation aux rayons ultraviolets ».

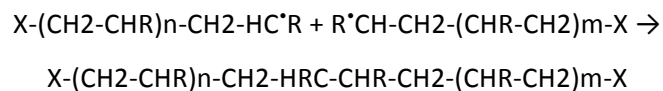
Par « polymérisation radicalaire », on entend une polymérisation en chaîne faisant intervenir comme espèce active des radicaux. Elle comprend une étape d'amorçage, de propagation, de terminaison, et éventuellement de transfert de chaîne. L'étape d'amorçage consiste en la formation d'un radical issu de l'amorceur sur la première unité monomère (dans cet exemple, un monomère oléfinique) :



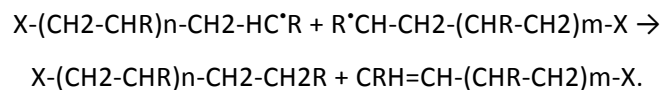
La propagation est la principale étape de la polymérisation radicalaire. C'est au cours de cette étape que la chaîne polymérique se forme à partir de la surface métallique par additions successives d'unités monomères sur la chaîne en croissance. Le nombre d'occurrences de la réaction de propagation gouverne le degré de polymérisation en nombre de la chaîne formée et donc la masse molaire du polymère formé.



Les réactions de terminaison sont de plusieurs types. La terminaison peut résulter de l'addition sur la chaîne en croissance d'une molécule d'amorceur, de solvant, d'une impureté présente dans le milieu etc... D'autres réactions de terminaison, la recombinaison et la dismutation, mettent en jeu deux chaînes en croissance. Dans une réaction de recombinaison, deux chaînes reforment une liaison covalente :



Dans une réaction de dismutation, deux chaînes donnent lieu à une réaction de transfert d'hydrogène, suivie d'une recombinaison. Le résultat global peut s'écrire :



La proportion relative de ces modes de terminaison dépend essentiellement du type de monomère employé, de l'accessibilité des sites radicalaires c'est-à-dire de l'encombrement stérique des sites actifs.

Le taux de greffage du polymère (de préférence bioactif) du matériau métallique greffé est exprimé en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Il est mesuré par exemple à l'aide d'un dosage colorimétrique au bleu de toluidine, lorsque le polymère comprend des groupes sulfonates, carboxylates ou phosphonates.

Au sens de la présente invention, on entend par « acide » un acide organique ou minéral dont

le pKa dans l'eau est inférieur à 3.

Par « alkyle en C₁-C₁₀ » on entend au sens de la présente invention une chaîne hydrocarbonée saturée de 1 à 10 atomes de carbone, linéaire ou ramifiée. A titre d'exemple d'alkyle en C₁-C₁₀, on peut citer notamment le méthyle, l'éthyle, le propyle, le n-butyle, le s-butyle, le tert-butyle, le pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle. De préférence, l'alkyle en C₁-C₁₀ est un alkyle en C₁-C₄. Le méthyle et l'éthyle sont particulièrement préférés.

Par « hétéroaryle », on entend, au sens de la présente invention, un groupe aromatique comprenant 5 à 10 atomes cycliques dont un ou plusieurs hétéroatomes, avantageusement 1 à 4 et encore plus avantageusement 1 ou 2, tels que par exemple des atomes de soufre, azote ou oxygène, les autres atomes cycliques étant des atomes de carbone. Des exemples de groupes hétéroaryle sont les groupes furyle, thiényle, pyrrolyle, pyridinyle, pyrimidinyle, pyrazolyle, imidazolyle, triazolyle, tétrazolyle ou encore indyle.

Au sens de la présente invention, on entend par « oxydation contrôlée », une étape d'oxydation permettant de générer spécifiquement des fonctions hydroperoxydes - OOH à la surface du matériau métallique. Ainsi, l'oxydation contrôlée selon l'invention permet d'obtenir un résultat différent de l'oxydation non contrôlée que pourrait subir le matériau métallique conduisant à une couche d'oxydation naturelle, qui est essentiellement constituée de fonctions OH dont la répartition et la densité ne sont pas homogènes sur la surface du matériau métallique.

Au sens de la présente invention, on entend par « absence d'O₂ », un taux de O₂ inférieur à 1 % en volume, de façon préférée inférieur à 0,5% en volume par rapport au volume total du gaz considéré.

Au sens de la présente invention, on entend par « puissance surfacique », la puissance de l'irradiation UV à la surface du matériau métallique. Elle est notamment dépendante de la puissance de la lampe utilisée et de la distance entre la lampe et l'échantillon. Elle peut être aisément mesurée par l'homme du métier, par exemple à l'aide d'un radiomètre à microprocesseur (e.g. VLX-3W, VILBER LOURMAT). Aux fins de la mesure, on considère la puissance stabilisée, par exemple lorsque la lampe est allumée depuis 1 heure ou plus.

Description détaillée de l'invention

Procédé de greffage

Ainsi, l'invention a pour objet un procédé de greffage de polymères sur un matériau métallique, comprenant les étapes suivantes :

a) l'oxydation de la surface du matériau métallique, conduisant à un matériau métallique oxydé, et

b) le greffage d'un polymère à la surface dudit matériau métallique oxydé par polymérisation radicalaire d'un monomère, ladite polymérisation radicalaire comprenant une étape d'amorçage et une étape de propagation, ladite étape d'amorçage étant effectuée par irradiation UV avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW, de préférence comprise entre 72 mW.cm⁻² et 226 mW.cm⁻², de manière encore préférée entre 91 mW.cm⁻² et 226 mW.cm⁻², de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW.cm⁻², ladite irradiation UV étant réalisée pendant une durée supérieure à 15 minutes et inférieure à 180 minutes, de préférence inférieure ou égale à 120 minutes, de manière encore préférée inférieure ou égale à 90 minutes. ledit procédé conduisant à un matériau métallique greffé.

Le procédé selon l'invention est un procédé de greffage direct. Ainsi, le procédé de greffage de la présente invention est exempt de toute étape de greffage d'une molécule intermédiaire ou coupleur entre le matériau métallique et le polymère greffé.

Matériau métallique

Le matériau métallique selon l'invention est de préférence un matériau prothétique. On peut citer comme exemple de matériaux métalliques, de préférence prothétiques, les matériaux à base de titane, d'aluminium, d'acier, de chrome, de cobalt, de niobium, de tantale, de vanadium, d'iridium, de zirconium, d'or et leurs alliages.

Les matériaux métalliques comprennent généralement en surface une couche d'oxydation native qui se forme spontanément en présence d'air, comprenant ou essentiellement constituée de groupes M-OH dont la densité et la répartition est aléatoire, M représentant un atome d'un des métaux de l'alliage, notamment un atome d'un métal cité parmi les listes ci-dessus.

Le matériau métallique (de préférence prothétique) est de préférence en titane ou en alliage de titane. En effet, le titane est connu pour ses propriétés de biocompatibilité.

Typiquement, un matériau en titane est essentiellement constitué de titane, et/ou d'oxyde de titane. Dans tous les cas, le matériau en titane comprend en surface une couche d'oxydation native qui se forme spontanément en présence d'air, comprenant des groupes Ti-OH dont la densité et la répartition est aléatoire.

Avantageusement, l'alliage de titane est à base de nickel, de vanadium, d'aluminium niobium et/ou de molybdène, de préférence c'est un alliage de titane, d'aluminium et de vanadium, de manière préférée entre toutes il s'agit du TiAl6V4.

Etape optionnelle de polissage

Le procédé selon l'invention peut comprendre une étape préalable de polissage. Cette étape est effectuée de préférence préalablement à l'étape de décapage qui est décrite ci-après. Ainsi, le matériau métallique peut être poli par abrasion pour limiter la rugosité de la surface du matériau.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, les matériaux métalliques sont polis avec du papier abrasif et de préférence avec différents papiers abrasifs de granulométries décroissantes. Plus spécifiquement, le polissage mécanique des matériaux métalliques peut être réalisé à l'aide d'un bras automatique monté sur une polisseuse rotative, avec du papier abrasif de granulométries décroissantes. Ainsi, on peut successivement utiliser des papiers abrasifs de grades 500 puis 1200.

Avantageusement, le matériau métallique est également lavé, de préférence successivement au polissage, notamment par trempage dans une solution d'acétone puis avec de l'eau, puis est de préférence séché.

De préférence toutefois, le procédé selon l'invention est dépourvu de toute étape de polissage.

Rugosité du matériau métallique

Avantageusement, le matériau métallique utilisé présente une rugosité supérieure à 0,2 μm , de préférence supérieure à 1 μm , et façon plus préférée supérieure à 3 μm . Typiquement la rugosité est inférieure à 20 μm .

La rugosité est de préférence mesurée par microscopie à force atomique. Si le matériau métallique de départ présente une rugosité trop élevée, alors le procédé comprend une étape de polissage telle que décrite ci-dessus pour obtenir une rugosité adaptée, notamment comprise entre

0.2 μm et 20 μm , de préférence comprise entre 3 μm et 10 μm .

Etape de décapage

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend une étape de décapage, réalisée préalablement à l'étape d'oxydation, afin d'en améliorer l'efficacité. Lorsque le procédé selon l'invention comprend également une étape de polissage, l'étape de décapage est alors conduite entre l'étape de polissage et l'étape a) d'oxydation.

Le décapage est avantageusement un décapage chimique. Un décapage chimique comprend typiquement une mise en contact du matériau métallique dans une solution aqueuse acide. Par exemple, le matériau métallique est trempé pendant une durée t_{decap} dans une solution aqueuse acide. L'acide présente de préférence un pKa compris entre -2 et 3.

De préférence, la durée t_{decap} est comprise entre 0,5 et 10 minutes, de manière encore préférée entre 0,5 et 2 minutes.

La solution aqueuse acide utilisée pour l'étape de décapage est de préférence une solution aqueuse d'acide nitrique (HNO_3) ou une solution aqueuse comprenant un mélange d'acides fluorhydrique et nitrique (mélange HF/HNO_3), de préférence en des proportions volumiques HF/HNO_3 comprises entre 1:20 et 20:1.

Avantageusement, le pH de la solution aqueuse acide est compris entre -1 et 3, de manière encore préférée entre -1 et 1.

Ainsi, avantageusement, le décapage chimique comprend le trempage du matériau métallique dans une solution aqueuse acide de pH compris entre -1 et 1 pendant une durée t_{decap} comprise entre 0,5 et 1 minute, la solution aqueuse acide étant de préférence une solution aqueuse comprenant le mélange HF/HNO_3 .

Des exemples de mise en oeuvre de cette étape de décapage pour des matériaux en titane ou alliage de titane sont notamment décrits par Liu et al (Materials Science and Engineering. R47 (2004) 49-121) et Takeuchi et al. (Biomaterials 24 (2003) 1821-1827). Lorsque le procédé selon l'invention comprend également une étape de décapage préalablement à l'étape d'oxydation, l'étape d'oxydation est réalisée de préférence rapidement après le décapage. Ainsi, le temps entre la fin de l'étape de décapage et le début de l'étape d'oxydation est avantageusement inférieur à 16 heures, de préférence inférieur à 12 heures, de manière encore préférée inférieur à 6 heures, de façon

encore plus préférée inférieure à 3 heures.

Avantageusement, l'étape de décapage comprend également le lavage (ou rinçage) du matériau décapé notamment avec de l'eau, en particulier de l'eau distillée.

Oxydation (étape a)

De manière générale, l'oxydation peut être réalisée par tous les moyens d'oxydation de matériaux métalliques bien connus de l'homme du métier tels que l'oxydation par traitement avec une solution de peroxyde d'hydrogène, ou au moyen d'une forte température, ou avec une combinaison des deux techniques (Takemoto et *al.*, 2004), l'oxydation anodique du titane dans une solution d'acide acétique ou dans un mélange d'électrolytes contenant des ions magnésium (Sul et *al.*, 2005), et l'oxydation micro-arc sur des prothèses de titane (Li et *al.*, 2004).

L'étape a) d'oxydation permet avantageusement de fournir une couche oxydée comprenant des groupes hydroperoxydes -OOH, de manière contrôlée, à la surface du matériau métallique.

En effet, les matériaux métalliques, notamment en titane ou en alliage de titane, présentent une couche d'oxydation native, dont la teneur en fonction M-OH n'est pas contrôlée (M représentant un atome métallique). Pour ces matériaux métalliques, l'étape d'oxydation permet notamment de former en surface des hydroperoxydes de métal (M-OOH) dont la densité peut être contrôlée.

Il en résulte que l'étape a) d'oxydation a une influence directe sur le taux de greffage du polymère, qui est très élevé, typiquement compris entre 1,5 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ainsi, si l'étape a) du procédé selon l'invention est omise, le taux de greffage s'en trouve fortement diminué, notamment dans le cas des matériaux métalliques, tels que les matériaux, de préférence prothétiques, en titane, aluminium ou en alliages.

En outre, il semble que la couche d'oxydation permet d'éviter la migration d'ions métalliques toxiques, notamment lorsque le procédé est mis en oeuvre avec un alliage de titane de type TiAl6V4 (dans ce cas particulier les ions métalliques toxiques sont les ions vanadium et aluminium).

Dans un premier mode de réalisation, l'étape a) d'oxydation est réalisée par traitement chimique : ce mode de réalisation sera dans la suite appelé « oxydation par voie chimique ». L'oxydation par voie chimique est notamment une oxydation par mise en contact du matériau métallique avec une solution oxydante, notamment H_2O_2 , ou une oxydation par ozonation.

L'oxydation par voie chimique est en particulier réalisée par traitement du matériau avec une solution aqueuse comprenant un oxydant et un acide, de préférence un mélange H_2SO_4 et H_2O_2 .

La mise en contact du matériau métallique avec la solution oxydante (notamment une solution comprenant H_2O_2) peut être réalisée par exemple, en versant la solution oxydante dans un récipient contenant le matériau métallique, ou le matériau métallique peut être plongé dans un récipient contenant la solution oxydante.

Dans le cas d'une oxydation par voie chimique par mise en contact du matériau métallique avec une solution oxydante, ladite solution oxydante est notamment un mélange acide /oxydant, en particulier H_2SO_4/H_2O_2 . L'acide est de préférence un acide de pKa (dans l'eau) inférieur à 3, de manière encore préférée de pKa (dans l'eau) inférieur à 2. Avantagement, l'acide est en solution aqueuse et choisi parmi l'acide fluorhydrique (HF), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique (H_2SO_4) et leurs mélanges, de manière encore préférée il s'agit de H_2SO_4 .

L'oxydant est de préférence H_2O_2 . Néanmoins il peut être remplacé par l'ozone dans le cas d'une ozonation. Ainsi, de préférence, dans ce mode de réalisation par traitement chimique, l'étape a) d'oxydation est réalisée avec un mélange aqueux H_2SO_4/H_2O_2 . La proportion d'acide par rapport à H_2O_2 peut varier dans une large mesure et l'homme du métier est à même de définir le rapport le plus efficace pour aboutir à un taux de greffage souhaité. De préférence, une solution H_2SO_4/H_2O_2 50/50 (v/v) est utilisée pour oxyder le matériau métallique. La température utilisée est généralement la température ambiante (20-30°C), voire une température plus faible (par exemple, entre 0 et 20°C), la réaction d'oxydation pouvant être exothermique.

Par « mélange acide/ H_2O_2 » on entend le mélange simultané ou séquentiel de la solution d'acide et de la solution de H_2O_2 . Ainsi, soit les deux solutions sont mises en contact simultanément avec le matériau métallique à oxyder, soit le matériau métallique est d'abord mis en contact avec la solution d'acide, puis la solution de H_2O_2 est mise en contact dans un deuxième temps avec le matériau métallique.

Dans tous les cas, l'homme du métier pourra adapter le temps de contact du matériau métallique avec la solution oxydante en fonction de sa nature (titane pur ou sous forme d'alliage...), du mode d'oxydation chimique mis en oeuvre et du taux de greffage final souhaité.

Dans le cas d'un mélange acide/ H_2O_2 simultané, le temps d'oxydation est de préférence de 1 à

10 minutes, de manière plus préférée de 3 à 6 minutes et de manière la plus préférée le temps d'oxydation est de 4 minutes. De préférence, ce temps d'oxydation s'applique à l'oxydation du titane ou d'un de ses alliages avec une solution H_2SO_4/H_2O_2 .

Dans le cas de l'utilisation d'un mélange séquentiel, le matériau métallique peut être, par exemple, plongé dans la solution d'acide pendant au moins 10 secondes, de préférence pendant au moins 20 secondes, de préférence pendant au moins 30 secondes, de manière plus préférée pendant plus de 50 secondes, de manière préférée pendant plus de 1 minute, de manière préférée pendant plus de 2 minutes, de manière préférée pendant plus de 3 minutes, de manière préférée pendant plus de 4 minutes. Ce temps de mise en présence du titane, ou d'un de ses alliages, avec H_2SO_4 peut être largement supérieur et peut, par exemple, atteindre 30 minutes ou plus.

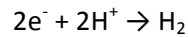
Cependant, dans un mode préféré de réalisation, le temps de mise en présence du matériau métallique avec la solution d'acide est inférieur à 5 minutes, temps au-delà duquel une diminution du taux de greffage est observée. Cette procédure est en particulier appliquée dans le cas de l'oxydation du titane ou d'un de ses alliages, avantageusement mis en présence d'une solution de H_2SO_4 .

De la même manière, le temps de mise en présence du matériau métallique avec la solution de H_2O_2 peut varier. De préférence, le matériau métallique, de préférence le titane ou un de ses alliages, est mis en présence de H_2O_2 pendant au moins 10 secondes, de préférence au moins 20 secondes, de préférence au moins 30 secondes, de préférence au moins 40 secondes, de préférence au moins 50 secondes, de préférence au moins 1 minute, de préférence au moins 2 minutes, de préférence pendant 2 à 3 minutes, et de manière la plus préférée pendant deux minutes après ajout de la solution de H_2O_2 . Dans un mode préféré de réalisation, on préfère une action de H_2SO_4 sur le titane, ou un de ses alliages, pendant 1 minute puis une action de H_2O_2 sur le titane pendant 3 minutes.

L'oxydation chimique par trempage du matériau métallique dans une solution oxydante, notamment un mélange acide/ H_2O_2 et de préférence un mélange H_2SO_4/H_2O_2 , typiquement en des proportions 50/50 (v/v), est particulièrement préférée.

Dans un mode de réalisation préféré, l'étape a) d'oxydation est réalisée par traitement chimique avec un mélange H_2SO_4 et H_2O_2 , typiquement en des proportions 50/50 (v/v). Dans un autre mode de réalisation, l'étape a) d'oxydation est réalisée par traitement anodique (ou anodisation) ou par ozonation.

Typiquement, lors d'une oxydation par traitement anodique, le matériau métallique est mis en contact avec une solution électrolytique acide contenue dans une cuve électrochimique comprenant une électrode, puis subit une étape de mise sous tension électrochimique, le matériau métallique jouant le rôle de l'anode dans la cuve électrochimique. A l'anode (matériau métallique), se produit une réaction d'oxydation des protons selon l'équation suivante :



Avantageusement, le potentiel appliqué à l'anode est compris entre 10 et 250 V vs électrode normale à l'hydrogène (NHE), de préférence entre 20 et 200 V vs NHE. En outre, avantageusement, l'intensité appliquée à l'anode est comprise entre 0,1 et 50 mA/cm², de préférence entre 1 et 50 mA/cm².

De préférence, la solution électrolytique comprend un acide possédant au moins un pKa inférieur à 2,5 ; par exemple un acide possédant au moins un pKa compris entre -10 et 2,5. Par exemple, on peut utiliser de l'acide chromique (anodisation chromique), de l'acide sulfurique (anodisation sulfurique), de l'acide orthophosphorique, de l'acide oxalique ou un mélange de ceux-ci. Les acides peuvent également être utilisés en mélange avec un alcool tel que le mélange méthanol/NaNO₃. De préférence toutefois, la solution électrolytique comprend de l'acide sulfurique (anodisation sulfurique) ou de l'acide orthophosphorique, de manière préférée de l'acide orthophosphorique.

Dans le cas des matériaux métalliques, à l'échelle du laboratoire, on préférera mettre en oeuvre l'étape a) d'oxydation par traitement chimique, tandis qu'à l'échelle industrielle, on préférera mettre en oeuvre l'étape a) d'oxydation par traitement anodique.

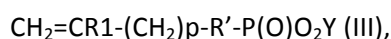
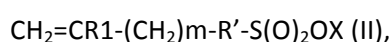
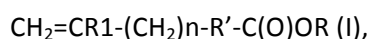
Monomères

Le monomère utilisé dans l'étape b), impliqué dans la polymérisation radicalaire, est porteur d'une fonction permettant une polymérisation radicalaire. De préférence, ledit monomère est une oléfine.

La structure des monomères utilisés dans la présente invention permet la formation d'un polymère, de préférence bioactif, à la surface d'un matériau métallique. En particulier, afin d'améliorer les propriétés d'ostéointégration et anti-bactériennes des matériaux cités ci-dessus, les monomères utilisés dans le cadre du présent procédé comprennent avantageusement un

groupement sulfonate et/ou carboxylate et/ou phosphonate. En effet, les polymères porteurs de groupements ioniques sulfonates et/ou carboxylates et/ou phosphonates favorisent l'adhérence, la colonisation et la différenciation des ostéoblastes. De plus, les polymères porteurs de groupe sulfonates et/ou phosphonates permettent d'inhiber l'adhérence de souches bactériennes, notamment de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis*, souches très majoritairement impliquées dans les infections sur matériels prothétiques métalliques.

Ainsi, avantageusement, l'oléfine est choisie parmi les oléfines de formule (I), (II) ou (III):



dans lesquelles, R1 représente un atome d'hydrogène ou un alkyle en C₁-C₁₀, de préférence un atome d'hydrogène,

n est compris entre 0 et 6, de préférence entre 0 et 1,

R représente un atome d'hydrogène, un alkyle en C₁-C₁₀ optionnellement substitué par un groupe OH, COOH ou PO₃H, un groupe Ar optionnellement substitué par un groupe OH, COOH ou PO₃H, Ar représentant un groupe phényle ou hétéroaryle, de préférence un groupe phényle, ou R représente un atome d'hydrogène, ou un cation choisi parmi les alcalins ou les alcalinoterreux, par exemple parmi Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺, de préférence Na⁺ ou Ca²⁺, de préférence R représente un atome d'hydrogène, ou un cation choisi parmi les alcalins ou les alcalinoterreux, par exemple Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺, de préférence Na⁺ ou Ca²⁺,

m est compris entre 0 et 6, de préférence entre 0 et 1,

R' représente une liaison, un alkyle en C₁-C₁₀ optionnellement substitué par un groupe OH, COOH ou PO₃H, 5 ou R' représente un groupe -C(O)-CR₂-OCR₃, Ar' Ar'-O-, ou Ar'-C(O)NH-, Ar' représentant un groupe phényle ou hétéroaryle optionnellement substitué par un groupe OH, COOH ou PO₃H, de préférence un groupe phényle optionnellement substitué par un groupe OH, COOH ou PO₃H, et

R2 et R3 représentent indépendamment des groupes alkyle en C₁-C₁₀,

X représente un hydrogène ou un ou plusieurs cations choisis de manière à obtenir une espèce électriquement neutre, notamment un cation choisi parmi les alcalins ou les alcalinoterreux, par exemple parmi 2 Na⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ ou Mg²⁺, de préférence 2 Na⁺ ou Ca²⁺,

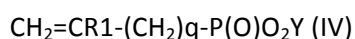
p est compris entre 0 et 6, de préférence entre 0 et 1,

Y représente un hydrogène ou un ou plusieurs cations choisis de manière à obtenir une espèce

électriquement neutre, un cation choisi parmi les alcalins ou les alcalinoterreux, par exemple parmi Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} , de préférence Na^+ ou Ca^{2+} .

Parmi les oléfines de formule (I), on peut notamment citer l'acide acrylique (AA), l'acide méthacrylique (MA), l'acide éthacrylique (EA), les sels correspondants (en particulier sels de métal alcalin, de préférence de sodium) et leurs mélanges.

Dans un mode de réalisation particulier, l'oléfine de formule (III) est une oléfine de formule (IV) :

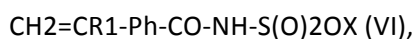
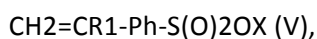


dans laquelle R1 et Y sont tels que définis ci-dessus, et q est compris entre 0 et 6, de préférence entre 1 et 5, par exemple égal à 2.

Dans les modes de réalisation où une oléfine de formule (I) avec un groupe R représentant un alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ optionnellement substitué par un groupe OH, l'étape b) de polymérisation est de préférence suivie d'une étape d'hydrolyse de la fonction ester pour libérer l'acide correspondant, soit sous forme d'acide soit sous forme de sel, de préférence avec un cation choisi parmi les alcalins ou les alcalinoterreux, par exemple parmi Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+} , de préférence Na^+ ou Ca^{2+} .

Parmi les oléfines de formule (II), sont particulièrement préférées les oléfines pour lesquelles R' représente un groupe Ar, Ar-O-, ou Ar-C(O)NH-, de manière encore préférée Ar, Ar représentant un groupe phényle ou hétéroaryle, de préférence un groupe phényle.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, les oléfines de formule (II) sont choisies parmi les oléfines de formule (V) et (VI):



dans lesquelles X et R1 sont tels que définis ci-dessus, et Ph représente un noyau phényle, de préférence substitué en positions 1 et 4.

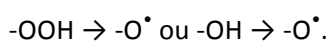
Parmi les monomères de formule (II), (V) ou (VI), on peut notamment citer l'acrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaAS), le méthacrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaMS), le styrène sulfonate de sodium (NaSS) et leurs mélanges. On préfère le styrène sulfonate de sodium.

Parmi les monomères de formule (III) on peut notamment citer le vinylbenzylphosphonate (VBP) et le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154).

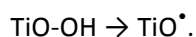
Ainsi, avantageusement, le monomère, en particulier l'oléfine, est choisi parmi les sulfonates, les phosphonates et/ou les carboxylates, de préférence choisi parmi l'acide acrylique, l'acide méthacrylate, le méthacrylate de méthyle (MMA), l'acrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaAS), le méthacrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaMS), le styrène sulfonate de sodium (NaSS), l'éthylène glycol méthacrylate, le méthacrylate phosphate, le méthacryloyl-diisopropylidène, le vinylbenzylphosphonate (VBP), 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154), ou leurs mélanges.

Greffage par polymérisation radicalaire (étape b)

Dans la présente invention, l'étape d'amorçage par irradiation UV permet de générer des radicaux $-O^{\bullet}$. Ainsi, l'étape d'amorçage par irradiation UV consiste en une rupture homolytique de la liaison O-O du groupe hydroperoxyde (généré grâce à l'étape a) d'oxydation) ou de la liaison O-H du groupe hydroxyde (résultant de l'oxydation native du matériau) se trouvant à la surface du matériau métallique oxydé :



En particulier, dans le cas d'un matériau métallique en titane, le mécanisme de cette étape d'amorçage par irradiation UV peut être représenté comme suit :



L'étape d'amorçage peut être effectuée préalablement ou de manière concomitante à l'étape de propagation.

Dans l'étape b), le (ou les) monomère(s) peut(vent) être utilisé(s) soit en solution, soit pur(s) (ou essentiellement pur(s)). Lorsque le (ou les) monomère(s) est (sont) utilisé(s) en solution dans un solvant organique ou aqueux. De préférence, il s'agit d'une solution aqueuse.

Avantageusement la concentration de monomère(s) dans la solution est comprise entre 0,2 et 1 mol.L⁻¹, de préférence entre 0,3 et 1 mol.L⁻¹, par exemple 0,7 mol.L⁻¹. De préférence, le (ou les)

monomère(s) est (sont) utilisé(s) en solution aqueuse, à une concentration comprise entre 0,2 et 1 mol.L⁻¹, de préférence entre 0,3 et 1 mol.L⁻¹, par exemple 0,7 mol.L⁻¹.

Avantageusement, ladite polymérisation radicalaire est réalisée en l'absence d'oxygène. En effet, la présence d'oxygène tend à inhiber la polymérisation radicalaire. Ainsi, de préférence, l'étape b) est réalisée en l'absence d'oxygène, sous atmosphère inerte, en particulier sous argon, hélium ou azote, avantageusement sous atmosphère d'argon.

Dans un mode de réalisation particulier, l'étape b) de greffage comprend les sous étapes suivantes :

b1) mise en contact du matériau métallique oxydé avec ledit monomère en solution aqueuse ;
b2) irradiation UV de la solution comprenant ledit monomère et ledit matériau métallique oxydé avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW.cm⁻², de préférence comprise entre 72 mW.cm⁻² et 226 mW.cm⁻², de préférence entre 91 mW.cm⁻² et 226 mW.cm⁻², de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW.cm⁻².

Ainsi, dans ce mode de réalisation, l'étape d'amorçage est effectuée de manière concomitante à la propagation (étape b2). Les étapes d'amorçage et de propagation ont donc lieu toutes deux lors de l'étape b2).

La solution aqueuse de l'étape b1) contenant ledit monomère, comprend en outre avantageusement un activateur UV de préférence choisi parmi la fluoresceine et la benzophénone.

Dans un autre mode de réalisation, l'étape b) de greffage comprend les sous-étapes suivantes :

b1') trempage du matériau métallique oxydé dans le monomère, ledit monomère étant essentiellement pur, conduisant à un matériau métallique oxydé imprégné de monomère ;
b2') irradiation UV du matériau métallique oxydé enrobé de monomère avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW.cm⁻², de préférence comprise entre 72 mW.cm⁻² et 226mW.cm⁻², de préférence entre 91 mW.cm⁻² et 226 mW.cm⁻², de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW.cm⁻².

Ainsi, dans ce mode de réalisation également, l'étape d'amorçage est effectuée de manière concomitante à la propagation (étape b2'). Les étapes d'amorçage et de propagation ont donc lieu toutes deux lors de l'étape b2').

L'étape b) comprend une irradiation UV du matériau métallique oxydé avec une source UV de longueur d'onde avantageusement comprise entre 10 nm et 380 nm, de préférence entre 200 nm et 380 nm. Par exemple, la source UV possède une longueur d'onde de 365 nm ou de 254 nm, de préférence 365 nm. Un paramètre important de l'irradiation est sa puissance surfacique sur la surface du matériau métallique oxydé, qui est elle-même fonction de la puissance de la source UV, et de la distance d_{S-Mox} entre la source UV et le matériau métallique oxydé.

De préférence, la puissance de la source UV est comprise entre 50 et 400 W, de manière encore préférée entre 150 et 200 W. Par exemple, lorsque la puissance de la source UV est de 200 W, la distance d_{S-Mox} peut être comprise entre 5 et 30 cm, de préférence entre 5 et 20 cm. Dans un mode de réalisation particulier, la distance d_{S-Mox} est de 10 cm et la puissance surfacique de la source UV à 200 W est de 162 mW/cm^2 .

Ainsi, l'irradiation UV est de préférence effectuée avec une source UV diffusant une puissance surfacique sur la surface du matériau métallique oxydé supérieure à 72 mW.cm^{-2} , de préférence comprise entre 72 mW.cm^{-2} et 226 mW.cm^{-2} , de préférence entre 91 mW.cm^{-2} et 226 mW.cm^{-2} , de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW.cm^{-2} .

Un autre paramètre important à prendre en considération est la durée d'irradiation UV t_{UV} . L'homme du métier choisira le temps nécessaire à l'irradiation du matériau métallique en fonction de la nature de ce dernier, du polymère à greffer et de la densité de greffage souhaitée. De préférence, la durée d'irradiation est inférieure à 180 minutes

Avantageusement, la durée d'irradiation UV t_{UV} est inférieure à 120 minutes. La durée d'irradiation UV t_{UV} est par exemple comprise entre plus de 15 minutes et 120 minutes, de manière encore préférée entre 30 minutes et 60 minutes, par exemple 60 minutes.

Dans un mode de réalisation particulier dans lequel le matériau métallique est un matériau en titane, la durée d'irradiation UV t_{UV} est avantageusement comprise entre plus de 15 minutes et 120 minutes pour une puissance surfacique supérieure à 72 mW.cm^{-2} de préférence.

Dans un mode de réalisation particulier dans lequel le matériau métallique est un matériau en alliage de titane, la durée d'irradiation UV t_{UV} est avantageusement comprise entre plus de 15 minutes et 120 minutes, avec une puissance surfacique de supérieure à 72 mW.cm^{-2} de préférence.

Avantageusement, il semble donc que le taux de greffage du matériau métallique oxydé lors de l'étape b) est fonction à la fois de la puissance d'irradiation UV reçue par le matériau métallique oxydé, et l'énergie surfacique reçue par ledit matériau.

Ainsi, avantageusement, la puissance surfacique due à l'irradiation UV reçue par le matériau métallique oxydé est comprise entre 72 et 226 mW/cm², de manière encore préférée entre 91 et 162 mW/cm², et l'énergie surfacique totale reçue de l'irradiation UV par le matériau métallique, de préférence prothétique, oxydé est comprise entre 194,4 et 1749,6 J.cm⁻², de manière encore préférée entre 220 et 450 J.cm⁻². L'étape b) de greffage conduit ainsi à un matériau métallique greffé.

Etape de rinçages et de lavages dite de « conditionnement »

Le matériau métallique greffé subit différents rinçages et lavages dans des solutions aqueuses et/ou salines aqueuses à température ambiante ou à 37°C ou à 60°C. Les solutions aqueuses ou salines aqueuses sont l'eau distillée, des solutions aqueuses de NaCl de différentes concentrations et/ou une solution tampon phosphate salin (PBS ou « Phosphate-buffered saline ») .

Une telle étape permet avantageusement de débarrasser le matériau métallique greffé de toute chaîne polymérique non greffée située en surface dudit matériau. Le matériau métallique greffé et rincé ainsi obtenu, une fois implanté, offre une meilleure sécurité pour le patient puisqu'elle empêche le relargage « in situ » de produits d'extraction issus de la synthèse.

