

UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

Greffage d'un polymère bioactif sur des surfaces de silicone pour améliorer la réponse biologique

Grafting of a bioactive polymer on silicone surfaces to improve the biological response

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Mylan LAM

Laboratoire de Biomatériaux pour la Santé

CSPBAT - UMR CNRS 7244

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE

soutenue le 9 décembre 2021 devant le jury d'examen constitué de :

BARBAUD Christel	Professeur des Universités	Université Sorbonne Paris Nord	Présidente du jury
DETREMBLEUR Christophe	Directeur de recherche FNRS	Université de Liège	Rapporteur
GARRIC Xavier	Professeur des Universités	Université de Montpellier	Rapporteur
HUMBLOT Vincent	Chargé de recherche - HDR	Université Bourgogne Franche Comté	Examineur
FALENTIN DAUDRE Céline	Maître de conférence - HDR	Université Sorbonne Paris Nord	Directrice de thèse

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Étude bibliographique	6
1. Généralités : les prothèses mammaires	8
2. Les infections associées aux implants mammaires	13
2.1. Description du contexte	13
2.2. Formation du biofilm	16
3. L'amélioration de la bio-activité des implants en silicone : propriétés antibactériennes et biocompatibilité	19
3.1. Modifications physiques : topographie et rugosité de surface	19
3.1.1. Rugosité et contractures capsulaires.....	20
3.1.2. Rugosité et adhésion bactérienne	22
3.1.3. Les propriétés mécaniques des implants en silicone.....	25
3.2. Revêtement de surface.....	26
3.2.1. Antibiotiques	26
3.2.2. Nanoparticules.....	29
3.2.3. Autres méthodes	33
3.3. Modifications de surface par voie covalente.....	36
3.3.1. Activation /oxydation : une étape préalable à la modification covalente.....	36
3.3.1.1. Le traitement par plasma sous vide	37
3.3.1.2. Effet corona : un plasma à pression atmosphérique	39
3.3.1.3. La chambre UV/ozone	40
3.3.1.4. Les irradiations UV	41
3.3.1.5. H₂O₂/H₂SO₄	42
3.3.1.6. Les méthodes solution-gélification	43
3.3.1.7. Déposition chimique en phase vapeur	44
3.3.1.8. La fonctionnalisation par une méthode de « grafting to »	45
3.3.1.9. La fonctionnalisation par greffage direct « grafting from »	52
4. Discussions	54
4.1. Les avantages et inconvénients des diverses méthodes	54
4.2. La prothèse mammaire idéale : une question d'équilibre.....	55
5. Conclusion	58
CHAPITRE II : Matériels et méthodes	60
1. Préparation des échantillons de silicone	62
2. Fonctionnalisation de surface	63
2.1. Préparation du monomère Styrene sulfonate de sodium	63
2.2. Greffage par polymérisation radicalaire.....	64
2.2.1. Techniques d'activation.....	64
2.2.2. Polymérisation radicalaire à partir de la surface (greffage)	65
3. Caractérisations du greffage	66
3.1. Dosage colorimétrique avec le bleu de toluidine	66
3.2. Microscopie électronique à balayage – module d'analyses dispersives en énergie (MEB-EDX)	69
3.3. Mesure de l'angle de contact	70
3.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - Réflectance totale atténuée (ATR-FTIR)	71
3.5. Spectrométrie photoélectronique X (XPS).....	71
3.6. Microscopie à force atomique (AFM)	72
4. Caractérisations des propriétés mécaniques	75
4.1. Test de traction.....	75
4.2. Test de gonflement.....	77

5. Etude de la réponse biologique	78
5.1. Préparation des échantillons	78
5.2. Adhésions protéiques	78
5.2.1. Adsorption de l'albumine de sérum bovin (BSA)	78
5.2.2. Adsorption de la fibronectine	79
5.3. Culture cellulaire	79
5.3.1. Test de cytotoxicité (MTT) :	80
5.3.2. Test de morphologie :	81
5.3.3. Test de prolifération :	82
Chapitre III : Résultats et discussions	84
Partie 1 : Greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium sur des implants en silicone.....	86
1. Caractérisations des surfaces de silicone brutes	89
2. Activation/oxydation des surfaces de silicone	92
2.1. L'activation chimique.....	93
2.2. Du greffage sans activation à l'activation physique	95
3. Greffage du polyNaSS avec une activation aux UV.....	98
3.1. Greffage avec activation UV (méthode B)	99
3.2. L'importance des irradiations UV	102
3.3. Optimisation des paramètres de greffage sous UV	103
3.3.1. Dimension de l'échantillon	103
3.3.2. Concentration en monomère	105
3.3.3. Réduction du temps d'activation.....	106
3.4. Estimation de la taille des chaînes de polymère greffé	108
4. Physisorption polyNaSS/silicone :	109
5. Compréhension du mécanisme de greffage :	111
Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone	114
1. Étude de la réponse biomécanique des surfaces de silicone	118
1.1. Essais de traction	119
1.2. Essais de gonflement des surfaces de silicone	121
2. Topographie de surface.....	124
3. Réponse biologique.....	127
3.1. Evaluation de la viabilité cellulaire	127
3.2. Evaluation de la morphologie cellulaire	129
Partie 3 : Etudes de la texturation de surface	136
1. Les surfaces texturées	139
1.1. Caractérisations des surfaces nues.....	139
1.2. Greffage du polyNaSS sur les différentes surfaces texturées.....	141
2. Du polydiméthylsiloxane au polydiphéthylsiloxane	143
2.1. Vue latérale des surfaces de silicone par microscopie électronique à balayage.....	143
2.2. Le greffage du polyNaSS sur le PDPS	146
2.3. Test de cytotoxicités	149
Partie 4 : Etude des interactions silicone/protéines avec le greffage polyNaSS	152
1. Adsorption de l'albumine	156
1.1. Adsorption de la BSA sur des surfaces non greffées	157
1.2. Adsorption de la BSA sur des surfaces greffées.....	160
2. Adsorption de la fibronectine.....	162
2.1. Adsorption de la FN sur des surfaces non greffées	164
2.2. Adsorption de la FN sur des surfaces greffées.....	165

2.3. Etude cinétique d'adsorption de la fibronectine	167
2.4. Organisation en surface de la fibronectine	171
3. Influence du changement de conformation de la fibronectine sur l'adhésion cellulaire ..	174
Partie 5 : Optimisation des procédés en accord avec les expériences ultérieures	178
1. Vers des surfaces de fonctionnalisation plus grandes	182
1.1. Comparaison des lampes UV-Mercure et UV LED	182
1.2. Adaptation des paramètres de greffages	183
1.2.1. Activation des surfaces sous UV LED	184
1.2.2. Greffage du polyNaSS après activation à P38% des surfaces de silicone sous UV LED	186
2. Du greffage unilatéral à double-face	189
3. La fonctionnalisation de mini-implants en silicone	191
Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives.....	198
ANNEXES.....	i
Bibliographie.....	iv

Liste des figures

Figure 1: (a) Formule chimique du polydiméthylsiloxane – PDMS (b) Représentation des différents états du PDMS selon le taux de réticulation.....	9
Figure 2: Processus de fabrication d'une prothèse mammaire - (a) Trempage du moule plusieurs fois dans une solution de silicone (visqueuse) puis séchage (b) mise en place de la pastille d'occlusion (c) remplissage du gel à l'intérieur de l'enveloppe (d) cuisson à l'étuve.	10
Figure 3: Évolution du nombre de publications sur le sujet du lymphome anaplasique à grandes cellules associés aux prothèses mammaires depuis le premier cas détecté en 1997 [13].....	11
Figure 4: (a) Corrélation entre la sévérité des contractures capsulaires et la concentration en bactérie (b) analyses des microbiomes d'explants issus de contractures capsulaires ou de lymphomes anaplasiques avec la prévalence des bactéries à Gram positif ou négatif [15,30]	15
Figure 5: Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien après insertion d'un implant dans le corps.....	17
Figure 6: Une double fonctionnalité des surfaces de silicone pour une réponse biologique optimale	19
Figure 7: Incidence de la sévérité des capsules issues de contractures capsulaires selon la rugosité des implants.....	20
Figure 8: Incidence du taux de lymphome anaplasique à grandes cellules selon la rugosité des prothèses	22
Figure 9: Classification des surfaces de prothèses mammaires en silicone selon la rugosité et intensité de l'adhésion bactérienne correspondantes [50][62].....	23
Figure 10: Traitement aux antibiotiques selon le type de microorganisme visé et le site d'infection [68].....	27
Figure 11: Morphologies de fibroblastes humains sur de silicones activés par plasma et sur des surfaces fonctionnalisées par l'acide acrylique couplé à des chaînes de PEG de différentes longueurs : (a) diNH ₂ -PEG ₂₀₀₀ , (b) diNH ₂ -PEG ₆₀₀₀ , (c) diNH ₂ -PEG ₂₀₀₀₀ /adsorption de collagène : (d) diNH ₂ -PEG ₂₀₀₀ /collagène, (e) diNH ₂ -PEG ₆₀₀₀ /collagène, (f) diNH ₂ -PEG ₂₀₀₀₀ /collagène.....	33
Figure 12: Activation des surfaces de silicone par des sources hautement énergétiques : (a) techniques de plasma, (b) combinaison entre des irradiations UV et de l'ozone gazeux, (c) irradiations UV seules en milieu aqueux	37
Figure 13: : Activation des surfaces de silicone par des moyens chimiques : (a) oxydation acide – Piranha, (b) oxydation sol-gel (c), dépôt chimique par vapeur	44
Figure 14: Illustration des deux principales voies de fonctionnalisation de surface : la stratégie de greffage indirect (« grafting to ») ou de greffage direct (« grafting from »).....	45
Figure 15: Différentes stratégies d'action antibactérienne – actions de répulsions (gauche) / actions bactéricides (droite)	49
Figure 16: (a) Structure chimique du quarter polymère de silicone bioactif / Résultats <i>in vivo</i> de l'adhésion des <i>S. Aureus Cowan I</i> (b) et des MRSA 88244 (c)(d) sur des surfaces sans (gris) et avec (noir) fonctions bioactives [44] [170].....	52
Figure 17: Mécanisme de greffage sur l'exemple des surfaces de titane [130].....	54
Figure 18: Prothèse mammaire entière avec gel de silicone (gauche) et enveloppe seule (droite)	62
Figure 19: Mini-implants texturés MOTIVA (gauche) et SEBBIN (droite) pour l'étude <i>in vivo</i> 63	

Figure 20: Structure chimique du monomère de styrène sulfonate de sodium	63
Figure 21: Principe de l'ozonation	65
Figure 22: Montage expérimental pour le greffage sous UV	65
Figure 23: (a) Lampe UV – Lot Oriel (source Mercure) / (b) Lampe UV – Omnicure (source LED)	66
Figure 24: Structure chimique de la molécule de bleu de toluidine	66
Figure 25: (a) $A=f(\text{concentration des solutions})$ (b) courbe d'étalonnage résultante avec le coefficient directeur de la droite	68
Figure 26: Principe de la mesure de l'angle de contact.....	70
Figure 27: Principe de la spectrométrie à rayons X.....	72
Figure 28: Principe de réflexion du laser de la microscopie à force atomique	73
Figure 29: Mise en place de la cellule liquide dans le microscope à force atomique avec des tuyaux pour l'entrée et la sortie du liquide	74
Figure 30: Principe générale d'une courbe contrainte-déformation	76
Figure 31: Montage d'un test de traction uni axial	76
Figure 32: Flacon de culture cellulaire avec des fibroblastes dans du milieu DMEM	80
Figure 33: (a) Découpe d'un implant mammaire (b) échantillon de silicone après lavage et séchage	89
Figure 34: Images sous MEB de la (a) face interne / (b) face externe de l'enveloppe de silicone et cartographie de la répartition des éléments chimiques en surface.....	90
Figure 35: Spectre infrarouge d'une surface de silicone brute	91
Figure 36: Evaluation de l'hydrophobicité des surfaces (face interne et face externe).....	92
Figure 37: Photos et images MEB d'un silicone non traité (a-1)(b-1) puis oxydé par le mélange H_2SO_4/H_2O_2 (a-2)(b-2)	94
Figure 38: Spectres infrarouges des surfaces de silicone ayant subi différents types d'oxydation ainsi que la mouillabilité résultante	95
Figure 39: Dosage colorimétrique et mesure de l'angle de contact avant et après le greffage direct (méthode A).....	97
Figure 40: Spectres infrarouges des surfaces de silicone avant et après oxydation par des irradiations UV	98
Figure 41: Mécanisme de polymérisation radicalaire à partir de la surface	99
Figure 42: : Mécanisme de greffage du polyNaSS sur des surfaces en silicone à l'aide des irradiations UV	100
Figure 43: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avant et après greffage avec une activation UV au préalable (Méthode B) (* p-value =0,05).....	101
Figure 44: Spectres XPS du signal du soufre 2p (S2p) des surfaces de silicone non greffées et greffées au polyNaSS	102
Figure 45: Importance du faisceau pour un greffage de qualité.....	104
Figure 46: Comparaison des taux de greffage et de l'hydrophilie des surfaces de silicone après greffage avec une concentration en NaSS de 0,7 M ou de 0,35 M	105
Figure 47: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone greffées après 60 ou 30 minutes d'activation	106
Figure 48: Spectres infrarouges des surfaces de silicone activées sous irradiations UV à 15, 30, 45, et 60 minutes	107
Figure 49: Représentation 2D des surfaces de silicone non greffées à sec (a) et des surfaces de silicone greffées en cellule liquide (b) par microscopie à force atomique.....	108

Figure 50: (a) Taille d'un motif de NaSS sur une surface de silicone (b) taille de la chaîne de polyNaSS sur une surface greffée en cellule liquide.....	109
Figure 51: Mouillabilité des surfaces après physisorption du polyNaSS après plusieurs temps d'activation en comparaison avec des surfaces fonctionnalisées sous irradiations UV	110
Figure 52: Dosage colorimétrique des surfaces après physisorption du polyNaSS après plusieurs temps d'activation en comparaison avec des surfaces fonctionnalisées sous irradiations UV	110
Figure 53: Suggestion de mécanismes chimiques de fonctionnalisation du polyNaSS sur des surfaces de silicone	111
Figure 54: Mécanisme de greffage du polyNaSS sous irradiations UV sur des surfaces de silicone et conditions expérimentales	116
Figure 55: Evolution des propriétés en fonction du taux de réticulation [191]	118
Figure 56: Courbes contrainte-déformation des différents groupes de silicone étudiés	120
Figure 57: Histogramme des modules d'Young calculés à partir des courbes contrainte-déformation	121
Figure 58: Principe de gonflement d'un élastomère dans un solvant (points rouges = nœuds de réticulation).....	121
Figure 59: Courbes de gonflement à l'équilibre des différents groupes de silicone en fonction du temps	122
Figure 60: Analyses à sec des surfaces de silicone non greffées, UV contrôles, et greffées par microscopie à force atomique (images 2D et 3D)	125
Figure 61: Rugosité de profil des surfaces de silicones non greffées (noir), UV-contrôles (rouge) et greffées (bleu).....	126
Figure 62: Taux de viabilité cellulaires des surfaces de silicone ayant subi des traitements différents.....	128
Figure 63: Taux de prolifération des fibroblastes sur des surfaces de silicone après différents temps d'incubation cellulaire (1, 3, 7 jours)	129
Figure 64: Observations de la morphologie des fibroblastes au contact des surfaces de silicone greffées ou non greffées sous (a) microscope optique et (b) microscope électronique à balayage après différents temps d'incubation cellulaire (1, 3, 7 jours)	130
Figure 65: Observations d'une cellule par AFM sur des surfaces de silicone non greffées et greffées après 1 et 7 jours	132
Figure 66: (a-c) Différentes morphologies des fibroblastes au contact d'un silicone greffé, (d-e) interactions entre deux cellules voisines.....	133
Figure 67: Photos des différents niveaux de texturation et leurs mouillabilités (à l'état brut) correspondantes	139
Figure 68: Images de microscopie électronique à balayage des surfaces (T0 à T3) à différents grossissements.....	140
Figure 69: Comparaison des taux de greffage des surfaces texturées et de leurs homologues non greffés	142
Figure 70: Comparaison de la mouillabilité des surfaces texturées et de leurs homologues non greffés	143
Figure 71: Observation des coupes transversales des surfaces de silicones de différents niveaux de rugosité (T0 à T3).....	144
Figure 72: Structure chimique du poly(diméthyl siloxane-co-diphenyl siloxane).....	145
Figure 73: Comparaison de la composition élémentaire de l'enveloppe de PDMS et de la couche barrière de PDPS	146

Figure 74: Spectres infrarouges des surfaces de PDMS et PDPS brutes	147
Figure 75: Mesure des angles de contact après le greffage du polyNaSS sur des surfaces de PDPS suivant différentes conditions expérimentales.....	148
Figure 76: Dosage colorimétrique après le greffage du polyNaSS sur des surfaces de PDPS suivant différentes conditions expérimentales.....	149
Figure 77: Evaluation par MTT de la viabilité cellulaire des surfaces du polydiphénylesiloxane (non greffées, UV contrôles, greffées polyNaSS).....	150
Figure 78: Structure de la BSA	156
Figure 79: Schéma de l'orientation d'une protéine et de ses domaines hydrophobes ou hydrophiles selon la mouillabilité de la surface d'adsorption.....	157
Figure 80: Spectres infrarouges des surfaces de silicone non greffées avant et après adsorption de la BSA en comparaison avec le spectre de la poudre de BSA seule.....	158
Figure 81: Evaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone nues (\varnothing 1,0 & 1,8 cm) avant et après une heure d'incubation avec la BSA	159
Figure 82: Représentation 2D et 3D de la topographie des surfaces de silicone nues et greffées après adsorption de la BSA	161
Figure 83: Structure 3D de la fibronectine	162
Figure 84: Représentation de la fibronectine avec ses différents domaines et ses sites d'interactions avec la membrane des cellules [207]	163
Figure 85: Spectres infrarouges des surfaces de silicone nues avant et après adsorption de la fibronectine après une heure d'incubation.....	165
Figure 86: Spectres infrarouges du silicone greffé avant et après adsorption de la fibronectine après une heure d'incubation.....	166
Figure 87: Représentation de la différence relative des intensités des bandes spectrales après adsorption de la fibronectine entre des surfaces de silicone nues et greffée au polyNaSS	167
Figure 88: Spectres infrarouges des surfaces de silicone nues avant et après 5 (orange), 10 (vert), 30 (bleu), 60 minutes (rouge) d'adsorption de la fibronectine	168
Figure 89: Évaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone nues après différents temps d'adsorption de la fibronectine	169
Figure 90: Spectres infrarouges des surfaces de silicone greffées au polyNaSS avant et après 5 (orange), 10 (vert), 30 (bleu), 60 minutes (rouge) d'adsorption de la fibronectine ..	169
Figure 91: Variation des intensités relatives au cours du temps des trois bandes caractéristiques de la liaison peptidique issue de la présence de la FN sur une surface de silicone greffée.....	170
Figure 92: Évaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone greffées au polyNaSS après différents temps d'adsorption de la fibronectine	171
Figure 93: Analyses de l'organisation de la fibronectine à la surface de silicone nu et greffé après adsorption de la fibronectine à différents temps en comparaison avec des surfaces sans protéines par AFM sur une zone de balayage de 5 x 5 μ m	172
Figure 94: Analyses de l'organisation de la fibronectine à la surface de silicone nu et greffé après adsorption de la fibronectine à différents temps par AFM sur une zone de balayage de 500 x 500 nm.....	173
Figure 95: Etapes du protocole expérimental pour l'étude de l'interaction fibronectine/fibroblastes	174

Figure 96: Observations de la morphologie des fibroblastes au contact des surfaces de silicone non greffées et greffées en présence de fibronectine au microscope optique à différents jours d'incubation (2, 4, 7 jours).....	175
Figure 97: Irradiance en fonction de la distance de travail selon la puissance maximale de sortie [217].....	182
Figure 98: Lampe UV LED (Omniculture A475) et objectif du scale-up en taille	184
Figure 99: Spectres infrarouges des surfaces de silicone avant et après activation sous UV-LED	185
Figure 100: Mesure des angles de contact avant et après greffage avec une activation et un greffage à P38% sous lampe LED à différentes concentrations de monomères.....	187
Figure 101: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avant et avec une activation et un greffage à P38% sous lampe UV-LED à différentes concentrations en monomère	187
Figure 102: Captures AFM des surfaces de silicone avant et après greffage à P38%	188
Figure 103: Montage du système rotatif pour le greffage double face du silicone	189
Figure 104: Mesure de l'angle de contact des faces extérieures et intérieures après greffage par rotation	190
Figure 105: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avec une activation et un greffage à P38% sous lampe LED à différentes concentrations de monomère.....	191
Figure 106: : Modèle de mini implant MOTIVA et sa texturation de surface vue au microscope électronique à balayage.....	192
Figure 107: Comparaison des spectres infrarouges de la surface des mini implants MOTIVA et de la surface de silicone issue d'une enveloppe de prothèse SEBBIN	193
Figure 108: Schéma du (1) montage du système rotatif avec suspension de l'implant par une tige et du (2) système de maintien par création d'un vortex.....	194
Figure 109: Evaluation de la mouillabilité des surfaces greffées selon deux techniques de greffage	195
Figure 110: Evaluation du degré de greffage des surfaces greffées selon deux techniques de greffage	195
Figure 111: Evaluation du degré de greffage des mini-implants SEBBIN	196

Listes des tableaux

Tableau 1: Molécules bactéricides/bactériostatiques à visée antibactérienne sur des surfaces de silicone.....	51
Tableau 2 : Amélioration de l'adhésion cellulaire sur les surfaces de silicone.....	57
Tableau 3: Composition élémentaire des enveloppes de silicone en pourcentage atomique (%at.)	91
Tableau 4: Composition élémentaire des surfaces de silicone après oxydation acide (% atomique).....	94
Tableau 5: Composition élémentaire des surfaces de silicones avant et après greffage (%atomique).....	102
Tableau 6: Taux de réticulation et masses molaires moyennes du réseau polymérique des surfaces de silicone	124
Tableau 7: Evaluation des paramètres de rugosité à partir des images AFM 2D des surfaces non greffées, UV-contrôles et greffées	126
Tableau 8: Détails des épaisseurs des diverses sous couches qui composent l'enveloppe d'implants mammaires.....	144
Tableau 9: Conditions expérimentales de greffage développées sur lampe UV Mercure sur des surfaces de silicone	183
Tableau 10: Analyse élémentaire de la composition de la surface des mini-implants MOTIVA (%atomique).....	192

Liste des abréviations

AFM	microscope à force atomique
ASTM	American Society for Testing Materials
BSA	Albumine sérique bovine
BT	Bleu de toluidine
CC	contracture capsulaire
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDS	Microanalyse par Energie Dispersive de rayons X
FN	Fibronectine
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ISO	International Organization for Standardization
LAGC	Lymphome anaplasique à grandes cellules
MEB	Microscope électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
NP	Nanoparticule
PBS	Tampon phosphate salin
PDMS	polydiméthylsiloxane
PDPS	polydiphénylsiloxane
PolyNaSS	poly(styrène sulfonate) de sodium
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultra-violet
UVO	Ultra-violet/ozone
XPS	Spectrophotométrie à rayons X

INTRODUCTION GENERALE

Les normes et les idéaux de la société actuelle influencent grandement le recours de plus en plus fréquent à la chirurgie esthétique qui de plus est une intervention facile d'accès à l'heure actuelle pouvant même se faire en ambulatoire. Symbole de féminité, les prothèses mammaires font l'objet d'une forte demande que ce soit pour une simple augmentation de la poitrine, pour une correction d'asymétrie ou pour l'obtention d'une forme anatomique particulière (70 % des cas). Outre pour pallier un complexe esthétique, l'emploi de tels implants permet de réparer le sein dans le cas de cancer du sein qui aboutit à son ablation dans 30 % des cas.

D'un point de vue statistique, les prothèses mammaires font partie du top 10 des dispositifs médicaux les plus implantés dans le monde. Selon les données recueillies par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), environ 400 000 femmes ont eu recours à une implantation mammaire pour des raisons esthétiques ou réparatrices en France.

Intégrant la classe III des dispositifs médicaux implantables, c'est-à-dire d'un risque élevé pour la santé, ces implants nécessitent un contrôle renforcé avant leur commercialisation. Malgré la panoplie de tests que passent ces implants pour assurer leur conformité, il existe toujours une part de risque de complications liées aux conditions opératoires, mais aussi à la physiologie du patient. Les effets et les conséquences secondaires spécifiques à la pose d'implants mammaires sont nombreux et présentent des formes plus ou moins sévères : ruptures de la prothèse et fuite du contenu, cancers immunitaires, douleurs, contractures capsulaires ou infections. Ayant fait l'objet de plusieurs scandales sanitaires comme les premières complications en 1992, le scandale de Poly Implant Prothèse (PIP) en 2011, ou dernièrement l'affaire « implant files » en 2019, la surveillance sanitaire des implants mammaires est particulièrement accrue et les normes de plus en plus strictes.

Plus récemment, une nouvelle forme de cancer liée aux implants mammaires a été identifiée comme le lymphome anaplasique à grandes cellules (LAGC). L'origine et le mécanisme de ce cancer restent encore flous. En France, on a diagnostiqué le premier cas en 2011 et depuis, près de 60 cas ont été recensés.

Le manque de connaissance et d'informations sur le lymphome anaplasique témoigne du faible recul sur le sujet, car c'est une maladie qui se développe sur le long terme. Cependant, des hypothèses ont émergé et le plus souvent la biocompatibilité des prothèses est remise en cause et la tendance à développer un biofilm bactérien est pointée du doigt.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'expertise du Laboratoire de biomatériaux pour la Santé (LBPS), spécialisé dans le traitement de surface à visée antibactérienne par le greffage d'un polymère bioactif porteur de groupements sulfonates. Le greffage covalent d'un tel polymère a déjà fait ses preuves dans l'inhibition de l'activité bactérienne des surfaces métalliques et polymères *in vitro* et *in vivo*. De façon générale, la présence du polymère à la surface engendre une modification de la conformation ou de l'orientation des protéines plasmatiques qui *in fine* repoussent l'adhésion des bactéries. Par ailleurs, le polymère bioactif améliore également la biocompatibilité des surfaces en favorisant l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Pour ce qui est du silicone, ces résultats ont été démontrés sur des quarter polymères à base de silicone et de groupements bioactifs, cependant, une telle synthèse requiert de nombreuses étapes rendant ainsi difficile une éventuelle industrialisation.

Dans ces travaux de thèse, il s'agit dans un premier temps de développer une méthode optimisée de greffage facile à mettre en œuvre afin d'accrocher de façon covalente le poly(styrène sulfonate) de sodium – polyNaSS directement sur des surfaces de silicone issues de réelles enveloppes de prothèses mammaires. Ces travaux comprendront aussi une étude des interactions surfaces/protéines, des tests de cytotoxicité des surfaces fonctionnalisées et des études mécaniques.

Le présent manuscrit sera divisé comme suit :

Chapitre 1 : Étude bibliographique qui vise à faire l'état de l'art sur les prothèses mammaires en silicone. Le chapitre va inclure une description des propriétés physicochimiques du silicone, une description des complications dont les prothèses mammaires font l'objet ainsi que leurs causes. Le chapitre vise également à présenter de

façon non exhaustive les études menées et les stratégies développées dans la littérature pour pallier les problèmes d'infections en conférant aux surfaces de silicone des propriétés biocompatibles et antibactériennes pour diverses applications.

Chapitre 2 : Une présentation du matériel et des méthodes expérimentales employées tout au long de ces travaux sera détaillée. Elle comprendra une partie sur la chimie, la biologie et la mécanique.

Chapitre 3 : Une partie résultats et discussion sera exposée pour rendre compte des résultats expérimentaux et de leurs interprétations sur la base des objectifs de départ. Des volets seront consacrés à la partie chimie (développement du greffage sur silicone), à la partie des propriétés mécaniques et biologiques et une partie concernera l'optimisation du protocole de fonctionnalisation.

Chapitre 4 : Une conclusion générale des travaux sera donnée avec les perspectives suggérées pour la suite du projet, avec une ouverture sur l'étude *in vivo* où des implants en silicone fonctionnalisés seront introduits dans l'animal pour l'étude microbiologique.

Chapitre I : Étude bibliographique

1. Généralités : les prothèses mammaires

Le silicone, communément appelé, polydiméthylsiloxane - PDMS est un matériau très largement utilisé dans des domaines divers et variés depuis des décennies : de la microfluidique [1] aux biomatériaux pour la santé (lentilles de contact [2,3], implants cochléaires [4], cathéters urinaires [5], prothèses mammaires [6,7], c'est un matériau qui possède de nombreuses propriétés. Il est perméable aux gaz, optiquement transparent et facile à mettre en œuvre ce qui permet d'obtenir une large gamme de tailles et de formes. Le matériau possède d'excellentes propriétés mécanique, notamment de flexibilité et est surtout peu cher. Dans le domaine des biomatériaux, le silicone médical-grade employé est dit « biocompatible », c'est-à-dire peu toxique [8]. Caractérisé par un squelette siloxane [7] - $[\text{O-Si}(\text{CH}_3)_2]_n$ - (Figure 1a), le silicone est connu pour être chimiquement inerte c'est-à-dire très peu réactif. Il est alors très peu sensible aux perturbations environnementales telles que l'humidité, les variations de température, et surtout les attaques chimiques ce qui s'avère être un avantage incontestable.

Sa structure chimique lui confère des propriétés surfaciques qui lui sont propres. L'absence de groupements polaires à la surface lui donne un caractère fortement hydrophobe qui peut être limitant pour certaines applications. Par exemple, pour celles qui requièrent une surface hydrophile pour permettre le passage de fluide polaire ou éléments hydrophiles. Par ailleurs, une surface hydrophobe est aussi propice au développement d'un biofilm bactérien [9]. Dans ces cas-là, il devient donc nécessaire de modifier la surface, mais cela reste un challenge de taille du fait d'un manque de réactivité de celle-ci. De nombreuses études ont été menées pour modifier les surfaces de PDMS en utilisant différentes techniques allant de la modification physique à la modification chimique. D'un point de vue physique, le silicone peut exister sous différentes formes (liquide, gel ou solide) selon le degré de réticulation des chaînes de polymères. Plus les nœuds de réticulation sont nombreux, plus le matériau tend vers l'état solide (Figure 1b).

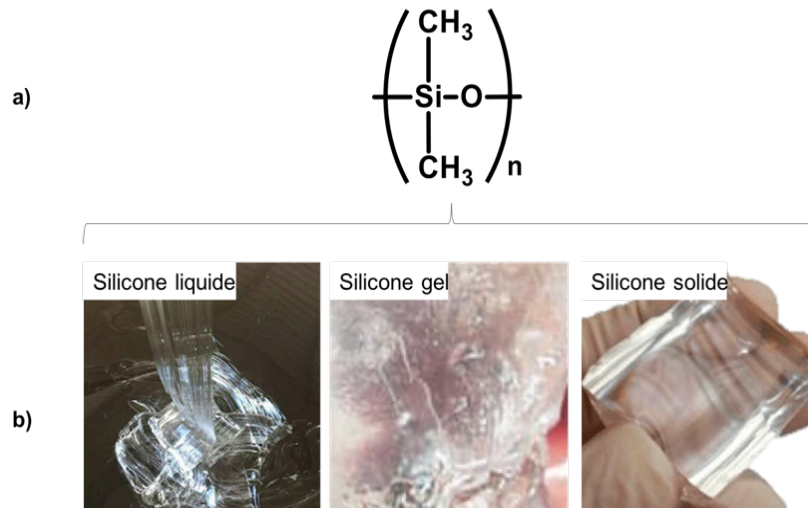


Figure 1: (a) Formule chimique du polydiméthylsiloxane – PDMS (b) Représentation des différents états du PDMS selon le taux de réticulation

Les implants mammaires sont fabriqués essentiellement à base de silicone et se composent de différentes parties : une enveloppe externe en silicone d'aspect lisse ou rugueux, un remplissage d'un gel de silicone ou de sérum physiologique, et une pastille d'occlusion qui referme l'implant.

Le procédé de fabrication des prothèses mammaires demande beaucoup de technicités, car il repose sur un travail principalement manuel et très méticuleux. La première étape est le moulage et la mise en forme de l'implant. Un moule de forme et de taille définie est successivement recouvert de plusieurs couches de silicone liquide et est laissé sécher (Figure 2a). Une fois l'enveloppe prête, un patch d'occlusion y est placé afin de refermer partiellement la prothèse, une petite ouverture est gardée par laquelle le silicone liquide sera injecté (Figure 2b-c) par la suite. Une fois remplie, la prothèse est mise en cuisson dans une étuve pour que le liquide de silicone à l'intérieur polymérise et forme ce qu'on appelle le gel de silicone (Figure 2d).

Tout au long du procédé de fabrication, des tests sont réalisés à toutes les étapes pour assurer la conformité de l'implant selon la réglementation en vigueur.

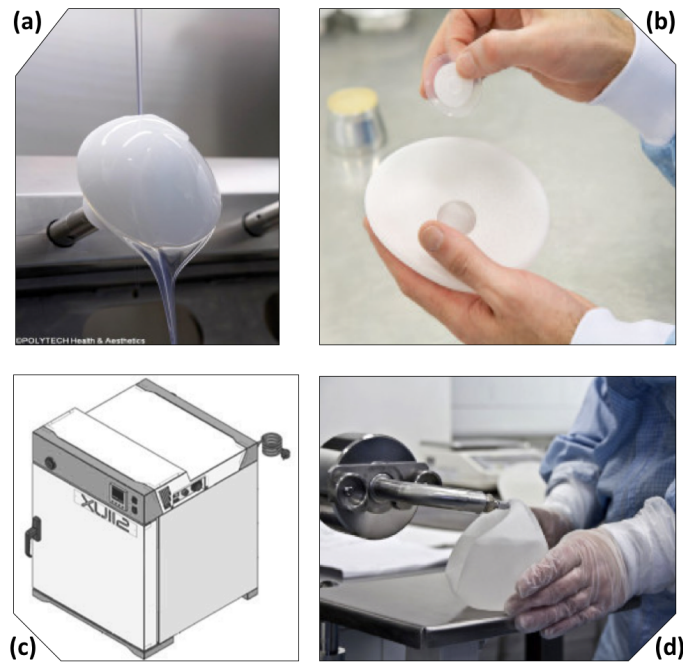


Figure 2: Processus de fabrication d'une prothèse mammaire - (a) Trempage du moule plusieurs fois dans une solution de silicone (visqueuse) puis séchage (b) mise en place de la pastille d'occlusion (c) remplissage du gel à l'intérieur de l'enveloppe (d) cuisson à l'étuve.

Avec les moyens technologiques actuels, les prothèses existent dans des formes et des tailles variables selon l'anatomie et l'effet esthétique recherché [10].

Les implants en silicone font partie du top 10 des prothèses implantables [11] utilisées pour diverses raisons : pour « réparer » dans le cas de mastectomies, pour « remplacer » dans les chirurgies de remplacements ou plus généralement pour « rendre » le corps plus harmonieux.

Récemment, les augmentations mammaires ont été pointées du doigt car elles favorisent les réponses inflammatoires à l'origine de sérieuses complications. Une déformation autour de la prothèse est d'abord observée et est définie comme la « réaction à un corps étranger ». Sur le long terme, l'enveloppe fibreuse autour de l'implant conduit à des complications telles que la calcification de la membrane responsable de douleurs et de déformations cutanées. Dans le pire des cas, cela mène au retrait et au remplacement de l'implant ce qui implique une seconde chirurgie accompagnée de tous les risques associés.

Depuis peu, une forme particulière de cancers a émergé : le lymphome anaplasique à grandes cellules associé aux implants mammaires (LAGC). Actuellement, selon l'association

Américaine des chirurgiens plastiques (American Society of Plastic Surgeons), 694 cas de lymphomes ont été rapportés dans le monde en février 2019 [12].

Exclusivement, les cas recensés sont liés à des femmes porteuses de prothèses texturées. Les données épidémiologiques ont soulevé la question de la sécurité et de la santé publique des implants mammaires en général.

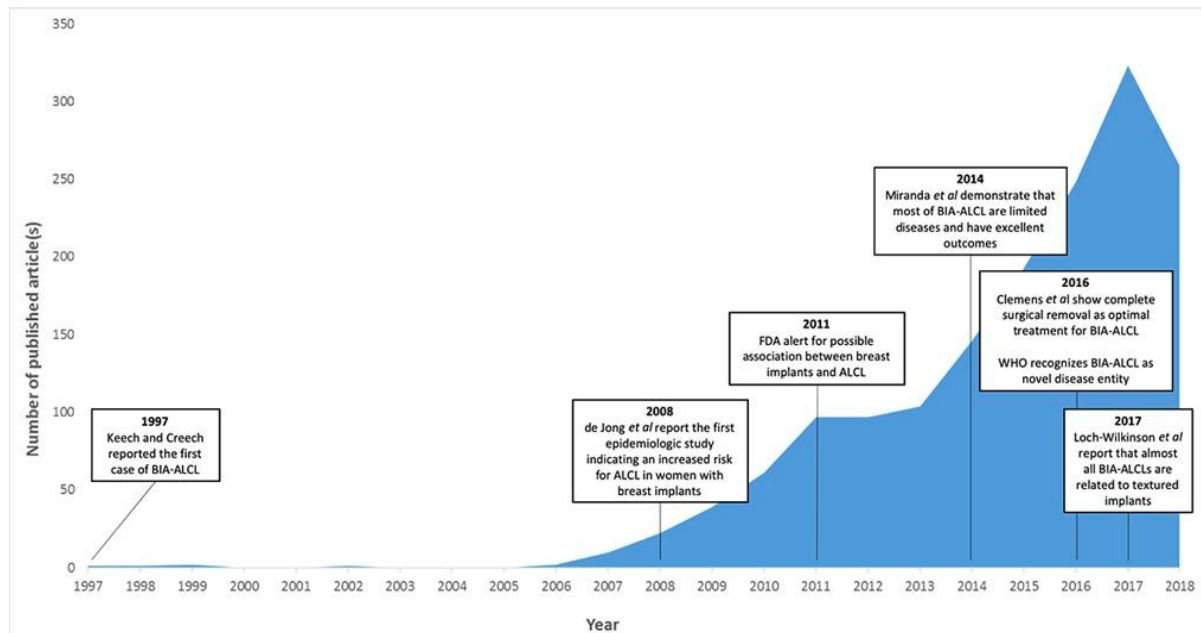


Figure 3: Évolution du nombre de publications sur le sujet du lymphome anaplasique à grandes cellules associés aux prothèses mammaires depuis le premier cas détecté en 1997 [13]

Pour rendre compte de l'inquiétude croissante qui concerne le lymphome anaplasique, la Figure 3 montre l'évolution du nombre de publications qui concerne le lymphome au cours de ces 20 dernières années [13]. Une croissance exponentielle des travaux est observée à partir de 2006. En France, le premier cas détecté remonte à 2011 et depuis 10 ans, une attention particulière est portée à l'innocuité des prothèses mammaires, surtout après l'affaire des implants PIP en 2011. En cause, l'utilisation d'un gel de silicone de taille non contrôlée qui a mené à la perspiration de ce dernier à travers la membrane de l'implant pour se répandre dans le corps. Et plus récemment en France, l'affaire relatée par « *cash investigation* » a encore souligné le manquement en matière de surveillance des dispositifs médicaux impliquant entre autres les prothèses mammaires. En conséquence, les prothèses macro-texturées sont aujourd'hui progressivement bannies du marché international.

Des études ont été menées par l'analyse microbiologique d'explants fibreux pour établir les facteurs à l'origine des LAGC. L'hypothèse principale est l'infection bactérienne (*S. epidermidis*) [14–16] localisée à la surface de l'implant qui se traduit par une réaction fibreuse excessive. L'hydrophobicité de la surface des biomatériaux en général encourage l'adsorption des protéines plasmatiques de manière non spécifique ce qui conduit à l'adhésion et la prolifération bactérienne *in fine* [17].

Prévenir la formation de biofilm est donc devenu une priorité et un challenge dans le domaine des biomatériaux. Rendre la surface antibactérienne ou antimicrobienne pour empêcher l'adhésion d'agents pathogènes et limiter la dégradation de la surface est un moyen pour limiter les futures complications [18,19]. Pour ce faire, de nombreuses techniques ont été développées en se basant sur différents mécanismes d'action. Cela implique des mécanismes visant à repousser ou à tuer les bactéries. D'un point de vue des protéines, les techniques visent à contrôler l'adhésion de celles-ci ou à moduler leur conformation. Par exemple, on peut citer l'immobilisation de biomolécules actives comme des enzymes [20], des peptides [21], des principes actifs [22,23], des polymères bioactifs [174-177], ou le recours à des éléments inorganiques et des nanoparticules (SiO_2 , TiO_2 , métaux) [79]. Ces approches impliquent aussi bien des interactions faibles ou covalentes entre les éléments et la surface.

Il est important de souligner que pour toutes surfaces une étape intermédiaire est indispensable et nécessaire pour créer des liaisons covalentes. C'est ce que l'on appelle l'étape d'activation ou d'oxydation. Celle-ci a pour but de changer la polarité de la surface en créant des groupements polaires tels que des hydroxyles ou hydroperoxydes en surface. D'autre part, cette étape est essentielle, car elle permet également d'amorcer la fonctionnalisation de surface.

Dans la littérature, différentes méthodes ont été étudiées pour activer des surfaces de silicone. L'exposition à une source d'énergie [24] est la plus fréquente avec l'utilisation du plasma à oxygène, de l'effet corona, des irradiations UV, ou encore de l'association UV/ozone. D'autres techniques impliquent une activation par voie chimique comme l'oxydation acide ou des méthodes sol-gel. La modification de la surface peut se faire à différentes échelles et de différentes façons.

En ce qui concerne les surfaces de prothèses mammaires particulièrement, des études de la rugosité de surface ont été largement menées. En effet, la rugosité peut induire une réponse biologique (adhésion cellulaire, adhésion bactérienne) ainsi qu'une réponse mécanique différente [25–27].

Ce chapitre d'introduction vise à présenter le contexte et les défis actuels concernant les prothèses mammaires et les problèmes associés. Il a aussi pour but de faire l'état de l'art des différentes méthodes rapportées dans la littérature concernant la modification de surface de silicone pour des applications différentes visant à améliorer la biocompatibilité de la surface, avec des méthodes d'activation et antibactérienne/antimicrobienne.

2. Les infections associées aux implants mammaires

2.1. Description du contexte

Récemment, une nouvelle forme de cancer a émergé et est décrite comme un rare lymphome à lymphocytes T de type non Hodgkinien. Plus largement appelé lymphome anaplasique à grandes cellules, le premier cas a été décrit en 1997 par Keech et Creech [28]. Cependant, l'inquiétude est seulement récente après un communiqué de la Food Drug Administration en 2011. Ce lymphome est exclusivement relié à la pose de prothèses mammaires texturées. Ce dernier se développe très progressivement dans le temps et ne se déclare seulement qu'après 8 à 10 ans conduisant à de sévères complications. C'est un cancer du système immunitaire qui se développe dans les tissus cicatrisants autour de l'implant. Au cours du temps, le cancer peut se répandre dans les nœuds lymphatiques proches de l'implant. Le lymphome se caractérise par la présence d'un sérome persistant qui cause des douleurs et des déformations cutanées visibles. Une surproduction de la protéine kinase du lymphome anaplasique ALK1 est observée [29]. L'origine de cette pathologie reste pourtant floue, mais des hypothèses ont été émises pour expliquer la maladie telles qu'une dégénérescence de la capsule fibreuse, des réactions inflammatoires, ou une immunodéficience. Toutefois, le diagnostic précoce peut prévenir l'aggravation de ce lymphome. Comme le problème survient à l'interface des implants, l'hypothèse d'une dégénération de la capsule est la plus probable. On spécule que l'élément déclencheur d'une inflammation chronique est lié à la présence d'un important biofilm bactérien autour de

l'implant qui mène à la production de lymphocyte en cause dans le LAGC. Le port d'implants texturés est plus propice au développement d'un lymphome anaplasique comparé à des implants lisses.