Matériaux métalliques greffés

Le procédé selon l'invention peut être représenté schématiquement par la **Figure 1**. La **Figure 1** illustre bien le fait que le procédé selon l'invention est un greffage « direct » : aucune molécule intermédiaire n'est greffée à la surface du matériau métallique pour jouer le rôle de « coupleur » entre la surface du matériau et le polymère. Dans le procédé selon l'invention, le polymère est lié à la surface du matériau métallique par un simple atome d'oxygène.

Ainsi, les matériaux métalliques greffés comprennent des polymères, de préférence bioactifs, greffés à leur surface. Les matériaux métalliques greffés obtenus par le procédé de l'invention présentent avantageusement un angle de contact avec une goutte d'eau inférieur à 50°, de préférence inférieur 45°, de façon plus préférée inférieure à 30° et pouvant être avantageusement inférieur à 20°. Les matériaux métalliques greffés obtenus par le procédé de l'invention présentent généralement un angle de contact avec une goutte d'eau supérieur à 5°.

Les inventeurs ont notamment découvert que l'utilisation d'une irradiation UV selon l'invention permet d'obtenir une réduction importante de l'angle de contact par rapport aux matériaux métalliques non greffés. Cette découverte permet d'envisager des matériaux métalliques greffés avec des polymères présentant des angles de contact faibles et donc une bonne biocompatibilité.

Avantageusement, le procédé selon l'invention conduit à un matériau métallique greffé possédant un taux de greffage dudit polymère (de préférence bioactif) supérieur à $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence supérieur à $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ainsi le procédé selon l'invention conduit à un matériau métallique greffé possédant un taux de greffage dudit polymère (de préférence bioactif) de préférence compris entre $1,5$ et $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence entre 3 et $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Le taux de greffage du polymère est dans une large mesure fonction du temps d'exposition à l'irradiation UV. Il peut dépendre également de la nature et de la quantité du monomère utilisé. Les polymères greffés à la surface des matériaux métalliques obtenus selon le procédé de l'invention sont issus de la polymérisation radicalaire des monomères décrits plus haut, utilisés dans l'étape b).

Le poids moléculaire des polymères greffés selon le procédé de la présente l'invention peut varier dans une large mesure et est choisi ou contrôlé par l'homme du métier en fonction de leur application ou usage ultérieur. Avantageusement, le poids moléculaire moyen en poids des polymères greffés peut varier de 200 à 100 000 daltons.

De préférence, les polymères greffés à la surface des matériaux métalliques obtenus selon le procédé de l'invention sont issus de la polymérisation radicalaire d'au moins un monomère choisi parmi : l'acide acrylique, l'acide méthacrylique, le méthacrylate de méthyle (MMA), l'acrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaAS), le méthacrylamide de N-(sulfonate de sodium phényl) (NaMS), le styrène sulfonate de sodium (NaSS), l'éthylène glycol méthacrylate phosphate, le vinylbenzylphosphonate (VBP) et le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154), et leurs mélanges. En fonction des monomères utilisés, les polymères greffés peuvent être des homopolymères ou des copolymères.

Dans un premier mode de réalisation particulier de l'invention, les polymères greffés sont des homopolymères. Dans ce mode de réalisation, un seul monomère est utilisé dans l'étape b) de polymérisation radicalaire, ledit monomère est alors de préférence une oléfine de formule (I), (II) ou

(III), de préférence choisie parmi le styrène sulfonate de sodium (le polymère greffé est alors le polyNaSS) ou le méthacrylate de méthyle (le polymère greffé est alors poly(méthacrylate de méthyle), ou PMMA), le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154) ou le vinylbenzylphosphonate (VBP).

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les polymères greffés sont des copolymères. De préférence, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire d'au moins deux monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (II) et (III) telles que définies ci-dessus. De manière encore préférée, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire d'au moins deux monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (V) et (III) telles que définies cidessus. Les quantités des oléfines de formules (I), (II) et/ou (III) peuvent varier dans une large mesure et sont adaptées en fonction notamment des propriétés désirées pour les copolymères.

Les copolymères greffés selon le procédé de la présente invention peuvent être obtenus par polymérisation radicalaire de monomères comprenant, en plus des monomères de formules (I), (II) et (III), d'autres monomères de type oléfine. Les oléfines additionnelles peuvent être de toute nature, avantageusement des oléfines donnant un caractère hydrosoluble ou non aux polymères greffés. De préférence, les monomères additionnels sont de nature hydrosoluble, tels que les oléfines comprenant un groupe de type sucre, notamment des oléfines comprenant un groupe ose tel que le glucose, le glucofuranose, le saccharose, le fructose, le mannose.

Dans les copolymères comprenant un monomère additionnel, la quantité des monomères de formule (I), (II) et (III) est avantageusement supérieure ou égale à 25%, de préférence supérieure ou égale à 50%, en moles par rapport au nombre total de moles des unités monomères présentes dans les polymères.

Selon un aspect préféré de l'invention, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire de deux ou trois monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (II) et (III) telles que définies ci-dessus. De manière préférée, le polymère greffé est le PolyNaSS. Le matériau est de préférence abondamment lavé et stérilisé préalablement à l'implantation.

Modes de réalisation particuliers

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est un procédé de greffage de polymères PolyNaSS sur un matériau métallique en titane ou alliage de titane (l'alliage étant

avantageusement le TiAl6V4), comprenant les étapes suivantes :

a) oxydation de la surface du matériau en titane ou en alliage de titane, conduisant à un matériau oxydé, et

b) greffage d'un polymère PolyNaSS à la surface dudit matériau oxydé par polymérisation radicalaire du monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS), ladite polymérisation radicalaire comprenant une étape d'amorçage, une étape de propagation, ladite étape d'amorçage étant effectuée par irradiation UV avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW/cm^2 , de préférence comprise entre 72 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de préférence entre 91 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW/cm^2 , de préférence, ladite irradiation UV étant réalisée pendant une durée supérieure à 15 minutes et inférieure à 180 minutes, de préférence inférieure ou égale à 120 minutes, de manière plus préférée inférieure ou égale à 90 minutes ledit procédé conduisant à un matériau greffé.

Dans ce mode de réalisation particulier, l'étape b) de greffage peut comprendre les sous-étapes suivantes :

b1) mise en contact du matériau en titane ou en alliage de titane oxydé avec le styrène sulfonate de sodium (NaSS) en solution aqueuse ;

b2) irradiation UV de la solution comprenant le styrène sulfonate de sodium (NaSS) et ledit matériau en titane ou en alliage de titane oxydé avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau comprise entre 72 mW.cm^{-2} et 226 mW/cm^2 , de préférence entre 91 mW/cm^2 et 226 mW.cm^{-2} , de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW/cm^2 .

Alternativement, l'étape b) de greffage peut comprendre les sous-étapes suivantes :

b1') trempage du matériau en titane ou en alliage de titane oxydé dans le styrène sulfonate de sodium (NaSS), ledit styrène sulfonate de sodium (NaSS) étant essentiellement pur, conduisant à un matériau métallique oxydé enrobé de styrène sulfonate de sodium (NaSS) ;

b2') irradiation UV du matériau métallique oxydé de en solution aqueuse avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieur à 72 mW/cm^2 , de préférence comprise entre 72 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de préférence entre 91 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW/cm^2 .

De préférence, dans ce mode de réalisation, le procédé comprend une étape de décapage. Il est entendu que l'homme du métier pourra combiner tous les modes de réalisation particuliers et préférés des étapes a) et b), avec le procédé de ce mode de réalisation particulier.

Ainsi, le matériau greffé obtenu par le procédé selon l'invention est de préférence un matériau

(de préférence prothétique) en titane ou alliage de titane à la surface duquel sont greffés directement des polymères, du polyNaSS de préférence, avantageusement avec un taux de greffage supérieur à $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence compris entre $1,5$ et $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de manière encore préférée avec un taux de greffage compris entre 3 et $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Le matériau est de préférence lavé et stérilisé préalablement à l'implantation.

Matériau susceptible d'être obtenu par le procédé

La présente invention concerne également les matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'invention. Les matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'invention sont donc greffés en surface par des polymères, de préférence bioactifs. Les matériaux métalliques greffés susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention présentent avantageusement un angle de contact inférieur à 50° , de préférence inférieur à 45° , de façon plus préférée inférieur à 40° , encore plus avantageusement inférieur à 30° pouvant même être inférieur à 20° . Les matériaux métalliques greffés obtenus par le procédé de l'invention présentent généralement un angle de contact avec une goutte d'eau supérieur à 5° .

Les matériaux métalliques greffés susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'invention possèdent un taux de greffage supérieur à $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence supérieur à $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence compris entre $1,5$ et $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de façon plus préférée entre 3 et $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les polymères greffés à la surface des matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus selon le procédé de l'invention sont issus de la polymérisation radicalaire des monomères décrits plus haut. Le poids moléculaire des polymères greffés peut varier dans une large mesure et est choisi ou contrôlé par l'homme du métier en fonction de leur application ou usage ultérieur. Avantageusement, le poids moléculaire moyen en poids des polymères greffés peut varier de 200 à $100\ 000$ daltons. De préférence, les polymères greffés à la surface des matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus selon le procédé de l'invention sont issus de la polymérisation radicalaire d'au moins un monomère choisi parmi : l'acide acrylique, l'acide méthacrylique, le méthacrylate de méthyle (MMA), l'acrylamide de N-(sulfonate de sodium phényle) (NaAS), le méthacrylamide de N-(sulfonate de sodium phényle) (NaMS), le styrène sulfonate de sodium (NaSS), l'éthylène glycol méthacrylate phosphate, le vinylbenzylphosphonate (VBP) et le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxabutyl] acrylate d'éthyle (MA154). En fonction des monomères utilisés, les polymères greffés peuvent être des homopolymères ou des copolymères.

Dans un premier mode de réalisation particulier de l'invention, les polymères greffés sont des

homopolymères. Dans ce mode de réalisation, un seul monomère est utilisé dans la polymérisation radicalaire, ledit monomère est alors de préférence une oléfine de formule (I), (II), (III) ou (IV) telle que définie ci-dessus, de préférence choisie parmi le styrène sulfonate de sodium (le polymère greffé est alors le polyNaSS) ou le méthacrylate de méthyle (le polymère greffé est alors poly (méthacrylate de méthyle), ou PMMA), le Vinylbenzylphosphonate (VBP) ou le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxabutyl] acrylate d'éthyle (MA154).

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les polymères greffés sont des copolymères. De préférence, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire d'au moins deux monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (II), (III) et (IV) telles que définies ci-dessus. De manière encore préférée, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire d'au moins deux monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (VI) et (III) telles que définies ci-dessus. Les quantités des oléfines de formules (I), (II), (III) et/ou (IV) peuvent varier dans une large mesure et sont adaptées en fonction notamment des propriétés désirées pour les copolymères.

Les copolymères greffés selon le procédé de la présente invention peuvent être obtenus par polymérisation radicalaire de monomères comprenant, en plus des monomères de formules (I), (II), (III) et (IV), d'autres monomères de type oléfine. Les oléfines additionnelles peuvent être de toute nature, avantageusement des oléfines donnant un caractère hydrosoluble aux polymères greffés. De préférence, les monomères additionnels sont de nature hydrosoluble, tels que les oléfines comprenant un groupe de type sucre, notamment des oléfines comprenant un groupe ose tel que le glucose, le glucofuranose, le saccharose, le fructose, le mannose. Dans les copolymères comprenant un monomère additionnel, la quantité des monomères de formule (I), (II), (III) et (IV) est avantageusement supérieure ou égale à 25%, de préférence supérieure ou égale à 50%, en moles par rapport au nombre total de moles des unités monomères présentes dans les polymères.

Selon un aspect préféré de l'invention, les copolymères greffés sont obtenus par polymérisation radicalaire de deux ou trois monomères choisis parmi les oléfines de formule (I), (II), (III) et (IV) telles que définies ci-dessus.

De manière préférée, les polymères greffés sont le PolyNaSS, le vinylbenzylphosphonate (VBP) et le 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154). Le matériau est de préférence lavé et stérilisé préalablement à l'implantation.

Utilisations des matériaux selon l'invention

La présente invention a également trait à un implant prothétique fabriqué à partir des matériaux métalliques susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention. Les implants prothétiques selon l'invention sont avantageusement des implants articulaires, en particulier utiles en tant que prothèse de hanche, ou des implants dentaires. La présente invention vise également les implants selon l'invention, pour leur utilisation dans le remplacement d'une articulation ou d'une dent, notamment par chirurgie.

Description des figures

Figure 1 représente schématiquement un mode de réalisation du procédé selon l'invention, faisant intervenir les différentes espèces intermédiaires mises en jeu à chaque étape du procédé. Le matériau (1) correspond au matériau métallique prothétique non traité avec une couche d'oxydation en surface à l'état natif. Le matériau (2) a subi l'étape a) d'oxydation, et présente en surface des fonctions hydroperoxydes, avec une densité équivalente ou plus importante que les fonctions OH du matériau à l'état natif. Le matériau (3) a subi une étape d'amorçage par irradiation UV : une rupture homolytique de la liaison O-O ou OH a eu lieu, donnant naissance à des radicaux O[•] en surface. Ce matériau amorcé (3) est ensuite mis en présence d'une oléfine de formule CH₂=CR₁A (dans laquelle par exemple R₁ représente H, et A représente Ph-SO₃Na), qui subit l'étape de polymérisation, pour conduire au matériau greffé (4).

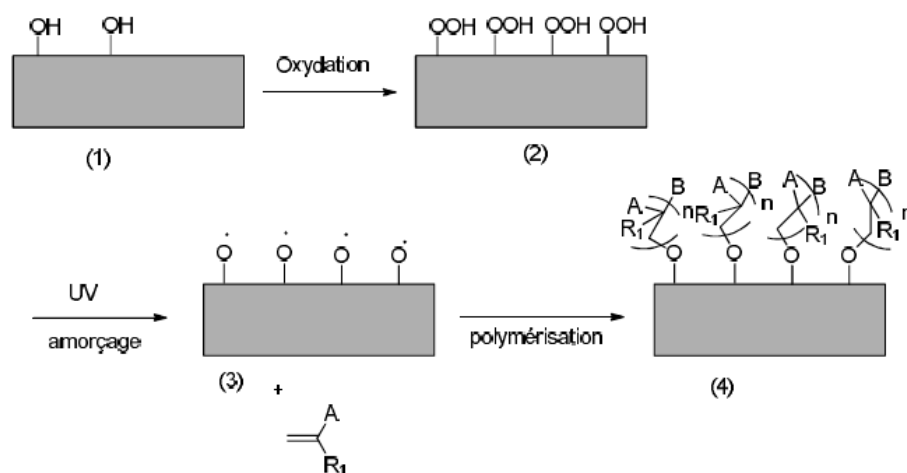


Figure 1

La **Figure 2** est un diagramme à barres démontrant l'effet de l'étape a) d'oxydation sur le taux de greffage d'un matériau prothétique en titane (exemple 3). L'axe des ordonnées représente le taux de greffage en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La barre de gauche (A) représente le taux de greffage moyen obtenu pour 6 échantillons de matériau en titane ayant subi les étapes a) et b) du procédé selon l'invention, et la barre de droite (B) représente le taux de greffage moyen obtenu pour 2 échantillons de matériau en titane ayant subi uniquement l'étape b) du procédé selon l'invention (pas d'oxydation contrôlée, seulement l'oxydation naturelle).

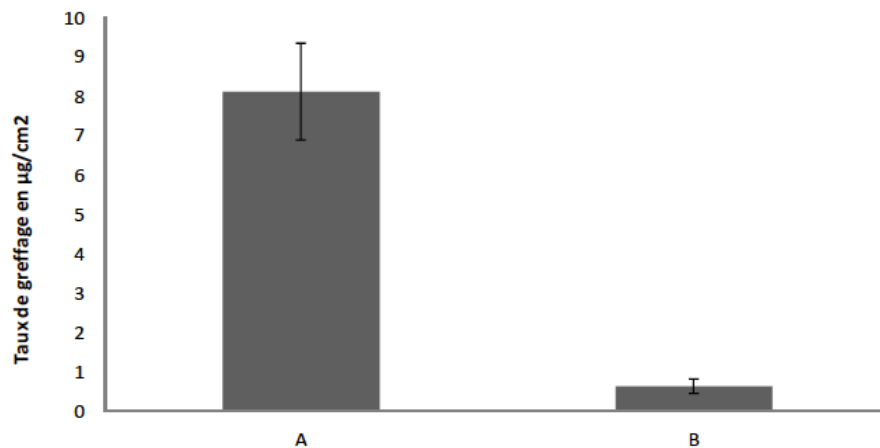


Figure 2

La **Figure 3** représente trois spectres infrarouges : spectre du du titane brut (matériau prothétique non traité *i.e.* à l'état natif, spectre du haut), spectre du du polyNaSS non greffé (spectre du milieu), et spectre du d'un matériau en titane greffé avec du polyNaSS selon le procédé de l'exemple 1 (spectre du bas). L'axe des ordonnées représente la transmittance (en %). L'axe des abscisses représente le nombre d'onde (en cm^{-1}).

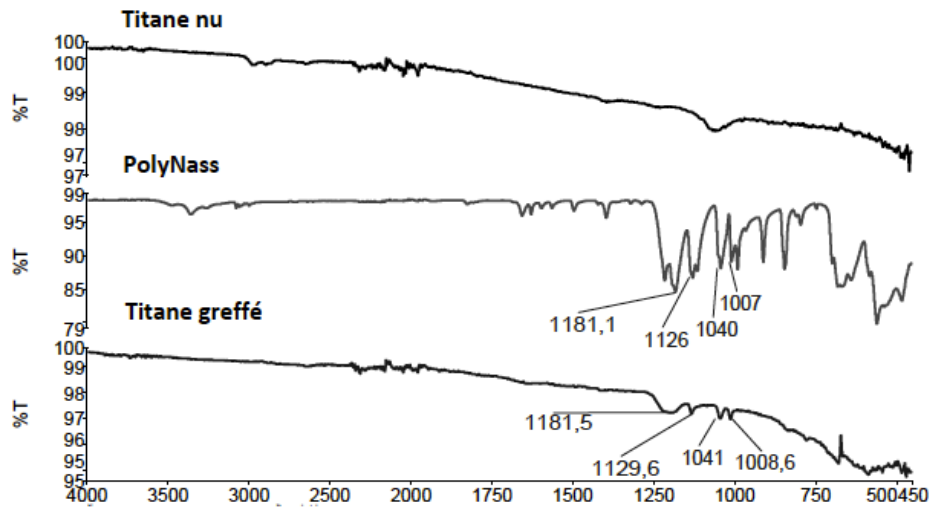


Figure 3

La **Figure 4** est un diagramme à barres démontrant l'impact du temps d'attente entre l'étape de décapage et l'étape d'oxydation. L'axe des ordonnées représente le taux de greffage en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. La barre de gauche (A) représente le taux de greffage moyen obtenu pour un matériau en titane ayant subi l'étape d'oxydation 16 heures après l'étape de décapage, et la barre de droite (B) représente le taux de greffage moyen obtenu pour un matériau en titane ayant subi l'étape d'oxydation 2 heures après l'étape de décapage.

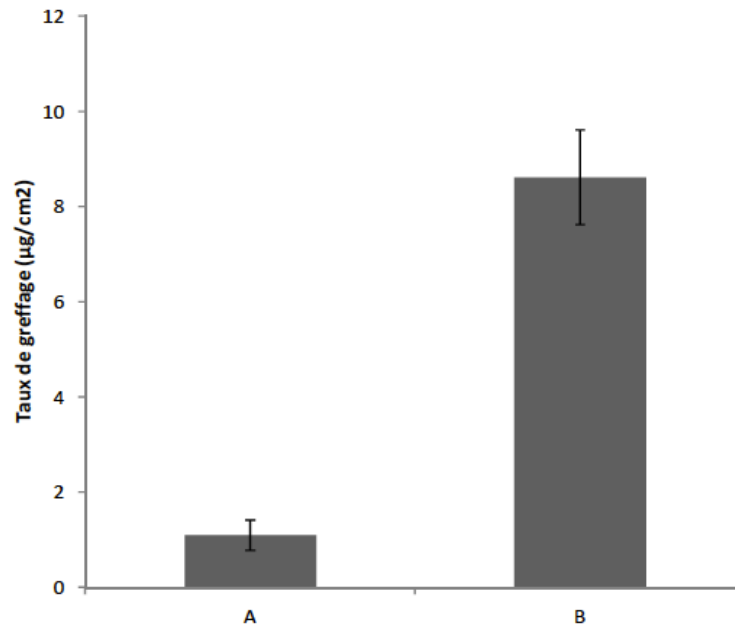


Figure 4

La **Figure 5** représente le taux de greffage d'un matériau métallique en titane de l'exemple 4 en fonction du temps d'irradiation UV du matériau oxydé dans une solution à 0,32 M en monomère. L'axe des ordonnées représente le taux de greffage en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, et l'axe des abscisses représente le temps d'irradiation UV en minutes. Les valeurs représentées sont des moyennes sur trois expériences.

La **Figure 6** représente le taux de greffage d'un matériau métallique en titane en fonction de la puissance surfacique de l'irradiation UV, pour un temps d'exposition de 45min sur un matériau en alliage de titane (**Figure 6A**) et sur un matériau en titane (**Figure 6B**), dans une solution à 0,7 M en monomère. Les valeurs représentées sont des moyennes sur trois expériences.

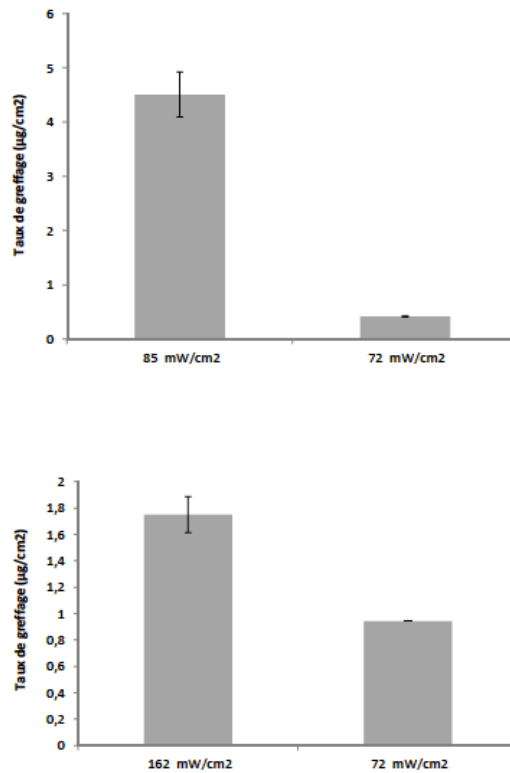


Figure 6

Exemples

Les avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples suivants, qui concernent des modes de réalisation particuliers de l'invention, mais ne sauraient être considérés comme limitatifs.

Exemple 1 : Mise en oeuvre du procédé selon l'invention

1.1. Mise en oeuvre du procédé

Le matériau métallique est dans cet exemple un matériau en titane ou en alliage de titane.

1.1.1 Polissage

Les surfaces du matériau métallique en titane peuvent être tout d'abord polies. Le polissage mécanique des disques de titane est réalisé à l'aide d'un bras automatique, monté sur une polisseuse

rotative, avec du papier abrasif de granulométries décroissantes (Struers). Un premier polissage avec un papier de grade 500 (ci-après P500) enlève environ 1/10^{ème} de millimètres d'épaisseur. Le polissage est ensuite affiné par l'utilisation d'un papier de granulométrie plus faible, 1200 (ci-après P1200).

Le protocole utilisé est le suivant : les disques sont polis 1 à 2 minutes avec du papier P500 avec une rotation de 200 tours/minute (t/min) puis 1 à 2 minutes avec P1200. Après le polissage, les échantillons sont lavés par trempage dans une solution d'acétone (1 nuit) puis 2x15min dans l'acétone au bain à ultrasons, et enfin 3x15min au bain à ultrasons dans l'eau distillée. Ils sont ensuite séchés à 60°C et utilisés immédiatement ou conservés sous argon.

1.1.2 Décapage

Le matériau métallique poli subit ensuite une étape de décapage dans un mélange H₂O/HF/HNO₃ (88/2/10). La solution utilisée pour ce lavage est un mélange d'eau, d'une solution aqueuse d'acide fluorhydrique à 24 M et d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 10 M de proportions respectives (85/5/10) (v/v/v), agité pendant 1 minute. Les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 60°C.

1.1.3 Oxydation

Le matériau métallique décapé est ensuite soumis à une étape d'oxydation par traitement chimique. Le matériau métallique est ainsi immergé dans un mélange d'acide sulfurique concentré H₂SO₄ et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Les échantillons sont immergés dans un volume v de solution d'acide sulfurique concentré H₂SO₄ (dilué à 50% avec de l'eau pour l'alliage) sous agitation pendant 1 minute. Un volume équivalent v de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (30% en volume d'eau) est additionné et les échantillons sont laissés dans ce mélange sous agitation pendant 3 minutes. Les surfaces oxydées sont ensuite rincées dans 3 bains d'eau pendant 3 minutes. Alternativement, le matériau métallique décapé peut être soumis à une étape d'oxydation par traitement anodique.

1.1.4 Greffage

Le matériau métallique oxydé est ensuite immergé dans une solution aqueuse dégazée de monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS) à 0,7 mol/L ou 0,32 mol/L. La solution dans laquelle est immergée le matériau oxydé est ensuite exposée pendant un temps variant entre 15 min et 240 min en fonction des échantillons à des irradiations UV provenant d'une source UV de longueur

d'onde 365 nm et de 200 W de puissance. En fonction de la distance entre la lampe et le matériau métallique (de 5 cm à 30 cm), la puissance surfacique varie entre 72 mW.cm⁻² et 226 mW/cm².

1.2. Caractérisation

La présence des polymères greffés à la surface a été mesurée par différentes méthodes.

1.2.1. Méthode colorimétrique au bleu de toluidine (BT)

Les échantillons métalliques greffés sont mis au contact d'une solution de BT à 5.10⁻⁴ M (ajustée à pH 10 grâce à de la soude) à la température de 30°C pendant 6heures. Cette étape correspond à la complexation du BT aux unités monomères du polymère greffé. Les échantillons sont ensuite rincés abondamment avec une solution d'hydroxyde de sodium 1.10⁻³ M pour éliminer le BT non complexé. On arrête les rinçages lorsque la solution est incolore. Le BT complexé est ensuite décomplexé au moyen d'une solution d'acide acétique 50% qui est laissée au contact des échantillons de titane pendant 24 heures. La solution obtenue est dosée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25 (Biomacromolécules 2006, 7, 755-760).

1.2.2. Infrarouge à Transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

Les échantillons sont directement analysés (sans préparation) par ATR-FTIR sur un appareil Perkin Elmer, spectrum Two.

1.2.3. Mesure d'angle de contact

Les mesures des angles de contact se font à partir d'une goutte d'eau déposée à la surface des échantillons oxydé ou greffé via l'appareil KRUSS : DSA100 qui permet de connaître les modifications du caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface.

1.3. Résultats

1.3.1 Validation du greffage

Pour les échantillons obtenus par mise en oeuvre du procédé décrit au point 1.1., les bandes caractéristiques du groupement sulfonate à 1180 cm⁻¹ et 1128 cm⁻¹, ainsi que le doublet de vibrations à 1010 - 1040 cm⁻¹, la vibration symétrique à 1040 cm⁻¹ sont observées dans le spectre infrarouge en

réflexion totale atténuée (ATR-FTIR, voir **Figure 3**).

1.3.2 Importance de l'étape d'oxydation

La mesure de la quantité de polymères polyNaSS greffés à la surface du titane a été réalisée en complexant les groupements sulfonate des polymères avec du bleu de toluidine, à la fois sur des échantillons ayant subi le procédé décrit au point 1.1 (e.g. polissage, décapage, oxydation), mais également sur des échantillons de matériau métallique n'ayant pas subi une étape d'oxydation (e.g. seulement polissage et décapage).

Ainsi, pour les échantillons ayant subi la totalité du procédé décrit au point 1.1., un taux de greffage de l'ordre de $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ est observé (voir la **Figure 2**) alors que les échantillons n'ayant pas subi l'étape d'oxydation contrôlée présente un taux de greffage de $0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. L'oxydation du matériau métallique par oxydation chimique aussi bien que l'oxydation anodique donnent des résultats satisfaisants. Il est à noter qu'un échantillon de matériau en titane oxydé immergé dans une solution de polyNaSS (e.g. Acros, Mn=70 000 g/mol, n°lot : A012503701, CAS : 24704-18-1) à une concentration de 0,7 mol/L puis abondamment lavé par rinçage à l'eau, mais non soumis à une étape de greffage proprement dite, donne des valeurs de $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ par mesure par complexation au bleu de toluidine. Cette expérience permet d'écarter l'hypothèse d'une simple adsorption du polymère à la surface du matériau métallique (e.g. en titane) oxydé.

En conclusion, l'étape d'oxydation est essentielle à l'obtention d'un matériau métallique greffé selon l'invention. Elle permet d'augmenter d'un facteur 25 ($7,7$ vs $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) le taux de greffage par rapport à un greffage sur une surface métallique présentant une oxydation naturelle.

1.3.3. Propriétés mesurées

Sur un matériau en titane « pur » (*i.e.* titane de départ non greffé, *i.e.* n'ayant pas subi le procédé de l'invention), l'angle de contact est de $59 \pm 5^\circ$. Les échantillons de matériau greffé obtenus selon le procédé décrit au point 1.1. présentent une valeur d'angle de contact égale à $15 \pm 2^\circ$, soit une baisse de l'angle de contact de 44° entre la surface non traitée et la surface greffée.

En conclusion, les matériaux métalliques greffés obtenus selon le procédé de l'invention possèdent une surface beaucoup plus hydrophile que les matériaux métalliques non greffés et cela est rendu possible notamment par l'étape préalable d'oxydation.

Exemple 2 : Importance du temps entre le décapage et l'oxydation

2.1. Protocole

Le matériau métallique est dans cet exemple un matériau en titane. 15 échantillons dudit matériau métallique sont utilisés.

Les surfaces des 15 échantillons de matériau métallique en titane sont tout d'abord polies puis subissent ensuite une étape de décapage dans un mélange $H_2O/HF/HNO_3$ (88/2/10). Les 15 échantillons décapés sont ensuite soumis à une étape d'oxydation. Après une période d'attente variant de 2 heures à 16 heures, les 15 échantillons oxydés sont ensuite soumis à l'étape de greffage dans une solution aqueuse de monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS). Les autres conditions utilisées sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

2.2. Résultats

La **Figure 4** montre que le temps entre la fin du décapage et le début de l'oxydation a une importance sur le taux de greffage selon la méthode de l'invention. Si 16 heures ou plus sépare la fin de l'étape de décapage du début de l'étape d'oxydation alors le taux de greffage n'est pas optimal (e.g. $1,09 \mu g/cm^2$). Ainsi il est préférable réaliser l'étape d'oxydation assez rapidement après l'étape de décapage.

Exemple 3 : Influence du temps d'irradiation sur le taux de greffage

3.1. Protocole

Le matériau métallique est dans cet exemple un matériau en titane. 15 échantillons dudit matériau métallique sont utilisés. Les surfaces des 15 échantillons de matériau métallique en titane sont tout d'abord polies. Les 15 échantillons subissent ensuite une étape de décapage dans un mélange $H_2O/HF/HNO_3$ (88/2/10). Les 15 échantillons décapés sont ensuite soumis à une étape d'oxydation par traitement chimique. Les 15 échantillons oxydés sont ensuite soumis à l'étape de greffage dans une solution aqueuse de monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS). Les autres conditions utilisées sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

3.2. Résultats

Le taux de greffage du polyNaSS à la surface des 15 échantillons de titane a été étudié en complexant les groupements sulfonate des polymères avec du bleu de toluidine. Les résultats

présentés dans le **Tableau 1** montrent que les résultats optimaux, *i.e.* un taux de greffage supérieur à $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, sont obtenus dans ce cas pour une irradiation UV comprise entre 30 et 120 minutes.

Tableau 1

Temps (min)	Moy ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$)
15	0,43
30	2,91
45	4,19
60	6,79
90	3,15
120	2,18
180	1,15
240	1,09

Exemple 4 : Influence de la puissance surfacique d'irradiation UV sur le taux de greffage

4.1. Protocole

Le matériau métallique est dans cet exemple un matériau en titane ou en alliage de titane. 15 échantillons dudit matériau métallique sont utilisés. Les surfaces des 15 échantillons de matériau métallique en titane ou en alliage de titane subissent une étape de décapage. Les 15 échantillons décapés sont ensuite soumis à une étape d'oxydation. Les 15 échantillons oxydés sont ensuite immergés dans une solution aqueuse de monomère styrène sulfonate de sodium (NaSS). La solution dans laquelle est immergée le matériau oxydé est ensuite exposée pendant 45 min à des distances

variant entre 5 centimètres et 30 centimètres des irradiations UV provenant d'une source UV de 200W de longueur d'onde 365 nm, de puissance surfacique variant ainsi entre 72 mW/cm² et 226 mW/cm². Les autres conditions utilisées sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

4.1. Résultats

La **Figure 6** montre qu'une puissance surfacique supérieure à 72 mW.cm⁻² est nécessaire pour induire un greffage satisfaisant sur le matériau métallique.