La formation d'une capsule « post-opérative » autour de l'implant fait partie du processus naturel de guérison qui survient automatiquement quand un matériau est implanté. Cette dernière vise à créer une fine barrière protectrice entre le corps étranger et le milieu biologique. Cependant, cette capsule peut évoluer vers une forme sévère qu'on appelle « contracture capsulaire » (CC). Même si les origines restent incertaines, on suppose que c'est une pathologie à cause multifactorielle qui inclut l'état de santé du patient, les conditions d'opérations ainsi que les propriétés physicochimiques liées à l'implant.

En général, les CC sont la complication la plus fréquente après la pose de prothèse de sein qui implique la plupart du temps une chirurgie de révision [30]. L'investigation de la composition des explants est nécessaire pour établir les causes de telles complications. Un pêle-mêle de protéines de la matrice extracellulaire est retrouvé avec les principales cellules du système immunitaires telles que les lymphocytes, les macrophages, ou les fibroblastes accompagnés de colonies bactériennes concentrées [31]. D'un point de vue anatomique, les contractures capsulaires se caractérisent par la contraction et le durcissement de la capsule. Le sein peut être enflammé, compressé et douloureux. La sévérité de la capsule est définie selon la classification de Baker [32] approuvée par la Food Drug Administration :

- Grade I : Le sein a une texture correcte et la forme semble naturelle en taille et la capsule n'est pas contractée.
- Grade II : L'aspect du sein semble normal, mais un peu ferme au toucher.
- Grade III : L'aspect du sein est légèrement difforme, le sein est dur au toucher.
- Grade IV : Le sein est dur, douloureux, et les déformations sont clairement visibles. La contracture de la capsule est sévère.

Ces complications soulèvent la question de la biocompatibilité du silicone, qui est une notion fondamentale dans le domaine des biomatériaux. La biocompatibilité se définit

généralement comme « la capacité d'un matériau à performer avec une réponse de l'hôte adaptée pour une application donnée » selon D.F William en 1999 [33].

À ce jour, d'après les données statistiques, les cas rapportés de lymphome sont reliés aux implants texturés [34,35]. Cela suggère que des facteurs environnementaux favorisent l'adhésion et la prolifération bactérienne, et ainsi que l'activation des lymphocytes T durant les inflammations chroniques [36].

L'analyse microbiologique des biofilms bactériens montre une présence en grande concentration de microorganismes tels que les *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) incrustés dans une matrice extracellulaire (Figure 4). Une étude récente a mis en évidence la présence spécifique d'une souche *Ralstonia pickettii*, une bactérie du sol à Gram négatif. En effet, Hu *et al.* [37] ont comparé les microbiomes de lymphome avec les microbiomes de capsules non tuméreuses. Les résultats ont montré que la présence de *Ralstonia pickettii* était en proportion inhabituellement importante. En général, la sévérité de la contraction capsulaire est directement corrélée à la quantité de bactéries présente [15] ce qui nous amène à l'hypothèse de l'infection bactérienne dans ce cas-là.

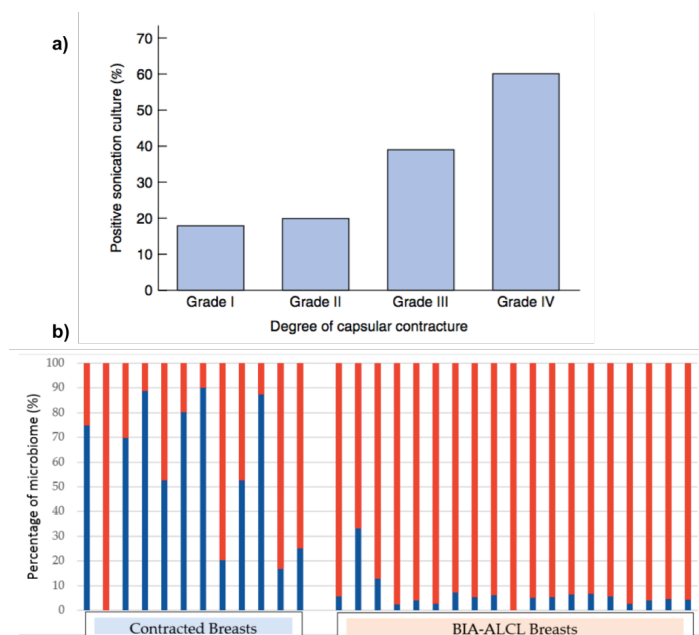


Figure 4: (a) Corrélation entre la sévérité des contractures capsulaires et la concentration en bactérie (b) analyses des microbiomes d'explants issus de contractures capsulaires ou de lymphomes anaplasiques avec la prévalence des bactéries à Gram positif ou négatif [15,30]

- La chaîne de réaction biologique à l'apparition du lymphome

L'introduction d'un implant dans le corps humain provoque une réponse biologique positive ou négative. Dans le cas des implants mammaires, la pose entraîne la formation d'une capsule protectrice autour de l'implant. *In fine*, celle-ci permet un bon maintien de la prothèse dans le corps. Cependant, si une infection bactérienne survient, une cascade de réactions de défense du système immunitaire s'amorce et conduit à une forme sévère de fibrose. La réaction fibrotique excessive peut endommager la capsule protectrice provoquant des infections subcliniques [38,39]. De nombreux mécanismes chimiques et biologiques interviennent en amont de l'apparition des complications en elles-mêmes avec l'adsorption des protéines plasmatiques puis la formation d'un biofilm.

- Adsorption non-spécifique des protéines

La présence d'un implant dans le corps conduit inévitablement à une réaction à un corps étranger. La première étape de cette réaction consiste en une adsorption non spécifique de protéines plasmatiques à la surface (Figure 5) dès les premiers instants. Ce phénomène est favorisé par l'hydrophobicité du matériau. À ce stade, deux protéines concourent à la surface : l'albumine et la fibronectine. Au niveau physiologique, l'albumine est plus concentrée que la fibronectine, respectivement de 40 g.L⁻¹ et de 200 mg.L⁻¹. Cependant, l'attachement cellulaire est principalement piloté par la présence de la fibronectine, car ses récepteurs RGD reconnaissent les intégrines présentes sur les membranes cellulaires [40].

2.2. Formation du biofilm

Costerton *et al.* ont introduit la notion de biofilm en 1978 après avoir observé des colonies de micro-organismes dans les plaques dentaires [41]. Après l'adsorption non spécifique des protéines, le biofilm se forme et est décrit suivant un modèle défini en plusieurs étapes (Figure 5): (i) attachement réversible et rapide de quelques bactéries planctoniques à la surface (ii) formation de micro-colonies par des attachements irréversibles avec la couche protéique (Couche de biomolécules [42]) puis à terme (iii) maturation du

biofilm qui prend de l'ampleur. À la fin, (iv) celui-ci atteint une structure tridimensionnelle et se détache pour se répandre dans le milieu biologique. Au cours de ces réactions, l'accumulation de matériaux biologiques (cellules, protéines, fluides) compose ce qu'on appelle le mucus polysaccharidique appelé « slime » qui facilite l'agrégation et l'adhérence du biofilm à la surface. Les bactéries adhèrent à la couche protéique grâce à leurs adhésines (MSCRAMMS) présentes sur leurs membranes permettant leur fixation à la surface de l'implant [43,44]. La reconnaissance entre les récepteurs des protéines et des adhésines provoque l'infection à long terme. Par la suite, la formation du biofilm déclenche une série de réactions du système immunitaire apparaissant comme une nécessité afin de contrôler l'homéostasie du système biologique connu comme la réponse inflammatoire [45]. L'inflammation est la réponse des tissus vasculaires à l'implantation qui vise à contenir, à diluer, et à éliminer les éléments toxiques.

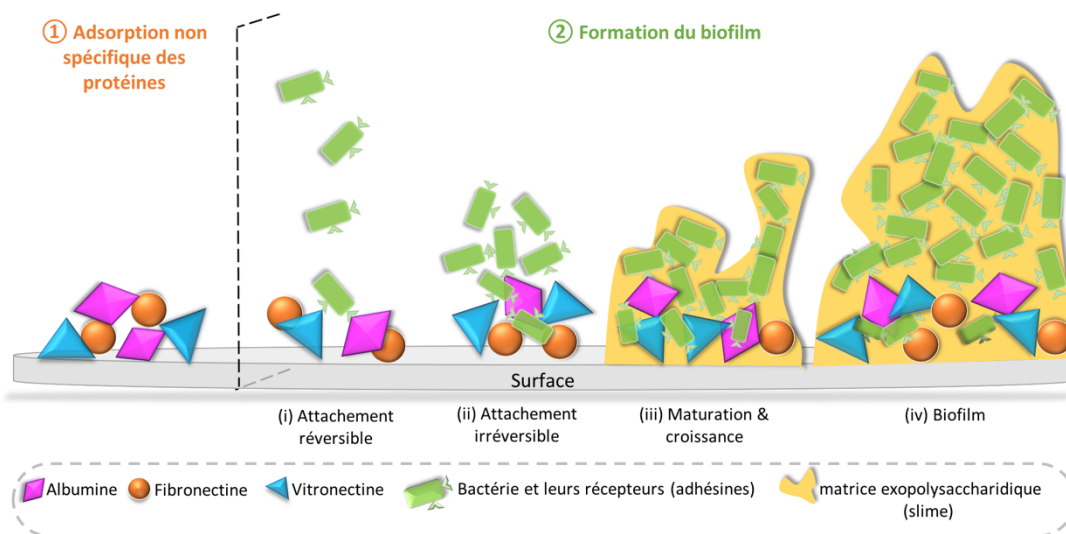


Figure 5: Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien après insertion d'un implant dans le corps

La réponse inflammatoire :

Au cours de la réaction inflammatoire, une multitude de cellules du système immunitaire sont recrutées et la nature de celles-ci à l'instant t est moment dépendante. En effet, l'arrivée des phagocytes caractérise la phase primaire de la réponse inflammatoire, ces derniers vont détecter puis détruire les micro-organismes. En parallèle, les lymphocytes fabriquent des

anticorps pour réguler la réponse immunitaire. Dans un premier temps, des neutrophiles arrivent, mais dû à leur courte durée de vie (24-48h), ils sont rapidement remplacés par des monocytes dont la durée de vie est supérieure (quelques semaines). Ensuite, ces derniers se différencient en macrophages capables de produire une variété de produits biologiquement actifs vis-à-vis de l'inflammation tels que des protéines, des enzymes, des radicaux libres, ou des facteurs de croissance. Les protéases lysosomiales et les radicaux libres peuvent endommager le matériau. L'inflammation aiguë survient quelques jours après. Une surproduction de fluides et de plasma est observée puis les neutrophiles induisent une fibrose avec le relargage de métalloprotéases matricielles, d'élastases et de cathepsines [46]. L'inflammation devient chronique lorsqu'il y a une réaction localisée avec des cellules proches de la surface de l'implant. Des monocytes et lymphocytes sécrètent les interleukines IL-6 et IL-10 [30] qui influencent l'activité des macrophages entraînant leur fusion en cellules géantes. De plus, les macrophages induisent la sécrétion de cytokines qui à leur tour sollicite les fibroblastes pour synthétiser du collagène. Le sac de collagène formé a une épaisseur entre 50 et 200 µm [47]. Les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes prolifèrent autour de l'implant pour former du tissu granulaire dans le processus de la guérison naturelle. La fibrose est la dernière étape de la réaction inflammatoire [48] en réponse à la présence d'un implant. À ce stade, les cellules environnantes vont s'adapter phénotypiquement à la structure endommagée de l'implant avec une perte de la fonctionnalité principale de ce dernier.

Pour résumer, la contamination bactérienne avec formation d'un biofilm apparaît comme la raison principale de l'apparition de contractures capsulaires ou de lymphome anaplasique. C'est ainsi que, des méthodes et stratégies ont été étudiées et élaborées pour pallier les problèmes d'infections en se basant sur des mécanismes divers et variés tels que :

- Le contrôle de l'adsorption non-spécifique de protéines plasmatiques
- La réduction de l'adhésion bactérienne par des actions de préventions, répulsions ou bactéricides.
- Le relargage de molécules actives (principes actifs)

Outre l'aspect antibactérien, il est important de prendre en considération que les techniques employées n'affectent pas de façon négative, l'adhésion, la prolifération, et la viabilité cellulaire mais au contraire la renforcer. Ainsi, l'association entre une surface antibactérienne et biocompatible permettrait d'avoir une surface de silicone bio-optimisée (Figure 6).

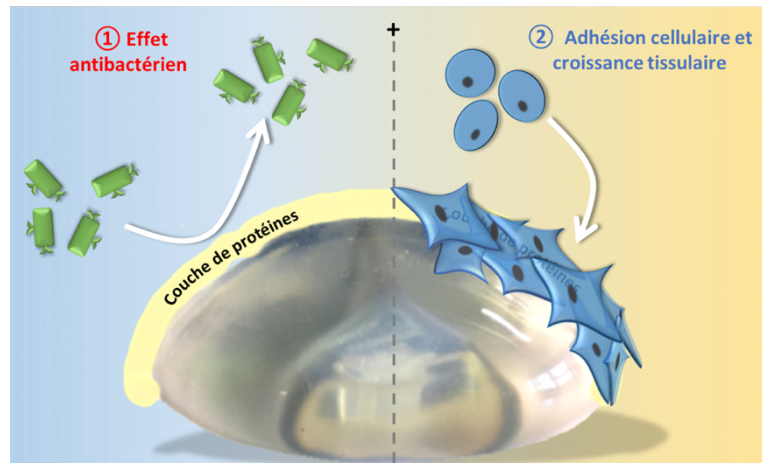


Figure 6: Une double fonctionnalité des surfaces de silicone pour une réponse biologique optimale

3. L'amélioration de la bio-activité des implants en silicone : propriétés antibactériennes et biocompatibilité

3.1. Modifications physiques : topographie et rugosité de surface

Les implants texturés sont depuis peu progressivement retirés du marché international car ils sont responsables de l'apparition des lymphomes anaplasiques à grandes cellules [49]. Cependant, il n'existe pas à ce jour de lien établi entre le niveau de rugosité d'une surface et la formation d'un biofilm bactérien et cela fait l'objet de nombreuses investigations. À l'origine, le développement de surfaces texturées avait un but esthétique et surtout un but mécanique pour maintenir l'implant en place dans le corps. La conclusion de plusieurs études a montré qu'une grande surface spécifique et la présence de cavités profondes à la surface favorisent grandement l'adhésion bactérienne. De plus, des études menées sur les implants à base de polyuréthanes ont montré qu'une texturation importante conduisant à une meilleure intégration des tissus autour de l'implant. Néanmoins, la relation entre la texturation, l'apparition du lymphome anaplasique et les infections bactériennes reste un sujet à débat. Selon Barr *et al.* [50], la rugosité des prothèses mammaires peut être

classée comme suit : lisse/nanotexturée (80-100 nm), microtexturée (100-200 μm), macrotexturée (200-300 μm), et macrotexturées-plus (>300 μm).

D'un point de vue technique, il existe plusieurs méthodes qui permettent de créer des irrégularités des surfaces de façon plus ou moins contrôlée. La technique de sablage est la plus courante : l'enveloppe de silicone n'étant pas encore complètement solide, est plongée dans un bac contenant des cristaux de sels plusieurs fois ce qui donne cet aspect rugueux.

3.1.1. Rugosité et contractures capsulaires

Les premières études sur les contractures capsulaires (CC) remontent dans les années 1980 et depuis, l'échelle de Baker est utilisée pour évaluer la sévérité de celles-ci. À la fin des années 1990, plusieurs études ont montré que les implants texturés diminuaient le taux d'incidence des CC ou du moins, ils ont permis de prévenir l'évolution des CC vers une forme sévère [51,52]. Une comparaison entre des implants texturés et des implants lisses a montré qu'une surface lisse conduisait à des stades plus avancés de CC. En considérant les stades 3 et 4 de Baker, les CC surviennent dans 58 % des cas en présence d'implants lisses et seulement, 8 % dans le cas d'implants texturés (Figure 7) [51].

Quelques années plus tard, Malata *et al.* [53] ont observé des résultats similaires montrant qu'après trois ans, le taux d'incidence des CC était de 59 % et de 11 % respectivement sur les implants lisses et texturés. Cela confirme aussi que la formation des capsules survient dès les premières années post-implantation.

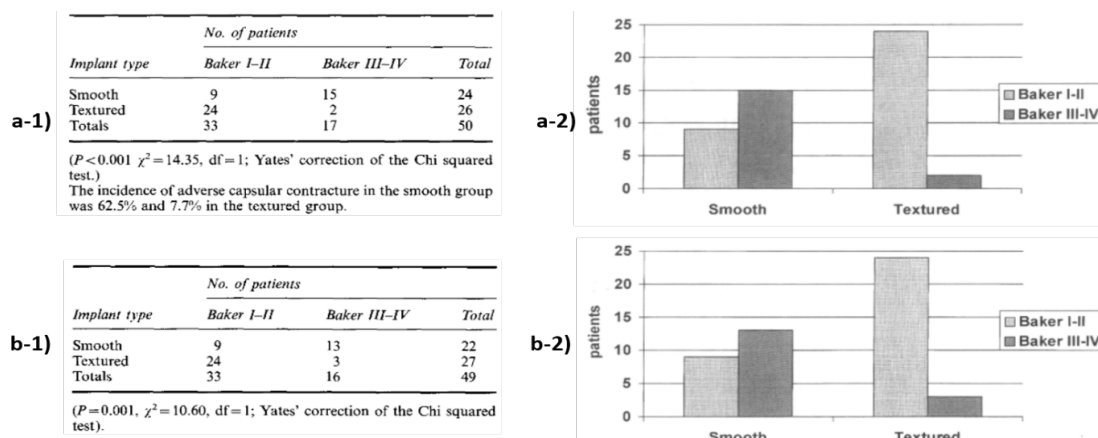


Figure 7: Incidence de la sévérité des capsules issues de contractures capsulaires selon la rugosité des implants

En mesurant l'épaisseur des capsules fibreuses par imagerie par résonance magnétique, Fischer *et al.* [52] ont comparé l'épaisseur et les compositions histologiques des implants lisses et texturés sur un modèle de rongeur. Les auteurs ont conclu que les surfaces lisses ont une coque plus fine, mais plus dense avec une forte concentration en fibroblastes et en fibres de collagène comparé aux surfaces texturées à court terme. Toutefois, à long terme, les capsules formées sur implants texturés sont comparables à celles observées sur les implants lisses.

L'origine des contractures capsulaires et du lymphome anaplasique demeurent cependant floue. Une des explications les plus courantes est attribuée à l'organisation des fibres de collagène à la surface. La présence de rugosité à la surface induit une désorganisation des fibres de collagène rendant la capsule non-contractile ce qui prévient les formes sévères de contractures. De même, l'arrangement des cellules environnantes diminue aussi les forces de contractiles des capsules [54]. Il est supposé que plus l'attachement entre la surface et la capsule est important, moins sévère sera la capsule [55]. Par ailleurs, les surfaces texturées permettent une meilleure croissance et adhésion cellulaire ce qui à terme empêchent l'apparition des capsules [56]. Valencia-Lazcano *et al.* [57] ont caractérisé le comportement des fibroblastes sur les implants lisses et texturés, respectivement des modèles commerciaux Mentor siltex/Allergan Biocell et Mentor/Allergan. Une augmentation de l'attachement cellulaire est mise en évidence sur les implants rugueux malgré la forte hydrophobicité de surface. Cependant, des publications ont au contraire montré qu'il n'y avait pas d'influence de la texturation de surface sur le taux d'incidence des contractures capsulaires en fonction du niveau de rugosité [58].

Malgré le potentiel de la texturation dans la prévention des contractures capsulaires sévères avec en plus une amélioration de l'adhésion cellulaire, la rugosité favorise aussi l'adhésion bactérienne et le mûrissement d'un biofilm. En 2017, Loch-Wilkinson *et al.* [59] ont statistiquement souligné que la formation de biofilm était reliée à l'emploi d'implants texturés (Figure 8).

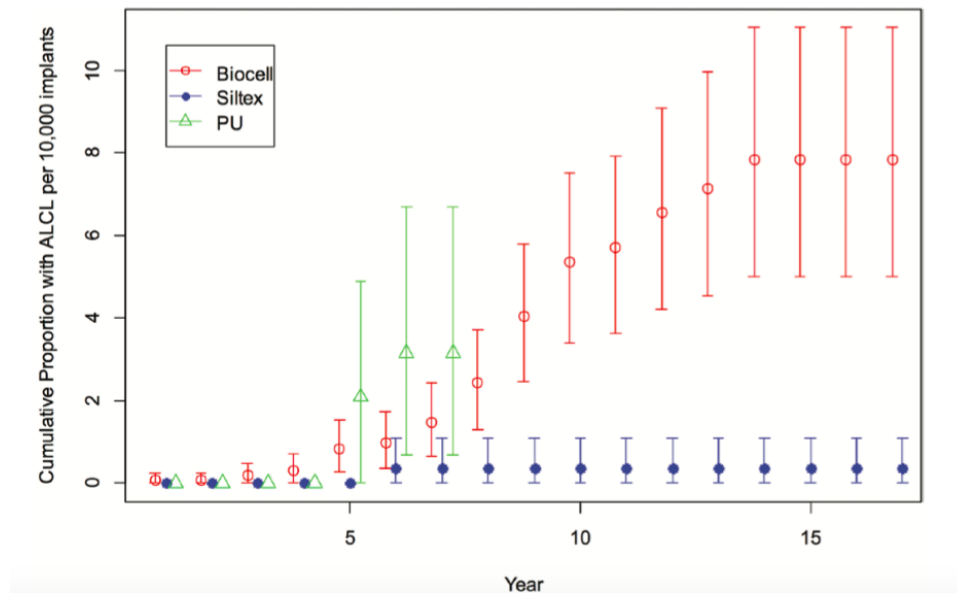


Figure 8: Incidence du taux de lymphome anaplasique à grandes cellules selon la rugosité des prothèses

3.1.2. Rugosité et adhésion bactérienne

Les biofilms sont les principales complications rencontrées dans le domaine des biomatériaux [15][60]. Pour cette raison, une grande attention est portée à l'étude de la relation entre les infections subcliniques provoquées par le développement des colonies de bactéries et la texturation/rugosité des surfaces. Dans un premier temps, il est important de noter que les bactéries adhèrent peu sur des surfaces non vivantes. La présence d'intermédiaires tels que des protéines est donc nécessaire pour l'attachement des bactéries aux surfaces [61]. La matrice extracellulaire autour d'un explant révèle une composition assez hétérogène (collagène, protéines, bactéries, cellules du système immunitaire).