Revendications

1. Procédé de greffage de polymères sur un matériau métallique, comprenant les étapes suivantes :

a) l'oxydation de la surface du matériau métallique, conduisant à un matériau métallique oxydé ;

b) le greffage d'un polymère à la surface dudit matériau métallique oxydé par polymérisation radicalaire d'un monomère, ladite polymérisation radicalaire comprenant une étape d'amorçage et une étape de propagation, ladite étape d'amorçage étant effectuée par irradiation UV avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW/cm^2 , de préférence comprise entre 72 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de préférence entre 91 mW/cm^2 et 226 mW/cm^2 , de manière préférée entre toutes égale à environ 162 mW/cm^2 , ladite irradiation UV étant réalisée pendant une durée supérieure à 15 minutes et inférieure à 180 minutes, de préférence inférieure ou égale à 120 minutes, de manière plus préférée inférieure ou égale à 90 minutes. ledit procédé conduisant à un matériau métallique greffé.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau métallique est un matériau en titane ou en alliage de titane, par exemple un alliage de titane à base de nickel, vanadium, aluminium, niobium, et/ou molybdène, notamment un alliage de titane, d'aluminium et de vanadium, typiquement l'alliage Ti Al6V4.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit monomère est une oléfine.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le monomère est choisi parmi les sulfonates, les phosphonates et/ou les carboxylates, de préférence choisi parmi l'acide acrylique, l'acide méthacrylate, le méthacrylate de méthyle (MMA), l'acrylamide de N-(sulfonate de sodium phényle) (NaAS), le méthacrylamide de N-(sulfonate de sodium phényle) (NaMS), le styrène sulfonate de sodium (NaSS), l'éthylène glycol méthacrylate, le méthacrylate phosphate, le méthacryloyl-di-isopropylidène, le vinylbenzylphosphonate (VBP), 2-[4-(dihydroxyphosphoryl)-2-oxa-butyl]acrylate d'éthyle (MA154), ou leurs mélanges.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite polymérisation radicalaire est réalisée en l'absence d'oxygène.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape

d'amorçage est effectuée préalablement ou de manière concomitante à l'étape de propagation.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de décapage réalisée préalablement à l'étape d'oxydation, le temps entre la fin de l'étape de décapage et le début de l'étape d'oxydation étant inférieur à 16 heures, de préférence inférieur à 12 heures.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape a) d'oxydation est réalisée par traitement du matériau avec une solution aqueuse comprenant un oxydant et un acide, de préférence un mélange H_2SO_4 et H_2O_2 .

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'étape a) d'oxydation est réalisée par traitement anodique.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le matériau métallique greffé possède un taux de greffage dudit polymère supérieur à $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, de préférence supérieur à $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Procédé de greffage de polymères bioactifs sur des matériaux métalliques

La présente invention concerne un procédé de greffage de polymères sur un matériau métallique, comprenant les étapes suivantes :

- a) l'oxydation de la surface du matériau métallique, conduisant à un matériau métallique oxydé ;
- b) le greffage d'un polymère à la surface dudit matériau métallique oxydé par polymérisation radicalaire d'un monomère, ladite polymérisation radicalaire comprenant une étape d'amorçage et une étape de propagation, ladite étape d'amorçage étant effectuée par irradiation UV avec une source UV diffusant une puissance à la surface du matériau supérieure à 72 mW/cm^2 , ladite irradiation UV étant réalisée pendant une durée supérieure à 15 minutes et inférieure à 180 minutes.

Ledit procédé conduisant à un matériau métallique greffé. La présente invention concerne également les matériaux susceptibles d'être obtenus par ce procédé et des applications de ces derniers, notamment en tant qu'implants articulaires ou dentaires.

TROISIÈME CHAPITRE : GRAFTING POLY(STYRENE SODIUM SULFONATE) ONTO TITANIUM SURFACES USING BIO-ADHESIVE MOLECULES: SURFACE CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES

Dans le chapitre 2, nous avons présenté le greffage direct de polymères bioactifs en utilisant des irradiations UV.^{1,2} Cette technique de greffage permet de lier des polymères anioniques de manière covalente et homogène sur toute la surface du titane mais sans contrôle de la taille des chaînes de polymères greffés. Il nous est apparu important d'étudier l'influence de la taille des polymères sur la réponse biologique. Dans ce troisième chapitre, nous allons présenter une technique de greffage indirect de polymères bioactifs à architecture contrôlée (masses définies) dite de « grafting to ».

Ce troisième chapitre traite essentiellement de la chimie du « grafting to ». La stratégie choisie pour le « grafting to » s'appuie sur l'utilisation d'une molécule d'ancrage de type catéchol (dopamine modifiée) qui fera le lien entre le polymère et la surface du titane. Schématiquement, le « grafting to » est une méthode de greffage indirecte qui nécessite plusieurs étapes : la synthèse des polymères, la synthèse de la molécule d'ancrage (voir annexe) et la fixation sur le titane. Par ailleurs, la fixation sur le titane se fait selon deux voies différentes : i) réaction de couplage du polymère avec la dopamine modifiée puis fixation sur le titane ou ii) fixation au préalable de la dopamine modifiée sur le titane puis couplage avec le polymère.

Sur le **Schéma 1** ci-dessous sont représentées les deux premières étapes du greffage « grafting to » : la première étape consiste à synthétiser des polymères de taille contrôlée. Pour cela, la technique utilisée est la polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT par transfert de chaînes réversibles par addition-fragmentation. Cette technique permet un équilibre dans l'étape de propagation et aboutit à une synthèse de polymères de tailles identiques. Le contrôle de la taille des chaînes macromoléculaires est permis grâce à l'utilisation d'un agent de contrôle qu'on appelle communément un agent RAFT. La deuxième étape est le clivage de l'agent RAFT situé en bout de chaîne de la macromolécule. Ce clivage est essentiel car il génère une fonction thiol (-SH) en bout de chaîne, qui servira dans l'étape de couplage avec une molécule d'ancrage.

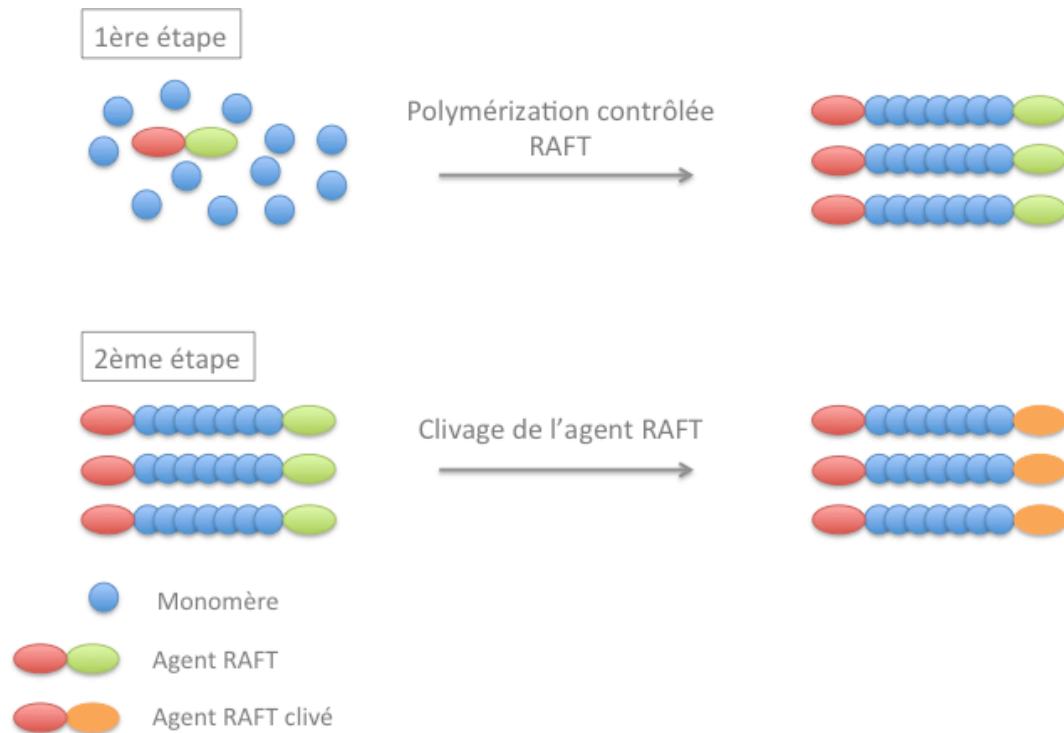


Schéma 1 : Représentation schématique des deux premières étapes communes du « grafting » to sur des surfaces en titane. La première étape est la synthèse des polymères par une polymérisation contrôlée dite « RAFT ». La deuxième étape est le clivage de l'agent RAFT qui permet de fonctionnaliser le polymère pour les étapes suivantes.

Sur le **Schéma 2** est représenté l'étape 3 et 4 : l'étape 3 est une réaction de couplage entre une chaîne macromoléculaire de polyNaSS et une molécule d'ancrage (dopamine modifiée). Cette réaction de couplage utilise une chimie très utilisée aujourd'hui : la chimie « click ». Parmi les réactions apparentées à la chimie « click », nous avons utilisé une réaction « thiol-ene click » qui se produit entre la fonction thiol du polyNaSS et la double liaison provenant de la molécule d'ancrage. La molécule d'ancrage possède une fonction catechol et une double liaison : il s'agit de l'acrylamide de dopamine. La dopamine est une molécule naturelle qui possède des propriétés adhésives bien connues. L'étape 4 est la dernière étape de notre « grafting to » qui est tout simplement la fixation de notre chaîne macromoléculaire avec le titane par l'intermédiaire de notre dopamine.

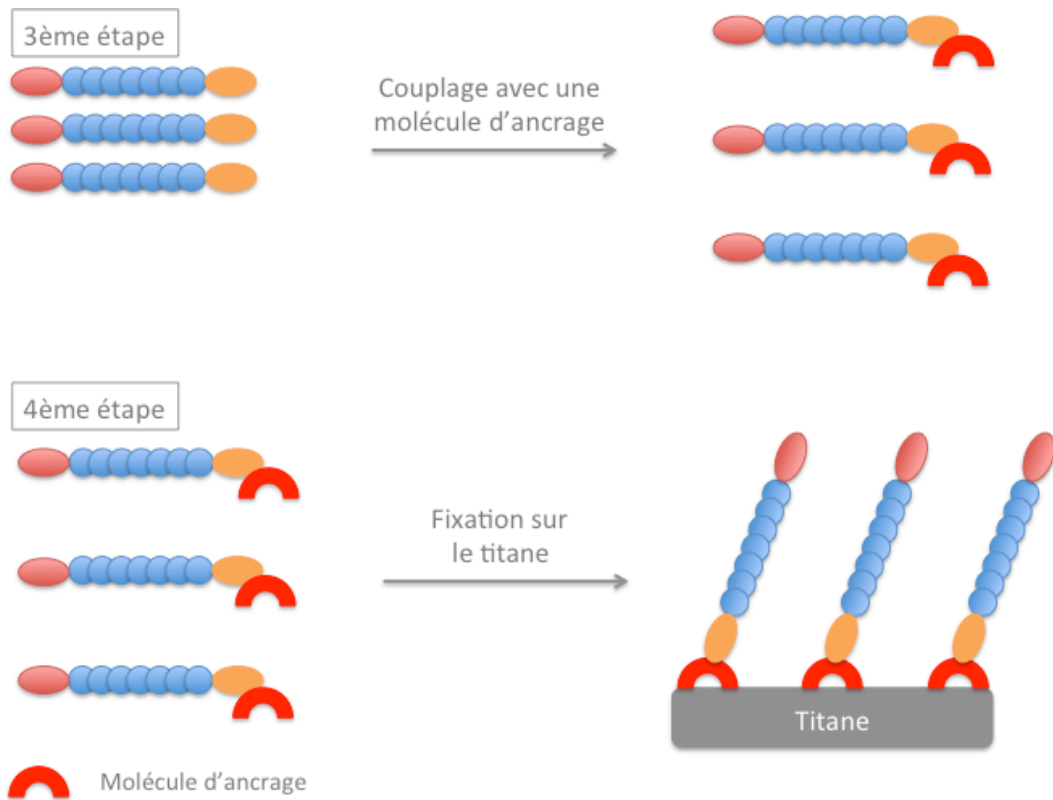


Schéma 2 : Représentation schématique de l'étape 3 et 4 de la technique de « grafting to » à la surface du titane. L'étape 3 est une réaction de couplage entre le polyNaSS et la dopamine modifiée qui joue le rôle de molécule d'ancrage. L'étape 4 représente la dernière étape de fixation du polymère sur le titane par l'intermédiaire de la dopamine, molécule bioadhésive.

Sur le **Schéma 3** est représenté une voie alternative permettant également le greffage de polyNaSS avec une architecture bien définie à la surface du titane. L'étape 3 bis permet une adhésion au préalable de la dopamine avant de continuer par la réaction de couplage à la surface du titane (étape 4 bis).

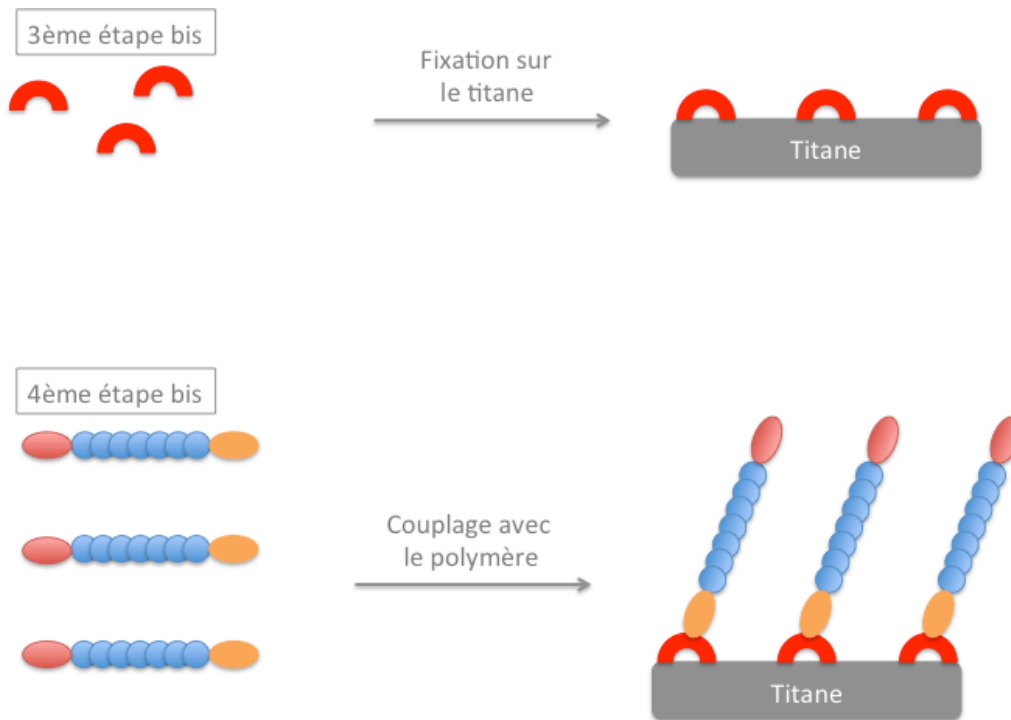


Schéma 3 : Représentation d'une voie alternative permettant le greffage de chaînes de polyNaSS avec une architecture contrôlée à la surface du titane. L'étape 3 bis permet une adhésion préalable de la dopamine avant la réaction de couplage à la surface du titane (étape 4 bis).

A l'issue de ce chapitre, nous avons démontré qu'il est possible de greffer à la surface du titane des polymères de tailles contrôlées en utilisant deux approches différentes.³ Ce « grafting to » a été possible en utilisant une dopamine modifiée qui a servi de molécule d'ancrage sur titane, élément indispensable dans le greffage. Des études préliminaires ont été menées pour montrer que notre greffage a une réponse biologique favorable sur la réponse cellulaire osseuse.³

1. H. Chourifa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, *RSC Advances* 6, 13766-13771 (2016).
2. V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudré, H. Chourifa. Process for grafting bioactive polymers onto metallic materials, *WO/2017/025519* (2016).
3. H. Chourifa, et al., *Biointerphases* 12, 02C418 (2017).

This contribution reports on grafting of bioactive polymers such as poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS) onto titanium (Ti) surfaces. This grafting process uses a modified dopamine as an anchor molecule to link polyNaSS to the Ti surface. The grafting process combines reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, postpolymerization modification and thiol-ene chemistry. The first step in the process is to synthesize polyNaSS with a thiol end group. The second step is the adhesion of the dopamine acrylamide (DA) anchor onto the Ti surfaces. The last step is grafting polyNaSS to the DA-modified Ti surfaces. The modified dopamine anchor group with its bioadhesive properties is essential to link bioactive polymers to the Ti surface. The polymers are characterized by conventional methods (NMR, SEC, ATR-FTIR) and the grafting is characterized by X-ray photoelectron spectroscopy, time-of-flight secondary ion mass spectrometry and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. To illustrate the bioactivity of the grafted Ti-DA-polyNaSS surfaces, their interactions with both proteins and cells are investigated. Both albumin and fibronectin are readily adsorbed onto Ti-DA-polyNaSS surfaces. The biological response of modified Ti-DA-polyNaSS and control ungrafted Ti surface are tested using human bone cells (Saos-2) in cell culture for cell adhesion, proliferation, differentiation and mineralization. This study presents a new, simple way to graft bioactive polymers onto Ti surfaces using a catechol intermediary with the aim of improving biological outcomes in orthopedic applications.

I. Introduction

During the second half of the 20th century, titanium (Ti) and its alloys began to be widely used in the biomedical industry, particularly as hard tissue replacements. For decades, these materials have successfully been employed in the orthopedic and dental fields. They have excellent physical and chemical properties such as good corrosion resistance, “acceptable” biocompatibility and mechanical properties close to human bone.¹⁻² However, unmodified Ti based materials can slowly induce the formation of a fibrous layer, even after several years of implantation, compromising the interface with the living tissue and leading to progressive loss of osseointegration and aseptic loosening of implants.³⁻⁴ The inability of Ti to establish strong chemical bonding with the biological surrounding tissues is at the origin of this problem.⁵ To overcome this challenge, different strategies have been proposed to modify the Ti surface, including mechanical, thermal and electrochemical methods.⁶⁻⁹ More recently Ti surface modification by grafting biomolecules and/or bioactive polymers is becoming a popular alternative approach.¹⁰

Previous studies have shown that anionic polymers such as poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS), poly(methacrylic acid) (polyMA), poly(methacryloyl phosphate) can favor osteoblast cell

adhesion and differentiation.¹¹⁻¹² The distribution of the ionic groups along the molecular chains creates active sites which can interact with the extracellular proteins such fibronectin that have been implicated in cell response.^{13,14} Recently, the grafting of polyNaSS was successfully achieved using radicals (under heating¹⁵⁻¹⁸ or UV irradiation¹⁹⁻²⁰) or atom transfer radical polymerization (ATRP²¹⁻²³). Radicals from Ti peroxides are able to initiate the radical polymerization of the sodium styrene sulfonate (NaSS) monomer.¹⁵⁻²⁰ This method is known to give a large distribution of synthesized polymers. ATRP produces grafted polymers with a narrower polydispersity, but requires the surface to be functionalized with a surface initiator. In this paper, we demonstrate a new method to graft polymers onto Ti surfaces with a predetermined molecular weight and a narrow polydispersity.

The success of controlled radical polymerization (CRP) relies on the robustness of radical chemistry and the capacity to control the polymer structure (predetermined molecular weight, narrow molecular weight distribution, well-defined end groups and architecture) under mild conditions. There are numerous CRP methods, with three of the most commonly used being: nitroxide mediated polymerization (NMP), ATRP and reversible addition fragmentation transfer (RAFT) polymerization. RAFT polymerization presents some advantages over ATRP polymerization. Both techniques allow the polymerization of a large array of monomers; however the RAFT process does not require the use of a potentially toxic metal catalyst (copper). NMP doesn't use metal complexes, but it does use expensive nitroxide or alkoxyamines and requires high temperatures. Few research studies have reported using RAFT polymerization for preparing brush polymers for grafting onto Ti surfaces. Also, despite of the importance and wide use of RAFT polymerization,²⁴⁻²⁶ few RAFT studies have used ionic monomers. We present in this report, the synthesis of anionic polymers (polyNaSS) by RAFT polymerization for grafting onto Ti surfaces.

Several techniques for covalently tethering well-defined polymer onto surfaces have been developed, including the covalent attachment of end-functionalized polymers incorporating an appropriate anchor ("grafting to") and the *in situ* polymerization initiated from the surface ("grafting from").²⁸ To date, the most common methodologies for the covalent attachment of target molecules onto Ti surfaces have involved the formation of monolayer with organofunctional silanes,²⁸⁻²⁹ phosphonic acids³⁰⁻³² and phosphonates.³³ Then, a target molecule was covalently attached to the surface. However, these strategies usually require multiple steps to generate appropriate organofunctional anchors. Recently, the catechol unit, because of its strong adhesive properties, has become an important biomimetic ligand for surface immobilization.³⁴ Inspired by the unique properties of the adhesive proteins secreted by marine organisms, the incorporation of the catecholic functionality into macromolecules has generated much interest.³⁴⁻³⁶ Messersmith and *al.*³⁷

have reported the first example of anchoring a catecholic initiator onto stainless steel surfaces, for subsequent surface-initiated ATRP. To date, the catecholic units have been conjugated with various polymerization initiators or “clickable” moieties.³⁸⁻⁴⁰ For example, Woisel and *al.*³⁹⁻⁴⁰ report a simple and versatile approach for Ti surface modification based on catechol surface modification that enables target molecules to be attached using the copper-catalyzed, azide-alkyne cycloaddition reaction.

In this context, we propose a new and efficient chemical way to functionalize Ti surfaces. It is a simple and versatile strategy based on catechol surface modification that was developed to enable bioactive ionic polymers bearing thiol end groups to be attached using a thiol-ene click reaction. First, a bioactive polymer was synthesized by RAFT polymerization to give a thiol end group. Then, the bioactive polymer was covalently attached via the “thiol-ene click” reaction onto Ti surfaces modified with dopamine derivative bearing an alkene group. This technique is an efficient way to produce dense polymer brushes of narrow dispersity, controlled architecture, well-defined thicknesses and compositions.

In this article the control Ti, catechol-modified Ti and poly(NaSS)-grafted Ti surfaces were characterized using x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). Results from the initial biological investigations into the influence of the grafted polyNaSS films on the protein adsorption and osteoblast cell response of these samples is also reported.

II. Experimental Methods

1. Materials

All chemical products were obtained from commercial suppliers and were used as received unless stated otherwise. Distilled water with a resistivity of 18.2 MΩ.cm (at 25°C) was obtained from a Millipore Milli-Q Plus water purification system fitted with a 0.22 μm filter. NaSS was purified by recrystallization in a mixture of ethanol/water (90/10 v/v). The purified NaSS was then dried under atmosphere pressure at 50°C overnight and then stored at 4°C. Bovine serum albumin (BSA, Sigma) and human fibronectin (Fn, Sigma) were used at concentrations mimicking their proportion (Fn/BSA) in human plasma. BSA was used at 4000 μg/mL in a phosphate-buffered saline solution (PBS, Sigma), while Fn was used at 20 μg/mL in PBS.

One-centimeter diameter titanium (Grade 2) disks were obtained from GoodFellow. The two

faces of the disks were polished consecutively with 500 and 1200 grit SiC papers. After polishing, the surfaces were cleaned in acetone overnight under stirring. The following day, the surfaces were successively cleaned once in an acetone bath and three times in a water (H₂O) bath with sonication for 15 min. Then, the disks were put in Kroll's reagent (2% HF, Sigma; 10% HNO₃, Acros and 88% H₂O) for one minute with stirring followed by 15 min sonication treatments in five consecutive water baths.

Detailed descriptions of synthesis procedures used to prepare the dopamine acrylamide (DA) anchor group, the polyNaSS via RAFT polymerization and thiolation of polyNaSS are provided in the supplementary material. Experimental details for the nuclear magnetic resonance (NMR) and size exclusion chromatography (SEC) methods used to characterize the synthesized polyNaSS samples are also provided in the supplementary material.

2. Analytical Methods

ATR-FTIR: The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra, recorded in attenuated total reflection (ATR) mode, were obtained using a Perkin Elmer Spectrum Two Spectrometer. A diamond crystal (4000 cm⁻¹ - 500 cm⁻¹) was applied to the sample surfaces and at least 512 scans with a resolution of 4 cm⁻¹ were summed for each sample.

XPS: XPS data were acquired on a Surface Science Instruments S-probe spectrometer. This instrument has a monochromatized Al K α X-ray and a low energy electron flood gun for charge neutralization of non-conducting samples. The samples were mechanically fastened to the sample holder and run as conductors. X-ray spot size for these acquisitions was approximately 800 μ m. Pressure in the analytical chamber during spectral acquisition was less than 5 x 10⁻⁹ torr. Analyzer pass energy for the survey and detail scans was 150 eV. The photoelectron take-off angle (the angle between the sample normal and the input axis of the energy analyzer) was 0°, which corresponds to a \approx 10 nm sampling depth. Service Physics Hawk Data Analysis 7 Software was used calculate surface atomic concentrations using peak areas above a linear background from the survey and detail scans and elemental sensitivity factors.

Three spots were analyzed from each replicate. Either two (Ti and Ti-DA-polyNaSS) or four (Ti-DA) replicates were analyzed. Each analysis spot included a survey spectrum and detail spectra of Na1s and S2p.

ToF-SIMS: ToF-SIMS data were acquired on an IONTOF ToF-SIMS 5 spectrometer using a 25

keV Bi₃⁺ primary cluster ion source in the pulsed mode. Spectra were acquired for both positive and negative secondary ions over a mass range of $m/z = 0$ to 800. The ion source was operated with at a current of 0.12 pA. Secondary ions of a given polarity were extracted and detected using a reflectron time-of-flight mass analyzer. Spectra were acquired using an analysis area of 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. The total primary ion dose for each spectrum was 9.2×10^{11} ions/cm². Positive ion spectra were mass calibrated using the CH₃⁺, C₂H₃⁺, and C₃H₅⁺ peaks. The negative ion spectra were mass calibrated using the CH⁻, C₂H⁻ and C₄H⁻ peaks. Calibration errors were below 20 ppm. Mass resolution ($m/\Delta m$) for a typical spectrum was ≈ 5000 for $m/z = 27$ (pos) and ≈ 4000 for $m/z = 25$ (neg). For each replicate 5 positive and 5 negative spectra were acquired from random locations across the surface. Two replicates of each sample type (Ti, Ti-DA and Ti-DA-polyNaSS) were analyzed.

QCM-D: QCM-D experiments were performed on Ti-coated sensors (QSX-310) using an E1 QCM-D system from Q-sense (Sweden) equipped with a temperature controlled measuring chamber and a peristaltic pump. All experiments were carried out under flow conditions using peristaltic pump (0.2 mL/min) at a controlled temperature (37°C). The concentration of the polymer solutions was fixed at 5 mg/mL in all the QCM-D experiments and the polymers were dissolved in distilled water. The variations in frequency (Δf) and dissipation (ΔD) were recorded at 5 overtone frequencies (3rd, 5th, 7th, 9th, 11th) as well as the fundamental frequency (5 MHz) of the Ti-coated sensor. For clarity, only the data from the fifth overtone (25 MHz) are displayed in the results section. Data were recorded until a plateau is reached for each step of the adsorption and rinsing process (*i.e.* when stable, equilibrium frequency and dissipation signals were reached). Physisorbed molecules or polymers were removed by intermediate rinsing steps with Milli-Q water or PBS (for proteins).

3. Biological Assays

All control and polymer coated Ti wafers used for biological assays were sterilized by exposure to UV germicidal lamp for 15 minutes, then wafers were flipped over and sterilized for another 15 minutes. The wafers were then placed individually into wells of TCPS 12-well plates and treated for 16 hours with a sterile solution of serum-free culture medium DMEM/Hams F12 containing penicillin (100 U/mL¹), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}^1$) and Amphotericin B (2.50 $\mu\text{g/mL}^1$) at 4°C. The TCPS control plates were treated identically.

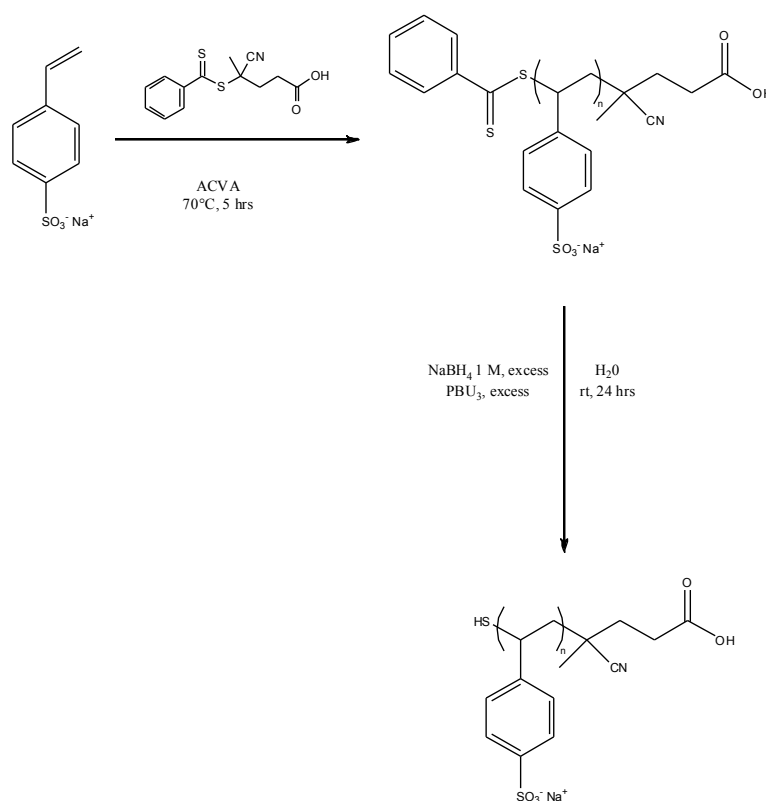
All cell-based assays were conducted using a human bone-derived cell line Saos-2 recognized to have the capacity to differentiate into mature bone-like cells producing alkaline phosphatase and a bone-like mineralized matrix when cultured under the appropriate mineralizing/differentiating

conditions.^[41,42] In this study, Saos-2 cells were used for all assays and were routinely cultured in standard medium comprised by DMEM/Hams-F12 medium supplemented with 10% (v/v) FBS, L-glutamine, penicillin and streptomycin, and incubated at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cell culture reagents were all sourced from Gibco (purchased from Life Technologies, Australia) unless otherwise mentioned. The control and polymer-coated Ti wafers were assayed for initial Saos-2 cell adhesion at 24 and 48 hrs, Saos-2 cell proliferation after 7 days, and Saos-2 cell differentiation after 25 days. Further details about the biological assays procedures are provided in the supplementary material.

III. Results & Discussions

1. Preparation of Thiolated polyNaSS Macromonomer

The thiolated polyNaSS (polyNaSS-SH) macromonomers used in this study were produced following a two-step strategy (**Scheme 1**). The first step involved the RAFT polymerization of NaSS in solution at 70°C using 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) as initiator, 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid as chain transfer agent and water as the reagent (see supplementary materials for synthesis details).



Scheme 1: Preparation of thiolated poly(sodium styrene sulfonate).

Using this chain agent transfer allowed the synthesis of polyNaSS macromolecules with well-defined molar masses and narrow dispersity values (**Table 1**). The polymers resulting from this first synthesis step were characterized with ^1H NMR and SEC. The thiol group was generated at ω -chain end of the polymers in a second step, by reducing the dithiobenzoate moieties with an excess (> 20 equiv relative to the number of polymer chains) of sodium borohydride (NaBH_4) in water for two days.⁴³⁻⁴⁵ Comparison of the infrared spectra before and after the reduction showed the disappearance of the dithioester group ($842 - 930$ and $\approx 1230 \text{ cm}^{-1}$) the reduction to the thiol group (**Figure 1**). To minimize the formation of disulfide bonds between the polymer chains, a reducing agent (PBU_3) was included in the reaction mixture. The thiol macromonomers thus produced had molar masses and dispersity values nearly identical to their precursor polyNaSS (**Table 1**). In addition, the comparison of the size-exclusion chromatograms before and after cleavage of the chain transfer agent didn't exhibit any detectable disulfide bond formation (see supplementary material). For this study four different polyNaSS-SH macromolecules spanning three molecular weights were prepared ($\approx 5 \text{ kDa}$ (2x), $\approx 10 \text{ kDa}$ and $\approx 35 \text{ kDa}$).

Table 1: Conversion, number average molecular weights, and dispersity values before and after post-polymerization modification.

	Conv. ^{a)} [%]	$M_{n,\text{before}}$ ^{b)} [g.mol ⁻¹]	$\mathcal{D}_{\text{before}}$ ^{b)}	$M_{n,\text{after}}$ ^{b)} [g.mol ⁻¹]	$\mathcal{D}_{\text{after}}$ ^{b)}
	^1H NMR	SEC			
polyNaSS ₁₇₀ ^{c)}	0.92	35 200	1.17	35,600	1.25
polyNaSS ₄₈ ^{c)}	0.88	10 000	1.15	10,500	1.21
polyNaSS ₂₅ ^{c)}	0.88	5 050	1.10	5,100	1.18
polyNaSS ₂₅ ^{c)}	0.85	5 200	1.25	5220	1.25

^{a)}After 5 hrs of polymerization at 70°C as determined by ^1H NMR. ^{b)}Number average molecular weight and dispersity obtained from conventional calibration with polystyrene sodium sulfonate standards. ^{c)}Number average degree of polymerization approximated based on the respective number average molecular weight.

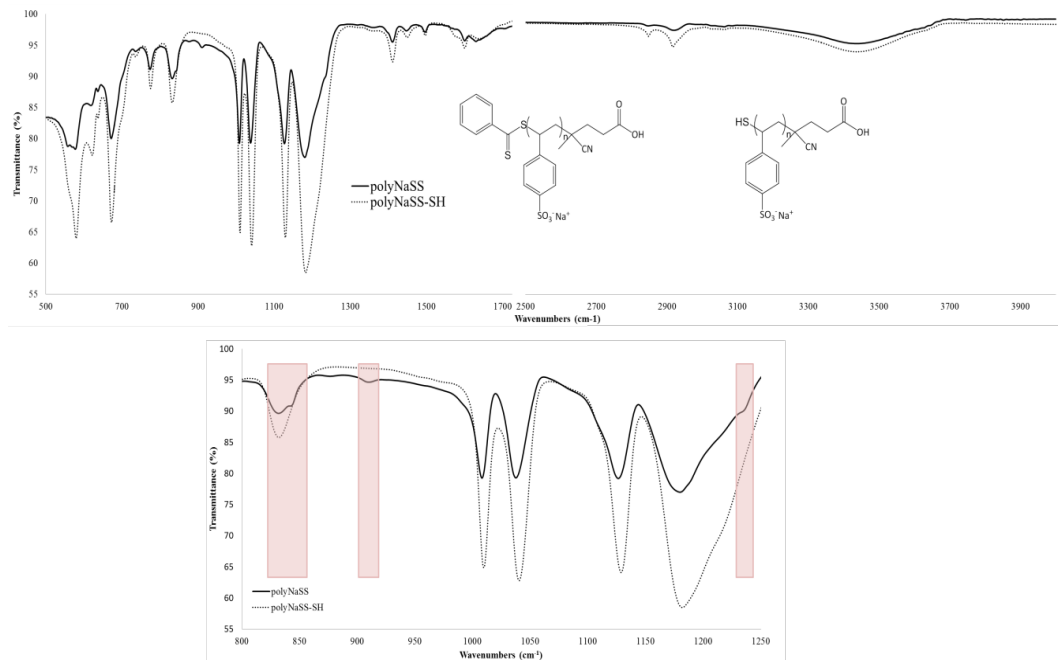
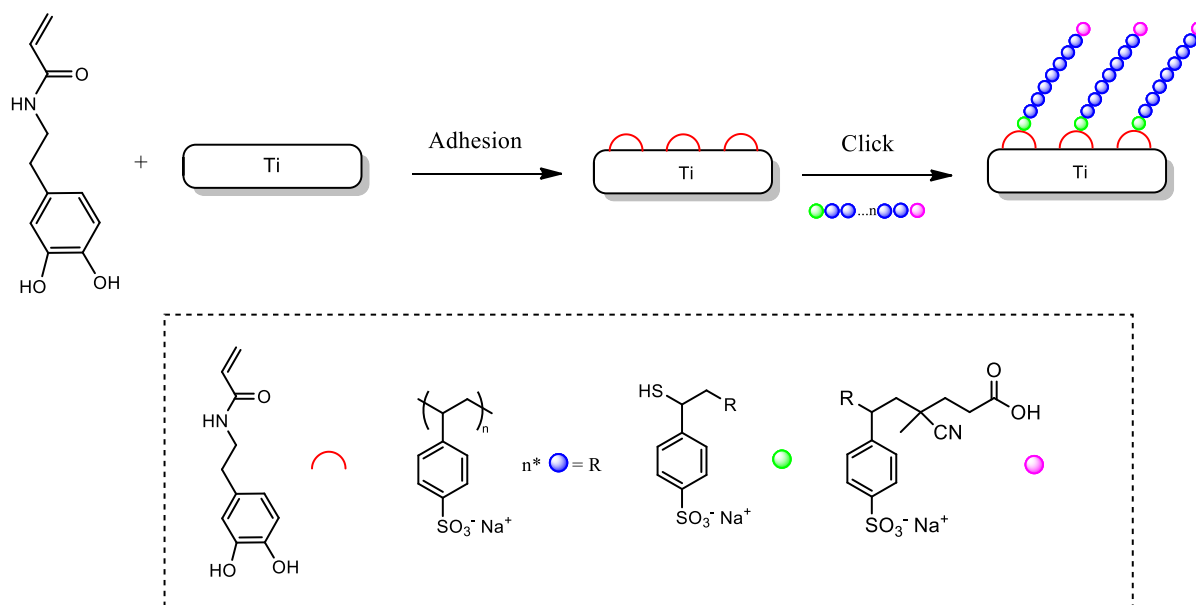


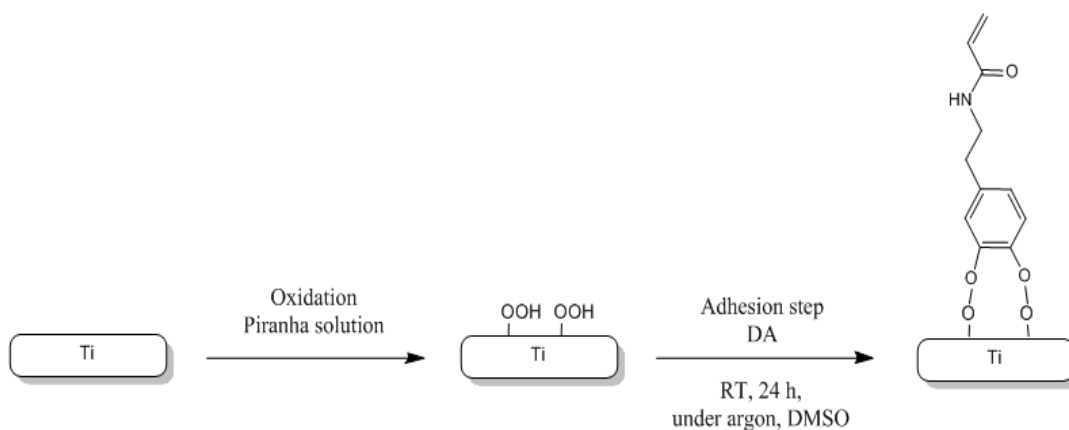
Figure 1: Infrared spectra of the polyNaSS (black line) before and the polyNaSS-SH (gray line) after the reduction step.

2. Grafting of polyNaSS-SH onto the DA Functionalized Ti Surfaces

The polyNaSS-SH macromolecules were grafted onto the Ti surfaces using DA as an anchor molecule. Thus, the grafting process has two steps: (1) adhesion of DA onto the Ti surface and (2) attachment of poly(NaSS)-SH to the DA layer (**Scheme 2**). For the first step the cleaned Ti surfaces were oxidized with a Piranha solution to create surface titanium peroxides (Ti-OOH) within the titanium oxide layer for reaction with the two hydroxide groups of DA (**Scheme 3**).



Scheme 2: Grafting of polyNaSS-SH onto the Ti surface *via* the DA anchor molecule.



Scheme 3: The adhesion of DA onto the Ti surface.

Since the auto-oxidation of the DA to dopaquinone greatly reduces its adhesion onto Ti surfaces, the solution pH must be controlled so the Ti surface can be effectively coated with DA (Ti-DA). XPS, a method for measuring the elements and chemical species present in the surface region of a sample,⁴⁶ was used to characterize the attachment of the DA anchor. The XPS results in **Table 2** show after DA attachment the Ti and O surface concentrations decreased while C and N surface concentrations increased, consistent with the successful adhesion of the DA anchor to the titanium surface. The Ti signal decreases due to attenuation of the substrate signals by the DA surface

overlayer. The carbon and nitrogen signals increase due to their presence in the DA surface overlayer (note carbon is detected on the control surface due to adsorption of adventitious hydrocarbons from air exposure onto the sample prior to XPS analysis). Although oxygen is present in both the oxide layer on the titanium surface and in the DA molecules, it has a higher concentration in titanium oxide layer and therefore the O signal decreases upon formation of the DA overlayer. Small amounts of F (≈ 2 atomic percent) and S (≈ 1 atomic percent) were detected on some spots of the Ti and Ti-DA samples, respectively.

Table 2: XPS determined surface atomic composition of the Ti surface before (Ti) and after (Ti-DA) coating with the DA anchor. The number of spots analyzed (n) for each sample type is indicated.

Samples	XPS atomic percent				
	C	O	Ti	N	Others
Ti (n=6)	30.4 \pm 1.6	48.7 \pm 1.8	19.2 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1	F
Ti-DA (n=12)	43.5 \pm 3.6	40.4 \pm 2.4	13.6 \pm 1.3	2.0 \pm 0.8	S

To provide additional insight about the molecular structure of the DA overlayer, ToF-SIMS analysis was done. ToF-SIMS when operated in the static mode provides a mass spectrum of the outer ~ 2 nm of a surface.⁴⁷ This method analyses positive and negative secondary ions sputtered from the sample surface region by a high-energy primary ion beam. The intensity of nitrogen and oxygen containing positive secondary ions with compositions consistent with the DA molecular structure (e.g., $m/z = 30.03$ (CH_4N), $m/z = 42.03$ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$), $m/z = 44.05$ ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$), $m/z = 56.05$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}$), $m/z = 70.04$ ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$), and $m/z = 95.05$ ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$)) were detected with higher intensity on the Ti-DA samples compared to the control Ti samples. Likewise, the intensity of nitrogen and oxygen negative secondary ions with compositions consistent with the DA molecular structure (e.g., $m/z = 26.00$ (CN) and $m/z = 42$. (CNO)) were detected with higher intensity on the Ti-DA samples compared to the control Ti samples. Positive secondary ions characteristic of the titanium oxide substrate (e.g., $m/z = 47.94$ (Ti), $m/z = 63.94$ (TiO) and $m/z = 64.95$ (TiOH)) were detected in higher intensity on the control Ti samples compared to the Ti-DA samples. These changes in characteristic ToF-SIMS peak intensities are consistent with the XPS results, supporting the adhesion of DA onto the titanium surface. In addition ToF-SIMS detected low to trace levels of peaks due to poly(dimethyl siloxane) (PDMS) on the samples. PDMS is a common surface contaminant and ToF-SIMS can detect its presence at significantly lower concentrations than XPS (XPS detection limit ≈ 0.1 atomic percent Si), so it is not

surprising for ToF-SIMS to detect low to trace levels of PDMS when XPS did not detect its presence.

QCM-D also showed DA was attached to the Ti surface. **Figure 2a** shows the frequency and dissipation shifts observed when the Ti sensor is first exposed to the DA solution and then rinsed. Upon exposure to the DA solution a rapid decrease in the frequency and an increase in the dissipation was observed. Upon rinsing the frequency increased and the dissipation returned back to its value prior to adsorption. These results are consistent with a fraction of the DA molecules tightly adhered to the Ti surface (frequency decrease of -4.5 Hz from before adsorption to after rinsing coupled with similar dissipation before adsorption and after rinsing). During the adsorption process some weakly bound DA molecules are also likely present given the larger decrease in frequency and an increase in dissipation. The total amount of DA bound to the Ti surface calculated for the frequency change was 80 ng/cm², consistent with the XPS and ToF-SIMS results described above for this sample.

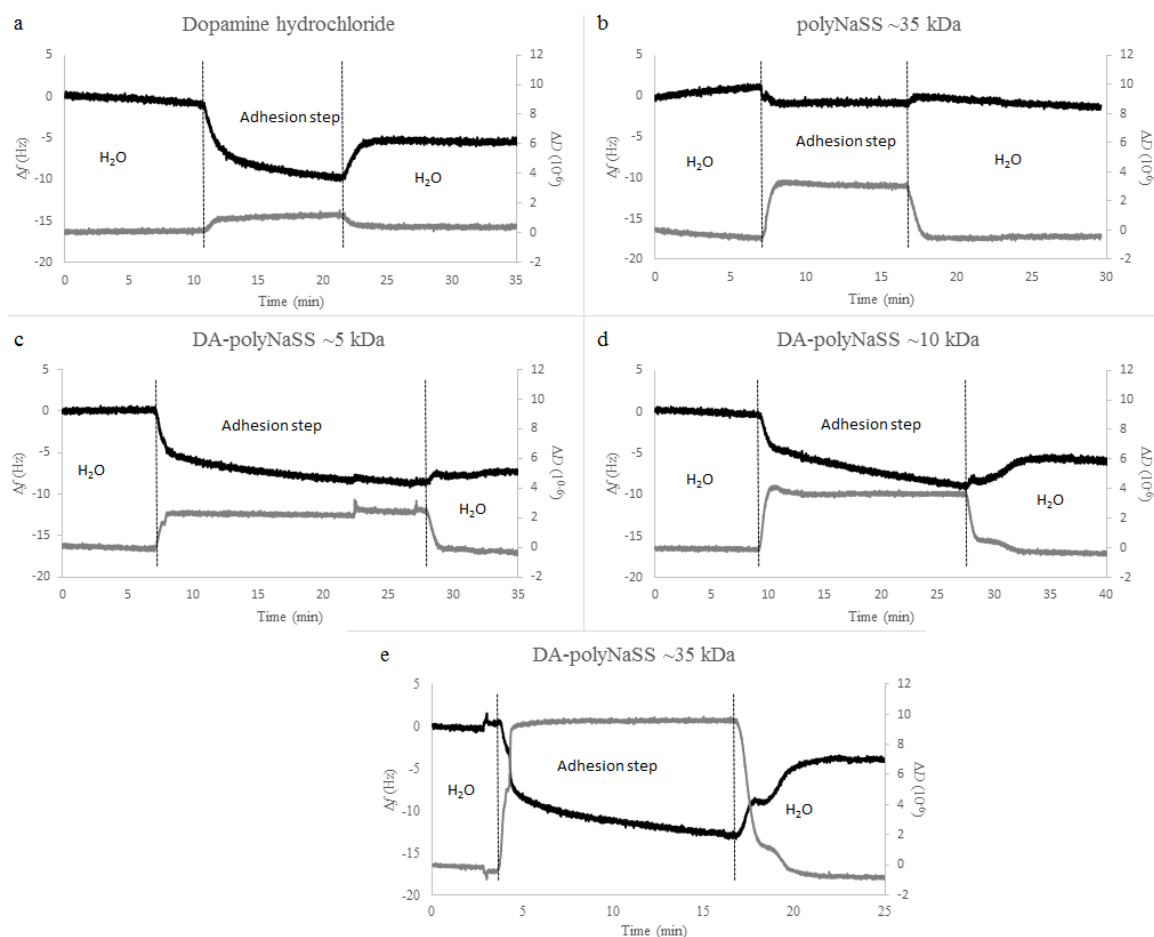
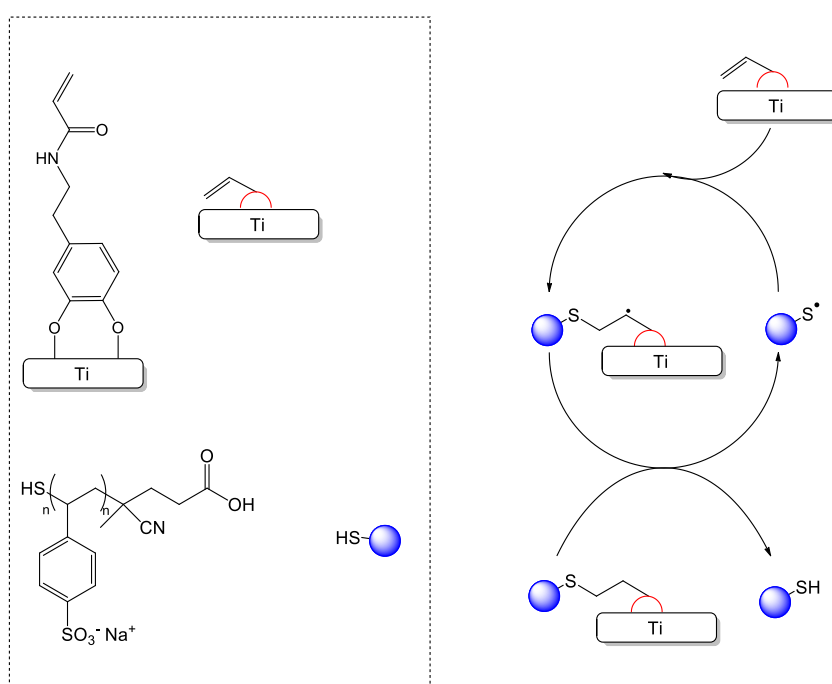


Figure 2: QCM-D analysis (the black line is the frequency change, Δf , and the gray line is the dissipation change, ΔD) of DA adhesion and polymer grafting onto Ti surfaces: a) Dopamine

acrylamide, b) ≈ 35 kDa polyNaSS, c) ≈ 5 kDa polyNaSS-SH, d) ≈ 10 kDa polyNaSS-SH, e) ≈ 35 kDa polyNaSS-SH.

PolyNaSS-SH was coupled to the Ti-DA surface (Ti-DA-polyNaSS) via the thiol-ene reaction following the general procedure shown in **Scheme 4**. The thiol-ene reaction proceeds with the radical mediated addition of a thiol to the ene moiety via the alternation between thyl radical propagation across the ene functional group and the chain-transfer reaction. This mechanism involves abstraction of a hydrogen from the thiol by the carbon-centered radical.



Scheme 4: Simplified mechanism for the preparation of the Ti-DA-polyNaSS sample by thiol-ene photopolymerization.

The Ti-DA-polyNaSS samples were generated at room temperature via 365 nm UV irradiation of a aqueous solution containing polyNaSS-SH, Ti-DA and a photoinitiator (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)).

The thiol-ene polymerization between Ti-DA and polyNaSS-SH was monitored by XPS, ToF-SIMS and QCM-D. The XPS results for the ≈ 5 kDa polyNaSS-SH in **Table 3** show after the thiol-ene reaction the Ti, O and N surface concentrations decreased while C, S and Na surface concentrations

increased, consistent with the successful attachment of the polyNaSS-SH to the Ti-DA surface. The Ti and N signals decrease due to attenuation of the substrate signals by the polyNaSS-SH surface overlayer. The C, S and Na signals increase due to their presence in the polyNaSS-SH surface overlayer. Although oxygen is present in both the Ti-DA surface and polyNaSS-SH, it has a higher concentration in Ti-DA and therefore the O signal decreases upon attachment of the polyNaSS-SH overlayer. The standard deviations in **Tables 2** and **3** for the three major elements detected by XPS (C, O and Ti) all increase in the order of Ti < Ti-DA < Ti-DA-polyNaSS-SH, indicating that the Ti surfaces functionalized with DA and polyNaSS-SH have greater spot-to-spot variations in composition compared to the starting titanium surface. This could be due to the presence of some patchiness in the functionalized samples. Small amounts of F (≈ 1 atomic percent) on some spots of the Ti-DA-polyNaSS samples were detected.

Table 3: XPS determined surface atomic composition of the ≈ 5 kDa Ti-DA-polyNaSS sample (see **Table 2** for XPS determined surface compositions of Ti and Ti-DA). The number of spots analyzed (n) is also indicated.

Samples	XPS atomic percent						
	C	O	Ti	N	S	Na	Others
Ti-DA-polyNaSS (≈ 5 kDa, n=6)	57.3 \pm 4.6	29.3 \pm 3.3	7.3 \pm 2.5	0.5 \pm 0.3	2.8 \pm 1.4	2.2 \pm 0.4	F

After the coupling of the ≈ 5 kDa polyNaSS-SH onto the Ti-DA surface, ToF-SIMS detected the appearance of several fragments characteristic of polyNaSS-SH. These included sodium containing positive secondary ions such as $m/z = 22.99$ (Na), $m/z = 45.98$ (Na₂), $m/z = 46.99$ (Na₂H), $m/z = 77.97$ (Na₂O₂), $m/z = 89.96$ (CO₂Na₂), $m/z = 94.96$ (Na₂SOH), $m/z = 103.98$ (C₂H₂O₂Na₂). The characteristic negative secondary ion peaks included sulfur containing fragments such as $m/z = 31.97$ (S), $m/z = 55.97$ (C₂S), $m/z = 86.96$ (NaSO₂), $m/z = 102.95$ (NaSO₃), $m/z = 155.99$ (C₆H₄SO₃) and $m/z = 183.02$ (C₈H₇SO₃). In particular, the peak at $m/z = 183.02$ represents the mass of the NaSS monomer unit minus sodium (M-Na). Secondary ions characteristic of the titanium oxide surface (Ti, TiO, TiOH, etc.) were still detected from the Ti-DA-polyNaSS sample, but in lower intensities compared to the Ti and Ti-DA samples. Given the ≈ 2 nm sampling depth of ToF-SIMS this suggests that polyNaSS layer does not completely cover the surface in the Ti-DA-polyNaSS samples. This is consistent with the XPS results that show increased spot-to-spot variation in the composition of the Ti-DA-polyNaSS samples.

Like the Ti and Ti-DA surfaces, trace levels of PDMS peaks were also detected by ToF-SIMS on the Ti-DA-polyNaSS surfaces.

The QCM-D results in **Figure 2** show the importance of the thiol group for grafting polyNaSS-SH onto the Ti-DA surface. Only small changes in the frequency and dissipation were observed when the Ti-DA surface was exposed to ≈ 35 kDa polyNaSS without a thiol end group, with most of those changes reversed during the rinsing step. In contrast, when the three polyNaSS-SH polymers were exposed to the Ti-DA surface, QCM-D showed larger variations in frequency and dissipation, consistent with higher grafting efficiencies of the polyNaSS-SH polymers. In particular, after rinsing about 2x more ≈ 35 kDa polyNaSS-SH was grafted to the Ti-DA surface than the ≈ 35 kDa polyNaSS (**Table 4**).

Comparing the three polyNaSS-SH macromolecules, ≈ 35 kDa polyNaSS-SH had the largest changes in frequency and dissipation during the grafting step, but most of the frequency change was reversed during the rinsing step. The ≈ 5 and ≈ 10 kDa polyNaSS-SH macromolecules had smaller changes in frequency and dissipation during the adsorption step. The ≈ 5 kDa polyNaSS-SH had the smallest change in frequency during the rinsing step. For all the poly(NaSS) macromolecules any changes in dissipation that was observed during the grafting step were reversed during the rinsing step. The dissipation returning to its low value prior to grafting is consistent with the polymer remaining after rinsing being strongly attached to the surface. The fact the dissipation increases during the grafting step indicates the film becomes more viscoelastic during this step, which suggests some of the polyNaSS-SH macromolecules are only weakly interacting with the surface. These weakly interacting polyNaSS-SH macromolecules are then removed during the rinsing step. The ratio of Δf after rinsing to Δf after grafting, which is an estimate of the fraction of polyNaSS-SH that is tightly-bound and grafted, decreases with increasing molecular weight (≈ 5 kDa polyNaSS-SH = 0.78, ≈ 10 kDa polyNaSS-SH = 0.63 and ≈ 35 kDa polyNaSS-SH = 0.32). This shows the challenges encountered when grafting large molecular weight macromolecules onto surfaces. As expected, the smallest molecule (DA) has the highest molecular surface coverage, as measured by nmol/cm² and molecules/cm² (see **Table 4**). The QCM-D results show a significantly higher number of ≈ 5 kDa polyNaSS-SH macromolecules are grafted onto the Ti-DA surface compared to the other polymers, likely because of fewer steric effects from sulfonate groups along the macromolecular chain when grafting the smaller ≈ 5 kDa polyNaSS-SH. For example, dividing the molecular coverage of DA by the molecular coverage of all polymers shows the number of DA molecules relative to number of grafted macromolecules increases as 21 (≈ 5 kDa polyNaSS-SH) < 53 (≈ 10 kDa polyNaSS-SH) < 246 (≈ 35 kDa polyNaSS-SH) < 457 (≈ 35 kDa polyNaSS). Although there are coverage variations that depend on molecular weight, the results show it is possible to graft architecture-controlled polymers of different

molecular weights onto the Ti-DA surface.

Table 4: QCM-D results for attaching DA to the Ti surface and grafting polyNaSS and polyNaSS-SH macromolecules onto the Ti-DA surface.

Samples	Δf (Hz) After grafting	Δf (Hz) After Rinsing	Δm (ng/cm ²)	nmol/cm ²	Molecules/cm ²
polyNaSS-SH ≈5 kDa	-9.2	-7.2	127	0.025	1.5×10^{13}
polyNaSS-SH ≈10 kDa	-9.0	-5.7	101	0.010	6.1×10^{12}
polyNaSS-SH ≈35 kDa	-13.8	-4.4	78	0.0022	1.3×10^{12}
polyNaSS ≈35 kDa	-1.9	-2.3	41	0.0011	7.0×10^{11}
DA	-10.2	-4.5	80	0.527	3.2×10^{14}

3. In vitro biological response

3.1. Protein Adsorption

QCM-D was used to investigate the adsorption of BSA onto grafted ≈10 kDa polyNaSS-SH as well as the interactions of Fn with the BSA-covered, grafted film (**Figure 3**). BSA is a blood protein that is used to block non-specific protein adsorption on a wide range of surfaces and is typically one of the first proteins to adsorb onto a material when that material is placed in the biological environment. In the biological environment large molecular weight blood proteins such as Fn, vitronectin and fibrinogen are known to arrive later and displace proteins that were initially adsorbed via the Vroman Effect.⁴⁸ The large change in frequency (≈30 Hz) observed upon exposure of the ≈10 kDa polyNaSS-SH grafted surface to the BSA solution corresponds to the adsorption of 531 ng/cm² of BSA. The frequency doesn't change further upon rinsing and the dissipation returned to its value prior to BSA adsorption. This shows the adsorbed BSA layer forms a densely packed layer and it is not

desorbed or altered by the buffer rinsing step. Upon exposure of the BSA-covered surface to the Fn solution an additional decrease in the frequency (≈ 22 Hz) was observed resulting in a further increase in the mass of the adsorbed protein film. There is also a significant increase in the dissipation upon exposure to the Fn solution, indicating an increase in the viscoelastic properties of the adsorbed protein film. Upon rinsing some of the frequency and dissipation changes were reversed, indicating some weakly bound proteins were removed during the rinsing step. However the total amount of remaining adsorbed proteins was higher (708 ng/cm^2) and the dissipation remained significantly higher than its value after BSA adsorption and rinsing. The increase in the adsorbed protein mass upon exposure to the Fn solution could be due to either adsorption of Fn into BSA film or displacement of some fraction of the adsorbed BSA molecules with Fn molecules. Since QCM-D detects changes in mass, either process could be consistent with the observed frequency changes. However, from the Vroman Effect Fn is known to displace BSA and it has been observed that Ti surfaces modified with a bioactive polymer have a higher affinity for Fn ($K_a = 10^{-6}$) compared to BSA ($K_a = 10^{-5}$).⁴⁹ Thus, it is likely the dominant process occurring is displacement of adsorbed BSA by Fn. The higher dissipation values observed after Fn adsorption and rinsing would be consistent with a more upright orientation of the long Fn molecules resulting in a more viscoelastic protein layer.

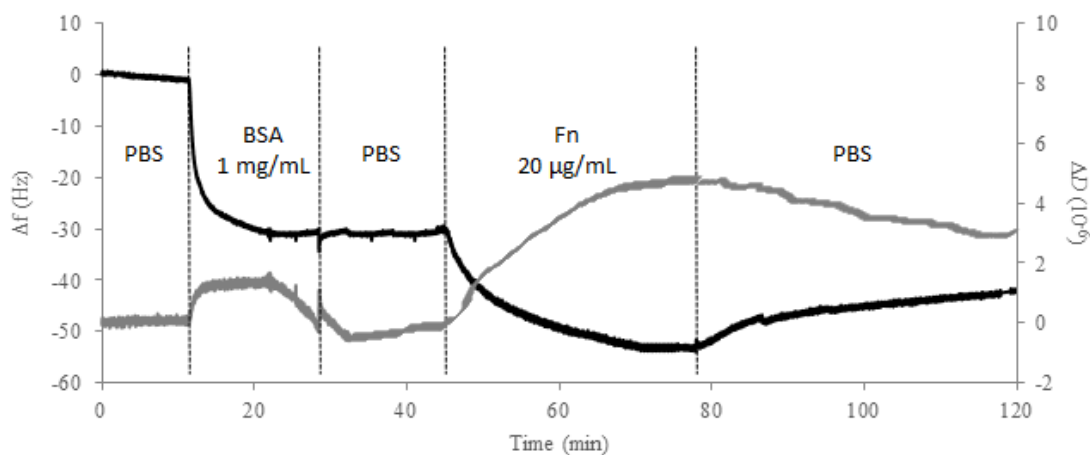


Figure 3: QCM-D frequency (Δf) and dissipation (ΔD) changes (fifth harmonic) with time during the exposure and rinsing of BSA and Fn solutions to the ≈ 10 kDa polyNaSS-SH grafted Ti sensor at 37°C and 0.2 mL/min .

3.2. Initial cell adhesion (spreading and morphology)

The initial adhesion of cells on ungrafted Ti and grafted Ti surfaces was examined after 24 hrs and 48 hrs of culture by staining the cell cytoskeleton with tubulin antibody and the nuclei with DAPI to visualize the cells (**Figure 4**). On both the grafted and ungrafted surfaces the cells had attached and were well spread by 24 hrs. At this timepoint, they were polygonal in shape with cytoplasmic protrusions extending in all directions. By 48 hrs, the adherent cells were becoming elongated on both surfaces.

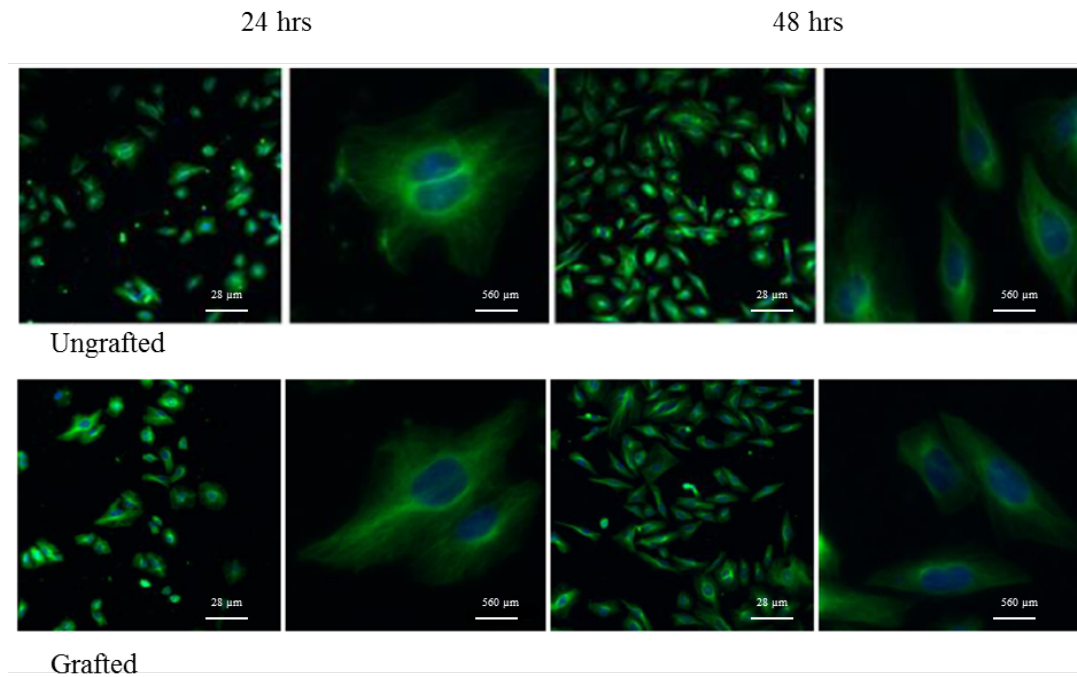


Figure 4: Representative confocal images of Saos-2 cells cultured for 24 hrs and 48 hrs on ungrafted and DA-polyNaSS grafted titanium surfaces (tubulin stained cells with DAPI).

3.3. Cell proliferation

Cell proliferation on the grafted and ungrafted Ti surfaces was measured using MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium) assay conducted over 7 days with timepoints at days 1, 4 and 7. Images were taken at each timepoint to check if the cells that had attached to the surface of wells around each wafer were affected by presence of wafers (ie cytotoxicity check). An additional wafer for each surface was set up and stained with cell tracker green (CTG) on day 7 to check cell morphology and distribution/coverage of cells on surfaces. The first outcome in this assay showed that cells attached to the TCPS wells around the wafers looked similar to the control TCPS wells which indicated that there was no evidence of cytotoxicity in response to the presence of the wafers (**Figure 5**).

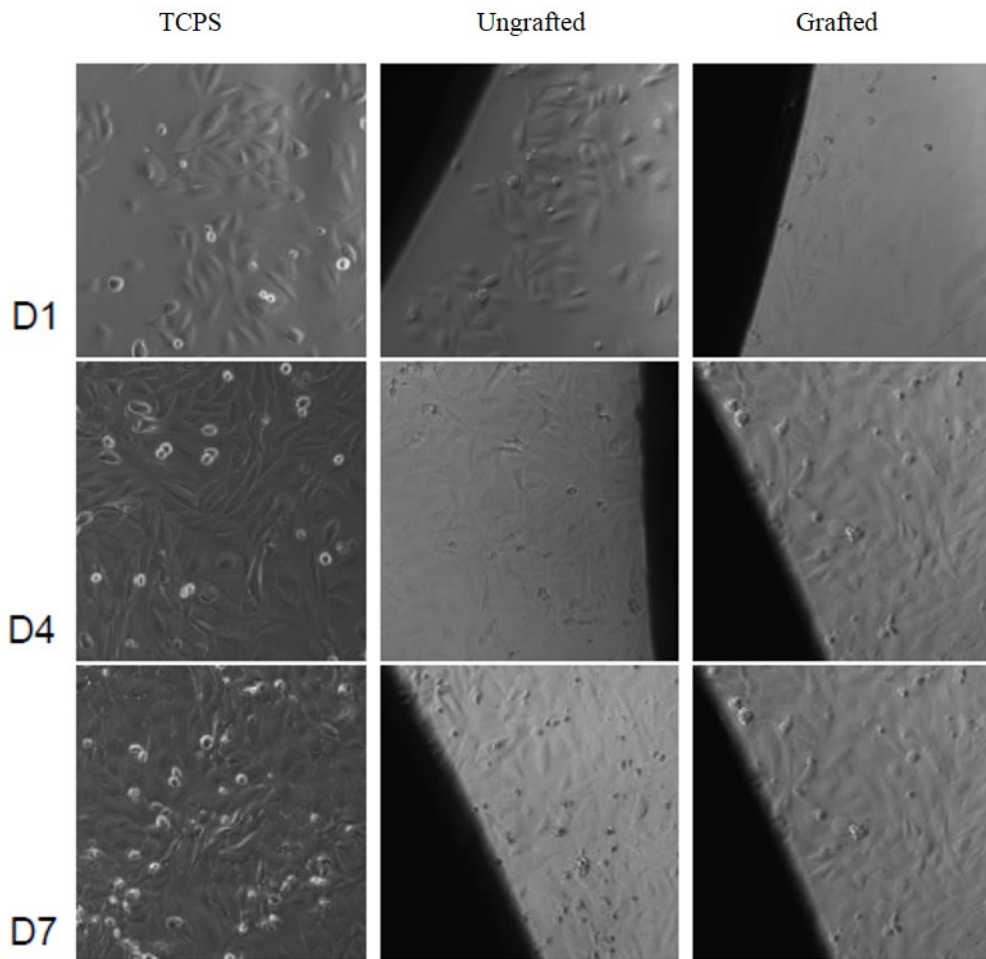


Figure 5: Representative phase contrast images taken at days 1, 4, 7 showed that cells were attached and spread to TCPS surface around each wafer and that the morphology of those cells was similar to the TCPS control surface (no wafer present) at each timepoint in the proliferation assay which demonstrated that neither the grafted or ungrafted wafers were cytotoxic to cells over 7 day period of exposure (phase contrast images).