James *et al.* [62] ont comparé différentes textures de surface d'implants mammaires issues de différentes marques. L'étude porte sur l'observation de l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm en présence de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *Ralstonia pickettii*. Les résultats ont montré que l'attachement bactérien et la formation du biofilm étaient plus importants avec les *P. aeruginosa* sur des surfaces hautement texturées. Par ailleurs, des disparités ont été constatées lorsqu'il s'agissait des souches de *S. epidermidis* et de *R. pickettii*, car aucune corrélation évidente n'a été observée entre la surface spécifique et la densité du

biofilm. Probablement que le comportement vis-à-vis d'une surface dépend étroitement de la souche bactérienne impliquée.

Une autre étude suggère que le développement de contracture capsulaire se fait de la même façon sur des implants lisses ou texturés, mais que la différence réside dans la concentration en *S. epidermidis* retrouvée [63]. Les surfaces rugueuses favorisent l'apparition précoce et rapide de biofilm comparé aux surfaces lisses. Une corrélation entre le nombre de bactéries et le degré de sévérité des contractures capsulaires a été démontrée. Les lymphocytes T qui résultent de la contamination ont été détectés en grande quantité sur des implants texturés par rapport aux implants lisses [64].

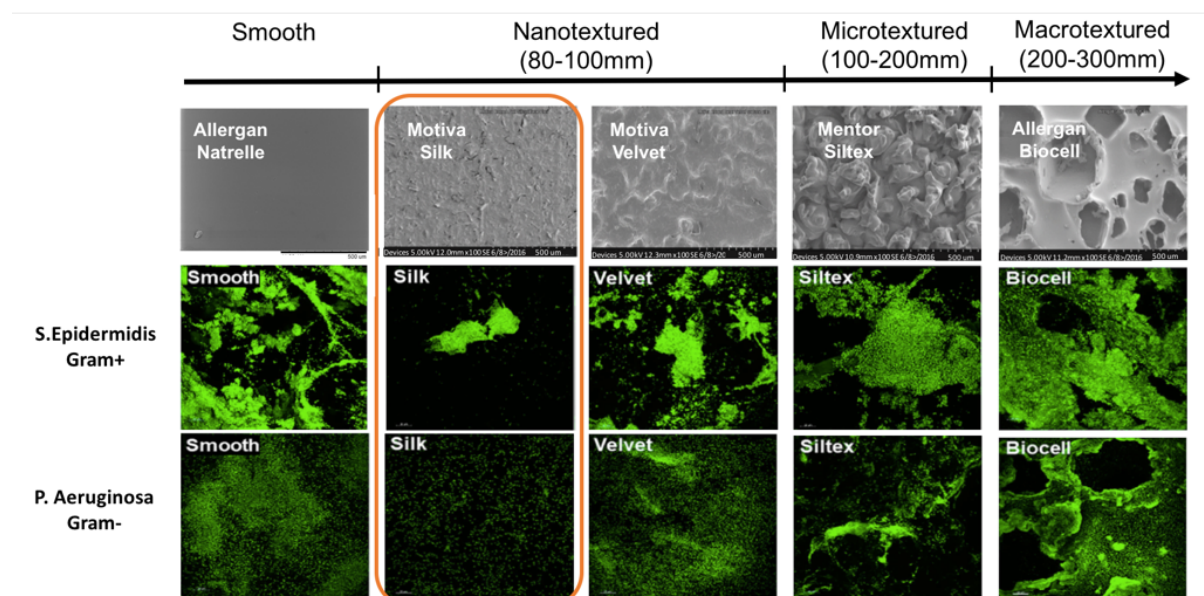


Figure 9: Classification des surfaces de prothèses mammaires en silicone selon la rugosité et intensité de l'adhésion bactérienne correspondantes [50][62]

De manière plus approfondie, Manav *et al.* [63] ont étudié *in vivo*, la croissance des bactéries en fonction de la rugosité des surfaces de silicone. L'infection bactérienne est induite avec un milieu de *S. aureus* suivi ou non d'une administration d'antibiotiques (Rifamycine). Les résultats ont montré que les surfaces texturées et les surfaces en polyuréthane conduisent à une concentration plus élevée en bactéries que leurs antagonistes. Les bactéries ont tendance à se nicher dans les « pores » des rugosités. Comme illustrées dans la Figure 9, les surfaces extrêmement rugueuses sont plus à même de promouvoir l'adhésion bactérienne.

Les contractures capsulaires observées sur les implants texturés se caractérisent par une épaisse coque et une densité importante de macrophages. Globalement, l'administration locale de Rifamycine a permis de prévenir le développement des bactéries mais n'a pu réduire les CC. La structure dite spongieuse des implants en polyuréthane et leur hydrophilie inhérente ont permis une meilleure pénétration et dispersion des antibiotiques conduisant à une plus forte résistance à l'inflammation et donc par conséquent limite le développement de CC. La forte intensité de fluorescence des bactéries sur les prothèses Biocell témoigne d'une densité importante des bactéries à Gram positifs et Gram négatifs. Contre intuitivement, cela ne signifie pas que les surfaces lisses sont exemptées d'adhésion bactérienne comme on peut le voir sur la Figure 9 dans le cas des surfaces Allergan-Natrelle. De façon intéressante, on note que les prothèses nano-texturées Motiva silk semblent attirer moins de bactéries comme en témoigne la plus faible fluorescence. Cela explique l'importance d'un certain niveau de rugosité.

Après avoir établi une classification des prothèses mammaires en fonction de la texturation de surface, Barr *et al.* [50] ont étudié les propriétés chimiques de ces surfaces en corrélation avec des tests d'adhésion cellulaire afin d'évaluer la biocompatibilité de ces matériaux. Le côté hydrophobe du silicone est plus exacerbé lorsque la rugosité est grande, c'est pourquoi les implants lisses sont moins à même d'attirer les bactéries et favoriser leurs développements.

Finalement, d'un côté, les implants texturés minimisent l'apparition des CC et évitent les CC de grade avancé. De même, ils favorisent l'adhésion et la prolifération cellulaire. D'un autre côté, d'un point de vue statistique, il a été montré que les lymphomes anaplasiques n'ont lieu qu'avec des implants texturés. Ce paradoxe mène à penser que pour atteindre une surface de biocompatibilité idéale, il est nécessaire de trouver un équilibre optimal entre un certain niveau de rugosité et une surface qui possède des propriétés antibactériennes.

3.1.3. Les propriétés mécaniques des implants en silicone

L'aspect mécanique est un paramètre essentiel qui apparaît dans le cahier des charges de n'importe quel type de dispositif implantable. Ces propriétés mécaniques incluent les propriétés intrinsèques du matériau et le stress mécanique qu'il peut endurer par l'action des tissus environnant et les mouvements naturels de la vie. Des paramètres tels que les modules d'élasticité ou la perméabilité doivent particulièrement être pris en compte avant et après toutes modifications de surface. En effet, le choix de la nature du matériau implanté dépend de la localisation de l'implant et donc des contraintes qu'il peut subir. Par exemple, un matériau dur et résistant sera choisi pour le remplacement ou le soutien de tissu osseux tandis qu'un matériau souple et flexible sera préférable pour les tissus mous.

Les prothèses mammaires en silicone sont souples et permettent d'épouser la forme et le contour du sein. L'enveloppe de silicone est qualifiée d'élastomère ce qui signifie que le matériau peut se déformer sous contrainte mais qui peut retrouver sa forme initiale lorsque celle-ci est relâchée. Les élastomères sont caractérisés par un module d'élasticité faible signifiant qu'une faible contrainte conduit à une grande déformation.

Dans certains cas, les prothèses mammaires sont sujets à un phénomène de « perspiration » où le gel de silicone traverse l'enveloppe de l'implant pour se répandre dans le corps et causer des dommages importants. Un manque de contrôle de la réponse mécanique des implants peut favoriser la perspiration. Par conséquent, les propriétés élastiques du matériau ne doivent pas être négligées lors de la modification de surface. En effet, la plupart du temps, les modifications de surface de silicone impliquent des réactions physico-chimiques plus ou moins violentes. Ces traitements ne sont pas sans conséquences d'un point de vue mécanique. Par exemple, l'exposition à de puissantes sources ionisantes peut impacter les propriétés intrinsèques du matériau en le fragilisant et provoquer la perspiration ou dans le pire des cas la rupture de l'implant. Le plus souvent, ces méthodes augmentent le taux de réticulation du silicone, autrement dit elles réduisent son élasticité. Dans le processus de fabrication de ces prothèses, de nombreuses normes doivent être respectées afin de garantir une qualité maximale des implants. Des tests de traction, d'usure et de perméabilité, ainsi que le contrôle de l'épaisseur des enveloppes sont nécessaires pour valider la conformité de l'objet.

3.2. Revêtement de surface

Le revêtement de surface aussi appelé « coatings » est un outil largement utilisé pour combattre les infections de nature bactérienne grâce à leur facilité d'utilisation et de mise en œuvre. Généralement, le protocole repose sur la simple immersion de l'implant dans la solution de revêtement. C'est une technique de routine employée dans les blocs opératoires avant toutes chirurgies pour prévenir les infections en utilisant des antiseptiques comme la Bétadine ou le peroxyde d'hydrogène. Aujourd'hui, des méthodes de revêtement plus complexes ont été développées impliquant notamment des combinaisons d'antibiotiques ou l'usage de nanoparticules visant à tuer les bactéries.

3.2.1. Antibiotiques

Depuis la découverte de la pénicilline par A. Flemming en 1929 [65], les antibiotiques sont largement utilisés pour prévenir les infections bactériennes. Une des approches consiste à immerger l'implant dans une solution d'antibiotiques en amont de l'opération. Par ailleurs, l'administration d'antibiotiques peut aussi se faire une fois que l'infection survient. Dans ces cas-là, à cause de l'épaisseur de la capsule autour du biomatériau, les antibiotiques pénètrent plus difficilement le biofilm et s'avèrent moins efficaces.

Dans le cas des augmentations mammaires, les antibiotiques de premières lignes sont la première génération de céphalosporines. La combinaison standard cefazoline/gentamicine/bacitracine est employée comme solution de lavage des prothèses avant implantation pour limiter le risque de développer une contracture capsulaire (CC). Cependant, Drinane *et al.* [66] ont comparé le taux d'incidence de l'apparition de CC sévères entre la combinaison des trois antibiotiques et un traitement placebo qui utilise une solution saline. Les résultats n'ont montré aucune différence évidente entre les deux traitements. Il n'y a pas d'augmentation du risque de CC dans les deux cas, ce qui prouve l'inefficacité des antibiotiques. Dernièrement, Baker et son équipe [67] ont démontré qu'*in vivo*, l'immersion des implants en silicone dans de la doxycycline a permis de réduire significativement le risque d'infection comparé à la précédente méthode. Pour ce faire, avant implantation, les surfaces ont été inoculées avec une solution de *Staphylococcus aureus* méticilline résistant (MRSA) ou de *P. aeruginosa*. Les résultats ont montré une nette diminution de la colonisation

bactérienne sur les implants avec la doxycycline dès 3 jours. Une autre stratégie consiste à cibler d'une part la nature de la bactérie identifiée par ultrasonication d'une coque contractile sévère et d'autre part spécifiquement le site d'infection. Cette méthode repose sur la combinaison de deux antibiotiques dont les cibles sont différentes [68].



	surgical site infection	capsular contracture
microorganism	 Staph. aureus	 Coagulase neg. Staph. Propionibact. spp. Bacillus spp.
virulence	+	-
antibiotic prophylaxis	cephalosporins	glycopeptides (vancomycin)

Figure 10: Traitement aux antibiotiques selon le type de microorganisme visé et le site d'infection [68]

Les céphalosporines visent principalement le site d'infection chirurgicale en interagissant avec les *S. aureus*, alors que la vancomycine (glycopeptide) cible les contractures capsulaires en interagissant avec les bactéries à coagulase-négative (Figure 10). Cette combinaison est plus efficace et adaptée pour les applications de prothèses mammaires et semble être intéressante.

Miller *et al.*[69] ont mené une étude *in vivo* sur un modèle de rat, où ils ont implanté des surfaces de silicone non-modifiées pour induire la formation d'une capsule physiologique. Un mois plus tard, ils provoquent l'infection en injectant volontairement un agent infectieux de type *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (MSSA). Les rats reçoivent ensuite une dose d'amoxicilline associée à de l'acide clavulanique pour détruire le biofilm. Les résultats ont montré une corrélation évidente entre l'épaisseur de la capsule et la concentration de bactéries calculées. Fait intéressant, la quantification des agents vasculaires (myofibroblastes, collagène) est un bon indicateur pour évaluer la sévérité de l'infection à la périphérie de l'implant. En effet, ces derniers ont été détectés dans des quantités significatives sur les surfaces infectées en comparaison avec les surfaces non infectées. Ainsi, la formulation en antibiotique d'une solution de revêtement semble avoir un effet majeur dans la prévention de l'adhésion bactérienne.

Par ailleurs, Barnea *et al.* [70] ont mis en évidence l'effet de surface sur la qualité de revêtement d'un matériau. En effet, les surfaces de silicone ayant subi une oxydation par plasma ont permis un revêtement d'antibiotiques de meilleure qualité. Par conséquent, cela se traduit par une inhibition significative du développement des bactéries à Gram positifs et Gram négatifs comparés à des surfaces non traitées. Cette différence peut s'expliquer par des interactions plus fortes entre la solution d'antibiotiques et la surface grâce aux fonctions chimiques créées par le traitement par plasma. Il y a alors moins de délamination du revêtement et donc une action bactéricide plus importante.

En 1998, Li *et al.* [71] ont développé une stratégie pour réduire l'activité bactérienne sur des implants péniens en silicone en vaporisant la surface d'un antibiotique avant implantation. Les auteurs ont étudié *in vitro* et *in vivo* la croissance des bactéries sur ces surfaces (*S. Aureus* et *S. epidermidis*). Statistiquement, la Rifampidminocycline, la vancomycine, ou l'amikacine n'ont montré aucune diminution significative de la colonisation bactérienne après sept jours. Une autre étude [72] a montré la prévention de la prolifération bactérienne sur des cathéters de silicone après imprégnation dans une solution contenant de la minocycline et de la rifampicine et un antiseptique du type Chlorhexidine et sulfadiazine d'argent. L'analyse clinique a montré que l'infection du sang a considérablement diminué avec la présence de bactéries.

L'incorporation d'agents antimicrobiens tels que le triclosane (biocide très utilisé) entre des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) couplées à une surface de silicone, a été étudiée pour contrer les infections bactériennes. *In vitro*, McBride *et al.* [73] ont montré que le greffage de PEG a permis le relargage de triclosane à long terme comparé à des surfaces non-pegylées, respectivement de 99% et 65% après deux mois. Cependant, d'un point de vue bactérien, les surfaces non-pegylées contenant seulement 1 % en masse de triclosane ont permis de prévenir la formation du biofilm à court terme. Avec la même quantité de triclosane, l'ajout du PEG a permis d'avoir un effet sur le long terme. Ainsi, la combinaison entre la nanotechnologie et les antibiotiques est aussi un moyen pour lutter contre les bactéries. L'emploi des nanosphères de Chlorhexidine a montré une efficacité contre les souches bactériennes après 15 jours *in vivo* [74]. L'inhibition bactérienne se produit très rapidement après seulement 24 h avec une grande ou petite dose de nanosphères.

3.2.2. Nanoparticules

Concernant les contractures capsulaires, le recours aux nanoparticules pourrait être une solution intéressante pour combattre l'adhésion bactérienne ou moduler la réponse protéique. Les nanoparticules (NPs) sont définies comme étant des matériaux de taille extrêmement petite variant entre 1 et 100 nm. Grâce à leurs nombreuses propriétés, les NPs sont de bons agents contre les bactéries [75]. Il existe une vaste gamme de NPs, parmi laquelle on cite les nanoparticules métalliques (cuivre, zinc, argent, titane, fer, magnésium, or), les nanoparticules d'oxydes (MO-NPs), ou les nanoparticules polymériques. Cependant, pour les applications biomédicales, selon la FDA, la durabilité de telles stratégies est assez limitée et parfois cytotoxique.

- **Nanoparticules d'argent**

Depuis longtemps, les nanoparticules d'argent (AgNPs) sont connues pour leurs excellentes propriétés antimicrobiennes grâce à leurs interactions avec les fonctions thiols (-SH) présents dans les éléments qui composent les bactéries (enzymes, protéines), qui peuvent mener à leur destruction [76]. Par exemple, l'activité antibactérienne des AgNPs sur le propylène pré-activé par effet corona a été investiguée par Ghorbanu et Molaei [77]. Les images de microscopie électronique à balayage suggèrent que l'activité bactéricide (*S. aureus* et *E. coli*) des NPs augmente avec la puissance et le temps d'exposition à la décharge. Sur des cathéters en silicone [78], le recouvrement d'une fine couche de nanoparticules d'argent a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Les résultats ont montré une réduction significative de la formation du biofilm avec les souches les plus communément retrouvées dans les infections. Les biomatériaux revêtus de nanoparticules d'argent apparaissent alors comme une stratégie prometteuse pour vaincre les infections.

- **Nanoparticules d'oxydes métalliques (MO-NPs)**

Les nanoparticules d'oxyde métallique (ZnO, MgO, CuO, Ag₂O, TiO₂) attirent également l'attention grâce à leur action sur une large gamme de microorganismes (Gram négatifs et Gram positifs) juste en faible concentration [79]. Les MO-NPs sont aussi de bons agents pour catalyser la production d'espèces toxiques telles que les dérivés réactifs d'oxygène (ROS) en induisant un stress oxydatif aux bactéries [80,81].

Principalement la photo-oxydation des molécules d'eau et de l'oxygène induit la production de dérivés réactifs d'oxygène (groupements hydroxyles, anions superoxydes, et hydroperoxydes). Ces derniers ciblent les structures membranaires des bactéries. L'incorporation de nanophase de titane dans la matrice des élastomères de silicone diminue le taux des *S. aureus* et limite aussi leur adhésion et prolifération à la surface. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries par les nanophases de titane est temps-dépendant. Après 3 heures, le taux de perte des cellules est plus important. De même, en fonction de la taille des bactéries, la rupture des membranes est plus ou moins longue [82].

La fonctionnalisation des surfaces de silicone avec nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2) portant des groupements amines confère une double fonction photo-réactive au matériau [83]. Le matériau possède à la fois un rôle bactéricide (*E. coli*) plus la concentration en TiO_2 est élevée, et à la fois un rôle cellule-promoteur (fibroblastes) en favorisant le développement cellulaire lorsque la concentration en groupements amines est élevée. La densité optimale des groupements amines est estimée à 3 molécules/nm².

Les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) se démarquent des autres oxydes, car ils ont une action sur une grande variété de bactéries. Ozkan *et al.* [84] ont amélioré l'activité antimicrobienne des surfaces de silicone en incorporant des particules d'oxyde de zinc et un marqueur coloré cristal violet par un procédé de gonflement-encapsulation. Le silicone ainsi dopé a montré une activité photo-bactéricide significative après 1 heure et 4 heures respectivement contre les *S. aureus* et les *E. coli*. La différence en matière de temps s'explique par la différence de susceptibilité entre les souches gram-positif et gram-négatif. Les mêmes résultats ont été observés sur du silicone médical-grade avec une stabilité à long terme, en ajoutant du cristal violet et de l'acide di(octyl)phosphinique encapsulé dans des nanoparticules de zinc [85].

Le revêtement par immersion (dip-coating) du silicone dans une solution d'oxyde de cuivre (CuO-NPs) améliore également l'activité antibactérienne (<2wt%) [86]. La présence des nanoparticules en surface augmente l'hydrophobicité et la rugosité de cette dernière. La surface traitée augmente la viabilité et la prolifération des cellules ostéoblastiques (MG63), accompagnée d'une activité antibactérienne. Cependant, la concentration en CuO-NPs doit être minutieusement contrôlée car si elle est trop concentrée les nanoparticules s'agrègent

et deviennent hautement cytotoxiques. Une concentration de 0,5 % en masse est optimale pour favoriser le développement cellulaire et tuer les bactéries simultanément. Cette méthode est d'un grand potentiel pour des applications dans le domaine des biomatériaux.

D'un point de vue bactériologique, les films d'oxyde de silicones contenant du zinc et du cuivre par un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma [87] avec une distribution homogène des métaux dans la matrice ont permis d'obtenir une surface antibactérienne contre les bactéries *E. coli*, sans cytotoxicité apparente pour les cellules. L'activité antibactérienne optimale est trouvée avec une formulation à 0,2 % de cuivre et 2,3 % de zinc. De façon intéressante, une différence cinétique est observée, l'effet bactéricide agit en quelques heures tandis que l'inhibition agit seulement après quelques jours

- **Nanoparticules glycolysées**

De nos jours, privilégier une chimie écoresponsable autant que possible est un critère essentiel. C'est pourquoi des études s'intéressent à l'association de nanoparticules et de biomolécules pour renforcer la biocompatibilité des implants. Par exemple, l'action des nanoparticules d'argent associées à des glycoprotéines (exopolysaccharide produit par les *Kocuria rosea*) a été étudié [88]. Les nanoparticules d'argent glycosylées détruisent les *S. aureus* et les *E. coli* par la formation de dérivés réactifs d'oxygène tels que des radicaux hydroxyles par exemple. L'action bactéricide est basée sur la destruction de l'architecture cellulaire. La présence des résidus glycosidiques favorise l'activité bactéricide, car ils facilitent la pénétration des nanoparticules dans les membranes des bactéries. La prolifération des fibroblastes quant à elle n'est pas perturbée.

Park *et al.* [89] ont fonctionnalisé des surfaces de silicone activées par plasma pour des applications ophtalmiques avec des nanofilms de polysaccharides composés de carboxyméthylcellulose et de chitosane par un procédé de dépôt couche après couche. Le nanofilm rend la surface superhydrophile. La lutte contre l'adhésion bactérienne est pilotée par le relargage d'agents anti inflammatoires. Parallèlement, la cytotoxicité du revêtement sur des kératinocytes a montré une viabilité cellulaire de plus de 98 %.

La réduction ou la limitation de la formation du biofilm peut également se faire en modulant l'adsorption non spécifique de protéines. Bračić *et al.* [90] ont développé un protocole « vert » pour empêcher l'adhésion des protéines sur les surfaces de silicone. Un

revêtement bicouche a été réalisé avec un glycosaminoglycane anionique (acide hyaluronique) et un surfactant cationique biocompatible dérivé de la lysine. Cette association conduit à la répulsion de l'albumine sérum bovin par rapport à des surfaces contrôles revêtues. De même, la présence de fibrinogènes à de faibles concentrations a été observée par QCM-D. *In vitro*, la croissance des *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *C. albicans* ont été réduits de 85%. Avec cette méthode, l'hydrophilie de la surface est maintenue jusqu'à 60 jours en conservant les échantillons dans un milieu aqueux. Sur le même principe, Mohan *et al.* [91] ont empêché l'adhésion non contrôlée des protéines (albumine et fibrinogène) en revêtant les implants en silicone d'acide hyaluronique carboxylé et d'un polysaccharide sulfaté (fucoidan). Parallèlement, le revêtement a permis de repousser les *S. aureus*.

La fixation de polysaccharides biocompatibles comme le carboxyméthylcellulose (CMC), le carboxyméthyl-1,3-dextran (CMD), et l'acide alginique (AA) se fait par une réaction de photocatalyse [92]. Le mécanisme de répulsion vis-à-vis des protéines se base sur les interactions électrostatiques entre les polysaccharides et les charges de surface. Les résultats ont montré que les CMD et AA chargés négativement sur des surfaces de silicone inhibent l'adsorption de l'albumine elle-même chargée négativement. Pour autant, le CMD et l'AA favorisent l'adsorption des lysozymes chargés positivement. Enfin, le silicone revêtu de CMC empêche les deux types de protéines de s'adsorber et améliore la viabilité des neurones ainsi que la cytocompatibilité.

Les microfilms composés d'un mélange de gélatine et de glutaraldéhyde peuvent aussi conférer des surfaces idéales pour l'adhésion et la croissance cellulaire avec une amélioration de la mouillabilité de la surface. Des cellules sphériques sont observées sous microscope optique témoignant d'une bonne adhésion cellulaire. Néanmoins, les auteurs ont souligné que la composition en glutaraldéhyde est importante pour assurer la stabilité du film, mais une quantité trop élevée pourrait s'avérer toxique [93].

3.2.3. Autres méthodes

- **Collagénisation**

Le collagène est une protéine structurale abondante de la matrice extracellulaire et est connu pour son rôle dans l'encapsulation des corps étrangers dans les dernières étapes de la réponse inflammatoire. De ce fait, une méthode intéressante serait de recouvrir en amont le matériau de collagène pour améliorer la biocompatibilité en évitant l'apparition d'un biofilm. Keranov *et al.* [94] ont greffé un acide acrylique sur des silicones activés par plasma suivi de l'immobilisation de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) de tailles variables portant deux groupements amines. L'immobilisation du collagène est facilitée par la présence de PEG ce qui a permis l'amélioration des interactions cellulaires avec le silicone de façon significative selon la taille du polymère. Une taille moyenne de PEG (6000 Da) est optimale pour initier l'adhésion et la prolifération des fibroblastes (Figure 11e) par rapport à des chaînes plus petites ou plus longues qui ne permettent pas d'atteindre la même densité cellulaire (Figure 11d/f).

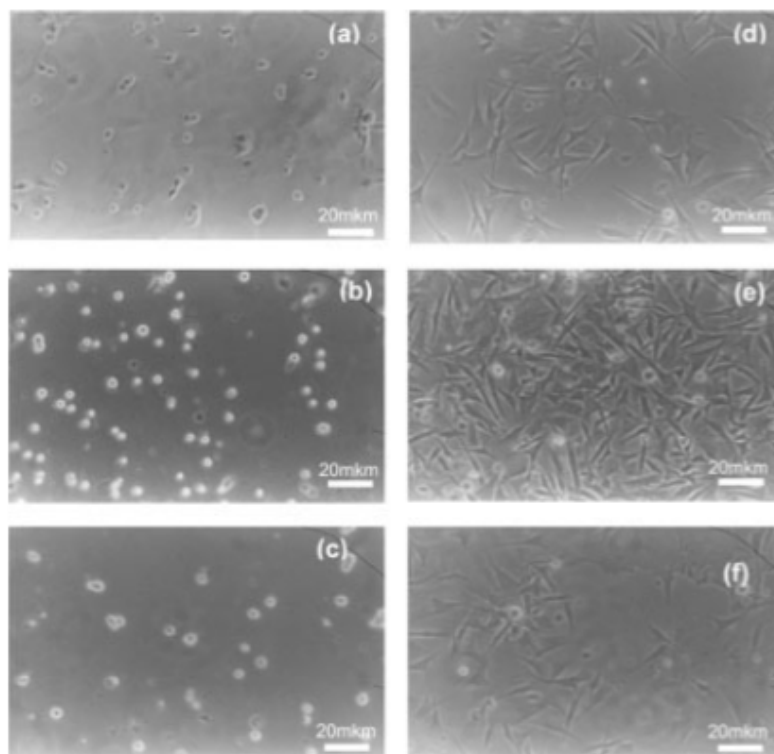


Figure 11: Morphologies de fibroblastes humains sur de silicones activés par plasma et sur des surfaces fonctionnalisées par l'acide acrylique couplé à des chaînes de PEG de différentes longueurs : (a) diNH₂-PEG₂₀₀₀, (b) diNH₂-PEG₆₀₀₀, (c) diNH₂-PEG₂₀₀₀₀ /adsorption de collagène : (d) diNH₂-PEG₂₀₀₀/collagène, (e) diNH₂-PEG₆₀₀₀/collagène, (f) diNH₂-PEG₂₀₀₀₀/collagène

Le revêtement de collagène de type I sur des implants en silicone par plasma améliore aussi l'affinité cellulaire pour la surface [95]. Les tests d'adhésion et de viabilité cellulaire ont été évalués par des tests de biocompatibilité avec des fibroblastes de souris (3T3) en utilisant des colorants tels que la calcéine-AM et l'iodure de propidium. *In vitro*, les auteurs montrent que la présence de collagène a conduit à une augmentation de l'adhésion cellulaire et de la viabilité ce qui est encourageant pour une éventuelle reconstruction des tissus environnants. Nablo *et al.* [96] ont étudié *in vivo* l'activité bactéricide des oxydes nitriques (NO) qui relarguent du xérogel avec une méthode sol-gel sur du silicone médical grade. Les résultats montrent une diminution de 82 % du nombre d'implants infectés lorsqu'ils sont recouverts de NO. Les résultats histologiques ont montré que la réponse à un corps étranger en réponse aux implants modifiés est comparable aux résultats observés sur des implants non traités. L'efficacité du relargage de xérogel dans cette étude suggère que le revêtement par ces oxydes nitriques est une solution intéressante pour réduire le taux d'infections lié aux biomatériaux.

Enfin, Ozkan *et al.* [97] ont développé des films de polymères recouverts de cuivre par dépôt chimique en phase vapeur assisté par aérosol (AACVD). Le cuivre a permis de réduire les activités des *E. coli* et des *S. aureus* de l'ordre de 4 log en nombre avec une différence d'ordre cinétique. Les *E. coli* sont tués plus rapidement que les *S. aureus*, cela est probablement dû à la différence de morphologie et de métabolisme entre les deux souches. D'un autre côté, l'augmentation de la mouillabilité de recouvrement a permis une excellente adhésion et prolifération cellulaire.

- **Graphène**

Le graphène est un matériau caractérisé par une couche de carbone organisé de manière hexagonale dont l'empilement constitue ce que l'on appelle le graphite. Cette organisation structurale particulière confère au matériau ses avantages : une grande surface spécifique, une conductivité thermique et électrique et de remarquables propriétés catalytiques [98]. Sous forme oxydée ou réduite, le graphène est un matériau très réactif. Il peut servir de support pour le greffage de molécules telles que des peptides ou des nanoparticules grâce à la présence de groupements réactifs comme des hydroxyles ou des carboxylates après oxydation.

Biologiquement, le graphène possède une double fonction quand il s'agit d'infections bactériennes. Il peut engendrer des (1) dommages physiques sur la membrane des bactéries par la présence de sommets et côtés pointus du matériau et (2) des dommages chimiques par induction d'un stress oxydatif par transfert de charge et formation d'espèce réactive de l'oxygène. Dans les configurations, cela conduit à la mort des bactéries.

Les nanomatériaux à base de carbone attirent l'attention depuis peu pour leurs propriétés antibactériennes. Le revêtement d'oxyde de graphène sur des surfaces de silicone ont montré un effet antibactérien plus important contre les *E. coli* que les *S. aureus* dû à leurs membranes plus fines [99]. La perte évidente de l'intégrité de la membrane a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage responsable de la fuite du cytoplasme et de ses composants vers l'extérieur.

Le degré d'oxydation du graphène est également un paramètre important pour moduler ses propriétés bactéricides. Gomes *et al.* [100] ont étudié les propriétés antibactériennes des nanoplatelets de graphène (GNP) sous leurs formes oxydées ou non, ainsi que les diverses techniques employées pour recouvrir les surfaces de silicone de graphène. Le revêtement par pulvérisation des GNP non oxydés a permis un recouvrement homogène et hautement concentré. À l'inverse, la méthode de simple immersion (dip-coating) aboutit à une concentration plus faible en GNP mais a permis une plus forte activité antibactérienne. De façon contre-intuitive, une concentration élevée en GNP favoriserait l'adhésion bactérienne. Comparativement, les meilleurs résultats bactéricides sont obtenus avec le graphène oxydé.

D'autres méthodes impliquent une approche biomimétique utilisant la soie d'araignée comme solution de revêtement. Cette technique minimise les chances de développer une contracture capsulaire sévère grâce à la diminution de la capsule fibreuse, car la soie réduit l'adhésion des fibres de collagène [101].

En conclusion, malgré des résultats prometteurs, les procédés de revêtement impliquent un attachement de nature non-covalente des molécules/espèces actives à la surface. En effet, le coating permet une durabilité à court terme, car une délamination de la solution active est inévitable au cours du temps. Ce phénomène s'accroît avec la friction de l'implant avec les tissus et liquides environnants. De plus, le contrôle de l'épaisseur lors d'un

revêtement est assez difficile à évaluer. C'est pourquoi les recherches se tournent plutôt vers des modifications de surfaces de nature covalentes.

3.3. Modifications de surface par voie covalente

3.3.1. Activation /oxydation : une étape préalable à la modification covalente

La présence de groupement méthyles (Si-CH_3) dans la structure chimique du silicone est responsable de sa forte hydrophobicité et sa faible réactivité. Pour modifier le silicone, une étape dite d'activation (ou oxydation) est nécessaire au préalable afin de générer des groupements réactifs polaires à la surface, notamment des groupements hydroxyles. Pour cela, il existe de nombreuses méthodes physiques ou chimiques. L'activation va améliorer la mouillabilité de la surface la rendant plus hydrophile et les groupements réactifs formés peuvent servir de point d'accroche pour le greffage ultérieur de molécules.

- Activation par exposition à des sources d'énergie

La stabilité chimique et physique du silicone rend difficile son activation. Cependant, le recours à des techniques hautement énergétiques permet de modifier la structure chimique à la surface du silicone. Ces modifications visent à moduler la mouillabilité de la surface, l'adhésion cellulaire, et l'adhésion protéique et parfois conférer des propriétés antibactériennes aux surfaces. Les méthodes suivantes reposent sur l'exposition des échantillons de silicone à des sources ionisantes qui délivrent des molécules hautement réactives. Les différentes méthodes impliquent l'utilisation du plasma, l'UV/ozone, ou les irradiations UV (Figure 12).

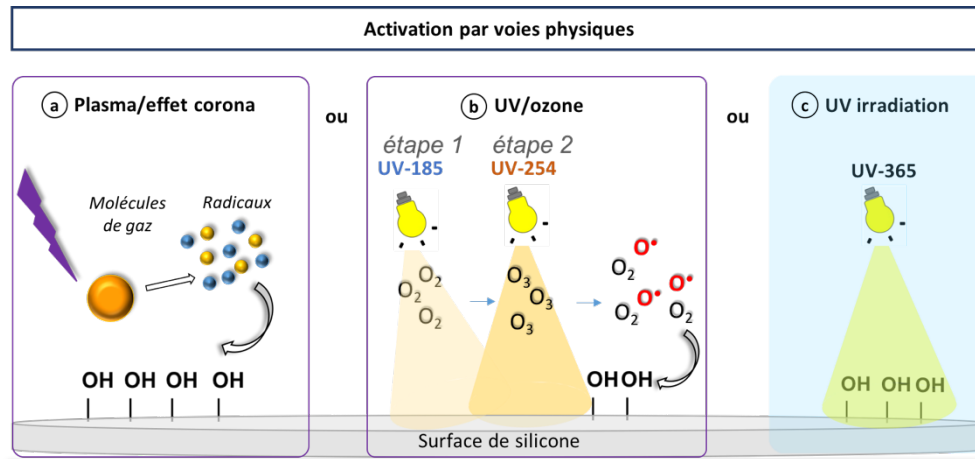


Figure 12: Activation des surfaces de silicone par des sources hautement énergétiques : (a) techniques de plasma, (b) combinaison entre des irradiations UV et de l'ozone gazeux, (c) irradiations UV seules en milieu aqueux

3.3.1.1. Le traitement par plasma sous vide

Le plasma est une technique rapide, efficace et largement utilisée pour activer des substrats de silicone en créant une couche de silice [102]. L'ionisation des molécules de gaz sous vide conduit à la création d'espèces hautement énergétiques comprenant des électrons, des ions, et des radicaux (Fig12-a).

Le plasma d'oxygène induit effectivement la formation de silanols tout en augmentant la mouillabilité de la surface [103]. Pourtant, les surfaces activées redeviennent hydrophobes assez rapidement dans le temps. Par conséquent, les conditions de conservation des silicones activées sont importantes. Maintenir les échantillons dans de l'eau distillée ou des solvants polaires permet d'allonger la durée de vie de ces groupements en surface pendant plusieurs semaines. De plus, il a été montré que plus le temps d'exposition au plasma est long, plus longtemps la surface restera hydrophile : 50-60 ° (plus de 6h à température ambiante)[104]. Une autre étude [105] a montré que la conservation des silicones plasma-activés dans un bouillon de Luria-Bertani était efficace pour maintenir l'hydrophilie, caractérisée par de très bas angles de contact autour de 10-20 ° au lieu de 20-30 ° dans de l'eau. Il a été montré que les bactéries à gram-négatifs telles que les *E. coli* étaient moins à même d'adhérer aux surfaces hydrophiles. Il a également été constaté que l'effet des traitements par plasma était d'autant plus marqué lorsque la puissance est importante. Dans certaines applications, le plasma est utilisé comme adhésif pour sceller deux surfaces très rapidement [106].

La compréhension du retour rapide à l'hydrophobicité des surfaces après traitement par plasma a été l'objet de vives investigations. La réorientation des groupements polaires nouvellement formés de la surface vers l'intérieur de celle-ci est une des hypothèses [107]. Une autre explication repose sur l'existence de chaînes de silicone de faible poids moléculaires qui migrent de l'intérieur de l'échantillon vers l'extérieur à travers le réseau tridimensionnel. Par ailleurs, les dégradations de la surface provoquées par le bombardement avec des particules de hautes énergies peuvent également influencer le retour à l'hydrophobicité [108]. Cependant, en dehors des moyens de conservations, de nombreuses solutions ont été étudiées et développées pour s'affranchir de ce problème, parmi celles-ci on cite le recours au greffage covalent de molécules chimique pour une mouillabilité durable dans le temps [109–112].

- Stabilité de l'activation par plasma : le recours à la silanisation

Comme décrit précédemment, malgré l'efficacité du plasma pour introduire des groupements réactifs oxygénés sur des surfaces de silicone, le retour rapide à l'hydrophobicité est un frein pour les applications qui nécessite une mouillabilité durable. Pour cette raison, l'attachement de molécules contenant des groupements silanes (silanisation) sur les silanols générées par plasma telles que des alkoxy silane peut être employé. La silanisation des surfaces permet une hydrophilie durable et par la même occasion, les silanes introduisent de nouvelles fonctionnalités chimiques ($-NH_2$, $-SH$) à la surface. Ces dernières peuvent servir de point d'accroche dans le greffage de biomolécules telles que des peptides, des polymères, ou des protéines selon l'application recherchée. Ainsi, les propriétés à l'interface d'un matériau jouent un rôle crucial dans le contrôle des interactions d'une surface avec les éléments du système biologique en modulant leurs adhésions, proliférations, ou viabilités [113].

En 1993, Ferguson *et al.* [114] ont adsorbé des monocouches auto assemblées d'un alkylsiloxane (SAM) par adsorption d'alkylthiochlorosilanes sur des surfaces préalablement activées par plasma. L'hydrophilie qui en résulte est largement comparable à celle des SAM adsorbées sur des substrats de référence (wafers de silicone, or). Une autre étude a souligné l'effet de l'adhésion cellulaire au contact des SAM de silanes. En effet, la présence de SAMs issue de la réaction entre le (3-aminopropyl)triethoxy silane (APTES) et le glutaraldéhyde sur

des surfaces activées par plasma a augmenté la bio affinité et la biocompatibilité du matériau [115]. Ce sont des surfaces qui sont propices à l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses (MSCs), qui de plus ont conservé pleinement leurs propriétés pour induire une bonne régénération ostéogénique par rapport à des surfaces contrôles. En outre, ces mêmes SAMs déposées sur du silicone par déposition couche après couche a permis le greffage d'une couche homogène de collagène de type I [116]. Dans cette étude, les auteurs ont amélioré l'adhésion cellulaire grâce à la présence de collagène d'autant plus favorisée par la rugosité de surface créée par le traitement plasmatique. Ces résultats sont une piste prometteuse pour stimuler l'adhésion et la formation de tapis cellulaires pour répondre à la demande de l'ingénierie tissulaire par exemple.

3.3.1.2. Effet corona : un plasma à pression atmosphérique

L'effet corona ou effet couronne [117] est une forme de plasma localisée. Il repose sur une décharge électrique partielle qui résulte de l'ionisation du milieu dans un environnement conducteur. L'effet corona se réalise dans des conditions de pression atmosphérique, alors que le plasma se fait dans des conditions de vide. Cependant, par rapport au plasma, cette technique permet d'ioniser une plus faible densité de molécules, mais pour autant elle permet la formation rapide et efficace de groupements polaires à la surface [118].

Les particules hautement réactives sont générées par l'application d'une forte différence de potentiel pour ioniser les molécules de gaz. Ces dernières sont transformées en radicaux, électrons, ou ions qui peuvent interagir avec la surface. Les changements chimiques et structuraux des surfaces vont alors faciliter les futures modifications de surfaces. Similairement, au traitement par plasma, ce procédé peut dégrader la surface si le temps d'exposition est trop long [119]. La décharge électrique coronaire a été un outil pour étudier la perte rapide d'hydrophilie lorsque les surfaces de silicone étaient oxydées par plasma [120]. La tension électrique appliquée, l'humidité et les conditions de vieillissement influencent effectivement les vitesses de rétablissement de l'hydrophobicité. De plus, les auteurs ont montré que la conservation sous vide des échantillons oxydés ralentissait le retour à l'état initial comparé à un stockage à l'air libre. La migration *in situ* des chaînes de faibles masses moléculaires générées pendant le processus d'activation participe activement au retour à

l'hydrophobicité. Les forces d'adhésion évaluées par microscopie à force atomique en fonction de temps de retour à l'état initial après exposition à l'effet corona est utilisé pour suivre ce retour.

3.3.1.3. La chambre UV/ozone

L'UV/ozone (UVO) repose sur une photo-oxydation où les atomes localisés à la surface du matériau sont excités par des irradiations UV avec une lampe Mercure à basse pression [121,122]. Habituellement, l'UV/ozone intervient dans le processus de désinfection de surface. Mais en chimie, cette technique permet d'oxyder des surfaces, d'augmenter l'hydrophilie de celles-ci, et de former des résidus organiques qui s'accompagnent de la formation de molécules telles que le CO_2 , H_2O ou O_2 .