Cell proliferation data over 7 days (**Figure 6**) showed that the cells on both the grafted and ungrafted Ti surfaces supported steady proliferation over the 7 day period of the assay to equivalent levels on both surfaces. Both were less than the TCPS control which is not unexpected since TCPS is purposefully designed to enhance cell adhesion and proliferation. This outcome was consistent with expectations based on data from the initial cell adhesion assay (as shown in **Figure 4**) and served to further confirm that neither surface was cytotoxic (as shown in **Figure 5**).

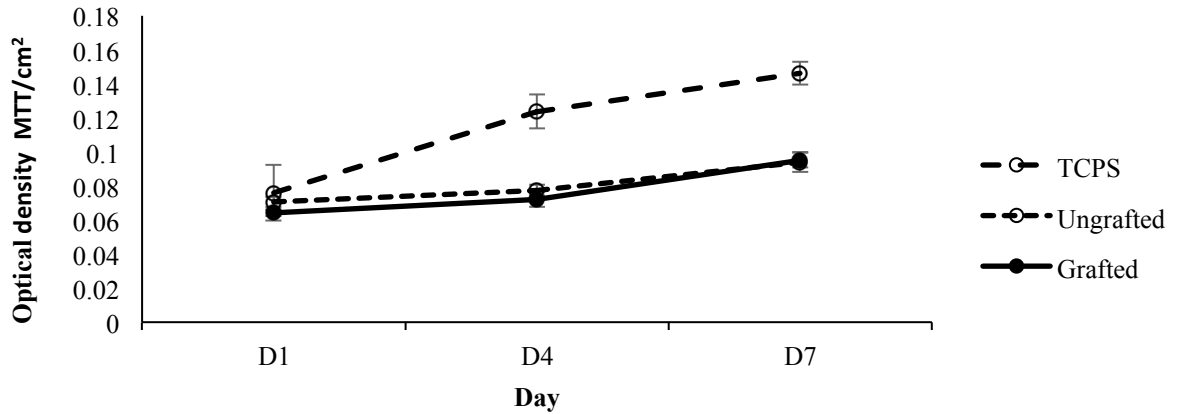


Figure 6: Proliferation of cells on grafted and ungrafted surfaces measured by MTT assay conducted at timepoints of 1, 4 and 7 days (data is based on triplicate samples of each wafer included at each of the 3 timepoints \pm SDM).

On day 7 of the proliferation assay, an extra sample of each surface with adherent cells was stained with Cell Tracker Green (CTG), a fluorescent tag for living cells, to enable visualization of cell cover on the opaque surfaces. Images of CTG stained cells attached to wafers on day 7 confirmed substantial levels of cell attachment and growth on all the grafted and ungrafted surfaces that was similar to the appearance of cells in TCPS control wells (**Figure 7**).

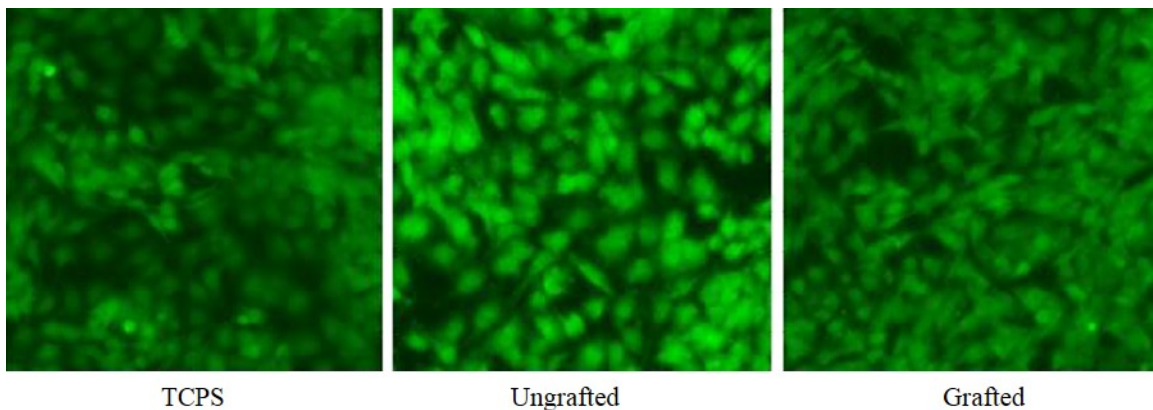


Figure 7: Representative fluorescent images of adherent cells on control TCPS, ungrafted and grafted surfaces on day 7 of the proliferation assay (CTG stained cells at 20x magnification).

3.4. Cell differentiation and mineralization at day 25

Differentiation of cells was evaluated using assays^{41,42} to measure calcium and alkaline phosphatase (ALP) in cells adherent to each surface that had been maintained under two different culture regimes (standard and osteogenic) for 25 days. In parallel, an MTT assay was conducted on day 25 to evaluate cell numbers on each of the surfaces that enabled ALP and calcium data to be adjusted for the number of cells that were attached to each surface. Outcomes of ALP and calcium assays (**Figures 8 and 9**) showed that culturing cells under osteogenic conditions promoted the production of both ALP and calcium by the cells compared to that produced by cells maintained on standard culture conditions over the 25 day period of the assay. Cells on the ungrafted surfaces produced more ALP than those on the grafted surfaces in osteogenic conditions showing that they were in an earlier stage of differentiation than the cells on the grafted surfaces (**Figure 8**). Cells on the grafted surfaces produced more calcium than those on ungrafted surfaces under osteogenic conditions (**Figure 9**) revealing that they were more highly differentiated state and were in the process of mineralizing their matrix.

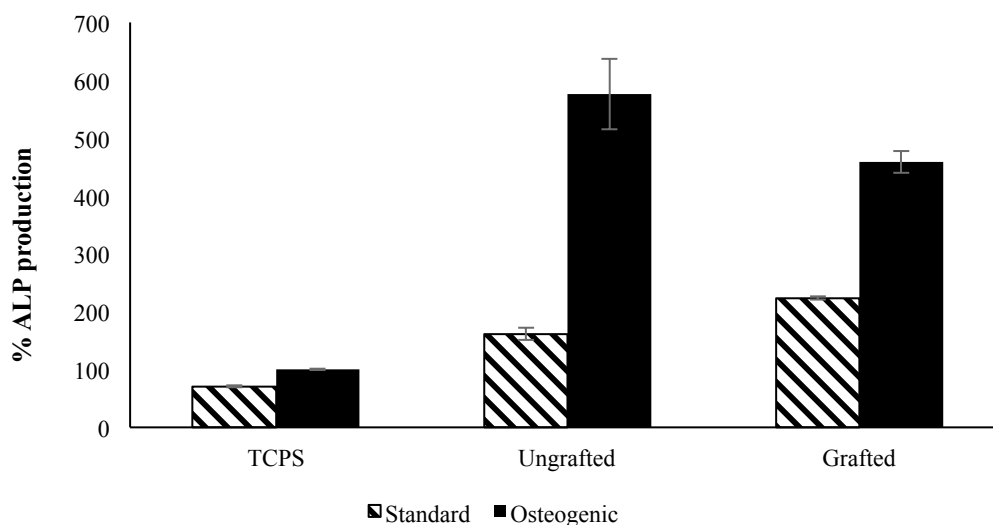


Figure 8: Alkaline phosphatase (ALP) produced by cells adherent to the control TCPS, grafted and ungrafted Ti surfaces (data represents the mean of triplicate samples of each surface corrected for cell number as measured using MTT assay run in parallel over 25 days and normalized to production by cells on control TCPS under osteogenic conditions \pm SDM).

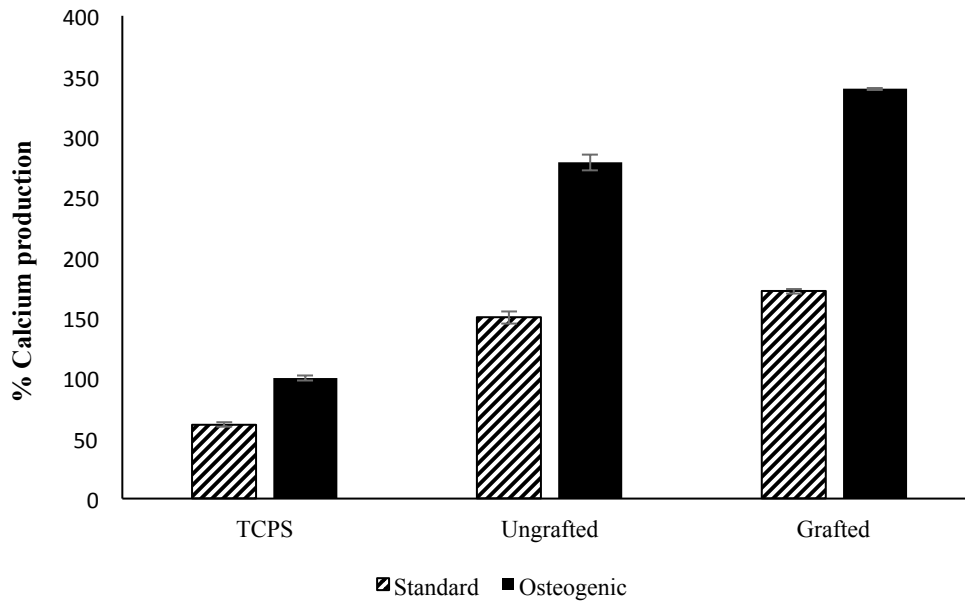


Figure 9: Calcium produced by cells adherent to the grafted and ungrafted Ti surfaces (data represents the mean of triplicate samples of each surface corrected for cell number as measured using MTT assay run in parallel over 25 days and normalized to production by cells on control TCPS under osteogenic conditions \pm SDM).

IV. Conclusions

We have described a new approach to graft bioactive polymers with a well-defined molecular weight onto Ti surfaces. This approach uses a catechol molecule, which plays the role of anchor molecule and acts as a linker between the polymer and the Ti surface. This strategy can be divided in two main steps: i) adhesion of the anchor molecule (DA) onto Ti surfaces and ii) grafting of polymers (polyNaSS-SH) onto the DA coated Ti surfaces via click chemistry. Each step was characterized to confirm the presence of DA and polyNaSS on the Ti surfaces before wafers were used to test the biological response. The grafted surfaces adsorbed a densely packed layer of BSA, of which a fraction was then displaced by Fn. *In vitro* biological assays conducted with a human bone cell line showed that the grafted Ti wafers supported initial cell adhesion and cell growth that was equivalent to the ungrafted Ti. The grafted surfaces promoted cell differentiation, specifically mineralization process associated with the formation of new bone. Additionally, the biological assays showed that there was no evidence of cytotoxicity with either the grafted or ungrafted Ti wafers. Optimization of the grafting methodology could be expected to further improve the biological outcomes above those of ungrafted Ti. This protocol can be adopted as a universal route to graft other bioactive polymers with different molecular weights onto Ti surfaces.

Supplementary Material (Annexe)

Detailed experimental data (organic synthesis, polymer synthesis, coupling reaction), NMR spectra, size exclusion chromatography traces, biological assay conditions are provided in the supplementary material.

V. References

- 1 C. Leyens, M. Peters, Titanium and titanium alloys: Fundamentals and Applications, Vol. 1 (Eds: Leyens C.; Peters M.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2003).
- 2 M. Long, H. J. Rack, *Biomaterials* 19, 1621-1639 (1998).
- 3 M. Esposito, J. M. Hirsch, U. Lekholm, P. Thomsen, *Eur. J. Oral Sci.* 106, 527 (1998).
- 4 A. M. Roos-Jansaker, S. Renvert, J. Egelberg, *J. Clin. Periodontol.* 30, 467-485 (2003).
- 5 B. Kasemo, J. Lausamaa, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 3, 247 (1998).
- 6 A. Michiardi, et al., *Acta Biomaterialia*. 6, 647 (2010).
- 7 Klabunde Windler M. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications. Brunette DM (Eds: T. P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen), Springer-verlag, Berlin, p.703 (2001).
- 8 Z. Schwartz, et al., *Mater. Sci. Eng. C* 23, 395 (2003).
- 9 A. Puelo, A. Nanci, *Biomaterials* 20, 2311 (1999).
- 10 X. Liu, P. K. Chu, C. Ding, *Mater. Sci. Eng.* 47, 49 (2004).
- 11 F. El Khadali, G. H elary, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, *Biomacromolecules* 3, 51 (2002).
- 12 F. Anagnostou, et al., *Biomaterials* 27, 3912 (2006).
- 13 H. Felgueiras, M. Evans, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 28, 225-233 (2015).
- 14 H. Felgueiras, V. Migonney, *IRBM* 37, 165-171 (2016).
- 15 V. Migonney, G. H elary, F. Noirclere, *WO2007/141460 A3* (2006).
- 16 G. H elary, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
- 17 G. H elary, F. Noirclere, J. Mayingi, B. Bacroix, V. Migonney, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 655-663 (2010).
- 18 S. Kerner, et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 707-715 (2010).
- 19 V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudr e, H. Chouirfa, *WO/2017/025519* (2016).
- 20 H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudr e, *RSC Advances* 6, 13766 (2016).
- 21 R. N. Foster. E. T. Harrison, D. G. Castner, *Langmuir* 32, 3207-3216 (2016).
- 22 R. N. Foster, P. K. Johansson, N. Tom, P. Koelsh, D. G. Castner, *Journal Vacuum Science and Technology A: Vacuum, Surfaces and Films* 33, 5, 4929506 (2015)
- 23 R. N. Foster, A. J. Keefe, S. Jiang, D. G. Castner, *Journal Vacuum Science and Technology A: Vacuum, Surfaces and Films* 31, 6, 06F103 (2013).
- 24 V. Sciannamea, R. Jerome, C. Detrembleur, *Chem. Rev.* 108, 1104 (2008).
- 25 K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* 101, 2921(2001).
- 26 J. Chiefari, et al., *Macromolecules* 31, 5559 (1998).
- 27 S. Minko, In *Polymer Surfaces and Interfaces*, (Ed: Stamm, M.), Springer: Berlin and Heidelberg,

- Germany 215, pp. 215-234 (2008).
- 28 M. C. Porté-Durieu, et al., *Biomaterials* 25, 4837 (2004).
 - 29 X. Jia X, X. Jiang, R. Liu, J. Yin, *Macromol. Chem. Phys.* 210, 1876 (2009).
 - 30 C. Viornerly, et al., *Langmuir* 18, 2582 (2002).
 - 31 N. Adden, et al., *Langmuir* 22, 8197 (2006).
 - 32 V. Zoulalian, et al., *J. Phys. Chem. B* 110, 25603 (2006).
 - 33 M. A. White, A. Maliakal, N. J. Turro, J. Koberstein, *Macromol. Rapid Commun.* 29, 1544 (2008).
 - 34 E. Faure, et al., *Progress in Polymer Science* 38, 236 (2013).
 - 35 J. Sedo, J. Saiz-Poseu, F. Busqué, D. Ruiz-Molina, *Adv. Mater.* 25, 653 (2013).
 - 36 Q. Ye, F. Zhou, W. Liu, *Chem. Soc. Rev.* 40, 4244 (2011).
 - 37 X. Fan, L. Lin, J. L. Dalsin, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15843 (2005).
 - 38 J. Liu, W. Yang, H. M. Zareie, J. J. Gooding, T. P. Davis, *Macromolecules* 42, 2931 (2009).
 - 39 M. A Watson, et al., *Langmuir* 26, 15920 (2010).
 - 40 A. Barras, J. Lyskawa, S. Szunerits, P. Woisel, R. Boukherroub, *Langmuir* 27, 12451 (2011).
 - 41 M. Prideaux, A. R. Wijenayaka, D. D. Kumarasinghe, *Calcif. Tissue Int.*, 95(2), 183-93 (2014).
 - 42 E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, J. R. Ralphs, R. G. Richards, J. S. Hayes, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102(8), 2636-43 (2014).
 - 43 C. W. Scales, A. J. Convertine, C. L. McCormick, *Biomacromolecules* 7, 1389-1392 (2006).
 - 44 Y. K. Chong, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* 40, 4446-4455 (2007).
 - 45 H. Willcock, R. O'Reilly, *Polym. Chem.* 1, 149-157 (2010).
 - 46 B. D. Ratner, D. G. Castner, Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, In Surface Analysis - The principal Techniques, 2nd Edition, J. C. Vickerman and Gilmore, Eds: John Wiley and Sons, Chichester 47-112 (2009).
 - 47 A. Belu, D. J. Graham, D. G. Castner, *Biomaterials* 24, 3635-3653 (2003).
 - 48 W. Norde, T. A Horbett, J. L. Brash. Proteins at Interfaces III: Introductory Overview, In Proteins at Interfaces III State of the Art, ACS Symposium Series Vol. 1120, American Chemical Society, Chapter 1, 1-34 (2012).
 - 49 H. P. Felgueiras, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 13207-13217 (2016).

QUATRIÈME CHAPITRE : RAFT BASED GRAFTING OF POLYNASS

ON TITANIUM DIRECTED AT BIOACTIVITY TO INHIBIT BACTERIAL

ADHESION AND PROMOTE THE RESPONSE OF HUMAN BONE CELLS

FOR IMPROVED OUTCOMES WITH ORTHOPEDIC DEVICES

Dans cette dernière partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à la réponse biologique que pouvaient engendrer les trois techniques de greffage que nous avons développés et mis en oeuvre : deux greffages par « grafting from » et un par « grafting to ».

Dans un premier temps, nous avons comparé les activités des surfaces fonctionnalisées par greffage radicalaire amorcé par voie thermique et par voie UV en étudiant leur capacité d'inhibition de l'adhésion bactérienne et leur activité vis à vis des ostéoblastes.

L'étude de l'inhibition de l'adhésion bactérienne sur les surfaces en titane greffées ou non de polymère bioactif a été faite en utilisant une souche bactérienne de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ou SA). Cette souche clinique a été utilisée dans notre étude car elle est impliquée dans les infections à corps étranger comme l'infection sur prothèses totales de hanche. Il s'agit d'une souche clinique de SA résistance à la méthicilline, gracieusement mise à notre disposition par le Pr. A. C. Crémieux et laquelle a déjà été utilisée au LBPS depuis de nombreuses années pour mettre en évidence l'influence des groupements carboxylate et sulfonate sur l'inhibition de l'adhérence *S. aureus*. L'étude de la réponse cellulaire osseuse a été faite sur les étapes d'adhésion, de prolifération et de différenciation ostéoblastique.

L'étude de la réponse bactérienne a été réalisée dans différentes conditions - protéines pures ou en mélange - afin de confirmer ou d'infirmer l'influence des protéines d'intérêt telles que la fibronectine sur l'adhésion bactérienne. Les résultats de l'étude sont très prometteurs - inhibition de l'adhérence de *S. aureus* réduite de l'ordre de 75% par rapport au titane contrôle - et confirment ceux obtenus dans les études précédentes¹ sur les surfaces greffées par voie radicalaire et amorcées thermiquement. D'autre part, les résultats montrent également que le mode d'amorçage UV ou

thermique ne modifie pas le caractère inhibiteur de l'adhérence bactérienne.

L'étude de la réponse bactérienne a été élargie à l'utilisation des surfaces de titane greffées de polymère bioactif par la technique de « grafting to » en utilisant des polymères (polyNaSS) de masses contrôlées et différentes. Les résultats des surfaces fonctionnalisées par la technique de « grafting to » sont inférieurs en terme d'inhibition de l'adhérence bactérienne lorsque les masses des polymères sont inférieures à 35 kDa ; en revanche lorsque la masse est de l'ordre de 35 kDa on retrouve quasiment le même taux d'inhibition.

Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par les différences de recouvrement de la surface du titane par le polyNaSS qui diffère selon que l'on utilise la technique de « grafting from », ou de « grafting to » que le « grafting from ». Les résultats sur le « grafting to » ont également montré un effet de la taille des polymères, plus la masse molaire du polymère était importante plus l'inhibition bactérienne était importante.

L'étude de la réponse osseuse n'a pas montré de différences significatives dans le comportement des cellules sur les différentes surfaces greffées. Il s'agit en effet d'une réponse macroscopique et moins ciblée en terme d'influence des protéines. Néanmoins les résultats montrent que les surfaces sont parfaitement compatibles et que l'on y observe une adhésion et une prolifération cellulaires conformes à celles observées sur les surfaces de titane. Cependant, seule la phase finale de la différenciation ostéoblastique varie en fonction du type de greffage de la surface « grafting to » et le « grafting from » : nous nous sommes intéressés à deux marqueurs un marqueur précoce - la production de phosphatase alcaline (ALP) et un marqueur tardif la minéralisation de la matrice extracellulaire – illustrée par la présence calcium (Ca).

Cette étude montre que la technique de « grafting from » permet une meilleure différenciation ostéoblastique ; cependant cela peut être simplement dû à un meilleur recouvrement des polyNaSS à la surface du titane par comparaison avec le « grafting to ».

1. H. P. Felgueiras, I. Ben Aissa, M. D. M. Evans, V. Migonney, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26, 261 (2015).
2. A. Alcheikh, et al., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24 (7), 1745-1754 (2013).

This article presents and compares three different techniques of grafting poly(styrene sulfonate sodium) on titanium surfaces. Two of them are “grafting from” techniques which require an activation step either thermal or by UV irradiation. The third method is a “grafting to” technique involving an anchorage molecule onto which poly(styrene sulfonate sodium) synthesized by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerization are clicked. Our interest in the “grafting to” technique pertains to the potential control of the architecture of the grafted polymers on the titanium surface, the simplicity and reproducibility of the process and the ease of the industrial process involved. In comparison the “grafting from” technique yields homogeneity of the grafted polyNaSS molecules on a titanium surface. This investigation compares the effect of the three grafting processes on the *in vitro* biological responses measured by the inhibition of bacterial adhesion using *S. aureus*, the main bacteria responsible for infections of joint implants, and on various processes in mammalian cells including the cell adhesion, growth and differentiation using an osteoblast-like cell line Saos-2. Overall outcomes of this investigation confirmed the significance of the sulfonate functional groups and their distribution on the biological response and showed that the optimal technique of grafting polyNaSS on titanium surface may depend on its application.

I. Introduction

Titanium (Ti) and its alloys are the materials of choice for orthopaedic and dental implant applications as well as for fixation devices because of the anti-corrosion properties, excellent compatibility and the mechanical properties which are closer to those of bone than many other materials.

Despite considerable progress in the areas of material science, surgical techniques and surface modifications, infection of the devices remains an issue in the osteointegration of Ti implants. Various strategies to promote osseointegration and to decrease bacterial infection have been explored including modifications of the topographical and physicochemical surface properties of Ti.^{1,2} Recent studies have focused on both promoting specific interactions of the host bone cells and inhibiting bacteria adhesion.^{3,4} Bacterial infections compromise the lifespan of the implant and generate complications such as pain, removal of the implant, associated morbidity and increased treatment cost. Prevention of bacterial adhesion, which is the first step of infection, is a one strategy to prevent implant infection. The most common bacteria in the peri-implant area of endosseous devices are Staphylococci, including *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epi*). *S. aureus*, which have a strong affinity for Ti,⁵ has been associated with

prosthetic joint infections⁶ and has also been identified in dental implant-related lesions.⁷ To overcome Ti implant-related infection, antibiotic loading and/or controlled antibiotic release from Ti surfaces have been tested.⁸ For example, Ti surfaces were modified with either incorporated or immobilized antibiotics such as gentamycin and vancomycin,⁹⁻¹¹ yet the long-term success of such implants was not achieved because of the development of antibiotic-resistant pathogens.¹² For this main reason, several strategies in the fight against implant-related infection have focused on the physicochemical modification of titanium surfaces to reduce bacterial adhesion,¹³ a prerequisite of their survival and subsequent proliferation. These endeavors have included titanium surface modifications with ion (Ag, Co) implantation,¹⁴ plating (TiN, alumina), ion (Ag, Sn, Zn, Pt) beam mixing,¹⁵ polycationic groups,^{16,17} polyelectrolyte multilayers of acid hyaluronic, and chitosan.¹⁸ Other approaches include decreasing bacterial adhesion by controlling and/or modulating the adsorption of proteins present in body fluids and tissues¹⁹ that are known to mediate subsequent bacterial interactions. A successful approach in achieving these outcomes is the use of polymers decorated with sulfonate ionic groups. These groups randomly distributed along the macromolecular chains of various poly(methyl methacrylate), polystyrene or poly(vinyl chloride) based copolymers have been demonstrated to promote specific interactions with selected adhesive proteins,^{20,21} such as fibronectin, which is known to mediate *S. aureus* adhesion.²² In addition, when grafted on silicone matrices, sulfonate and carboxylate groups from poly(sodium styrene sulfonate) and poly(methacrylic acid) chains have been shown to modulate the inhibition of *S. aureus* adhesion *in vitro*^{23,24} and *in vivo*.²⁵ For all these reasons, we were interested to examine the effect of titanium alloy grafted with sulfonate groups on bacterial adhesion using *S. aureus*. In addition, we examined the response of mammalian cells, specifically osteoblast-like cells, to sulfonate grafted Ti alloy. Several *in vitro* and *in vivo* studies have reported that, when present at the surface of Ti and poly(ethylene terephthalate) surfaces and implants, sulfonate groups enhance aspects of the osteoblast response such as cell adhesion, proliferation, and differentiation that are the prerequisites to osseointegration.^{26,27}

The present study investigated the effect of grafting polyNaSS by covalent bonding to commercial pure titanium (Ti) surfaces on the *in vitro* biological response as measured by the adhesion of *S. aureus* and on selected osteoblast activities pertinent to bone formation. The effect of the distribution of sulfonate groups on polyNaSS macromolecular chains of different molecular weight on the inhibition properties of *S. aureus* adhesion and on osteoblast behavior was evaluated to compare the polyNaSS grafted Ti surfaces prepared by “grafting from” and by “grafting to” techniques. The “grafting from” was prepared using either thermic or UV activation generating a homogeneous and well distributed layer of grafted short polyNaSS chains on Ti surface whereas the

“grafting to” technique allowed the grafting of macromolecular chains of polyNaSS of different and precise molecular weights with controlled architectures.

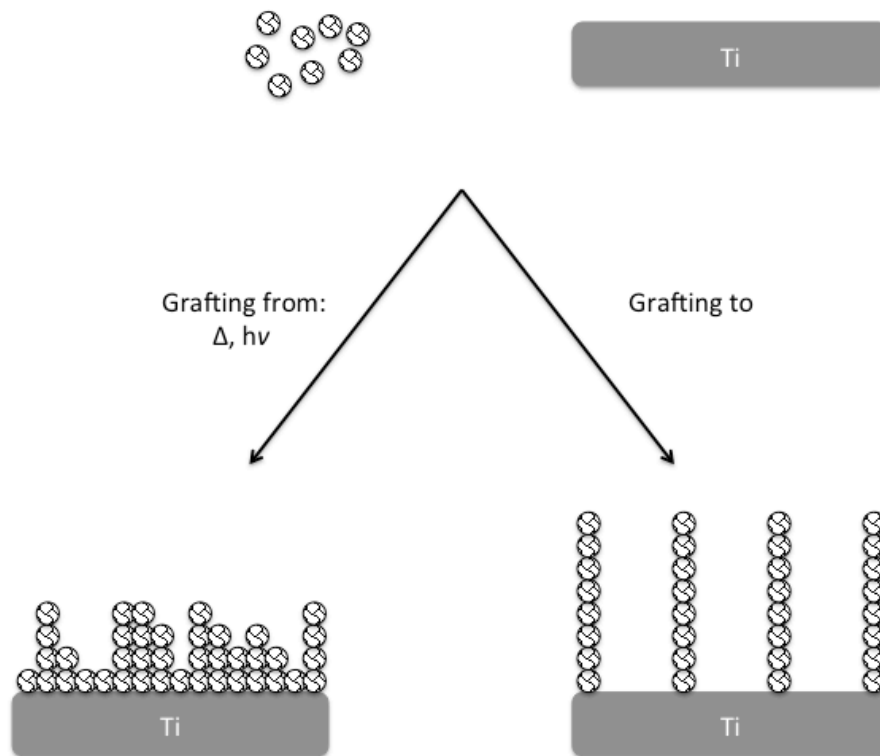
II. Materials and Methods

1. Materials

One-centimeter diameter titanium (Grade 2) disks were obtained from GoodFellow supplier. The two faces of the disks were polished consecutively with 500 and 1200 grit SiC papers for \approx 2-3 min each. After polishing, the surfaces were cleaned in acetone overnight under stirring. The following day, the surfaces were cleaned once in an acetone bath and then three times in distilled water (dH₂O) bath with sonication for 15 min. Then, the disks were put in Kroll's reagent (2% HF, Sigma; 10% HNO₃, Acros and 88% dH₂O) for one minute with stirring followed by 15 min sonication treatments in five consecutive dH₂O baths. Sodium styrene sulfonate (NaSS monomer, Sigma) was purified by recrystallization in a mixture of water/ethanol (10/90 v/v), dried at 50°C under vacuum, and then stored at 4°C.

2. Methods

Poly(NaSS) chemical grafting was performed with different ways: “grafting from” and “grafting to” techniques. The “grafting from” process included the thermal grafting and the UV grafting as described by Hélyary et al.²⁸ and Chouirfa et al.^{29,30} respectively. In some words, the UV grafting is 15 times faster than the thermal grafting and uses twice less monomers (0.32 M for the UV grafting instead of 0.7 M for the thermal grafting). The “grafting to” procedure was described in details by Chouirfa et al.³¹ The main difference between the “grafting from” and the “grafting to” technique is the architecture of the grafted polymers and the homogeneity of polymer grafted recovering of the surface (**Scheme 1**). Indeed, the “grafting from” permits to generate the radical polymerization of monomers and then the grafting of polymers of theoretically distributed molecular weights – in fact we demonstrate that the length of grafted polymers chains is low (DP_n 5 to 10) but with a very good surface recovering. In the case of the “grafting to” technique, the grafted polymers on the titanium surface have been polymerized by RAFT synthesis then present a controlled architecture and a well defined molecular weight (5, 10 and 35 kDa) but in the same time the recovering is lower than in the case of the “grafting from” process. Overall, three grafted surfaces were prepared and compared to a control Ti surface that was not polyNaSS grafted as detailed in **Table 1**.



Scheme 1: The “grafting from” includes the thermal polyNaSS grafting (Δ) and the UV polyNaSS grafting ($h\nu$) and gives a distribution of the polymers chains size whereas the “grafting to” lead to the grafting of polymer chains of precise and unique size.

Table 1: Details of polyNaSS grafted surfaces.

Surface	Details	Reference
Ti Control	Non-grafted	Ti
Thermal grafted Ti	Grafted from	Ti-TH
UV grafted Ti	Grafted from	Ti-UV
Architecture controlled grafted surface	Grafted to	Ti-PR

The grafted polyNaSS onto the titanium surface *via* “the grafting to” needs to incorporate an anchoring molecule (catechol) for the adhesion on the surface. The catechol group links the polyNaSS with the titanium surface. On the **Figure 1**, the polyNaSS structure is differently represented according the grafting way: “grafting from” or “grafting to”.

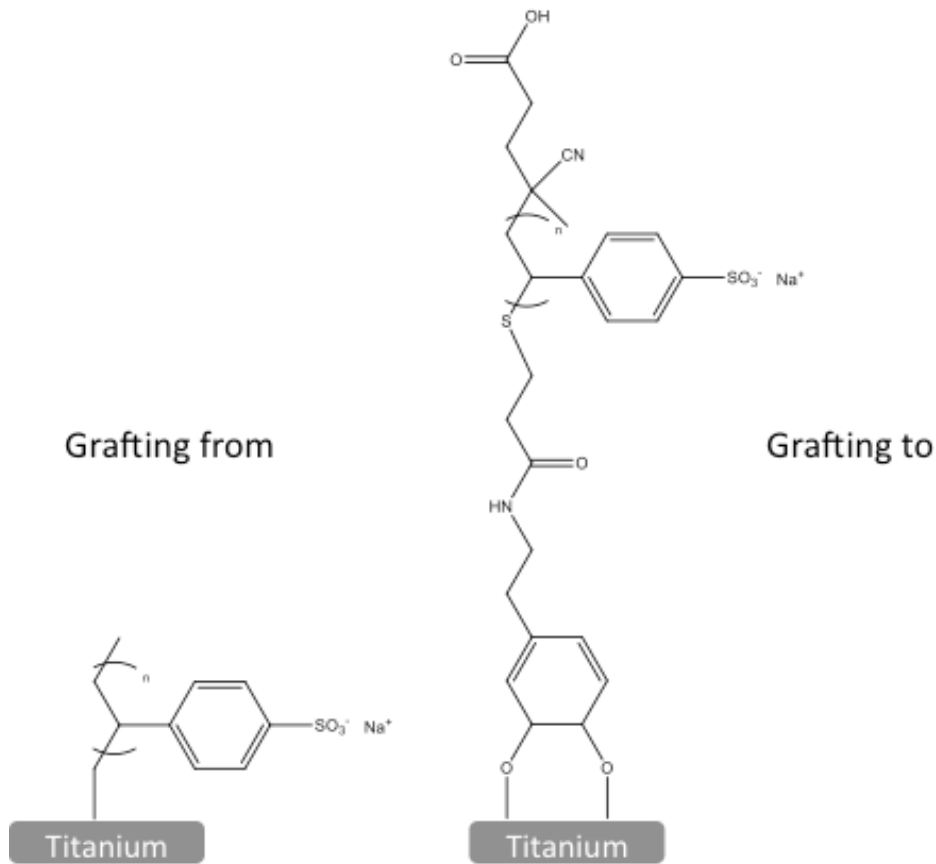


Figure 1: Representation PolyNaSS according the grafting way: on the left “grafting from” and on the right “grafting to” with the catechol group .

3. Characterization

The presence of poly(NaSS) chains on the grafted surfaces was determined using the toluidine blue (TB) colorimetric method,²⁹ Fourier-transformed infrared (FTIR),^{29,31} X-ray photoelectron spectroscopy (XPS),³¹ contact angle,²⁹ quartz crystal microbalance by dissipation (QCM-D).³¹

For the TB analysis, Ti disks were individually immersed in a TB (Acros) aqueous solution (5×10^{-4} M) at 30°C for 6 hrs, allowing TB complexation with the SO_3^- groups from the poly(NaSS).^{32,33} Surfaces were rinsed with 5×10^{-3} M sodium hydroxide in dH_2O to remove the non-complexed dye. Disks were then immersed in a mixture of acetic acid/ dH_2O (50/50 v/v, Sigma) for 24 hrs, inducing TB decomplexation. The concentration of the decomplexed TB was measured by visible spectroscopy at 633 nm using a Perkin-Elmer spectrometer lambda 25.

Static solvent contact angles were measured using a DSA10 contact angle measuring system from KRUSS GmbH. A droplet of solvent was suspended from the tip of a microliter syringe supported above the sample stage. The image of the droplet was captured and the contact angle was measured using DSA drop shape analysis program from KRUSS. The contact angle of distilled water (2 μL) on the surface was recorded 10 s after contact, 3 measurements were taken and averaged for each face.

XPS data were acquired on a Surface Science Instruments S-probe spectrometer. This instrument has a monochromatized Al K α X-ray and a low energy electron flood gun for charge neutralization of non-conducting samples. The samples were mechanically fastened to the sample holder and run as conductors. X-ray spot size for these acquisitions was approximately 800 μm . Pressure in the analytical chamber during spectral acquisition was less than 5×10^{-9} torr. Analyzer pass energy for the survey and detail scans was 150 eV. The photoelectron take-off angle (the angle between the sample normal and the input axis of the energy analyzer) was 0° , which corresponds to a ≈ 10 nm sampling depth. Service Physics Hawk Data Analysis 7 Software was used calculate surface atomic concentrations using peak areas above a linear background from the survey and detail scans and elemental sensitivity factors. Three spots were analyzed from each replicate. Each analysis spot included a survey spectrum and detail spectra of Na1s and S2p.

4. Cell culture

Prior to cell culture, all substrates (ungrafted and grafted) were washed with 1.5 M sodium chloride (NaCl, Fisher), 0.15 M NaCl, pure water and phosphate buffered saline solution (PBS, Gibco). This was repeated three times. The surfaces were finally air dried and sterilized on both sides by exposure to ultraviolet light (UV, 30 W) for 15 min. The wafers were then placed individually into wells of 12-well TCPS plates and treated for 16 hrs with a sterile solution of serum-free culture medium DMEM/Hams F12 containing penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) and Amphotericin B (2.50 $\mu\text{g/mL}$) at 4°C . The TCPS control plates were treated identically. All cell-based assays were conducted using a human bone-derived cell line Saos-2 recognized to have the capacity to differentiate into mature bone-like cells producing alkaline phosphatase and a bone-like mineralized matrix when cultured under the appropriate mineralizing/differentiating conditions. In this study, Saos-2 cells were used for all assays and were routinely cultured in standard medium comprised by DMEM/Hams-F12 medium supplemented with 10% (v/v) FBS, L-glutamine, penicillin and streptomycin, and incubated at 37°C in humidified air containing 5% CO_2 . All cell culture reagents were sourced from Gibco (purchased from Life Technologies, Australia) unless otherwise mentioned. The control and polyNaSS grafted wafers were evaluated for initial Saos-2 cell adhesion at 24 and 48

hrs, Saos-2 cell proliferation over 7 days, and Saos-2 cell differentiation after 25 days, as previously described.³¹ Each assay was conducted using triplicate samples of each Ti surface (ungrafted and grafted) held in wells of culture plates and a tissue culture control surface (either TCPS or Permanox) that was included as an internal assay cell culture control.

5. Bacteria adhesion

Clinical meticillin resistant strain *S. aureus* MRSA 88244 was provided by Prof. A. C. Crémieux, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France. Bacterial strain was stored at -80°C until using. Before experiments, they were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La Coquette, France) at 37°C for 18 h under stirring. The bacteria were initially thawed; spread in a Muller Hinton Agar (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La Coquette, France) gel and incubated for 18 h at 37°C. For each experiment, one colony of *S. aureus* was extracted and combined with 9 mL of Tryptone-Casein-Soja (TCS) (Bio-Rad Laboratories) to expand overnight at 37°C under stirring. The adhesion of *S. aureus* (88244) onto poly(NaSS) grafted and ungrafted Ti was assessed following the experimental procedure derived from Felgueiras et al.²⁶

PreadSORption of Ti samples surfaces by proteins. 1) albumin passivation: by incubating surface with 0.4 g/L human serum albumin (HSA) PBS solutions for 30 min at 37°C under stirring in order to avoid non-specific adsorption 2) pure or mixture proteins adsorption for 1 h at 37°C under stirring: with HAS, poor platelet plasma (PPP, 10% plasma) or Fibronectin (Fn) or depleted poor platelet plasma (dPPP) supplemented or not by Fn .

Prior to any experiment, the growth parameters for bacteria proliferation were established and the corresponding exponential phase determined (phase when bacteria exhibit the highest adhesins expression).

One colony suspended in new 9 mL TCS medium and its absorbance was measured in duplicate at 600 nm. Two suspensions were then prepared and incubated at 37°C under stirring. Their absorbance was read every 30 min. The bacterial exponential phase was determined at 4 hrs. Thus, 3 hrs was the time selected for bacterial culture prior to seeding.

The colony was expanded overnight (37°C under stirring), was centrifuged (3500 rpm, 15 min)

and re-suspended in 1 mL of physiological water (0.85%). 160 μ L of the previous were then combined with 1 mL of Trypto-Caseine-Soja (TCS) and incubated for 3 hrs at 37 °C. The bacterial solution was centrifuged, the supernatant discarded, and 20 mL of PBS was added. Bacterial suspension was then prepared around 10^6 CFU/mL. 1 mL was added to the test groups, which included ungrafted and grafted surfaces adsorbed with PPP, FgDP, HSA (4 g/L) (Sigma), Fn (20 mg/L) (Sigma), FgDP + Fn (20 mg/L) and incubated for 1 h. After, the bacteria were detached using trypsin to determine number. Data was reported as function of the initial seeding number and exhibited as percentage of *S. aureus* inhibited by the grafted surfaces in relation to the ungrafted surfaces. The inhibition of bacterial adhesion exhibited by poly(NaSS) grafted Ti samples was expressed as a percentage of the bacteria adhesion obtained on ungrafted Ti samples, which was considered as 100%.

Bacteria attached to pure plasma pre-adsorbed onto ungrafted and grafted Ti surfaces for 1 h were stained with 1/1000 (v/v) propidium iodide in PBS for 5 min. The surfaces were then carefully washed with PBS, protected from light and observed by fluorescent microscopy.

III. Results and Discussions

1. Surface characterization

The “grafting from” was both checked for the thermal grafting and the UV grafting by ATR-FTIR, TB, contact angle and XPS in the previous publications.²⁸⁻³⁰ Beside, the “grafting to” with different polyNaSS molecular weight (5, 10 and 35 kDa) was also verified by QCM-D, angle contact, TB, XPS, ATR-FTIR.³¹ Here, we focus to the distribution of the grafting onto the titanium surface by using the contact angle and the toluidine blue.

The XPS results in **Table 2** show the C, Ti, O, N, S and Na surface concentrations. For each sample, we find the characteristic elements of our polymer, both for the “grafting from” (Ti-TH and Ti-UV) and for the “grafting to” (Ti-PR \approx 5, 10, 35 kDa).

Table 2: XPS determined surface atomic composition of the \approx 5, \approx 10, \approx 35 kDa Ti-PR samples. The number of spots analyzed (n) is also indicated.

Samples	XPS atomic percent						
	C	O	Ti	N	S	Na	Others
Ti- TH (n=4)	58.3 ± 5.7	28.2 ± 4.8	2.5 ± 2.3	-	7.0 ± 1,0	2,4 ± 0.4	-
Ti-UV (n=6)	62.1 ± 4.6	25.5 ± 1.2	1.0 ± 0.6	-	7.7 ± 0.4	2.0 ± 0.8	-
Ti-PR (≈5 kDa, n=6)	57.3 ± 4.6	29.3 ± 3.3	7.3 ± 2.5	0.5 ± 0.3	2.8 ± 1.4	2.2 ± 0.4	F
Ti-PR (≈10 kDa, n=6)	55.3 ± 9.3	29.4 ± 3.9	6.7 ± 1.5	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.8	1.8 ± 0.9	F, Zn, Ca
Ti-PR (≈35 kDa, n=6)	64.8 ± 6.7	22.8 ± 4.4	2.8 ± 2.4	0.4 ± 0.2	4.8 ± 1.2	3.2 ± 1.0	Zn

To provide additional insight about the molecular structure of the grafted polyNaSS, ToF-SIMS analysis was done. ToF-SIMS when operated in the static mode provides a mass spectrum of the outer ≈2nm of a surface. This method analyses positive and negative secondary ions sputtered from the sample surface region by a high-energy primary ion beam. ToF-SIMS detected the appearance of several fragments characteristic of the polyNaSS. These included sodium containing positive secondary ions such as $m/z = 22.99$ (Na), $m/z = 45.98$ (Na₂), $m/z = 46.99$ (Na₂H), $m/z = 77.97$ (Na₂O₂), $m/z = 89.96$ (CO₂Na₂), $m/z = 94.96$ (Na₂SOH), $m/z = 103.98$ (C₂H₂O₂Na₂). The characteristic negative secondary ion peaks included sulfur containing fragments such as $m/z = 31.97$ (S), $m/z = 55.97$ (C₂S), $m/z = 86.96$ (NaSO₂), $m/z = 102.95$ (NaSO₃), $m/z = 155.99$ (C₆H₄SO₃) and $m/z = 183.02$ (C₈H₇SO₃). In particular, the peak at $m/z = 183.02$ represents the mass of the NaSS monomer unit minus sodium (M-Na). Given the ≈2nm sampling depth of ToF-SIMS this suggests that polyNaSS layer does not completely cover the surface for the “grafting to” whereas for the “grafting from”, the polyNaSS layer totally cover the surface. This is consistent with the XPS results that show increased spot-to-spot variation in the composition of the samples.

When the titanium surface is totally recovered by a hydrophilic polymer, the contact angle formed by a water droplet and the surface is decreased. PolyNaSS being an anionic and hydrophilic polymer, when grafted on Ti surface this should lead to lower the contact angle when compared to

ungrafted titanium surface. According to **Figure 2**, the presence of polyNaSS grafted on the titanium surface leads to contact angles inferior to that of the Ti control ($\approx 108^\circ$) : the “grafting from” technique illustrated by Ti-TH and Ti-UV surfaces leads to contact angle values $\theta \approx 15^\circ$ and $\approx 16^\circ$ respectively at least three times inferior to the θ observed for the “grafting to” surfaces Ti-PR 5 ($\approx 50^\circ$), 10 ($\approx 52^\circ$) and 35 ($\approx 53^\circ$) kDa. The contact angle measurements allowed showing that the grafting of polyNaSS is similar whatever the grafting from technique (thermal or UV activation) and traduce a large recovering of the surface whereas the recovering is lower when polyNaSS is grafted by “grafting to” technique.

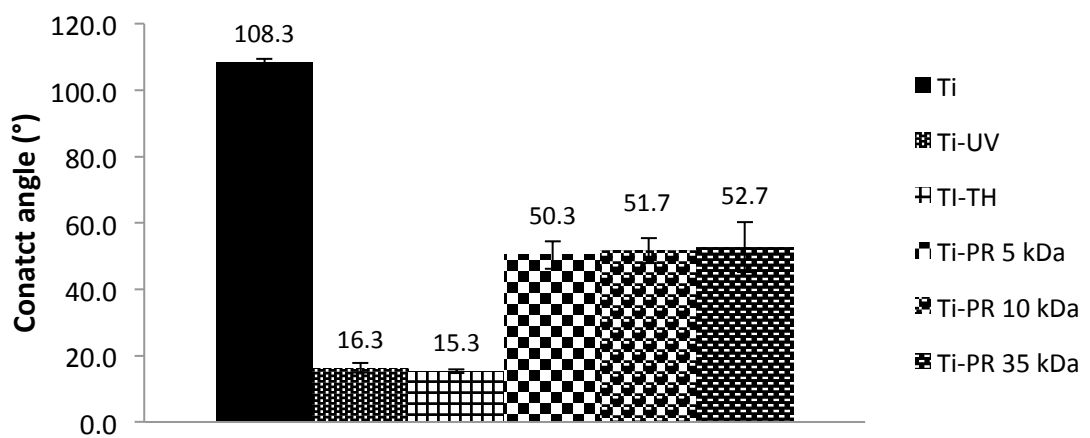


Figure 2: Contact angle of different samples.

The results and conclusion on contact angles measurement were confirmed by the TB measurement on the different grafted surfaces. Indeed, the thermal grafting and the UV grafting present grafting rates of polyNaSS sensitively higher than those observed by using the “grafting to” technique (**Table 2**). This outcome mainly involves steric effect which is more significant in the “grafting to” than with the “grafting from” situation.

Table 2: Quantity of grafted polyNaSS in function of the type of grafting: "grafting from" (Ti-TH and Ti-UV) and "grafting to" (Ti-PR 5, 10, 35 kDa).

	Ti-TH	Ti-UV	Ti-PR 5 kDa	Ti-PR 10 kDa	Ti-PR 35 kDa
Quantity of grafted polyNaSS ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	5 ± 0.3	4.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

Visually (**Figure 3**), the colorimetric test of toluidine blue (TB) is clearly different when comparing the “grafting from” than the “grafting to” samples. As far as 1 mol of TB forms a complex with 1 mol of sulfonate groups, this assay provides macroscopic information about the distribution of the polyNaSS grafting on the surfaces. The photos show clearly that the “grafting from” technique gives a homogeneous distribution of the sulfonate groups on the surface whereas the “grafting to” technique leads to a lower distribution of the sulfonate groups which are concentrated in highly intense spots – the grafting is patchy.

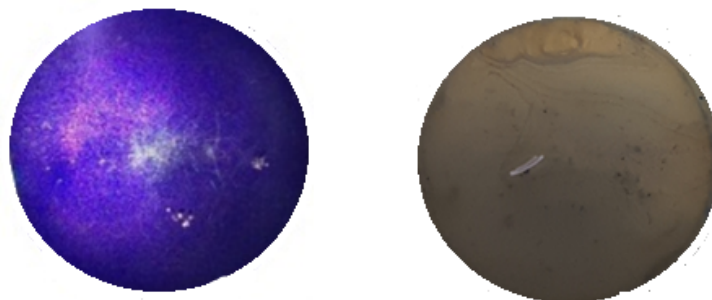


Figure 3: Titanium surfaces polyNaSS grafted by “grafting from” technique (Ti-UV and Ti-TH) on the left and titanium surfaces polyNaSS grafted by “grafting to” technique on the right: TB colorimetric assay.

2. Evaluation of cell response

The experimental plan with this section of work aimed to compare 3 different grafting methodologies (Ti-UV, Ti-TH, Ti-PR) used to functionalize the surface of titanium samples disks with polyNaSS. Grafted samples were compared to ungrafted Ti control samples. The biological response to all the Ti surfaces was evaluated using human bone-derived cell line Saos-2 in a series of *in vitro* cell-based assays to measure initial cell adhesion and spread, cell proliferation and cell differentiation.

2.1. Initial cell adhesion (spreading and morphology)

The initial adhesion of cells on ungrafted Ti and grafted Ti (*i.e.* Ti-UV, Ti-TH, Ti-PR) surfaces was examined after 24 hrs and 48 hrs of culture by staining microtubules of the cell cytoskeleton with tubulin antibody and the nuclei with DAPI to visualize the cells (**Figure 4**). On both the grafted and ungrafted surfaces and the control tissue culture plastic control (Permanox), the cells had attached and were well spread by 24 hrs. At this timepoint, they were polygonal in shape with cytoplasmic

protrusions extending in all directions. By 48 hrs, the adherent cells were becoming elongated on all the surfaces. Outcomes showed that the cells attached and spread on each of the Ti surfaces (ungrafted and grafted) in a similar way to that seen on the control Permanox surface that is intentionally designed for that purpose. This demonstrated that the Ti surfaces had no negative impact on initial cell adhesion and spreading behavior of the cells during the first 48 hours of direct contact.

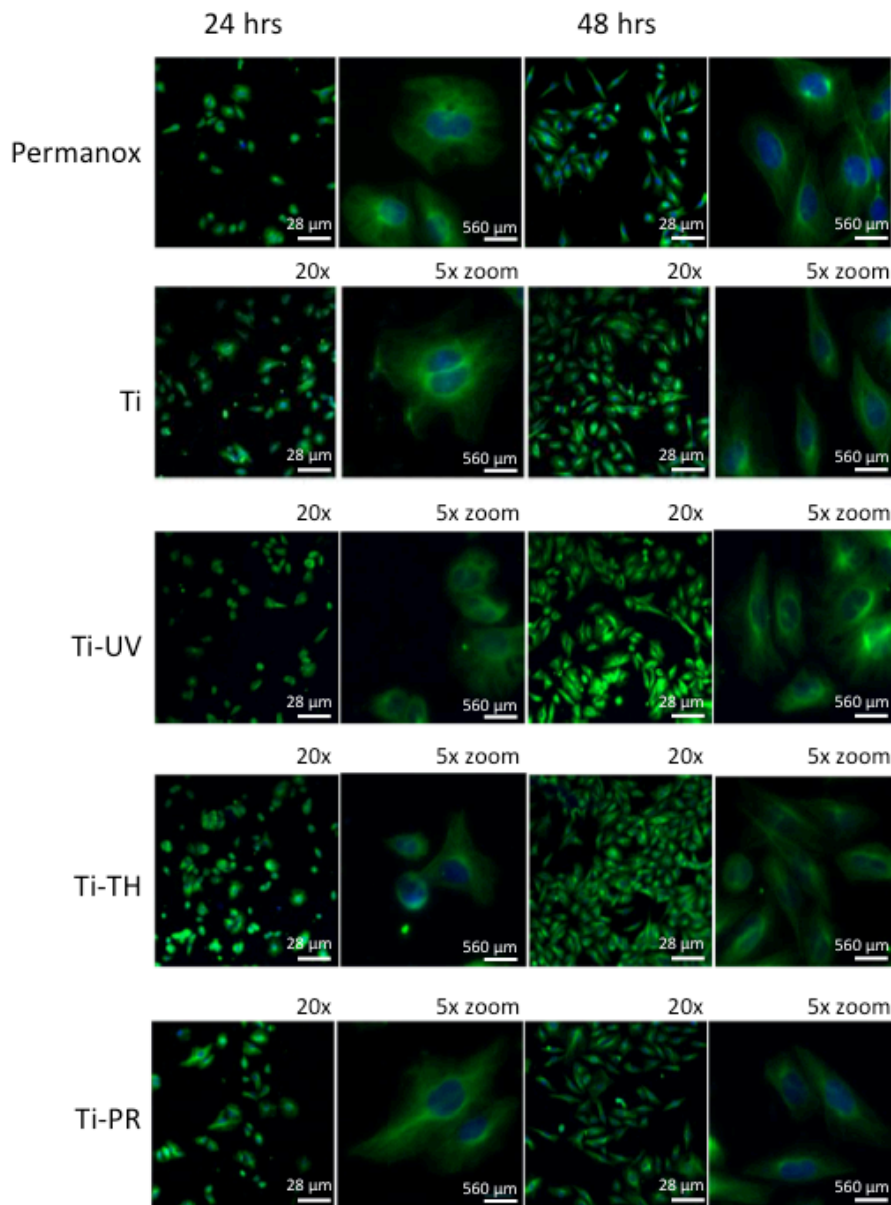


Figure 4: Representative confocal images of cells attached to control Permanox wells and test Ti wafer surfaces at 24 hrs and 48 hrs (green tubulin stained cell cytoskeleton with blue DAPI counterstain for cell nuclei at 20x and additional 5x zoom).

2.2. Cell proliferation

Cell proliferation on the grafted and ungrafted Ti surfaces was measured using MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium) assay conducted over 7 days with timepoints at days 1, 4 and 7. Images were taken at each timepoint to check if the cells that had attached to the surface of wells around each wafer were affected by presence of wafers at any timepoint (ie indirect cytotoxicity check). An additional wafer for each surface was set up and stained with cell tracker green (CTG) on day 7 to check cell morphology and distribution/coverage of cells on surfaces.

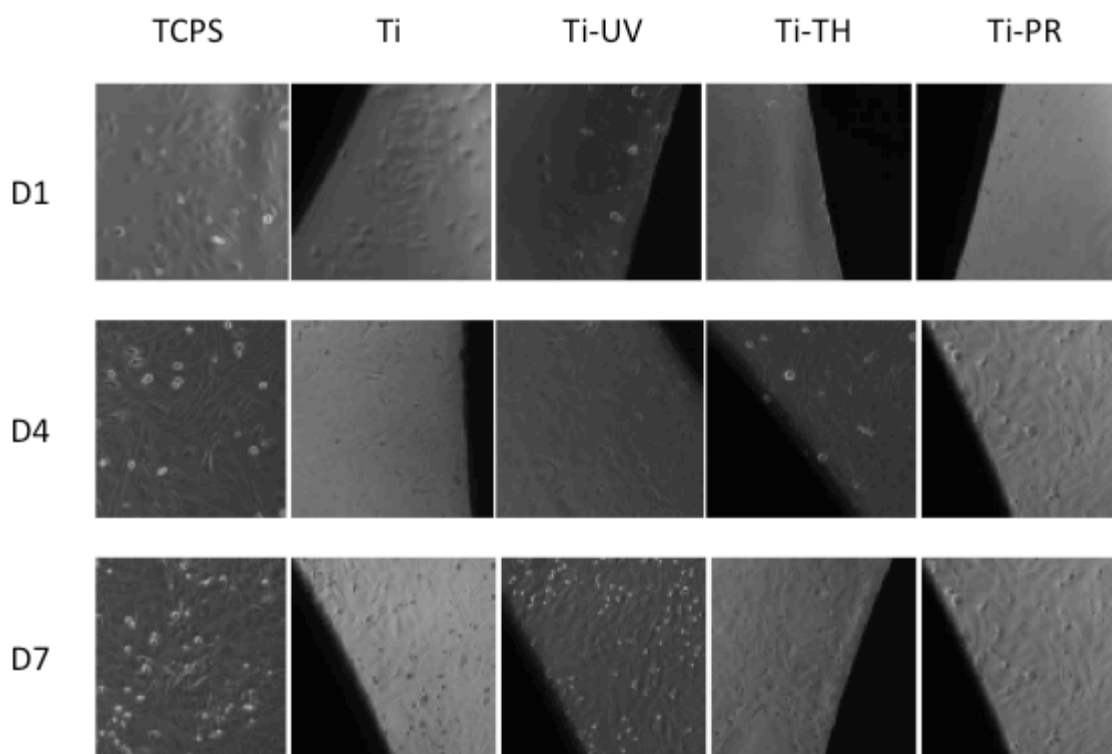


Figure 5: Representative phase contrast images taken at Days 1, 4 and 7 showed cells were attached and spread to control TCPS and to the test wafers at each timepoint. Images were taken at edge of wafers to show cells attached to surface of TCPS well around each wafer as an indirect cytotoxicity check.

Cell proliferation data over 7 days (Figure 6) showed that the cells on both the grafted and ungrafted Ti surfaces supported steady proliferation over the 7 day period of the assay to equivalent levels with a slight increase observed on Ti-UV grafted surface at day 7. Although all were less than TCPS, this was not unexpected since TCPS is intentionally designed to promote cells adhesion and growth. Representative images of CTG stained cells on each of the surfaces on day 7 (**Figure 5**)

confirmed the distribution and vitality of the cells growing on each of the Ti surfaces was similar to that seen on TCPS surface. This outcome was consistent with expectations based on data from the initial cell adhesion assay (as shown in **Figure 3**). Images of cells attached and spread on the surface of the TCPS wells around the Ti samples (**Figure 7**) served to further confirm that none of Ti surfaces surface was eluting anything cytotoxic into the cell culture medium during the 7-day period of the proliferation assay.

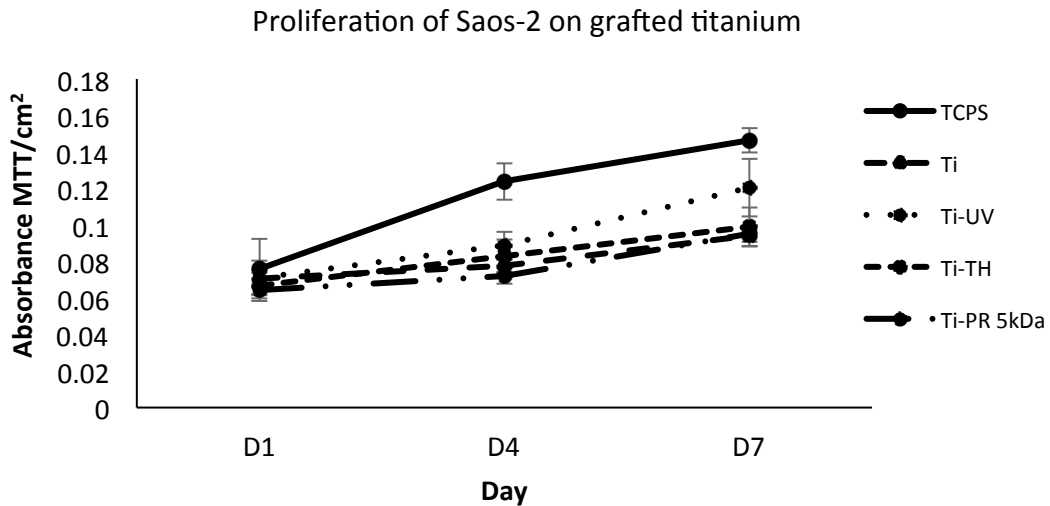


Figure 6: Proliferation of cells on grafted and ungrafted surfaces measured by MTT assay conducted at timepoints of 1, 4 and 7 days (data is based on triplicate samples of each wafer included at each of the 3 timepoints \pm SDM).

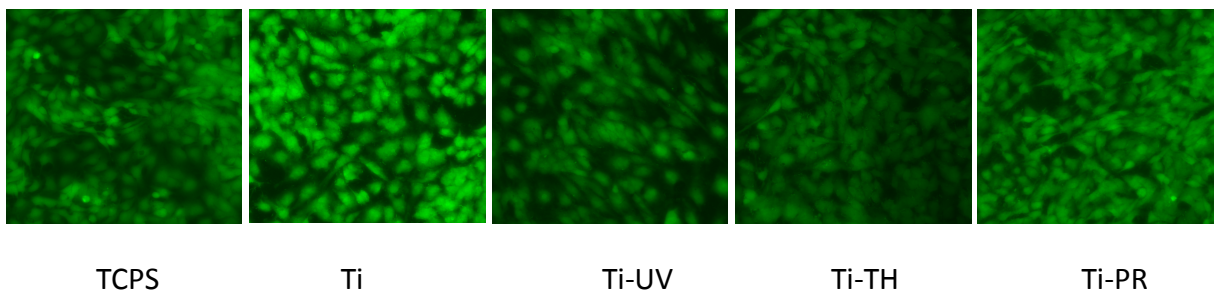


Figure 7: Representative fluorescent images of adherent cells on control TCPS and test Ti wafers on day 7 of the proliferation assay (CTG green stained cells at 20x magnification).

2.3. Cell differentiation and mineralization at day 25

Differentiation of cells was evaluated using assays^{34,35} to measure the production of alkaline phosphatase (ALP) (**Figure 8**) and calcium (**Figure 9**) in cells adherent to each surface that had been maintained under two different culture regimes (standard and osteogenic) for 25 days. ALP is regarded as a marker for early stage of cell differentiation during the initial phase of extracellular matrix formation. Calcium is a marker for later stage of cell differentiation where mineralisation occurs in the extracellular matrix. In parallel, an MTT assay (**Figure 10**) conducted in parallel with the differentiation assay (**Figure 10**) was conducted on day 25 to evaluate cell numbers on each of the surfaces that enabled ALP and calcium data to be adjusted for the number of cells that were attached to each surface. CTG staining showed that cell coverage for all samples was similar in the undifferentiated and differentiated sample sets. Cells on TCPS were fully confluent and cell cover on Ti control samples was patchy as cells had washed off during handling. Each of the 3 grafted surfaces supported complete cell cover similar to TCPS in the undifferentiated set, with some small uncovered patches evident in the differentiated set.

Outcomes of ALP and calcium assays (**Figures 8 and 9**) corrected for cell number showed that culturing cells under osteogenic conditions promoted the production of both ALP and calcium by the cells compared to that produced by cells maintained on standard culture conditions over the 25 day period of the assay. Cells growing under osteogenic conditions for 25 days on all of the Ti surfaces produced more ALP and calcium than those on TCPS. This was not unusual as TCPS is designed specifically for cell adhesion and spreading not differentiation. Cells growing on the ungrafted Ti and the grafted Ti-PR surface produced significantly more ALP than those on the Ti-UV and Ti-TH grafted surfaces when maintained under osteogenic conditions for 25 days (**Figure 7**). Cells growing on all of the Ti surfaces produced high levels of calcium when maintained under osteogenic conditions most notably the Ti-PR surface (**Figure 8**).

Together, these outcomes showed that cells adherent to the Ti-UV and Ti-TH grafted surfaces were producing a considerable level of mineral at day 25 indicative of a later stage of differentiation (*i.e.* the phase in which ALP production decreases with a concurrent increase in mineral production as measured by calcium levels). Cells adherent to the Ti-PR grafted surfaces responded differently as they had produced ALP to an approximately similar level to the ungrafted Ti control but more Ca compared to Ti control over the 25 day time period. The relatively high levels of both ALP and Ca produced by cells on the Ti-PR grafted surfaces indicated that some of the cell population was well differentiated and producing mineral while other cells in the cell population were still in an earlier stage of differentiation.

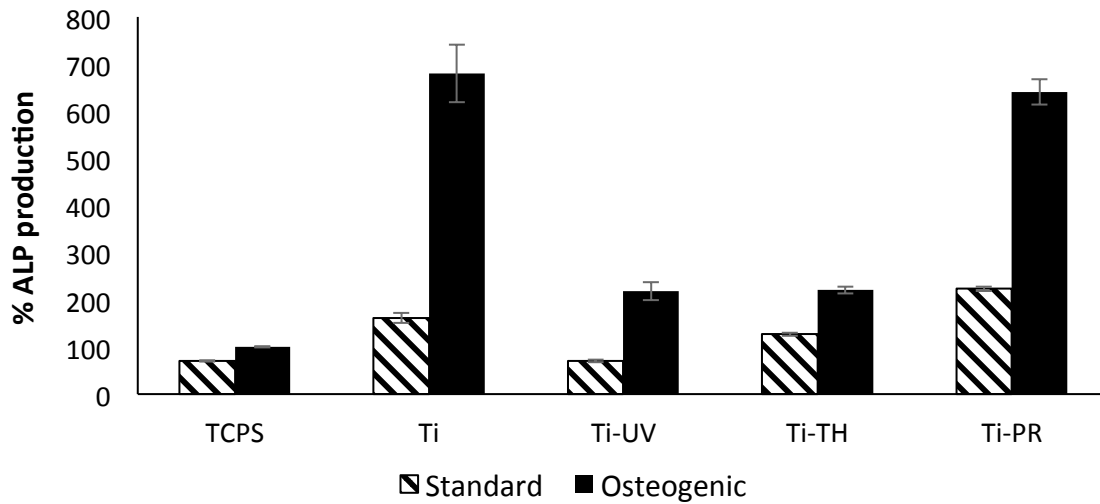


Figure 8: Alkaline phosphatase (ALP) produced by cells adherent to the control TCPS, grafted and ungrafted Ti surfaces (data represents the mean of triplicate samples of each surface corrected for cell number as measured using MTT assay run in parallel over 25 days and normalized to production by cells on control TCPS under osteogenic conditions \pm SDM).

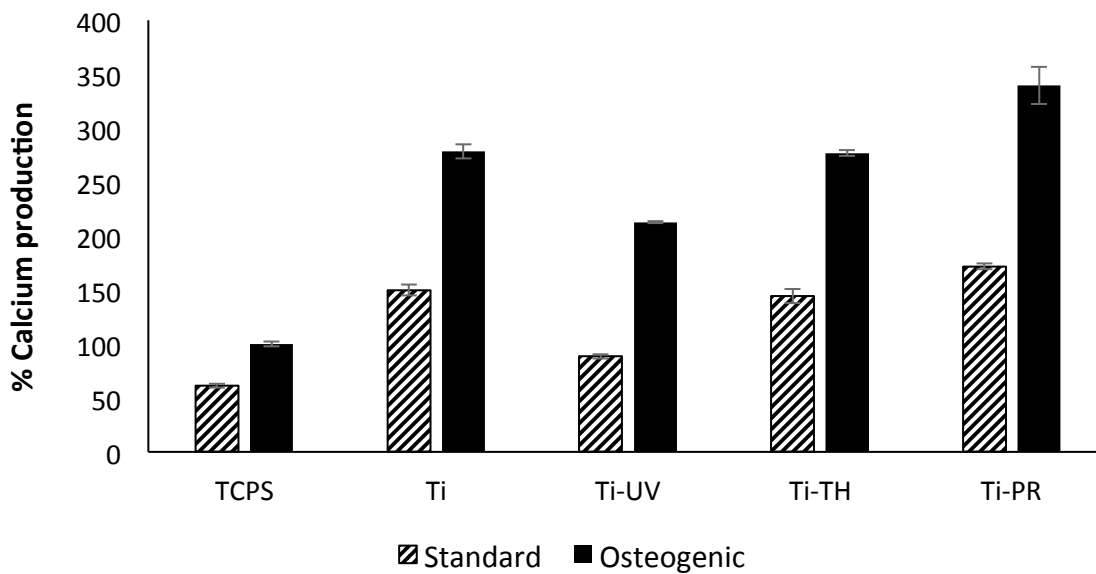


Figure 9: Calcium produced by cells adherent to the grafted and ungrafted Ti surfaces (data represents the mean of triplicate samples of each surface corrected for cell number as measured using MTT assay run in parallel over 25 days and normalized to production by cells on control TCPS under osteogenic conditions \pm SDM).