Le principe de l'UVO (Fig. 12-b) repose sur l'émission de deux types de longueur d'onde ayant des rôles différents. En premier a lieu la photolyse des molécules de dioxygènes avec l'UV-185 nm pour former de l'ozone (O_3). Puis, les UV-254 nm transforme l'ozone formé en dioxygène avec une forte susceptibilité à l'oxydation par un mécanisme de dissociation : les méthyles sont oxydés en silanol. Cette méthode est moins agressive que les traitements par plasma. En effet, ces dernières dégradent moins les surfaces mais sont plus longues à mettre en œuvre. Le traitement UVO peut être réalisé à faible irradiance 28 mW/cm^2 et à faible distance source-surface (6 mm). L'exposition des surfaces conduit à la formation d'une couche de silice (SiO_2) et des couches sub-oxydes (SiOx) dont l'épaisseur augmente avec le temps d'exposition. Après 3 heures, les surfaces de silicone deviennent hydrophiles, les angles de contact passent de 110° à 43° . L'étude a montré qu'un silicone (11000 g/mol) de fort poids moléculaire favorise la formation de SiO_2 comparée à des silicones de poids moléculaires plus faibles (1500 g/mol ou 3000 g/mol). Cette couche de silice permet de maintenir un caractère hydrophile plus longtemps. Les auteurs ont montré que selon la technique de préparation des échantillons, l'efficacité de l'UVO était différente. En effet, outre la structure chimique du matériau, les rugosités de la surface jouent également un rôle dans la réactivité de cette dernière. Berdichevsky *et al.* [123] se sont intéressés à l'effet de l'UVO sur la réduction de l'adsorption des analytes dans les microcanaux de silicone seulement avec l'augmentation de la mouillabilité des surfaces avec des angles de contact mesurés à 50° . L'exposition à l'UVO [124] permet aussi de générer des groupements

hydroxyles (-OH) sur le poly(dimethylsiloxane) (PDMS) pour amorcer le greffage du poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) pour des fins d'extraction de l'ADN. Sur du poly(vinylméthylsiloxane) (PVMS), l'oxydation de la surface avec l'UVO se fait en seulement 30 secondes sans en modifier les propriétés mécaniques. Par rapport au PVMS, un temps plus long est nécessaire pour oxyder le PDMS pour atteindre la même densité de groupements polaires. Ceci est dû à une différence de réactivité.

Par ailleurs, la présence des groupements hydroxyles favorise d'autant plus les réactions d'adsorption d'organosilanes par exemple [125]. Shamsavan *et al.* [126] ont greffé un acide poly(acrylique) (PAAc) sur des surfaces de silicone par polymérisation radicalaire par transfert d'atome (Si-ATRP). L'UVO a été utilisé pour créer des groupements réactifs initiant l'accrochage de molécules silanes par des liaisons hydrogènes qui ont ensuite permis d'amorcer le greffage de PAAc. Peu de dégradation de surface a été observée, et la transparence du matériau a été préservée.

3.3.1.4. Les irradiations UV

Plus récemment, l'équipe LBPS a développé une technique rapide et facile à mettre en œuvre pour activer des surfaces de silicone issues de prothèses mammaires avec la seule utilisation des irradiations UV [127] à l'aide d'une lampe Mercure à basse pression source (LOT ORIEL – 365 nm). Expérimentalement, il s'agit d'exposer les surfaces de silicone aux UV pendant une heure en milieu aqueux (Figure 12c). L'équipe LBPS a montré que des groupements hydroxyles ont été formés à l'issue de l'activation (bande FTIR à 3600 cm^{-1}) qui s'accompagne d'une diminution de l'angle de contact de l'ordre d'une dizaine de degrés même si la surface reste hydrophobe. Cette méthode permet de former des groupements hydroxyles stables. Une explication en détails sera donnée dans la partie 1 des résultats et discussions.

D'un point de vue mécanique, il est supposé que les UV induisent la rupture des liaisons C-H des groupements méthyles (-CH₃) pour créer des radicaux CH₂•. De plus, comme la réaction se produit dans un milieu aqueux, les UV rompent les molécules d'eau menant à la recombinaison des CH₂• et des •OH formant ainsi une liaison CH₂-OH.

Le défi majeur de ces techniques impliquant l'exposition à des sources de haute énergie est de trouver l'équilibre optimal entre la formation des groupements réactifs et le moment où la surface commence à se dégrader.

- **Activation par méthodes physico-chimiques**

En parallèle des activations par des sources hautement énergétiques, il existe des méthodes qui impliquent des oxydations par voie chimique. Parmi celles-ci, on cite les activations en solutions acides, les procédés solution-gélification (sol-gel), ou les dépôts chimiques en phase vapeur (CVD). La Figure 13 illustre le principe de chacune de ses méthodes.

3.3.1.5. H_2O_2/H_2SO_4

Le mélange piranha est une solution largement utilisée pour oxyder des surfaces métalliques comme le titane par exemple [128]. Le piranha est un mélange de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'acide sulfurique (H_2SO_4) selon un ratio 3 : 1 [129,130]. La réaction qui en résulte est fortement exothermique et au contact d'une surface elle permet la formation de groupements réactifs tels que des hydroperoxydes (-OOH) ou des hydroxyles (-OH) au bout de quelques minutes (Fig. 13a). Cependant, la réaction peut s'avérer violente sur des matériaux à base de silicone, il est alors parfois nécessaire de réduire le temps d'immersion ou de moduler les ratios H_2O_2/H_2SO_4 . Par exemple, Yang *et al.* [131] ont réalisé une réaction de silanisation en greffant des groupes méthacrylates par le biais de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate sur des silicones activés dans du piranha pendant 30 secondes. Néanmoins, une durée prolongée du silicone dans l'acide entraîne une dégradation de la surface. En effet, après 45 secondes, des craquelures et une perte d'hydrophilie sont observées. Alternativement à l'acide sulfurique, il est possible d'utiliser de l'acide nitrique qui conduit à une réaction moins agressive. Sur le silicone issu de l'enveloppe externe de prothèses mammaires (1-2 mm d'épaisseur), l'équipe LBPS a montré que le traitement piranha dégradait de manière irréversible la surface quasi instantanément après immersion [127]. Bien que l'oxydation par voie acide est rapide et facile à mettre en œuvre, une attention particulière doit être portée à la nature de la surface à oxyder afin d'adapter les paramètres.

3.3.1.6. Les méthodes solution-gélification

En science des matériaux, la technique dite « sol-gel » est une technique peu chère qui consiste à former en solution un matériau à partir de petites molécules qui confère de nouvelles propriétés aux surfaces. La chimie par voie humide implique la succession de réactions d'hydrolyse et de condensation amorcées par un alcoxyde métallique en solution qui aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel appelé « gel »(fig. 13b). Cette technique permet de limiter les effets de dégradation de surface. Les films d'oxyde poreux ou non poreux ainsi créés à la surface du silicone sont des outils intéressants pour contrôler les interactions à l'interface implant/environnement biologique.

Sur des matériaux à base de polydiméthylsiloxane, les stratégies sol-gel ont été largement initiées par Mark et son équipe au début des années 80 [132–134]. La plupart du temps, ces techniques reposent sur la formation d'une couche de dioxyde de silicium (SiO_2) ou de dioxyde de titane (TiO_2). La réaction de Stöber est la voie traditionnelle pour former le SiO_2 en utilisant du tetraethoxysilane (TEOS) qui réagit avec des molécules d'eau (Figure 13b). Roman et Culberts [135,136] ont développé quant à eux une méthode permettant de déposer *in situ* du TiO_2 , du dioxyde de zinc (ZrO_2) et du vanadium dans une matrice de silicone utilisée en microfluidique de façon homogène. L'hydrophilie ainsi générée empêche l'adsorption d'un marqueur fluorescent (Rhodamine-B) hydrophobe. De cette façon, on contrôle les interactions entre la surface et les molécules environnantes. Par exemple, Gomez-Sjoberg *et al.* [137] ont préparé des surfaces de silicone dans lesquelles ont été intégrées des nanoparticules de silice. La formation d'une couche de SiO_2 est induite sur ces surfaces par simple immersion dans une solution de tetraethoxysilane. Le matériau finalement obtenu est biocompatible, mais plus spécifiquement, il a permis de réduire significativement l'adsorption de médicament anticancéreux utilisé dans des expériences en biologie. Dans le cas d'une surface non traitée, l'administration de telles molécules biologiques serait plus compliquée à réaliser du fait de leurs fortes interactions avec les parois hydrophobes du silicone. Girshevitz *et al.* [138] ont été les premiers à déposer un film d'oxyde de titane fin et uniforme des surfaces de silicone par un procédé de dépôt en phase liquide. Un traitement au plasma a été réalisé au préalable pour permettre une bonne adhésion de l'oxyde. Ce dernier a permis de réduire significativement l'adhésion des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs. L'effet

antibactérien a été accentué par une exposition aux UV en amont de ces surfaces qui entraîne une légère augmentation de leurs mouillabilités.

3.3.1.7. Dépôt chimique en phase vapeur

Le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) est rapide et efficace pour modifier les surfaces. Le principe repose sur la transformation de molécules de gaz en molécules solides à la surface d'un matériau (Figure 13c). Il est fréquemment utilisé pour déposer des films ultrafins dans des conditions de vide. Les surfaces de silicone voient leur hydrophilie améliorée par CVD en utilisant de l'hexamethyldisilazane (HMDS) et du perfluorodecyltrichlorosilane (FDTs) [139]. Tout comme le traitement par plasma, les modifications par CVD sont sujettes à une perte rapide de l'hydrophilie. En effet, juste après l'oxydation, les angles de contact sont à 20 ° puis 30 minutes plus tard, un retour à l'état hydrophobe est observé avec des angles à 60-70 °. Une silanisation subséquente peut aider à maintenir une hydrophilie correcte qui va promouvoir une meilleure adhésion et prolifération cellulaire avec une réduction de l'adhésion bactérienne.

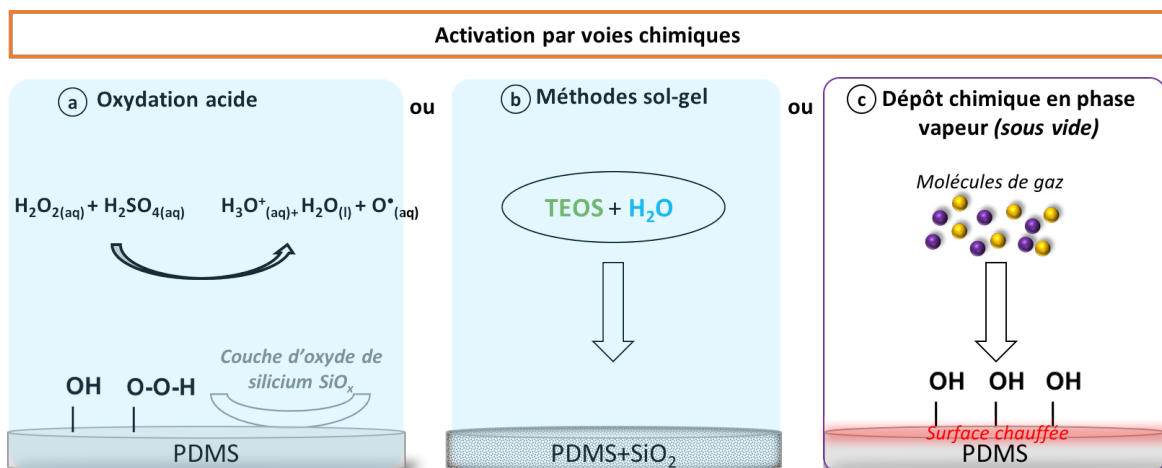


Figure 13: : Activation des surfaces de silicone par des moyens chimiques : (a) oxydation acide – Piranha, (b) oxydation sol-gel (c), dépôt chimique par vapeur

Pour oxyder/activer les surfaces de silicone, d'autres méthodes chimiques ont été développées dans le domaine de la micro fluidique telles que des procédés de dépôt couche après couche, l'utilisation de surfactants ioniques ou de polymères chargés [140]. Cependant, ces méthodes impliquent des interactions faibles entre la surface et le revêtement.

La fixation de biomolécules sur un matériau se fait par modification covalente de la surface. Comme décrits dans la Figure 14, il existe deux types de greffages classiques. L'approche du « grafting to » implique une première étape où une molécule ancre est fixée à la surface. Ensuite, on y couple une chaîne de polymères. Cette méthode permet d'avoir des chaînes de taille contrôlées. L'approche du « grafting from » se fait en une seule étape. L'exposition de la surface à une source d'énergie (thermique ou radiative) crée des espèces réactives et en présence de monomères, elles permettent l'amorçage d'une réaction de polymérisation en chaîne.

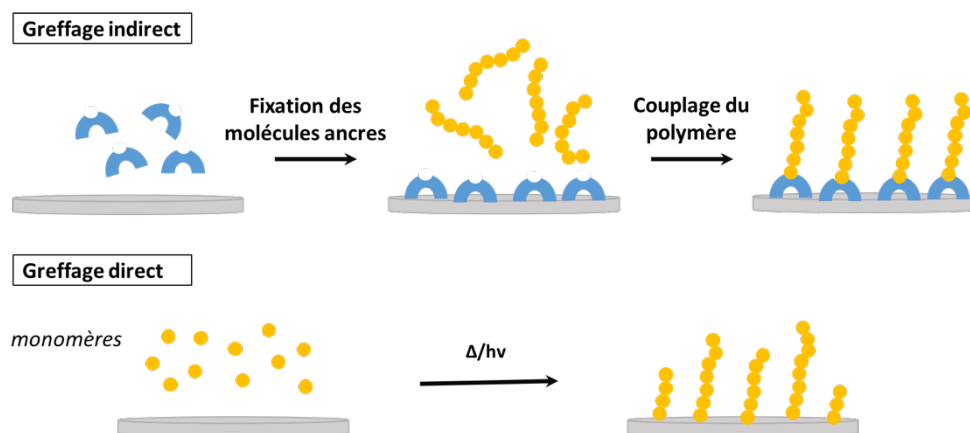


Figure 14: Illustration des deux principales voies de fonctionnalisation de surface : la stratégie de greffage indirect (« grafting to ») ou de greffage direct (« grafting from »)

3.3.1.8. La fonctionnalisation par une méthode de « grafting to »

- **Peptides**

Le recours à des peptides antimicrobiens (AMP) a été largement développé pour la lutte contre les infections du tractus urinaire associées à l'usage de sonde (ITUAUS) [89][141]. Leur mode d'action repose sur un mécanisme bactéricide (Figure 15). Le greffage de peptides sur des surfaces de silicone leur confère une certaine résistance bactérienne [142]. La présence spécifique de certains acides aminés tels que le tryptophane, l'arginine, et la lysine composent de prometteurs AMP contre les souches *E. coli*, *S. aureus*, et *C. albicans* [143]. En 2016, Pinese *et al.* [144] ont fonctionnalisé des surfaces de cathéters en silicone avec un peptide hybride, le (diméthylhydroxly-silyl). Le greffage est facilité par la présence de groupements silanols à la surface par un traitement plasma d'oxygène en amont. Ces surfaces

modifiées ont été exposées aux souches *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus* pendant 24 h. Les résultats ont montré une réduction de 80 % du nombre de bactéries adhérentes par unité de surface témoignant l'efficacité de l'AMP.

Le pouvoir bactéricide d'un peptide antimicrobien peut être régulé en portant une attention particulière à la composition en acides aminés. Par exemple, le peptide CWR11, riche en arginine et tryptophane, a pour mission de rompre les membranes des bactéries sans cytotoxicité apparente vis-à-vis des cellules. L'arginine augmente les interactions électrostatiques avec les membranes chargées négativement, et le tryptophane participe à l'augmentation de la mouillabilité de la surface [145]. Ce peptide n'est pas directement greffé à la surface. En effet, à l'aide des irradiations UV, d'autres molécules ont été précédemment attachées à la surface telles que l'éther poly(allylglycidyle) (AGE), des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) servant d'intermédiaire pour accrocher le peptide. Pour fixer ce même peptide, Lim *et al.* [146] ont simplement immergé le silicone dans une solution de polydopamine (PD) puis dans une solution contenant le peptide CWR. Cette technique permet de réaliser un greffage non destructif avec le même potentiel bactéricide que précédemment avec une durabilité dans le temps. Par ailleurs, un simple revêtement de polydopamine permet d'améliorer la croissance de cellules souches avec des morphologies optimales [147].

D'un point de vue cellulaire, les peptides riches en arginine, glycine, et asparagine confèrent aux surfaces de silicone des propriétés favorables à la prolifération des fibroblastes [148]. De la même manière, le greffage de peptides GRGDSP sur des implants cardiaques en silicone [149] offre une meilleure adhésion cellulaire avec un étalement des cellules fibroblastiques après 24 h comparés aux surfaces non traitées. Ceci, grâce à la séquence RGD du peptide qui interagit avec les membranes des cellules. *In vivo*, les mêmes résultats ont été observés. Ces résultats montrent qu'en plus d'un effet bactéricide, les peptides antimicrobiens ne sont pas cytotoxiques pour les cellules mais au contraire améliorent leur prolifération et leur viabilité.

Selon l'état du peptide, c'est-à-dire greffé ou en solution, l'effet antibactérien se produit à des cinétiques différentes. En effet, les AMP riches en tryptophane, lysine, et arginine sur des surfaces de silicone par l'intermédiaire de l'éther poly(allyl glycidyle) offre une action bactéricide plus lente que les peptides en solution [143]. Des investigations plus

approfondies sont nécessaires pour évaluer la cytotoxicité de ces deux conditions au regard des cellules par exemple.

Mishra *et al.* [150] ont utilisé un puissant peptide antimicrobien (LasioglossinIII) dont ils ont modifié l'extrémité N-terminal avec une cystéine pour contrôler le greffage à la surface ainsi que sa concentration. Le greffage se fait toujours par l'intermédiaire des chaînes AGE et PEG. Une activité antibactérienne significative contre les bactéries à Gram positifs et négatifs (*E. coli* and *E. faecalis*) a été observée. Des techniques de fluorescence ont mis en évidence, une fuite de l'adénosine triphosphate en dehors de la cellule témoignant la lyse membranaire provoquée par le peptide. L'activité antibactérienne est étroitement régulée par le contrôle de l'orientation du peptide grâce au couplage en surface avec une fonction thiol (-SH). Parallèlement, le LasioglossinIII est biocompatible avec une toxicité réduite envers les globules rouges. L'étude des propriétés mécaniques sur des peptides GRGDSP fixés de façon covalente sur du silicone silanisé à une densité de 30 pmol/cm². *In vivo*, la couche peptidique résiste à une flexion mécanique pendant 48 h [149].

- **Greffages de polymères**

Outre les peptides, le greffage de macromolécules telles que des polymères permettent aussi de conférer aux surfaces des propriétés antibactériennes pour prévenir les infections sans toxicité apparente.

Dans la littérature, le poly(éthylène glycol)-PEG et ses dérivés sont des polymères largement utilisés pour leurs propriétés d'antifouling [151–153]. Ils possèdent d'incroyables propriétés en matière de biocompatibilité, d'anti-adhésion bactérienne, et d'hydrophilie. De plus, leur présence permet de réduire grandement l'adsorption non spécifique de protéines. Cependant, la qualité de l'activité antibactérienne sur une surface dépend étroitement de la façon dont le polymère est fixé à la surface comme le montre une étude de Kingshott *et al.* [154]. En effet, ils ont montré que les *Pseudomonas sp* ont tendance à s'adhérer facilement en présence de PEG simplement physisorbé à la surface d'un polyéthylène téréphtalate. En revanche, lorsque le PEG est immobilisé de façon covalente, ils observent une diminution significative de l'adhésion bactérienne.

Les dérivés de PEG ont aussi été étudiés pour améliorer les surfaces de silicone pour diverses applications. Li *et al.* [155] ont synthétisé un copolymère P(PEGDMA) et l'ont fixé sur des surfaces de silicone médical-grade par activation préalable à l'UV/ozone. Les résultats ont montré une réduction de 90 % de l'adhésion des fibroblastes, des protéines et des bactéries (*S.aureus* & *S. epidermidis*). Subséquemment, le greffage de la polysulfobétaïne sur le P(PEGDMA) a permis d'améliorer l'hémocompatibilité tout en conservant l'activité antibactérienne. Concernant l'adhésion des protéines, le greffage du PEG sur des surfaces de silicone silanisées a permis une répulsion significative des protéines durant plus de 30 jours [156]. En plus de cela, l'espacement entre les chaînes de PEG à la surface peut favoriser ou inhiber l'adhésion protéique. En effet, plus la surface est élastique, plus la distance entre deux chaînes de polymères sera importante ce qui augmenterait l'accessibilité des protéines à la surface directement [157].

Les cathéters intravasculaires en silicone peuvent également être le support de développement d'un biofilm bactérien, ce qui constitue une issue dramatique. Ding *et al.* [158] ont greffé avec succès un copolymère dibloc composé de PEG et de polycarbonates cationiques sur des surfaces de silicone grâce à une polymérisation par ouverture de cycle organo-catalysée. Le recouvrement préalable par la polydopamine a grandement facilité le greffage. Le couplage des deux polymères comparé à l'effet du PEG seul a permis d'atteindre de meilleures propriétés d'antifouling et antimicrobiennes à l'encontre des *Staphylococcus aureus* susceptible à la méticilline (MSSA) et avec des *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA). L'analyse qualitative réalisée à l'aide du microscope électronique à balayage a révélé que la surface fonctionnalisée a empêché la formation du biofilm durant plus de 7 jours sans cytotoxicité apparente.

Certaines applications en microfluidique sont aussi limitées par la forte hydrophobicité du silicone impactant fortement l'adhésion cellulaire. Séguin *et al.* [159] ont développé un silicone portant des fonctions amines et des fonctions thiols pour permettre une meilleure adhésion des cellules endothéliales de rat (C2C12). Pour ce faire, un dépôt d'aluminium a été réalisé sur des surfaces de silicone plasma-activées avant la fixation de SAM à l'aide de 3-aminopropyltriméthoxysilane (3-APTMS) et 3-mercaptopropyltriméthoxysilane

(3-MPTMS). La couche d'aluminium permet de maintenir la surface oxydée stable pendant plusieurs semaines. Les groupements amines ont permis l'accrochage de la protéine A ayant un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire. Pendant ce temps, les groupements thiols sont disponibles pour le greffage de molécules bioactives. Par exemple, Magennis *et al.* [160] ont greffé différents types d'acrylates par thiol-ene click. Le greffage a permis de réduire significativement l'adhésion bactérienne sans être cytotoxique.