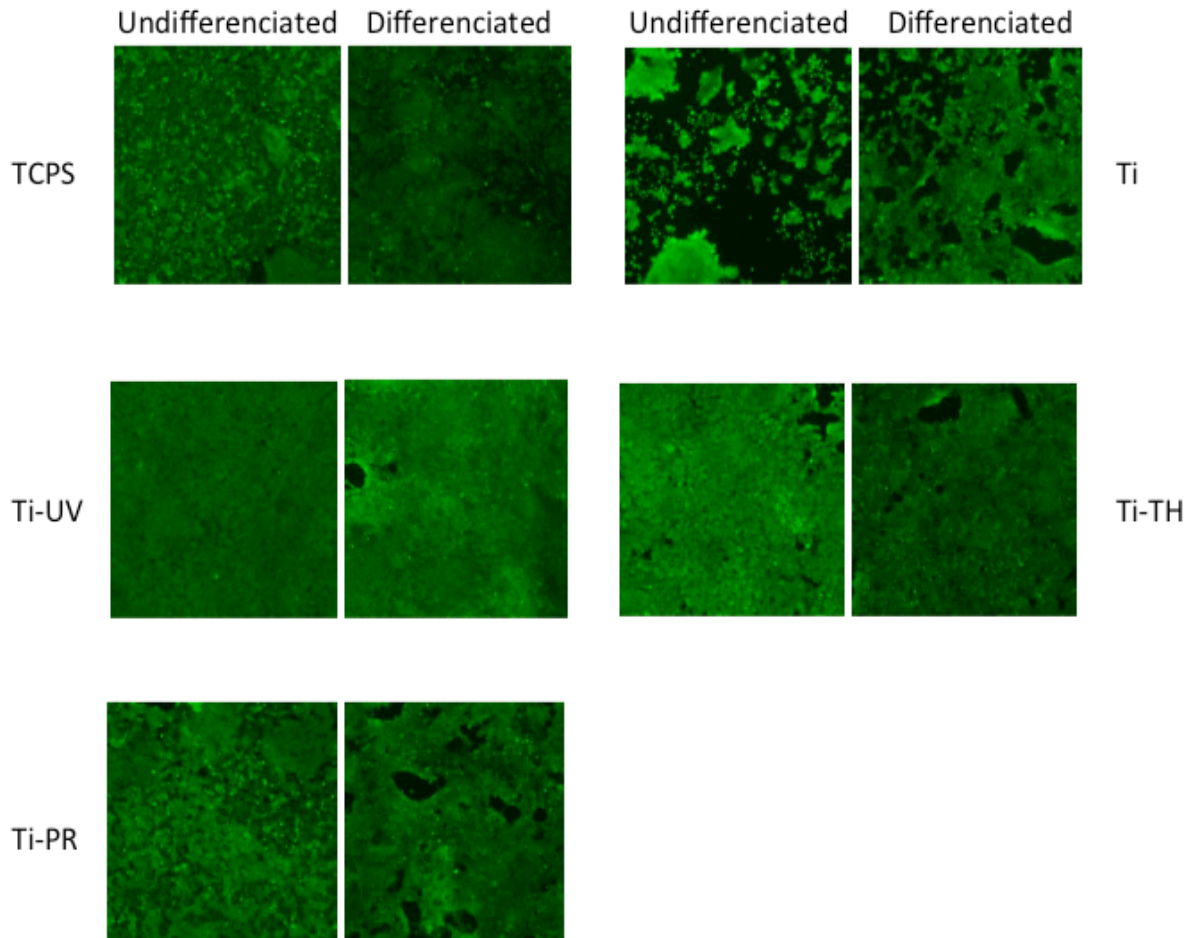


Figure 10: Cell average on each of the surfaces in undifferentiated and differentiated sets at day 25 of the differentiation assay (cells stained with cell tracker green CTG to visualise them).

Taken together, Ca and ALP data showed that the cells adherent to UV and TH grafted surfaces had differentiated and were forming mineral by day 25 while the cells on the PR grafted surfaces was producing considerable mineral but had not yet reached their full differentiation state. This means that while all grafted surfaces supported differentiation of Saos2 cells, the UV and TH grafted surfaces induced cell differentiation/mineralisation earlier than the PR grafted surface.

3. Bacteria adhesion - analysis

For more than twenty years Migonney et al.^{26,36} showed that the presence of sulfonate groups on any polymer or metallic surface endowed it with anti bacterial adhesion properties *in vitro* and *in vivo*. Moreover, it was demonstrated that the origin of this activity is due to the affinity and conformation of Fn when adsorbed on the polyNaSS functionalized surfaces in comparison to non functionalized ones. Recent studies showed that titanium surfaces functionalized by polyNaSS were also capable of inhibiting *S. epidermidis* (SE) and *S. aureus* (SA) adhesion and that the inhibition is

mediated and modulated by the presence of Fn (SA) and/or Fg (SE). The inhibiting properties were related to the presence of sulfonate groups on one hand and to the presence of the adhesive proteins at the surface in the “appropriate” conformation on the other hand. For that reason, *S. aureus* adhesion was studied on the different polyNaSS grafted and ungrafted Ti surfaces previously adsorbed by pure (Fn) and mixtures of proteins (PPP, dPPP, dPPP+Fn) with the aim of highlighting the role of the pre-adsorbed Fn pure (Fn) and in the presence of the plasma proteins (PPP, dPPP+Fn) on polyNaSS grafted surfaces on the inhibition of bacteria adhesion and the role of the distribution of sulfonate groups on the grafted Ti surfaces.

The results are all expressed as % of inhibition of *S. Aureus* bacteria adhesion by polyNaSS surfaces compared to ungrafted Ti samples previously adsorbed by (a) PPP as a mixture of proteins, (b) pure albumin HSA, (c) pure Fn, (d) depleted plasma (dPPP) and (e) depleted plasma + Fn (dPPP+Fn) and presented in **Figure 11 (a) (b) (c)** conditions and in **Figure 12 (d) (e)** conditions. All the concentrations of the pre-adsorption assays were set à 10% of the plasma proteins concentrations. Results show that:

(a) In the presence of plasma proteins (PPP) on the surface the poly(NaSS) grafted surfaces induce an important inhibition of MRSA clinical strain adhesion whatever the way of grafting which varies from 36 to 74.9%.

The highest inhibition value was obtained for the UV grafted surfaces and the lowest for the 5 kDa grafted surfaces. UV and thermal grafting give about the same results 74.9% for UV compared to 70.2% for thermal grafting, confirming that the distribution and availability of sulfonate groups from grafted polyNaSS chains are identical in both cases. This is not surprising since the polymerization initiated “from” the surface follows the same radical polymerization process in both cases. In addition, it is worthy to note that those results confirmed those obtained by Felgueiras and al. in the case of thermal polyNaSS grafting on Ti samples. When analyzing the results obtained on the architecture controlled polyNaSS amount grafted surfaces, it showed that the inhibition properties depend on the length of the polyNaSS chains or the amount of available sulfonate groups. Then, even if the coverage of the surfaces by polyNaSS chains seems to be lower than for UV and thermal grafting (BT assays), the few spots where polyNaSS chains are present and the of NaSS groups are enough in amount and efficiency to lead to inhibition rates up to 65% (polyNaSS chains of 35kD). The higher the molecular weight the higher the inhibition rate. Those results are obtained when surfaces are pre adsorbed with plasma proteins at 10% *i.e.* in the presence of Fn (20 microg/mL) amongst the other proteins present in plasma.

(b) When plasma proteins from PPP are replaced by Alb (10% of its plasma concentration) the rates of inhibition are significantly lowered. HSA is known to cover and passivate all the surfaces. It has no activity on bacteria adhesion except decreasing its access to the surface but without any specificity. The inhibition rate are divided by 1.5 to 3.3 three depending on the surfaces. When Fn is not present the effect on bacteria adhesion inhibition is highly lowered.

(c) When polyNaSS grafted surfaces are preadsorbed with pure Fn, the inhibition rates of SA adhesion are strictly identical as those obtained in the presence of PPP and higher than in the presence of Alb. It means that the only presence of Fn pure or in mixture at the surface of polyNaSS grafted surface is able to induce inhibition rate of 70% acting as described on PMMA based copolymers. The specificity of the interactions between Fn and polyNaSS grafted surfaces is high enough to act in pure or mixture conditions.

(d) **Figure 12** In the presence of PPP depleted in Fg and Fn, the inhibition rate of bacteria adhesion are quite identical as those obtained in the presence of HSA. Indeed, those conditions are similar to HSA since the most present protein in Fg and Fn depleted plasma is still HSA and Fn is not present.

(e) **Figure 12** in the presence of depleted plasma + Fn, the inhibition rates recover the value it was obtained in the presence of pure Fn and in the presence of PPP. This confirms the role of Fn in the inhibition process of *S. aureus* adhesion on polyNaSS grafted surfaces. Moreover, the rates are equivalent to those observed in the presence of plasma proteins from PPP. In addition, the effect of the length of polyNaSS chains on the inhibition rate is confirmed, showing that the amount and availability of sulfonate groups are the key point to allow the inhibition of SA adhesion in the presence of Fn.

All those results demonstrated the synergic role of polyNaSS and Fn on the inhibition of bacteria adhesion regardless the type of grafting. The observed activity of the grafted surfaces on *S. aureus* adhesion results from specific interactions between adsorbed Fn and the SO_3^- groups distributed on the Ti surfaces resulting in changed Fn conformation.^{21,37} Such modifications in the Fn adsorption pattern lead to differences in the availability of some Fn domains that interact with bacteria, reducing/preventing access to, or interaction with, the adhesin receptors on the *S. aureus* cell membrane (*i.e.* Fn-BPA or Fn-BPB (Fn-binding protein A or B) thus inhibiting adhesion.^{23,37}

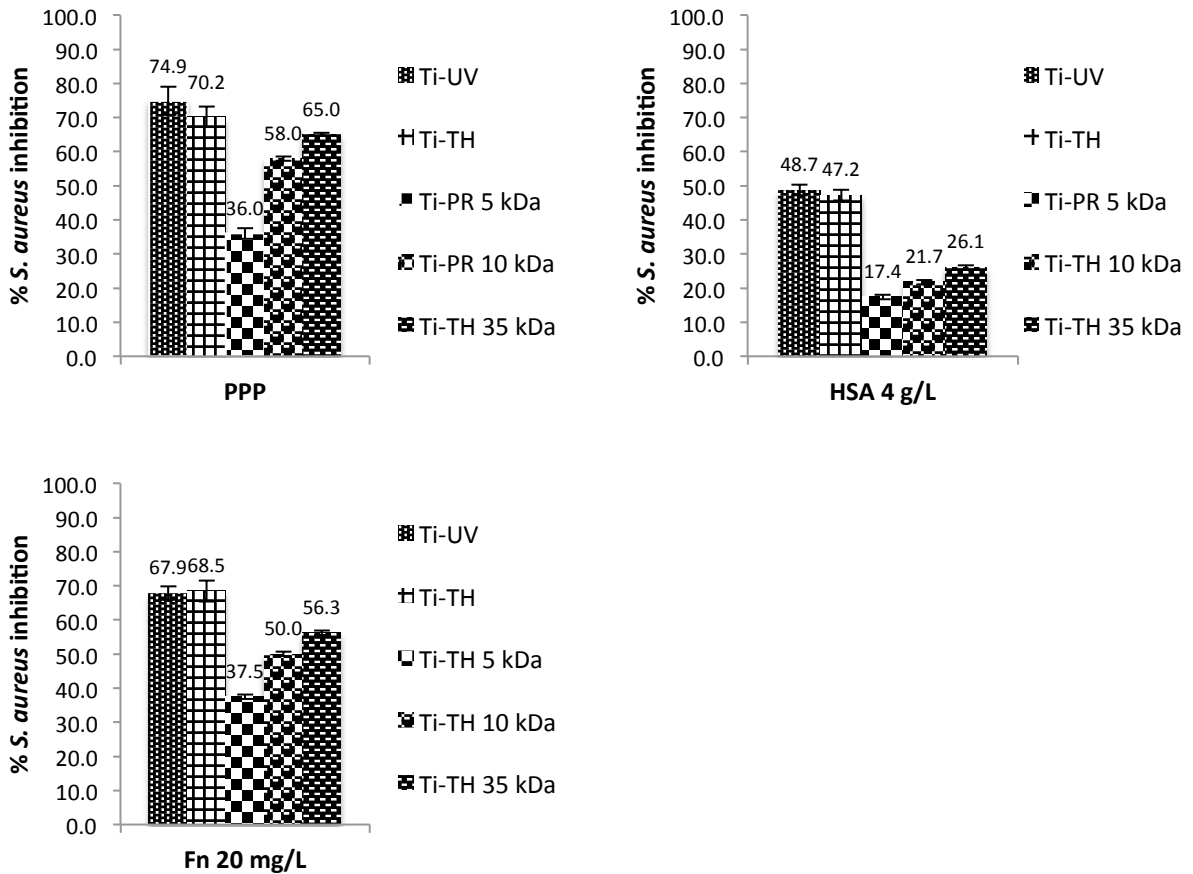


Figure 11: Inhibition of *S. aureus* adhesion on polyNaSS grafted Ti surfaces previously adsorbed by pure proteins and mixtures (PPP, HSA 4 g/L and Fn 20 mg/L) relative to ungrafted surfaces (1 h culture, 37°C).

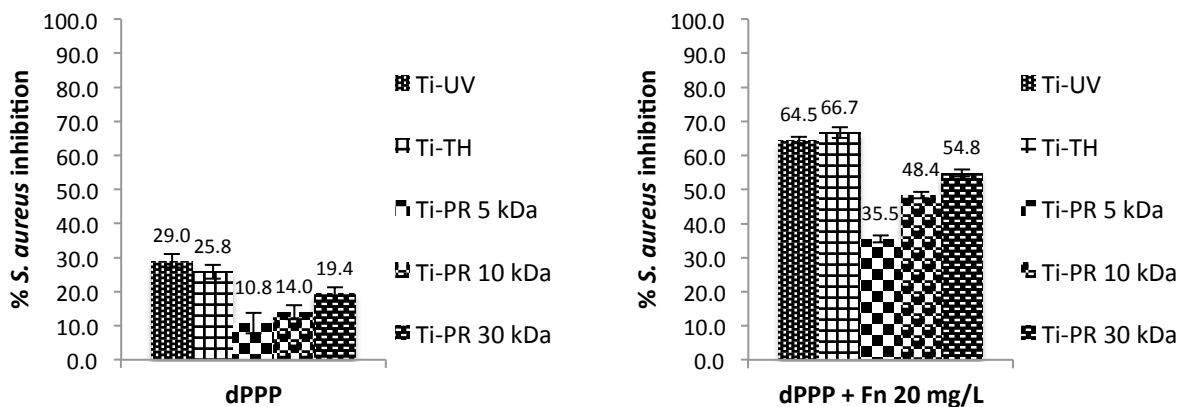


Figure 12: Inhibition of adhesion of *S. aureus* on grafted Ti surfaces pre-adsorbed with different substrat solutions (dPPP and dPPP + Fn 20 mg/mL) relative to ungrafted surfaces (1 h culture, 37°C).

On the **Figure 13**, the labelled *S. Aureus* show the differences between the surfaces linked to the presence of the polyNaSS. Regarless the way of grafting, the activity of the polymer is verified but

here again, the “grafting from” permits a better bacterial inhibition thanks to a better repartition of the polyNaSS onto the surface. However, concerning the “grafting to”, the bacterial inhibition increases with the molecular weight of the polymer.

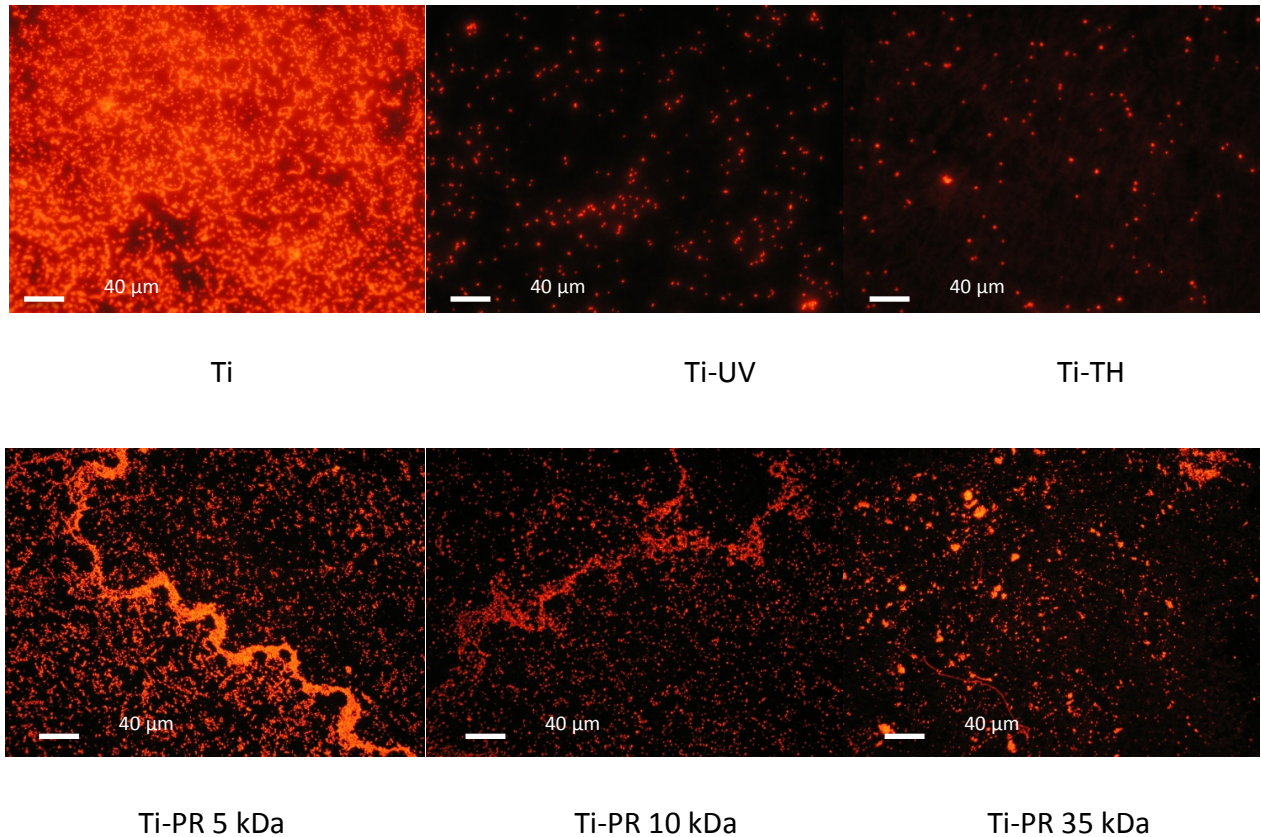


Figure 13: Fluorescent detection of *S. aureus* on different surfaces preadsorbed with pure plasma for 1 h.

IV. Conclusions

In this article, the “grafting from” is compared to “grafting to” to evaluate the effect on biological response. The “grafting from” technique was performed using two different methods namely UV and thermal initiation whereas the “grafting to” enables graftings with different molecular weights (5, 10 and 35 kDa). Both of these grafting methods covalently links a bioactive polymer (polyNaSS) to the Ti surface. The “grafting from” totally covers the surface in polyNaSS (**Figure 3**) but the architecture of these polyNaSS molecules is uncertain. In contrast, with the “grafting to” technique the architecture of the grafted polyNaSS molecules are well-defined by RAFT polymerization but the Ti surface is not totally covered (**Figure 3**) likely to have been caused by a steric effect more significant for the “grafting to” than the “grafting from” technique. The biological response shows differences in response to the grafting method.

Assays using mammalian cells showed no evidence of cytotoxicity when cells were in direct contact with any of the Ti grafted surfaces or the ungrafted Ti control. All the grafted surfaces supported similar levels of cell adhesion, spread and growth/proliferation but there were notable differences between the three grafted surfaces in the cell differentiation assay. This was an interesting outcome as the Ti-UV and Ti-TH surfaces showed considerably lower contact angle measurements than the Ti-PR (**Figure 2**) with a correspondingly higher concentration of polyNaSS on these 2 “grafted from” surfaces compared to the Ti-PR “grafted to” surface (**Table 3**). The Toluidine Blue assay showed that the polyNaSS groups on the Ti-PR surface were patchy in distribution. Taken together data shows that the “grafted to” Ti-PR method can have an impact on cellular activities but it needs further optimisation of the RAFT-based grafting technique to fully demonstrate its full potential.

Concerning the bacterial response, whatever the used system the effect on the *S. aureus* is positive (*S. aureus* inhibition). Yet, the “grafting from” has a better result than the “grafting to”. Inside the “grafting from”, we referenced two different ways to initiate the grafting and the bacterial result did not show significant differences (between 70 - 75% in PPP). However, the molecular weight of the polyNaSS showed a differential response with Ti-PR 5kDa 36%, Ti-PR 10kDa 58%, Ti-PR 35kDa 65% of *S. aureus* inhibition in PPP. Essentially, the higher the molecular weight of the polyNaSS, the greater the level of *S. aureus* inhibition. This relationship between polyNaSS molecular weight and bacterial inhibition may involve the differential adsorption of Fn molecules to the range of Ti-PR grafted surfaces prepared in this investigation.

To conclude, the precision RAFT-based “grafting to” technique showed promising outcomes when tested using *S. aureus* with increased levels of bacterial inhibition evident as the molecular weight of polyNaSS increased. Studies with human bone-derived cells showed no evidence of cytotoxicity with the new “grafting to” technique. Comparison of the new technique with previously tested “grafted from” techniques using thermal and UV irradiation revealed only subtle differences in the cellular response. We propose that optimization of the RAFT-based “grafting to” technique is needed to fully demonstrate the utility of this precision technique for the purpose of improving long-term outcomes for orthopedic implants.

V. References

1. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, *Dent. Mater.* 23, 844–54 (2007).
2. D. A. Puleo, A. Nanci, *Biomaterials* 20, 2311-21 (1999).
3. M. Bachle, R. J. Kohal, *Clin. Oral Implants Res.* 15, 683-92 (2004).
4. U. Meyer, A. Buchter, H. P. Wiesmann, U. Joos, D. B. Jones, *Eur. Cell. Mater.* 9, 39-49 (2005).
5. L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, R. G. Richards, *Biomaterials* 25, 4135-48 (2004).
6. L. G. Harris, R. G. Richards, *Injury* 37, S3-14 (2006).
7. A. Leonhardt, C. Bergström, U. Lekholm, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 5, 226-32 (2003).
8. L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 91, 470-80 (2009).
9. V. Jr. Antoci, et al., *J. Orthop. Res.* 2007, 25, 858-66 (2007).
10. S. Radin, P. Ducheyne, *Biomaterials* 28, 1721-9 (2007).
11. K. C. Papat, M. Eltgroth, T. J. Latempa, C. A. Grimes, T. A. Desai, *Biomaterials* 28, 4880-8 (2007).
12. D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C. R. Arciola, *Biomaterials* 31, 6363-77 (2010).
13. P. A. Jr. Norowski, J. D. Bumgardner, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 88, 530-43 (2009).
14. T. Wan, H. Aoki, J. Hikawa, J. H. Lee, *Biomed. Mater. Eng.* 17, 291-7 (2007).
15. M. Yoshinari, Y. Oda, T. Kato, K. Okuda, A. Hirayama, *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 388-94 (2000).
16. L. Cen, K. G. Neoh, E. T. Kang, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 71, 70-80 (2004).
17. J. C. Tiller, C. J. Liao, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 5981-5 (2001).
18. P. H. Chua, K. G. Neoh, E. T. Kang, W. Wang, *Biomaterials* 29, 1412-21 (2008).
19. R. R. Maddikeri, et al., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 84, 425-35 (2008).
20. F. El Khadali, G. Hélyary, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, *Biomacromolecules* 3, 51-6 (2002).
21. C. Latz, G. Pavon-Djavid, G. Hélyary, M. D. M. Evans, V. Migonney, *Biomacromolecules* 4, 766-71 (2003).
22. M. Delmi, P. Vaudaux, D. P. Lew, H. Vasey, *J. Orthop. Res.* 12, 432-8 (1994).
23. F. Anagnostou, et al., *Biomaterials* 27(21), 3912-9 (2006).
24. S. Berlot, et al., *Biomacromolecules* 3, 63-8 (2002).
25. A. C. Crémieux, G. Pavon-Djavid, A. Saleh Mghir, G. Hélyary, V. Migonney, *JABBS* 1, 178-85 (2003).
26. H. P. Felgueiras, I. Ben Aissa, M. D. M. Evans, V. Migonney, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 26, 261 (2015).
27. A. Alcheikh, et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 24, 1745-1754 (2013).
28. G. Hélyary, F. Noirclère, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomaterialia* 5, 124-133 (2009).
29. H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, *RSC Advances* 6, 13566-13771 (2016).

30. , V. Migonney, J. S. Baumann, C. Falentin-Daudré, H. Chouirfa, WO/2017/025519 (2016)
31. H. Chouirfa, et al., *Biointerphases* 12(2), 02C418 (2017)
32. S. Sano, K. Kato, Y. Ikada, *Biomaterials* 14(11), 817-822 (1993).
33. K. Kato, Y. Ikada, *Biotechnology and Bioengineering* 47, 557-566 (1995).
34. M. Prideaux, A. R. Wijenayaka, D. D. Kumarasinghe, *Calcif. Tissue Int.* 95, 183-93 (2014).
35. E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, J. R. Ralphs, R. G. Richards, J. S. Hayes, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 2636-43 (2014).
36. D. M. Vasconcelos, et al., *Materials Science and Engineering C.* 45(1), 176-183 (2014).
37. Y. H. An, R. J. Friedman, *J. Biomed. Mater. Res.* 43, 338-48 (1998).

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail était de proposer de nouvelles voies de fonctionnalisation du titane par le poly(styrène sulfonate de sodium) par greffage covalent dans le but d'améliorer l'ostéointégration des prothèses totales de hanche en titane ou en alliage de titane tout en prévenant l'adhésion bactérienne, étape initiale de l'infection dite « à corps étranger ».

Ce travail de thèse comporte deux grandes parties :

i) Une partie « chimie » dans laquelle sont décrites les différentes méthodes de greffage du polyNaSS sur le titane - deux méthodes de greffages « from » (1) une méthode mise au point au LBPS en 2000 (brevetée UP13 - licence CERAVER) qui consiste en un greffage radicalaire amorcé par voie thermique et (2) la méthode de greffage UV développée pendant cette thèse qui consiste à utiliser les rayonnements UVs au lieu d'une élévation de température, pour amorcer la polymérisation radicalaire à partir de la surface (brevet SATT 2016) et une méthode de greffage « to » que nous avons également développée pendant cette thèse, qui utilise une molécule d'ancrage fonctionnalisée suivie d'une réaction « click » pour lier le poly(styrène sulfonate de sodium) d'architecture contrôlée préalablement synthétisé par polymérisation RAFT. Cette partie « chimie » a donné lieu à la rédaction d'une revue présentant un état de l'art de la modification de surfaces de titane pour des applications biomédicales (chapitre 1), au dépôt d'un brevet et à la publication de deux articles originaux, un article consacré au greffage UV (chapitre 2) et un article dédié au greffage de polymères à architecture contrôlée en utilisant une molécule d'ancrage dérivée de la dopamine (chapitre 3).

ii) Une partie « biologie » qui regroupe la réponse cellulaire et la réponse bactérienne. L'étude de la réponse cellulaire vis à vis des différentes surfaces de titane fonctionnalisées a été réalisée par Madame P. Bean au sein de l'équipe « biomatériaux » dirigée par le Dr. M. D. M. Evans au CSIRO, Sydney, Australie.

L'étude de la réponse bactérienne - inhibition de l'adhésion d'une souche de *Staphylococcus Aureus* résistance à la méthicilline - que j'ai réalisée au laboratoire de microbiologie à l'hôpital Raymond Poincaré, Garches, dirigé par le Pr. G. Chiocchia, avec l'aide du Dr. A. Saleh-Mghir dans le cadre d'une collaboration entre le LBPS (Pr. V. Migonney) et le Pr. A. C. Crémieux

Dans le chapitre 1 nous avons reporté toutes les techniques de modifications de surface de titane permettant de conférer un caractère anti-bactérien, selon deux grandes parties:

i) Surfaces anti-bactériennes par modification physique de surface : c'est à dire sans création d'une liaison chimique de type covalent entre la surface de titane et l'entité déposée. Parmi celles-ci on trouve des surfaces bactériostatiques et des surfaces bactéricides. Ainsi, le revêtement de surfaces de titane par des couches successives de polycations/polyanions telles que les couches (polyLLysine)/polysaccharides(chitosane, acide hyaluronique, ...) ou par des polymères de type PEG ou polyNIPAM empêche l'adhérence de nombreuses bactéries dont *Staphylococcus aureus*. La couche d'oxyde formée naturellement ou non sur la surface du titane (TiO₂) peut être modifiée afin d'y dessiner une architecture particulière tels que des nanotubes de TiO₂ ou des nanopores et de proposer une surface bactériostatique. Parallèlement à ces approches, d'autres modifications de surface par recouvrement de molécules bactéricides à base de peptide anti-microbien, d'antibiotiques ou d'antiseptiques, etc ...à caractère bactéricide ont été développées avec plus ou moins de succès.

ii) Surface anti-adhérence bactérienne par modification chimique de surface : c'est à dire par création d'une liaison covalente. On y retrouve le greffage « à partir de la surface (grafting « from ») et sur la surface (grafting « to »). Le processus de greffage « from » est uniquement consacré au greffage du polyNaSS pour son activité anti-adhérence bactérienne ou bactériostatique. Le greffage « to », est plus largement utilisé et majoritairement à l'aide des trois ancrés suivantes : silane, catéchol, ancre à phosphate couplée à des molécules possédant une activité antibactérienne.

Le travail de recherche proprement dit a consisté à élaborer des surfaces de titane bioactives par greffage de polyNaSS par voie chimique en utilisant des techniques de greffage dites de grafting « from » (amorçages UV et thermique) et une technique de greffage dite de grafting « to » (avec une ancre à catéchol) dans le but de prévenir l'adhérence bactérienne.

Le greffage par « grafting from » utilisant les irradiations UV fait suite au procédé (voie thermique) développé par le LBPS qui permet la formation de radicaux libres à la surface du titane - lyse des hydroperoxydes par énergie UV - à partir desquels sont générées les chaînes de polyNaSS greffées. L'intérêt du procédé UV est (1) la très forte diminution du temps de polymérisation qui passe de 15 hrs (voie thermique) à 1 h (voie UV) (2) la diminution de la concentration en monomère qui passe de 0,7 à 0,35 M pour un même taux de greffage de polyNaSS greffé de l'ordre de 5 µg/cm². Le greffage par voie UV est un vrai succès qui a donné lieu à la production d'articles et de brevets et qui présente un intérêt pour les applications industrielles dans le cadre de partenariats entre le LBPS et ses contrats industriels CERAVER et LARS.

Le chapitre 3 est dédié à toutes les réactions et synthèses permettant de proposer le greffage de chaînes de polyNaSS à architecture contrôlée par la technique de « grafting to » en utilisant une molécule d'ancrage dérivée de la dopamine. Parmi les différentes étapes mises en œuvre pour le greffage :

i) La première a consisté à synthétiser des polymères de tailles définies (5, 10 et 35 kD / SEC) et de faible indice de polydispersité ($\mathcal{D} < 1,5$) par polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT avec des taux de conversion élevés (RMN).

ii) La deuxième a consisté à modifier la dopamine par un groupement acrylamide et les chaînes de polyNaSS par une fonction thiol (-SH) pour coupler le polyNaSS sur le titane par une réaction de thiol-ène click.

Les chaînes de polyNaSS ont été couplées à la dopamine modifiée par une fonction acrylamide (DA) selon deux voies : (1) la dopamine fonctionnalisée est préalablement fixée au titane puis les chaînes de polyNaSS-SH sont « cliquées » sur la surface Ti-DA - (2) la dopamine fonctionnalisée est d'abord couplée par chimie « click » au polyNaSS-SH puis fixée sur la surface de titane. A l'issue de cette étape de fonctionnalisation des surfaces de titane par des chaînes de polyNaSS contrôlées, nous avons réalisé une étude préliminaire afin de vérifier la biocompatibilité de ces surfaces en utilisant des cellules ostéoblastes. Cette étude a été réalisée à Sydney par l'équipe du Dr. M Evans (CSIRO)

Le chapitre 4 est quant à lui dédié à l'étude de la réponse cellulaire (différenciation ostéoblastique) et à l'étude de la réponse bactérienne (adhésion de *S. aureus*) au contact de surfaces de titane greffées de polyNaSS par différents types de greffage – le greffage radicalaire (« grafting from ») amorcé par voie thermique et par voie UV et le greffage (« grafting to ») de polymères de tailles différentes et contrôlées (5, 10, 35 kDa). L'intérêt d'une telle étude était (1) de montrer que quel que soit le type d'amorçage - par énergie UV ou thermique – puisque le greffage du polyNaSS est identique alors la réponse biologique doit être la même (2) d'évaluer si la longueur des chaînes de polymères greffés ont un effet sur la réponse biologique. Les résultats des études réalisées montrent que la réponse biologique (cellulaire et bactérienne) est identique sur les surfaces greffées par greffage radicalaire quel que soit l'amorçage thermique (Ti-TH) ou UV (Ti-UV). Dans les deux cas l'inhibition de l'adhérence bactérienne développée par les surfaces par comparaison au titane non greffée de polyNaSS sont respectivement égales à $70,2 \pm 3,1\%$ pour Ti-TH et à $74,9 \pm 4,2\%$ pour Ti UV. La réponse cellulaire est également la même.