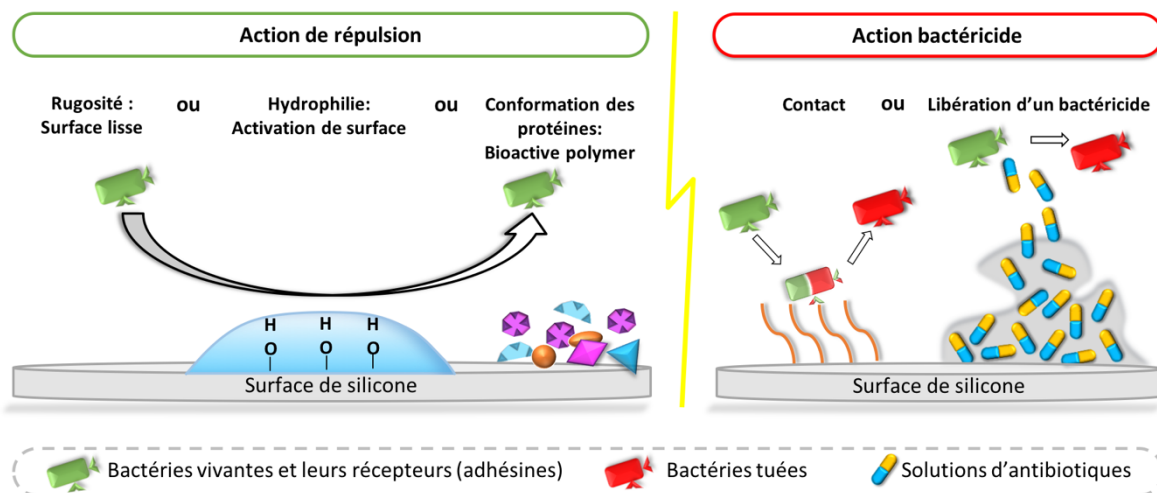


Figure 15: Différentes stratégies d'action antibactérienne – actions de répulsions (gauche) / actions bactéricides (droite)

Le greffage de polyacrylamide sous forme de brosse sur du silicone par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (RAFT) a permis de réduire les contaminations microbiennes [161]. Cependant, les conditions de synthèse ne sont pas idéales (hautes températures, produits chimiques nocifs). Wang *et al.* [162] ont créé une surface silicone bactéricide en y couplant un copolymère $p(\text{MA POSS-co-DMAEMA}^+)$. L'hydrophilie de la surface réduit l'adhésion des cellules épithéliales et les charges présentes dans les copolymères tuent les bactéries lorsque celles-ci entrent en contact avec la surface. Voo *et al.* [163] quant à eux ont synthétisé un copolymère dibloc avec un PEG d'un côté et un polycarbonate portant des fonctions imides de l'autre. Les propriétés antifouling et antibactériennes des surfaces fonctionnalisées ont été évaluées avec des chaînes de polymères de tailles variables. Le pouvoir bactéricide augmente avec la taille des chaînes cationiques. Inversement, l'effet antifouling (inhibition de l'adhésion des protéines, des plaquettes) augmente avec la taille des chaînes de PEG. Selon l'application recherchée, le

recours à ce type de copolymère présentant une double fonctionnalité semble être un outil intéressant.

Le contrôle des interactions des protéines avec la surface est également un point essentiel dans le contrôle de la réponse biologique et bactérienne. Basé sur un principe de protéine résistante, le greffage de l'oxyde de polyéthylène (PEO) sur le silicone a permis de diminuer l'adsorption du fibrinogène et de l'albumine de plus de 90 % comparé aux surfaces brutes [164]. La technique de greffage employée permet un fort taux de recouvrement du PEO sur les surfaces. Elle consiste en une réaction d'hydrosilylation catalysée par du platine après introduction de fonctions Si-H sur les surfaces via une catalyse acide.

Concernant les prothèses mammaires, et plus particulièrement dans la lutte contre l'apparition de contractures capsulaires (CC), le greffage d'un polymère zwitterionique tel que le 2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) a permis d'améliorer la biocompatibilité des implants mammaires en silicone tout en permettant une activité et morphologie normale des protéines qui s'y adsorbent [165]. Récemment, les études *in vivo* après 6 mois d'implantation ont montré une réduction du taux de CC sur des surfaces greffées avec le MPC par polymérisation thermique [166]. Les résultats histologiques montrent une diminution évidente de l'épaisseur de la capsule avec une réduction de 45 % en épaisseur. Corrélativement, les auteurs ont observé une réduction de 20-30 % des marqueurs inflammatoires tels que la myéloperoxydase, les facteurs de croissance transformants β (TGF- β), et les actines- α dans les tissus environnants comparés aux implants non traités. Le greffage MPC sur les implants en silicone montre un excellent effet anti-fibrotique qui s'accompagne d'une diminution de l'expression des protéines de la réponse inflammatoire.

Le Tableau 1 répertorie toutes les stratégies et leurs cibles pour pallier le problème d'infections sur des surfaces en silicone.

Tableau 1: Molécules bactéricides/bactériostatiques à visée antibactérienne sur des surfaces de silicone

	Molécules	type de bactérie	remarques	Réf.
Peptides	TRP-ARG-LYS	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	- bactéricide par disruption des membranes - 70 % d'activité bactéricide - pas de toxicité pour les cellules	[143] [146]
	Temporine hybride + dimethylhydroxysilane	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	- bactéricide par disruption des membranes - 92 % des bactéries éliminées (1h)	[144]
	LasioglossinIII	<i>E. faecalis</i> & <i>E. coli</i>	-termination cystéine -60 % and 40 % (anti-biofilm)	[150]
Polymères & Copolymères	méthacrylate P(PEGMA) / diméthacrylate P(PEG-DMA) / polysulfobetaine P(DMAPS)	<i>Gram+</i> & <i>Gram-</i> .	- répulsion : > 90 % inhibition adhésion bactérienne - diminution de l'adhésion des fibroblastes de ≥80% - hémocompatible	[155]
	+ triclosane	<i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i>	- molécules incorporées dans la matrice du matériau - activité antimicrobienne après 2 mois	[76]
	Diblock copo-PEG/polycarb - dopa	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> (MSSA MRSA)	- Antifouling - Antimicrobien	[158] [165]
	Poly(N-vinylimidazole)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	- plus efficace contre <i>P. aeruginosa</i>	[159]
	p(MAPOSS-co-DMAEMA ⁺)	<i>S. aureus</i>	- synthèse en plusieurs étapes - charges latérales augmentent l'activité bactéricide - réduction adhésions des cellules et protéines	[162]
	(Silicone-PMMA) + groupes tert-butylamine	<i>Gram+</i> & <i>Gram-</i>	- destruction de la membrane interne - plus efficace sur les <i>Gram -</i>	[171]
	Quarter polymère de silicone (fonctions bioactives)	<i>S. aureus</i>	- contrôle de l'adhésion protéiques - répulsion des bactéries	[44] [170]

3.3.1.9. La fonctionnalisation par greffage direct « grafting from »

L'équipe LBPS s'est intéressée dans les années 2000 à la synthèse de copolymère bioactif à base de silicone pour améliorer la biocompatibilité des lentilles intraoculaires et des prothèses orthopédiques [167]. Ils ont développé un quarter-polymère [168] qui porte des chaînes de silicone, des groupements carboxylates et sulfonates définis comme des fonctions bioactives. Ces groupements distribués aléatoirement dans le copolymère ont permis (i) d'inhiber la croissance cellulaire *in vitro* sans cytotoxicité et (ii) de prévenir l'adhésion bactérienne indirectement en modifiant la conformation/orientation des protéines adsorbées en premier lieu [169]. *In vitro*, la bio activité du quarter-polymère a montré une diminution de l'adhésion des *S. aureus* et des *MRSA 88244* à plus de 80 %. Et *in vivo*, cette diminution a été approximativement de 1.5 à 2 log d'unité de différence par rapport à des surfaces contrôles (Figure 16) [170].

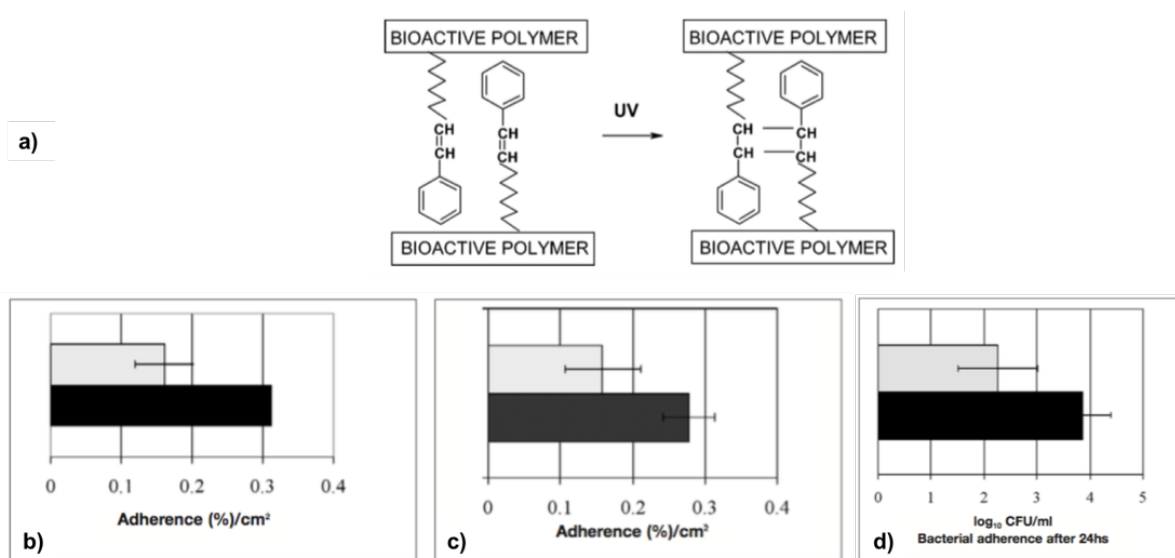


Figure 16: (a) Structure chimique du quarter polymère de silicone bioactif / Résultats *in vivo* de l'adhésion des *S. Aureus Cowan I* (b) et des *MRSA 88244* (c)(d) sur des surfaces sans (gris) et avec (noir) fonctions bioactives [44] [170]

Un autre groupe de chercheurs a également amélioré l'activité antimicrobienne avec un copolymère silicone-PMMA associé à des groupes tert-butylamine [171]. Le fort attachement entre les bactéries et la surface ont conduit à des changements morphologiques avec un changement de perméabilité de leurs membranes avec la rupture de celles-ci menant à leurs destructions. Cependant, malgré des propriétés antibactériennes intéressantes, la

synthèse de tels copolymères est complexe, ce qui pourrait s'avérer être un obstacle pour une éventuelle industrialisation. Néanmoins, ces résultats ont été prometteurs et ont encouragé le développement de méthodes plus simples. Celles-ci impliquent le greffage de molécules biologiquement actives directement sur les surfaces par des techniques dites de « grafting from ».

Le greffage d'un polymère tel que le poly(N-vinylimidazole) [172] sur des films de silicone sous irradiation γ a permis de lutter sélectivement contre les bactéries à Gram négatifs (*P. aeruginosa*). En effet, les Gram positifs prolifèrent pareillement sur les films traités ou non traités. De la même façon, la polymérisation sous irradiation UV de monomères à base d'acrylate [160] sur des surfaces de silicones thiolées confère des propriétés antibactériennes avec une réduction du biofilm bactérien de 99 %.

L'expertise de l'équipe LBPS repose sur le greffage de polymère bioactif tel que le poly(styrène sulfonate) de sodium (polyNaSS) largement étudié pour son caractère biocompatible et antibactérien lorsqu'il est accroché à des surfaces de nature diverses. Le polyNaSS favorise des interactions contrôlées avec le système biologique, et permet donc un meilleur contrôle de la réponse de l'hôte. La spécificité du polymère est attribuée à sa fonction sulfonate (SO_3^-) qui améliore la biocompatibilité des matériaux. En effet, son efficacité a été largement démontrée sur des surfaces métalliques (titanes, alliages de titane) [160,173,174] et sur des surfaces polymères (PET, PCL) [175–178].

Le mécanisme d'action du polyNaSS s'appuie sur son caractère hydrophile améliorant ainsi la mouillabilité des surfaces. Plus précisément, le polymère joue un rôle primordial dans l'adsorption des protéines plasmatiques. Effectivement, l'introduction d'un quelconque implant dans le corps provoque une adsorption non spécifique des protéines du milieu biologique. L'albumine, la fibronectine, et la vitronectine adhèrent à la surface dès les premiers instants. La compétition entre ces trois protéines limite et affaiblit l'adhésion cellulaire à cause de leurs récepteurs (intégrines) qui ne reconnaissent que spécifiquement ceux de la fibronectine [179]. De même, les bactéries grâce à leurs adhésines reconnaissent des sites spécifiques de la fibronectine d'où la formation du biofilm. Cependant, la présence du polyNaSS induit une modification de la conformation/orientation de cette protéine de telle

sorte que les sites d'attachement ne sont plus identifiables par les *S. aureus* environnants ce qui diminue l'adhésion bactérienne et le risque de développer un biofilm [49][170][180]. Le principe de greffage du polymère bioactif sur des surfaces préalablement activées se base sur un mécanisme de « grafting from » qui implique une polymérisation radicalaire des monomères de styrène sulfonate de sodium sous irradiations UV. Ces rayonnements conduisent à la rupture des liaisons O-OH ou -O-H des fonctions générées par activation laissant place à des radicaux oxygénés qui amorcent ensuite la réaction de polymérisation (Figure 17).

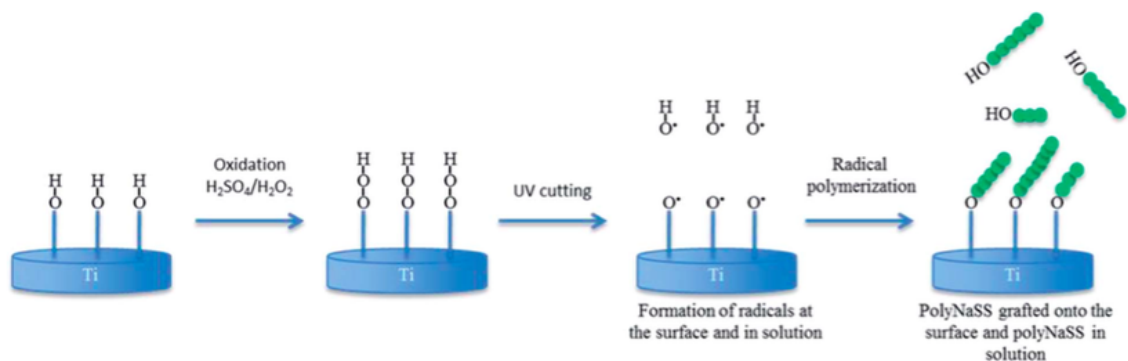


Figure 17: Mécanisme de greffage sur l'exemple des surfaces de titane [130]

Sur les alliages de titane, le polyNaSS a permis de moduler la conformation de la fibronectine et du collagène de type I. Grâce à ces changements, les sites actifs des protéines sont moins exposés et les bactéries ne peuvent plus les reconnaître pour y adhérer [168].

Un des premiers objectifs principaux de ces travaux de thèse est de développer une méthode facile à mettre en œuvre pour greffer de façon covalente le polyNaSS sur des surfaces de silicone issues d'implants mammaires. Cela implique dans un premier temps de trouver le moyen optimal pour activer le silicone pour permettre la polymérisation radicalaire du styrène sulfonate de sodium.

4. Discussions

4.1. Les avantages et inconvénients des diverses méthodes

Aujourd'hui, une grande variété de techniques a été développée pour pallier les problèmes liés à la présence d'un biomatériau dans le corps. La lutte contre les infections

peut se faire en agissant sur divers paramètres tels la mouillabilité pour limiter l'adsorption non spécifique des protéines, le greffage de molécules conférant des propriétés antibactériennes, ou l'encapsulation/le revêtement de molécules actives pour des actions bactéricides. Grâce à l'état de l'art décrit, il est alors possible de mettre en exergue les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes selon l'application finale recherchée.

Le concept d'infection est largement défini comme étant un problème multifactoriel. À ce jour, la technique classique pratiquée afin de minimiser le risque d'infection est l'immersion de l'implant dans un antiseptique avant l'opération chirurgicale en utilisant de la Bétadine ou de l'eau oxygénée par exemple [181]. Parfois, on y associe une administration d'antibiotiques pour couvrir un plus grand spectre de microorganismes. Pourtant, le traitement aux antibiotiques n'est pas suffisant, car des infections tardives surviennent toujours sous une forme plus ou moins sévère. D'autant plus que, le corps humain développe facilement une résistance aux antibiotiques.

De ce fait, des méthodes impliquant le greffage covalent de biomolécules existent. Par exemple, les peptides antimicrobiens ont largement démontré une efficacité contre les agents microbiens par un effet bactéricide. Cependant, on observe une perte d'activité au cours du temps. La présence d'acides aminés induit aussi une résistance aux sels réduisant ainsi considérablement l'activité antimicrobienne [64]. D'un autre côté, le greffage de polymères biocompatibles requiert souvent de nombreuses étapes de synthèse, ce qui rend parfois difficile sa réalisation. Cependant, ces derniers permettent souvent un effet antibactérien durable dans le temps sans cytotoxicité apparente.

4.2. La prothèse mammaire idéale : une question d'équilibre

Dans le cas des prothèses mammaires, le manque de biocompatibilité et les infections aggravent les contractures capsulaires et favorisent l'apparition de lymphome anaplasique. Les travaux qui visent à améliorer la biocompatibilité et à réduire les infections sur des surfaces de silicone sont nombreux. Toutefois, on note qu'il y a très peu d'études qui visent à

améliorer spécifiquement les prothèses mammaires. En effet, dans la base de données *google scholar*, entre 2010 et 2020, 11800 publications ont été référencées avec les mots-clés suivants « silicone implants antibacterials – breast » alors qu’il y a 3590 pour « silicone breast implants antibacterial ». Ce chiffre était de 1540 entre les années 2000 et 2010 ce qui montre l’intérêt grandissant pour le sujet des prothèses mammaires. Aujourd’hui, avec l’émergence du lymphome anaplasique et le recours plus fréquent à la chirurgie plastique, les études dans ce domaine s’intensifient pour en comprendre les causes et mécanismes.

Le cahier des charges pour une prothèse mammaire optimale est l’accomplissement d’une double fonction. Elle doit posséder des propriétés antibactériennes et permettre une bonne intégration cellulaire (Figure 6).

- La topographie de surface

Ce chapitre bibliographique souligne le rôle important de la texturation dans l’adhésion bactérienne d’un côté, et dans l’adhésion cellulaire de l’autre. On souligne également que la rugosité de surface augmente les chances de développer un lymphome anaplasique. Mais paradoxalement, une surface rugueuse empêche la survenue de formes sévères de contractures capsulaires et permet une meilleure adhérence des tissus environnants.

Ainsi, pour atteindre un taux minimal de bactérie à la surface tout en favorisant l’adhésion et la prolifération cellulaire, la prothèse doit nécessairement présenter une légère rugosité de surface.

- Effet antibactérien et biocompatibilité

Avec les nombreuses techniques de revêtement antimicrobien et les techniques diverses de greffage (polymères biocompatibles, peptides, copolymères), nous possédons un arsenal d’outils permettant de lutter contre les problèmes bactériens à travers divers mécanismes d’action (Figure 15). Cependant, les effets secondaires de ces méthodes doivent également être pris en considération. En plus de l’activité antibactérienne, les traitements ne doivent pas être cytotoxiques pour les tissus et milieux environnants et ne doivent pas altérer les propriétés mécaniques du matériau. Les stratégies permettant de garantir le bon

développement cellulaire et conférer des propriétés antibactériennes sont résumées dans le Tableau 2.

Par ailleurs, en considérant les spécifications au niveau industriel, d'autres paramètres sont à prendre en compte tel que le bénéfice économique, la faisabilité à l'échelle industrielle, la sécurité et qualité selon les normes ISO. Ainsi, pour commercialiser un produit, la transition laboratoire-industrie doit être simple et ne peut être possible si la réaction est complexe à réaliser et nécessite l'utilisation de produits coûteux ou toxiques à grande échelle. Par conséquent, il est essentiel de réunir et sélectionner méthodiquement les techniques les plus adaptées pour des investigations plus poussées pour espérer atteindre l'étape des essais cliniques par exemple.

Tableau 2 : Amélioration de l'adhésion cellulaire sur les surfaces de silicone

Molécules	cellules cibles	remarques	applications	Ref.
Revêtements collagène de type I	cellule souche mésenchymateuse, Fibroblastes	- bio-affinité - bonne adhésion et viabilité cellulaire	-revêtement de surface	[116][117]
Polymère bioactif : Poly(styrène) sodium sulfonate	Fibroblastes	<u>Double fonctionnalité :</u> 1) Antibactérien : modulation de la conformation des protéines, non identifiable pour les bactéries 2) Adhésion et viabilité cellulaire	- implants orthopédiques (titane et ses alliages) -quater polymère	[173][175] [176][177] [178]
Polydopamine	Cellules souches adipeuses	- effet biomimétique - morphologie cellulaire régulière	implant cochléaire	[149]
GRGDSP - peptide	fibroblastes cardiaques	- biocompatible - résistance mécanique	Patch cardiaque	[151]
Gélatine-glutaraldéhyde (GA)	cellules endothéliales	- revêtement hydrophile - GA: cytotoxique si trop concentré	implants cardiaques	[93]

5. Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de mettre en évidence le principe ainsi que les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes permettant de lutter contre les infections bactériennes et pallier le manque de biocompatibilité du silicone. On rappelle que la technique sélectionnée dépend fortement de l'application recherchée afin d'assurer une biocompatibilité optimale. En effet, une méthode peut être idéale pour une application, mais pas pour une autre. La modification de surface en chimie est un outil puissant pour contrôler les interactions entre une surface et les éléments qui s'y absorbent. *In fine*, cela permet d'induire et de réguler la réponse de l'hôte.