Lorsque les surfaces sont greffées de polyNaSS par « grafting to », la réponse cellulaire est faiblement modifiée mais la réponse bactérienne est totalement dépendante de la taille des chaînes macromoléculaires greffées. L'inhibition augmente avec la taille des chaînes de polyNaSS (Ti-PR 5 kDa $36,0 \pm 1,6\%$; Ti-PR 10 kDa $58,0 \pm 0,7\%$; Ti-PR 35 kDa $65,0 \pm 0,4\%$) montrant ainsi qu'un nombre de groupements sulfonate est nécessaire pour obtenir le même effet inhibiteur que lorsque le polymère est greffé par voie UV ou thermique.

Ces différences de résultats de la réponse bactérienne s'expliquent par les différences en nombre et en répartition des groupements sulfonate sur les différents types de surface : les groupements sulfonate étant nécessaire pour obtenir une inhibition de l'adhérence bactérienne. D'autre part, au laboratoire nous avons montré que la forte activité d'inhibition de l'adhérence bactérienne des surfaces greffées de polyNaSS est modulée par la présence d'une protéine plasmatique, la fibronectine qui s'adsorbe de façon spécifique et selon une conformation optimale sur ces surfaces. Les résultats de la réponse bactérienne sur les trois types de surfaces greffées illustrent parfaitement cela et montrent de plus l'effet de l'importance du nombre de groupements fonctionnels dans l'activité recherchée.

Pour conclure, nous avons :

i) Amélioré la technique de « grafting from » en changeant la phase d'amorçage : utilisation d'un rayonnement UV au lieu de la température pour lyser les fonctions « hydroperoxyde ».

ii) Mis en place le greffage (« grafting to ») de chaînes de polyNaSS de tailles définies (RAFT) à la surface du titane.

iii) Montré que les processus de greffage « from » et « to » engendrent des chaînes d'architectures et de tailles différentes. Cette différence de conformation joue un rôle sur la réponse biologique in vitro.

iv) Montré que si le greffage sous UV est une amélioration extrêmement importante du procédé de greffage du polyNaSS qui devient plus accessible à l'échelle industrielle ; le greffage par grafting « to » présente un intérêt pour la mise à jour du mécanisme de l'activité biologique des surfaces bioactives greffées de polyNaSS et doit être optimisé en améliorant la densité de greffage des chaînes de polyNaSS.

PERSPECTIVES

Un travail de thèse est rarement fini et ne représente qu'une pierre à l'édifice d'un projet bien plus important. Pour ne citer que quelques unes des perspectives qui pourraient être envisagées dans un futur proche au sein du LBPS.

La première serait de réaliser de la polymérisation RAFT par voie UV, cela demande cependant à être testé afin de savoir si dans ce cas il est également possible de réduire le temps de polymérisation tout en maintenant le contrôle de la polymérisation.

Une autre perspective serait de déterminer le taux de recouvrement de la molécule d'ancrage. Nous avons apporté la preuve que la DA était présente sur la surface mais nous n'avons pas d'informations sur sa quantité sauf par XPS. Nous avons pensé à déterminer le recouvrement de la surface par la DA en couplant cette dernière à de la fluorescence (des essais sont en cours). De cette information découle la compréhension des taux et de la densité de greffage du polyNaSS à la surface du titane. En effet, afin d'avoir le maximum de polyNaSS : faut-il avoir le plus possible de molécules d'ancrage à la surface ? La taille des chaînes peut moduler la réaction de couplage, si la DA est déjà fixée sur le polyNaSS, il est peut-être possible de réduire l'effet stérique afin d'augmenter le taux de greffage du polyNaSS à la surface du titane.

De plus, nous avons choisi 3 tailles arbitraires de polyNaSS (5, 10 et 35 kDa) mais peut-être qu'il faudrait tester une taille encore plus petite et/ou une plus grande. Une taille plus petite permettrait de réduire l'effet stérique et d'augmenter le taux de greffage alors qu'une taille plus grande permettrait d'avoir plus de fonctions réactives « sulfonate » mais un effet stérique important.

Enfin, nous savons qu'il existe d'autres polymères bioactifs qui permettent d'améliorer sensiblement l'ostéointégration à base de phosphate et phosphonate. La dernière perspective que nous envisageons ici est de remplacer le polyNaSS par un polyphosphonate et de refaire les mêmes essais qu'avec le polyNaSS et de comparer les résultats. Synthétiser de nouveaux polymères par RAFT et les greffer à la surface du titane. Le LBPS a déjà commencé à se pencher sur cette voie et visiblement, le challenge est au rendez-vous.

ANNEXE : SUPPLEMENTARY MATERIAL

Deuxième chapitre : Grafting Poly(Styrene Sodium Sulfonate) onto Titanium Surfaces using Bio-adhesive Molecules: Surface Characterization and Biological Properties

Analytical Methods:

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (¹H NMR): Spectra were recorded on a Bruker Avance III 400 spectrometer (400 MHz) at room temperature. Chemical shift values (δ) are reported in ppm. The residual proton signal of the NMR solvents were used as internal standard (D₂O: 4.79 ppm and DMSO-*d*₆: 2.50 ppm)

Determination of monomer conversion: Monomer conversion (*p*) was calculated from ¹H NMR data using the following **Equation (S1)**.

$$p = \left(\int_{5.87\text{ppm}} t_0 - \int_{5.87\text{ppm}} t_f \right) / \int_{5.87\text{ppm}} t_0 \quad (\text{S1})$$

$\int_{5.87\text{ppm}} t_0$: the integral of one of the vinyl protons from the monomer at the beginning (t_0) of the RAFT polymerization, normalized by the integration of the DMSO peak to $\int_{2.50\text{ppm}} = 1$

$\int_{5.87\text{ppm}} t_f$: the integral of one of the vinyl protons from the monomer at the end (t_f) of the RAFT polymerization, normalized by the integration of the DMSO peak to $\int_{2.50\text{ppm}} = 1$

Calculation of $M_{n,th}$: The theoretical number average molecular weights ($M_{n,th}$) were calculated using the following **Equation (S2)**.

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 p M_m}{[CTA]_0} + M_{CTA} \quad (\text{S2})$$

$[M]_0$ and $[CTA]_0$ are the initial concentrations (mol.L⁻¹) of the monomer and the chain

transfer agent respectively.

p is the monomer conversion as determined by ^1H NMR.

M_m and M_{CTA} are the molecular weights ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) of the monomer and the chain transfer agent.

Size exclusion chromatography (SEC): SEC was performed on a Shimadzu Prominence instrument equipped with a SIL-20A auto sampler and a Shimadzu RID-10A differential refractive index detector. The system was fitted with an UltrahydrogelTM (Waters) gel guard column (6×40 mm) and two UltrahydrogelTM (Waters) analytical columns (7.8×300 mm). NaNO_3 (0.1 M) was used as the mobile phase, eluting at 0.7 mL/min at 40°C. Samples were dissolved in an aqueous solution of NaNO_3 (0.1 M). Prior to injection, the samples were filtered through cellulose acetate membranes (0.45 μm pore size). The molecular weights of the polymers (M_n) and the dispersity (\mathcal{D}) were determined using LCsolution GPC software by a conventional calibration obtained from poly(NaSS) standards (Sigma-Aldrich) ranging from $\approx 2 \times 10^2$ to $\approx 150 \times 10^3$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthesis Procedures:

Synthesis of dopamine acrylamide: In a two-neck round bottom flask balloon, dopamine hydrochloride (3 g, 15.8 mmol, 1 equiv) was introduced with a magnetic stirrer bar and 3 vacuum-argon cycles were done. Then, in a round bottom flask, sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 14.44 g, 37.9 mmol, > 2 equiv) was dissolved in 400 mL of water and the solution was bubbled under argon for 30 min under magnetic stirring. The solution of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ was added to the two-neck round bottom flask balloon containing the dopamine hydrochloride. Then the flask was put in an ice bath before adding sodium carbonate (Na_2CO_3 , 11 g, 103.8 mmol) and acryloyl chloride (8 mL, 98.5 mmol) over one hour. Then, the ice bath was removed and the reaction was carried out overnight at room temperature under magnetic stirring. The following day the solution pH was ~ 8 and hydrochloric acid (HCl 37%) was added until the pH equaled ≈ 2 to remove the borate protection. Then the solution was washed twice with ethyl acetate (400 mL then 150 mL). The organic phase was collected and washed twice with HCl 37% (once with 500 mL (1%) and then with 200 mL (1%)). The collected organic phase was dried over magnesium sulfate (MgSO_4) and filtered. The ethyl acetate was removed under reduced pressure and the crude product was purified by silica gel column chromatography, a mixture of dichloromethane (DCM)/methanol (MeOH) 97/3 v/v and then with DCM/MeOH 95/5 v/v to give after drying under vacuum at 50°C a light brown powder (Yield: 2.55 g, 78%). Refer to **Figure S1** for ^1H NMR spectrum and **Figure S2** for ^{13}C NMR spectrum. ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-}d_6$) δ = 8.76 (1H, s, Ph-OH), 8.67 (1H, s, Ph-OH), 8.13 (1H, t, -NH-C=O), 6.63-6.44 (3H, m, Ph), 6.2, (1H, dd, J = 10.04, 7.03 Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}-$), 6.08 (1H, dd, J = 17, 2.32 Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}-$),

5.57 (1H, dd, $J = 10.04, 2.32$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}-$), 3.26 (2H, q, $J = 6.78$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 2.54 (1H, t, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J = 7.28$ Hz). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 164.45$ (C, $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 145.06 (1C, Ph-OH), 143.55 (1C, Ph-OH), 131.8 (1C, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 130.14 (CH_2-Ph), 124.88 (1C, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 119.19 (1C, Ph), 115.95 (1C, Ph), 115.49 (1C, Ph), 40.61 ($-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 34.58 ($\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

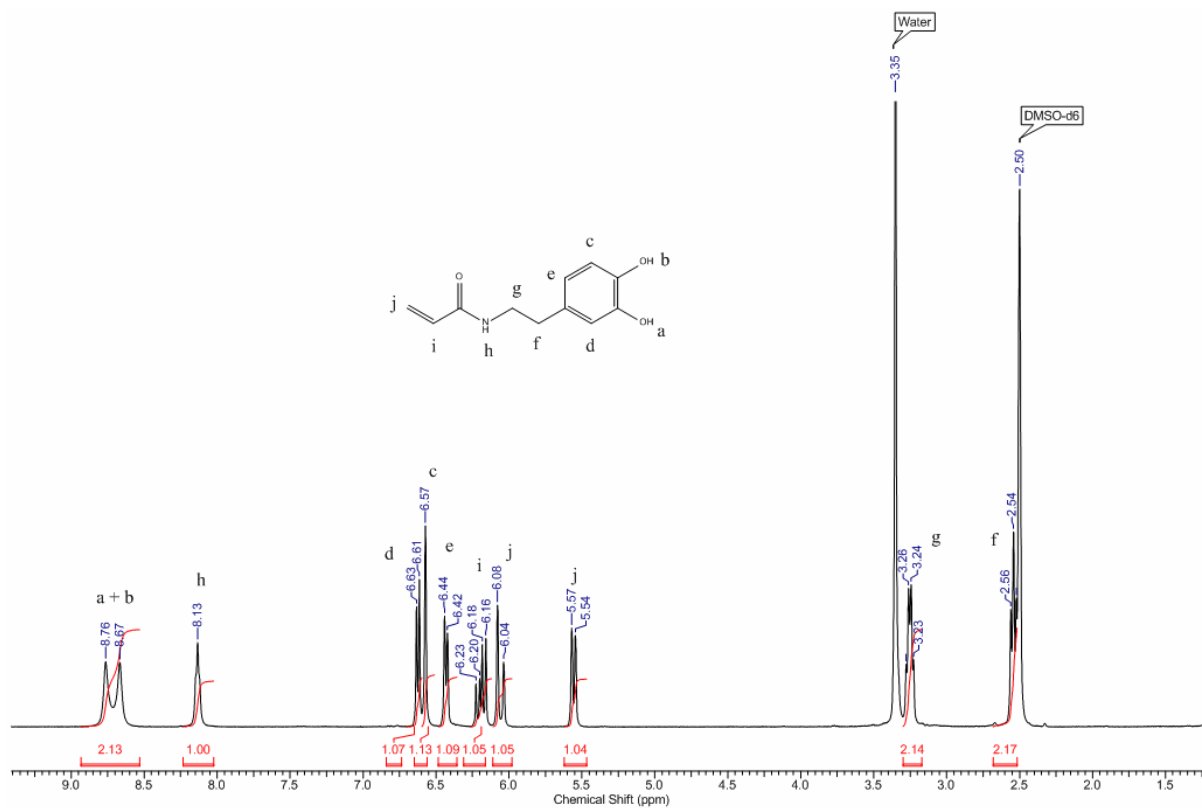


Figure S1: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) of dopamine acrylamide.

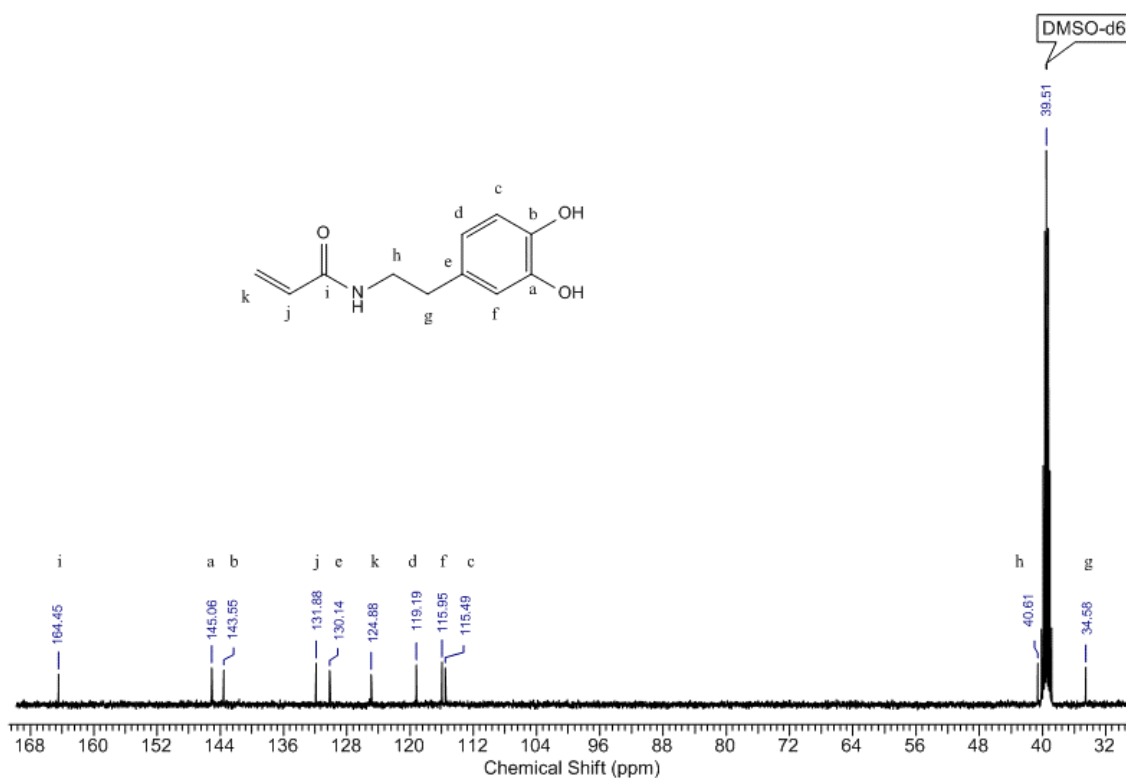


Figure S2: ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) of dopamine acrylamide.

Preparation of polystyrene sodium sulfonate (polyNaSS) *via* reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization: Styrene sodium sulfonate was added to a 50 mL round bottom flask containing a stir bar, 15 mL of water, 0.1 mL of DMSO (used as internal reference), 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) and 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid, then argon was bubbled through the solution for 30 min. Before beginning the polymerization an aliquot was taken for NMR analysis (t_0). Then, the round bottom flask was sealed with a septum and placed in an oil bath thermostated at 70°C. After 5 hrs, the polymerization mixture was cooled down in an ice bath and aerated. An aliquot was taken to determine the final conversion (t_f) by ^1H NMR. The product was precipitated into 350 mL of ice-cold acetone to yield a pink powder. After being dried overnight in a vacuum oven at 50°C, the polymers were analyzed by SEC and by ^1H NMR.

Table 1: Quantitative information for the preparation of polystyrene by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization

	NaSS		ACVA		CTA ^a		[NaSS]:[ACVA]:[CTA]
	[g]	[mol]	[g]	[mol]	[g]	[mol]	
polyNaSS ₂₅ ^b	5	2.43×10 ⁻²	1.94×10 ⁻¹	2.08×10 ⁻⁴	5.83×10 ⁻²	6.93×10 ⁻⁴	[35]:[0.3]:[1]
polyNaSS ₄₈ ^b	5	2.43×10 ⁻²	1.09×10 ⁻¹	1.17×10 ⁻⁴	3.29×10 ⁻²	3.91×10 ⁻⁴	[62]:[0.3]:[1]
polyNaSS ₁₇₀ ^b	5	2.43×10 ⁻²	9.81×10 ⁻³	3.50×10 ⁻⁵	3.26×10 ⁻²	1.17×10 ⁻⁴	[208]:[0.3]:[1]

^aCTA: chain transfer agent, 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid. ^bNumber-average degree of polymerization approximated based on the respective number-average molar mass.

SH end group formation of polyNaSS-SH by reduction reaction: A 100 mL round bottom flask containing a solution of polyNaSS (4 g, ≈0.76 mmol) in water (10 mL) was capped with a septum, placed in an ice bath and the mixture bubbled with argon for 15 min. A solution of sodium borohydride (NaBH₄) (1M) was deoxygenated separately by bubbling argon through the solution for 15 min. To the polymer mixture was added 10 mL of NaBH₄ (1 M) solution (≈20 equiv relative to the number of polymer chains) via syringe. Then, 2 mL of tributylphosphine (PBU₃, >>10 equiv) was added to the mixture and bubbled with argon for 15 min. The solution was allowed to stir for at least 48 hrs at room temperature before the polyNaSS-SH was precipitated in ice-cold methanol. The polymer was filtered and washed with cold methanol to remove any residual NaBH₄. After drying overnight in a vacuum oven at 50°C, the white powder of the polyNaSS-SH samples were analyzed by SEC (see Figure S3).

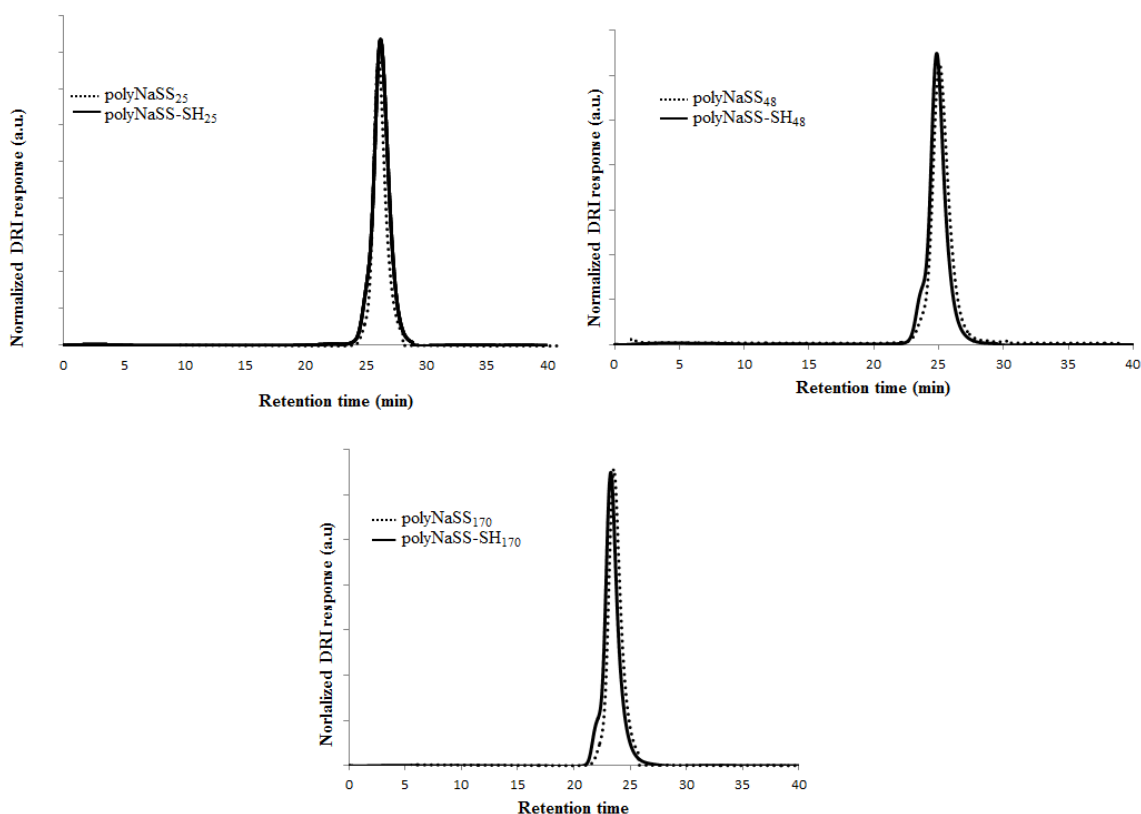


Figure S3: Size exclusion chromatograms (differential refractive index detector) of polyNaSS in dotted line (polyNaSS₂₅; polyNaSS₄₈; polyNaSS₁₇₀) synthesized by RAFT polymerization and polyNaSS-SH in solid line (polyNaSS-SH₂₅; polyNaSS-SH₄₈; polyNaSS-SH₁₇₀) after reducing.

DA adhesion on titanium surface: The round bottom flask containing DA (0.6 g, 2.89 mmol), a stir bar and 14 mL of DMSO was wrapped in an aluminum foil and sealed with a septum. The solution was bubbled in argon for 15 min under stirring. The titanium surfaces were immersed in a Piranha solution (H₂SO₄/H₂O₂ 50/50 v/v) in a controlled and inert atmosphere (>99% argon). First, they were immersed in sulfuric acid for one minute under stirring and then hydrogen peroxide was added. This reaction is very exothermic and the color of the solution becomes orange. The titanium surfaces were amply rinsed with H₂O. Finally the surfaces were immersed in the DA solution previously prepared under controlled and inert atmosphere and then the reaction was allowed to proceed for 24 h at room temperature (rt) while stirring.

Thiol-ene reaction between the dopamine acrylamide and the SH end group of polyNaSS-SH on titanium surface: The DA covered titanium surfaces were immersed in a solution of polyNaSS-SH (0.12 mol.L⁻¹) and AAPH (≈10 equiv) in a round bottom flask. The flask was wrapped in aluminum foil and the solution bubbled with argon for 30 min while stirring in an ice bath. Then the reaction was

allowed to proceed for 24 hrs while stirring at room temperature. Finally the titanium surfaces were rinsed with water and dried overnight in a vacuum oven at 50°C.

Biological Assays:

Initial cell adhesion over 24 and 48 h: The initial adhesion events (attachment and spreading) of Saos-2 cells to the Ti control and Ti-DA-polyNaSS surfaces were studied at 24 and 48 h. For this assay, cells were seeded onto test samples held in individual wells of 24-well TCPS plate at a density of 1.5×10^4 cells/cm² in standard medium and allowed to adhere and spread to 2 time-points of 24 and 48 hrs. Then medium was removed and samples rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS), samples fixed for 30 min at rt in 4% paraformaldehyde in PBS, washed twice with PBS before being immunostained to visualize the microtubules of the cell cytoskeleton (using α -tubulin antibody) and the cell nuclei (using DAPI). Prior to immunostaining, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, washed twice with PBS then blocked for 1 h in 1% BSA in PBS, then incubated in α -tubulin primary antibody diluted 1/200 in blocking buffer at 4°C overnight. Samples were then washed 3x in blocking buffer and incubated for 90 min in FITC conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (Dakopatts) diluted 1/20 in blocking buffer. Finally, samples were washed twice in PBS, counterstained with DAPI 1/1000 for 5 min at rt, washed twice more with PBS and images of stained cells collected using a confocal microscope (Nikon).

Cell proliferation over 7 days: The rate of cell growth (proliferation) of Saos-2 cells on the Ti control and Ti-DA-polyNaSS surfaces were studied over a 7 day period. For this assay, Saos-2 cells were seeded in standard culture medium at a density of 1.5×10^4 cells.cm⁻² onto control Ti and Ti-DA-pNaSS wafers held in individual wells of 24-well TCPS plates and incubated at 37°C in humidified air containing 5% CO₂ and allowed to attach and proliferate. Cells were also cultured in identical wells of a TCPS plates to each time-point without any wafers as an internal assay control. The number of adherent cells was measured at designated time-points of 1, 4 and 7 days using a routine MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay with triplicate samples of each wafer type at each time-point. One extra sample was established in the day 7 plate to check cell distribution on each surface by staining with Cell Tracker Green at the end of the assay (as described below). Cells in the day 7 plates had culture medium changed on day 4. Phase contrast images of cells on surfaces at each timepoint were collected using an upright microscope (Nikon) prior to performing MTT assays. For MTT assays at each of the time-points, each wafer with adherent cells was transferred to a new well in a 24-well plate. 1 mL of a freshly prepared MTT test solution was gently added to each well and plates were incubated at 37°C for 4 hrs. Medium was aspirated from the wells and 1ml of DMSO solution was added to each well to dissolve the MTT incorporated into

adherent cells. Plates were gently shaken for 10 min and a 100 μ l representative sample collected from each well and transferred into a well of a 96-well TCPS plate and optical density of wells read using a Plate Reader (Molecular Devices Spectramax) set on a wave length of 595 nm. The mean reading of triplicate samples with SDM was graphed. Cells adherent to the extra sample of each surface on day 7 of proliferation assay were stained with Cell Tracker Green (CTG), a fluorescent tag for living cells, to enable visualization of the cell cover on the opaque surfaces. CTG was added to medium and the cells incubated for 30 min at rt. The media was removed and cells attached to each wafer were washed and fixed then visualized with a fluorescence microscope (488 nm) and representative digital images recorded.

Cell differentiation over 25 days: The differentiation and mineralization of Saos-2 cells on the Ti control and Ti-DA-pNaSS surfaces were studied over a 25 day period. For this assay, Saos-2 cells were seeded in standard culture medium at a density of 3×10^4 cells.cm⁻² onto control ungrafted Ti and Ti-DA-pNaSS grafted wafers held in individual wells of 24-well TCPS plates and incubated at 37°C in humidified air containing 5% CO₂ and allowed attach and proliferate for 4 days. Cells were also cultured in identical wells of a TCPS plate without any wafers as an internal assay control. Four complete sets of plates were established, two for the differentiation assay and two for an accompanying MTT assay to establish the number of attached cells at day 25. In either set one series was maintained under standard Saos-2 culture conditions and the other set was maintained in standard Saos-2 medium with added osteogenic factors (as detailed below). There were triplicate samples of each surface in each set of plates. After 4 days, the culture medium in one set of the plates in the differentiation assay was replaced with the standard Saos-2 culture medium (standard culture conditions) and in the other set with standard Saos-2 medium containing osteogenic supplements of β -Glycerophosphate (BGP) at 1.5 mg.mL⁻¹ (7 mM), Dexamethasone (Dex) at 40 ng.mL⁻¹ (100 nM), and Ascorbic acid (Asc) at 20 μ g.mL⁻¹ (70 μ M)) hereafter referred to as osteogenic culture conditions. Culture medium was replenished every 3-4 days and cultures maintained until mineral deposits were visible in the plates maintained under osteogenic culture conditions, which occurred at day 25. Differentiation was determined by measuring the production of alkaline phosphatase and mineralization was measured by the production of calcium by the adherent cells under both of the standard and osteogenic culture conditions.

Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme that is a byproduct of active bone formation, which is routinely used as a measure of early stage cell differentiation. ALP production was measured in cells adherent to the grafted and ungrafted Ti surfaces at 25 days using a quantitative assay based on p-nitrophenyl phosphate (p-NPP from Sigma#N-1891). Wafers were transferred to new wells in a fresh

plate and 500 μL of p-NPP at a concentration of 2.0 mg/mL in 0.1 M glycine buffer was added to each well and plates shaken at 37°C for 60 min then the reaction was neutralized by the addition of 500 μL 1M NaOH per well. Sample sets were compared to a standard curve prepared from 10 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ stock solution of p-NPP diluted in 0.1 M glycine buffer and neutralized to create 8 standards ranging from p-NPP dilutions of 1/5 to 1/640. The optical density of wells containing test samples and standards was read spectrophotometrically at 405 nm using a plate reader (Molecular Devices Spectramax).

Calcium is produced by bone cells as they differentiate/mature and is regarded as a marker of later stage differentiation which occurs as cells produce mineral associated with bone formation. A calcium sensitive dye, Arsenazo III, was used in a quantitative assay to determine the amount of calcium produced by cells adherent to the grafted and ungrafted surfaces after 25 days in culture. Wafers were individually transferred to fresh wells and 500 μL 0.6 M HCl added to each well and plates shaken at rt overnight to permeabilise cells and release the calcium. On the next day, the reaction was neutralised by addition of 100 μL 3 M NaOH per well. A 20 μL aliquot was taken from each well and mixed with 200 μL of Arsenazo III reagent (Sigma#11090) at a concentration of 0.15 mg. mL^{-1} to form a complex with the calcium which resulted in a colour change. The optical density of the test samples and standards wells was read spectrophotometrically at 595 nm using a plate reader (Molecular Devices Spectramax). Sample sets were compared to a standard curve prepared from 1mg/ml CaCl_2 stock solution diluted in H_2O to create 8 standards ranging from CaCl_2 dilutions of 1/100 to 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

For both the ALP and calcium assays, data was corrected to take into account the differences in area of the samples (wafers were 0.8 cm^2 and TCPS wells were 2 cm^2) with final values expressed as p-NPP or calcium in mg/cm^2 . Data was then normalized to the TCPS control value in osteogenic conditions and adjusted to take into account the number of cells present (cell density) on the wafers and control TCPS wells as determined by the MTT assay run in parallel with differentiation/mineralization assay over the 25 day period.

Ces travaux de recherche traitent du greffage du polyNaSS (polymère bioactif) à la surface du titane dans le but de proposer une solution permettant de prévenir les infections bactériennes tout en favorisant l'ostéointégration des prothèses totales de hanche. Le greffage du polyNaSS est réalisé selon deux voies : un greffage dit « direct » utilisant la technique de « grafting from » et un greffage indirect utilisant la technique de « grafting to ». Le greffage « direct » utilise les radiations UV pour amorcer la polymérisation du NaSS à partir de la surface du titane. A l'inverse le « greffage indirect » nécessite l'utilisation d'une molécule d'ancrage - dérivée de la dopamine- qui fera le lien entre le polyNaSS et la surface du titane. L'intérêt du « greffage indirect » est de pouvoir greffer des chaînes de polyNaSS de tailles définies (5, 10 et 35 kDa) à la surface du titane ; les chaînes de polyNaSS sont synthétisées de façon contrôlée par une polymérisation RAFT puis couplées à un dérivé de dopamine par une chimie « click ». En revanche le recouvrement de la surface par le polyNaSS est plus faible que lors d'un greffage « direct ».

Les surfaces de titane greffées selon les deux voies ont été évaluées *in vitro* pour déterminer leurs effets anti adhérence bactérienne et d'ostéointégration. Toutes les surfaces greffées sont biocompatibles et ne présentent aucun effet de cytotoxicité vis à vis des cellules osseuses. La réponse cellulaire (ostéoblastes) est toujours meilleure pour les surfaces greffées par greffage « direct » par comparaison au greffage « indirect ». En revanche pour la réponse bactérienne (*Staphylococcus aureus*) la réponse est dépendante de la taille du polymère greffé. L'ensemble des résultats semble montrer qu'il est préférable de disposer d'une surface recouverte de façon homogène avec des polyNaSS de taille non contrôlée qu'une surface partiellement recouverte par des polymères de taille contrôlée. Cependant, le greffage indirect de polyNaSS de tailles contrôlées présente un intérêt particulier pour le contrôle des interactions avec les systèmes vivants et il demande à être optimisé.

This work deals with the grafting of polyNaSS (bioactive polymer) to the surface of titanium in order to propose a solution to prevent bacterial infections while promoting the osseointegration of total hip prostheses. The grafting of the polyNaSS is carried out in two ways: a "direct" grafting using the "grafting from" technique and an indirect grafting using the "grafting to" technique. "Direct" grafting uses UV radiation to initiate NaSS polymerisation from the titanium surface. Conversely, "indirect grafting" requires the use of an anchoring molecule - derived from dopamine - which will make the link between the polyNaSS and the surface of the titanium. The advantage of "indirect grafting" is that it is possible to graft polyNaSS chains of defined sizes (5, 10 and 35 kDa) to the surface of the titanium; the polyNaSS chains are synthesised in a controlled manner by a RAFT polymerisation and then coupled to a dopamine derivative by "click" chemistry. However, the coverage of the surface by the polyNaSS is less than that of a "direct" grafting.

The titanium surfaces grafted by both techniques were evaluated *in vitro* to determine their bacterial and osseointegration effects. All grafted surfaces are biocompatible and have no cytotoxicity effect on bone cells. A greater cellular response (osteoblasts) is achieved for the surfaces grafted by "direct" grafting compared to the "indirect" grafting. However, for the bacterial response (*Staphylococcus aureus*) the response is dependent on the size of the grafted polymer. All the results seem to show that it is preferable to have a homogeneously coated surface with polyNaSS of uncontrolled size than a surface partially covered by polymers of a controlled size. However, indirect grafting of a controlled sized polyNaSS is of particular interest for controlling interactions with living systems and requires optimisation.