Pour les implants mammaires, ce chapitre est essentiel, car il met en lumière des moyens divers dont on pourrait s'inspirer pour améliorer la biocompatibilité de tels implants. Cela pourrait permettre de résoudre les problèmes de contractures capsulaires et de lymphomes anaplasiques.

En conclusion, au travers de cette partie, il semblerait que combiner un certain degré de texturation (promouvoir l'activité cellulaire) et associer l'attachement d'une molécule active apparaît comme la solution pour bio-optimiser les implants en silicone. C'est dans ce cadre qu'intervient l'expertise du laboratoire et que s'inscrivent ces travaux de thèse. En effet, le poly(styrène sulfonate) de sodium à lui seul pourrait améliorer la biocompatibilité des surfaces tout en repoussant les bactéries comme il a été montré sur les quarterpolymères. La synthèse de ces derniers étant compliquée à réaliser, le protocole est difficilement industrialisable. Par contre, le greffage direct du polyNaSS sur les implants mammaires en silicone semble plus simple et prometteur.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

1. Préparation des échantillons de silicone

Toutes les surfaces de silicone utilisées dans le cadre de ces travaux sont issues d'enveloppes externes de prothèses mammaires en silicone. Les implants ont été fournis par l'industriel français SEBBIN soit entièrement c'est-à-dire avec le gel de silicone soit sous forme d'enveloppe vide (Figure 18). Dans les deux cas, des protocoles de lavage spécifiques ont été développés avant utilisation afin d'assurer une surface la plus propre possible.



Figure 18: Prothèse mammaire entière avec gel de silicone (gauche) et enveloppe seule (droite)

- Implants avec gel de silicone

À l'aide d'un scalpel la prothèse est découpée et le gel de silicone est retiré grossièrement. On détaille ensuite l'enveloppe en petites surfaces (bandelettes) puis toujours à l'aide d'un scalpel, les résidus de gel sont retirés en raclant délicatement la surface. Une fois celui-ci enlevé, les surfaces sont lavées dans une solution de tétrahydrofurane (THF) dans un bain à ultrason deux fois pendant 10 minutes. Cette étape permet d'éliminer les restes de gel et l'huile de silicone des surfaces. Ces dernières sont ensuite rincées à l'eau distillée 2 fois pendant 5 minutes puis une dernière fois pendant une nuit avant d'être séchées à l'étuve 37 °C pendant une heure pour une utilisation ultérieure.

- Implant sans gel de silicone : enveloppe seule

Étant donné l'absence de gel, le protocole de lavage est plus simple. L'enveloppe est découpée puis simplement lavée dans de l'eau distillée plusieurs fois pendant 24 h pour retirer les éventuelles impuretés et poussières.

- Mini-implants en silicone (modèle lapin)

Ces petits implants d'un millilitre de volume environ et de 1 à 1,5 cm de diamètre sont destinés à l'étude *in vivo* dans un modèle animal. Avant greffage, les implants sont lavés à l'eau distillée plusieurs fois pendant 24 h (Figure 19).

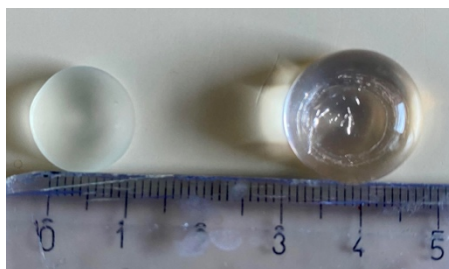


Figure 19: Mini-implants texturés MOTIVA (gauche) et SEBBIN (droite) pour l'étude *in vivo*

En fonction du type d'expériences menées, les surfaces sont coupées selon différentes tailles et formes (disques, éprouvettes, carrées ...).

2. Fonctionnalisation de surface

2.1. Préparation du monomère Styrène sulfonate de sodium

Le styrène sulfonate de sodium ou 4-vinyl benzene sulfonate de sodium (NaSS, Sigma Aldrich), est le monomère utilisé dans le greffage des surfaces de silicone (Figure 20). Avant utilisation, il doit être purifié par un procédé de recristallisation qui est une technique de purification d'un solide se basant sur la différence de solubilité à chaud et à froid du produit et des impuretés. Une masse de 90 g (0,46 moles) de monomère est dissoute dans un mélange de 180 mL d'eau distillée et de 1600 mL d'éthanol (carlo erba) (10 : 90 v/v) à 70 °C sous agitation pendant une nuit.

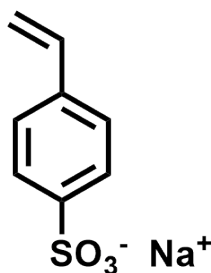


Figure 20: Structure chimique du monomère de styrène sulfonate de sodium

Une fois dissous, le mélange subit une première filtration Büchner à chaud et le filtrat récupéré est conservé à 4 °C pendant 48 h. À l'issue de cette étape, les cristaux de NaSS sont récupérés en réalisant une seconde filtration Büchner. Le monomère purifié est séché à pression atmosphérique dans une étuve à 50 °C pendant une nuit puis est stocké à 4 °C pour une utilisation ultérieure [174,176].

2.2. Greffage par polymérisation radicalaire

Le greffage du polymère bioactif sur les surfaces de silicone a été réalisé par une technique dite de « grafting from » qui consiste en une réaction de polymérisation radicalaire initiée à partir de la surface. Au préalable, une activation de la surface permettant de créer des espèces réactives (radicaux) est suivie de la polymérisation radicalaire à partir de la surface.

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata avec un nombre de 3 échantillons par conditions.

2.2.1. Techniques d'activation

- Ozonation : Les échantillons sont placés dans le réacteur d'ozonation contenant 100 mL d'eau distillée. Un flux d'oxygène avec une pression de 0,5 bar est transformé en ozone grâce à son passage dans un générateur d'ozone (OZONAIR BMT 802N (ACW)). L'ozone passe ensuite dans le réacteur qui contient de l'eau distillée à 30 °C dans lequel se trouvent les échantillons et ce pendant 20 minutes (Figure 21). Le débit d'oxygène est de 0,6 L/min, la tension appliquée au générateur est de 100 V et la pression de 0,5 bar.

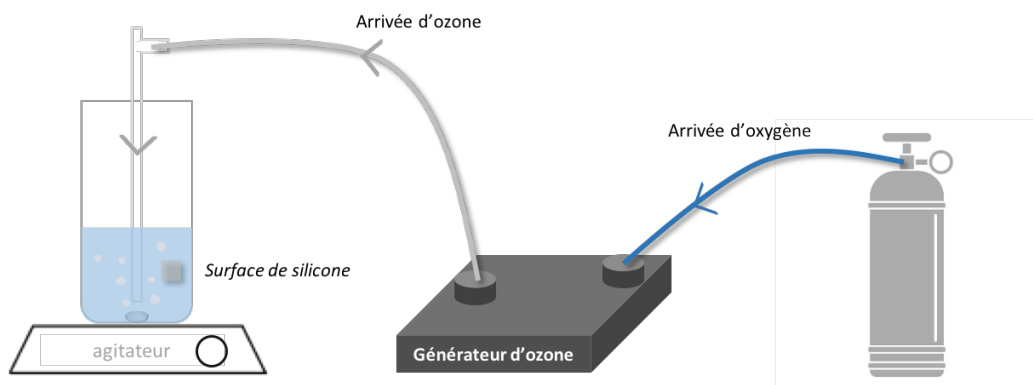


Figure 21: Principe de l'ozonation

- Activation acide : l'échantillon est placé dans 2 mL d'acide sulfurique pendant 1 minute puis 2 mL de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés. L'échantillon est maintenu dans le mélange 3 minutes de plus avant d'être retiré et lavé dans de l'eau distillée.
- Activation sous UV : à l'aide d'une tige en téflon, l'échantillon est maintenu en immersion dans un ballon de 100 mL contenant 60 mL d'eau distillée. Le milieu aqueux est dégazé pendant 30 minutes sous argon puis la surface est exposée sous irradiations UV pendant une heure à 160 mW/cm^2 (Figure 22) [127].

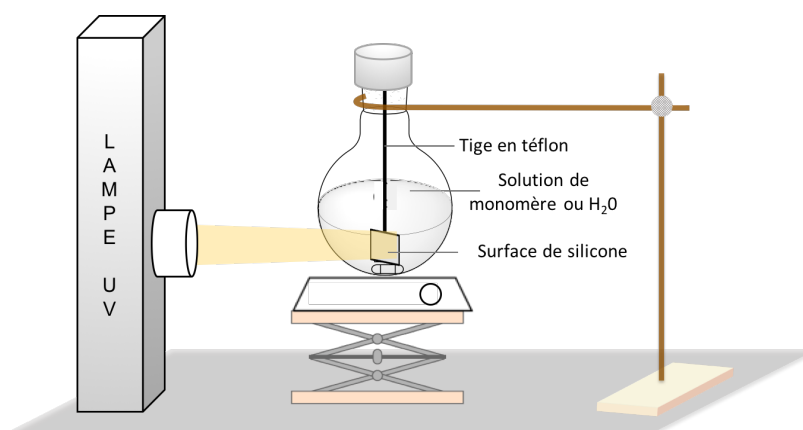


Figure 22: Montage expérimental pour le greffage sous UV

2.2.2. Polymérisation radicalaire à partir de la surface (greffage)

Une solution de monomère (styrène sulfonate de sodium) à 0,7 M ou 0,35 M est préparée en dissolvant respectivement 9 g ou 4,5 g de monomère recristallisé dans 60 mL d'eau distillée.

La solution est ensuite mise à dégazer sous argon pendant 30 minutes. Une fois l'activation de la surface réalisée, l'échantillon est rapidement transféré vers un ballon contenant le monomère préalablement dégazé. Celui-ci est ensuite placé sous irradiation UV à 160 ou à 220 mW/cm² en fonction de la concentration en monomère pendant une heure [127]. L'échantillon, une fois greffé, est lavé à l'eau distillée à température ambiante pendant 24 h afin d'enlever l'excès de polymères non greffé à sa surface. L'eau de lavage est changée toutes les 3 heures.

Deux principales sources UV ont été utilisées dans ces expériences (Figure 23). Dans un premier temps, une source Mercure (Lot Oriel) puis une source LED (Omniculture), toutes les deux à une longueur d'onde de 365 nm.

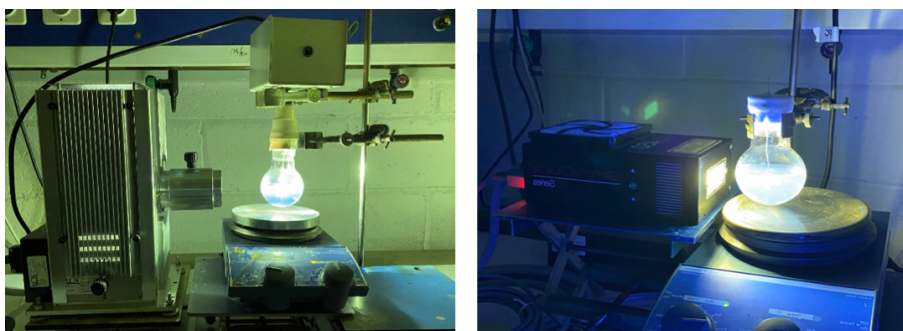


Figure 23: (a) Lampe UV – Lot Oriel (source Mercure) / (b) Lampe UV – Omniculture (source LED)

3. Caractérisations du greffage

3.1. Dosage colorimétrique avec le bleu de toluidine

Le bleu de toluidine ou chlorhydrate de triméthyl thionine est un colorant dont la formule est rappelée ci-dessous :

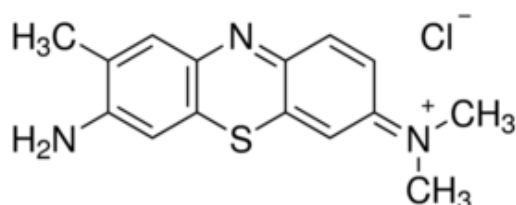


Figure 24: Structure chimique de la molécule de bleu de toluidine

Le dosage au bleu de toluidine (BT) est une technique de dosage colorimétrique qui repose sur la présence d'un groupe chromophore dans la molécule de BT absorbant dans le domaine du visible aux alentours de 633 nm. La molécule (Figure 24) possède un groupement cationique $N^+(CH_3)_2$ qui lui permet de se complexer avec les groupements anioniques (sulfonate SO_3^- ou carboxylate COO^-) présents à la surface. Nous nous sommes donc appuyés sur l'hypothèse avancée par Ikada *et al.* [182] selon laquelle une mole de BT se complexe avec une mole de groupement carboxylate.

Ainsi, le dosage du bleu de toluidine nous donne la concentration en groupements anioniques présents à la surface après fonctionnalisation. Cette propriété a été transposée au polyNaSS, qui peut se complexer au groupement $N^+(CH_3)_2$ par ses groupements sulfonates.

1) Préparation de la solution

Une solution de bleu de toluidine est préparée en dissolvant 76,6 mg de poudre de BT dans une fiole de 500 mL qu'on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit à l'abri de la lumière.

2) Étape de complexation et décomplexation

Expérimentalement, chaque échantillon est placé au contact de 5 mL de la solution de BT (pH 10) à 30 °C pendant 6 h sous agitation. Ensuite, les surfaces sont rincées abondamment trois fois 5 minutes dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration $1,10^{-3}$ M afin d'éliminer l'excédent de BT non complexé. Enfin, les molécules de BT complexées à la surface sont décomplexées dans 5 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique (50/50 % v/v) pendant 24 h sur un agitateur orbitalaire à température ambiante.

L'absorbance de la solution résultante de la décomplexation est mesurée par spectrophotométrie UV-visible. En utilisant la loi de Beer-Lambert, il est possible de remonter à la concentration en BT et donc à la concentration en polymère greffé à la surface qu'on définira comme le taux de greffage.

Courbe d'étalonnage :

La loi de Beer-Lambert définit l'absorbance d'une solution comme étant proportionnelle à la concentration de celle-ci ainsi qu'à la longueur de la cuve spectrométrique. Sa formule s'écrit comme suit : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ où A correspond à l'absorbance, l correspond à la longueur de la cuve (cm), C correspond à la concentration molaire de la solution (mol/L) et ϵ correspond au coefficient d'extinction molaire (L/mol/cm). Cette dernière grandeur est déterminée grâce à l'établissement d'une courbe d'étalonnage à partir de solutions de BT de différentes concentrations dans de l'acide acétique (Figure 25). Les absorbances des solutions sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde 633 nm et la pente de la droite obtenue détermine le coefficient d'extinction molaire ϵ de la solution de BT qui est de l'ordre de 46000 L/mol/cm en général.

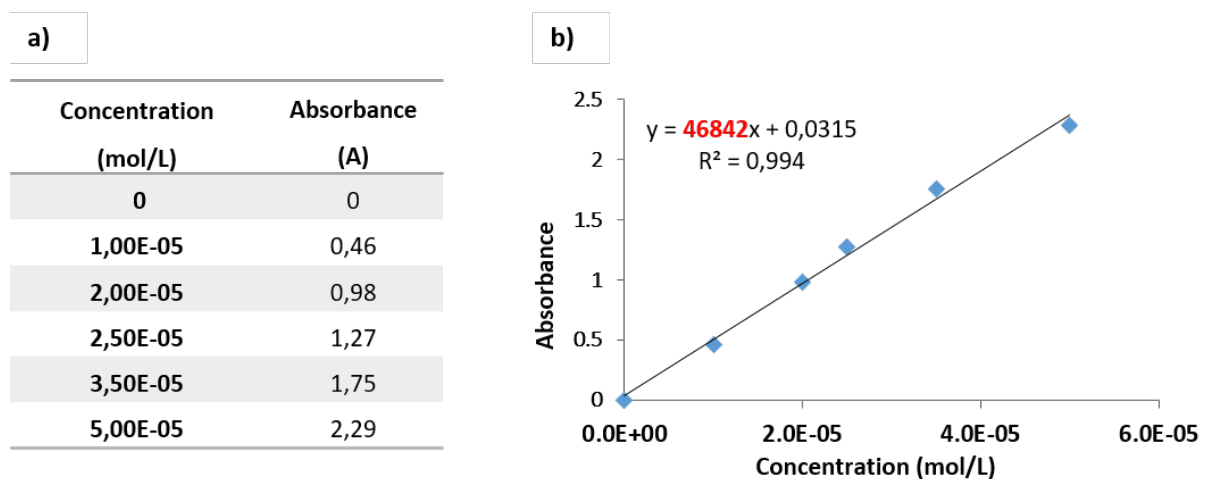


Figure 25: (a) $A=f(\text{concentration des solutions})$ (b) courbe d'étalonnage résultante avec le coefficient directeur de la droite

En considérant, la relation qui stipule qu'une mole BT équivaut à une mole de sulfonate, on détermine la concentration (C) de polymère présent à la surface greffée :

Equation 1

$$n(\text{sulfonate}) = \frac{A * V}{\varepsilon * l}$$

Equation 2

$$TG = \frac{n(BT)}{m}$$

A : Absorbance

V : Volume d'acide acétique (L)

ε : Coefficient d'extinction molaire (L/mol/cm)

l : longueur de la cuve (cm)

m : masse de l'échantillon (g)

n : quantité de matière de BT (mol)

Le taux de greffage (TG) exprimé en mol/g est déterminé en divisant n (sulfonate) par la masse totale de l'échantillon.

3.2. Microscopie électronique à balayage – module d'analyses dispersives en énergie (MEB-EDX)

La Microscopie Électronique à Balayage (MEB) permet de visualiser une image 3D de haute qualité avec une résolution de l'ordre de quelques nanomètres. La technique utilise le principe de l'interaction électron-matière qui génère des électrons secondaires de plus faibles énergies convertis par la suite en signaux électriques permettant de reproduire la topographie de la surface. Par ailleurs, le microscope est couplé à un module d'analyse dispersive en énergie (EDS) qui permet de faire une analyse élémentaire à la surface de l'échantillon et d'établir une cartographie (mapping) de la répartition des éléments en surface. Les analyses MEB-EDX réalisées au cours de ces travaux ont été effectuées à l'aide d'un microscope HITACHI TM3000, avec des tensions réglables entre 0,1 et 30 kV ainsi que des grossissements de 40x à 8000x.

Les échantillons analysés doivent être propres et complètement secs, sans quoi il pourrait y avoir un problème lors de la mise sous vide de l'appareil.

Dans le cadre de l'observation d'échantillons humides notamment pour l'observation des cellules fixées sur les surfaces, une platine Pelletier a été utilisée.

3.3. Mesure de l'angle de contact

La mouillabilité d'une surface est une propriété importante dans la chimie des surfaces. Sa mesure permet de caractériser les propriétés physico-chimiques à l'interface entre deux phases. La mouillabilité est évaluée par mesure d'angle de contact entre la goutte de solvant et la surface. En théorie, une surface est dite hydrophobe quand l'angle θ entre la goutte et la surface est supérieur à 90° , à l'inverse, elle est dite « hydrophile » lorsque l'angle est inférieur à 90° .

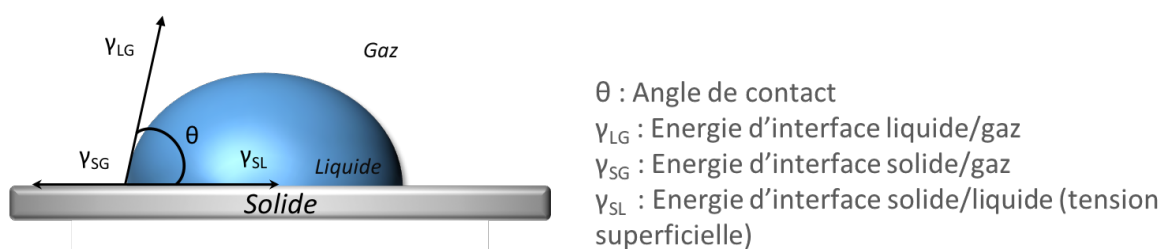


Figure 26: Principe de la mesure de l'angle de contact

L'aptitude d'une goutte à s'étaler est principalement due aux interactions à l'interface entre les groupements chimiques de l'échantillon solide et les groupements chimiques du solvant déposé. Cette propriété se base sur l'existence d'une tension de surface (Figure 26).

Dans ce manuscrit, l'eau distillée est utilisée pour évaluer l'hydrophilie ou l'hydrophobicité des surfaces. Les mesures sont prises avec l'appareil drop shape analysis DSA10 (KRUSSE GmbH) muni d'une caméra. Une goutte de $2 \mu\text{L}$ de solvant est déposée à la surface de l'échantillon et une capture de l'image est réalisée avec le logiciel Drop Shape Analysis program environ 30 secondes après-dépôt. Les calculs de l'angle de contact se basent selon la méthode de la goutte sessile. Au moins 3 mesures sont prises sur chaque échantillon afin de moyenniser les valeurs. L'équation de Young-Dupré permet de retrouver l'angle de contact à partir des tensions superficielles des différentes interfaces selon l'équation :

Equation 3 : formule Young-Dupré

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{LS}}{\gamma_{LG}}$$

3.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - Réflectance totale atténuée (ATR-FTIR)

La spectroscopie infrarouge est un outil important dans le cadre de notre étude. Basée sur les vibrations des liaisons atomiques, elle permet d'identifier les groupements fonctionnels ou liaisons chimiques par exemple.

En effet, la lumière infrarouge est absorbée à des fréquences spécifiques liées aux énergies de liaison vibrationnelles des groupes fonctionnels présents dans le matériau. Un spectre caractéristique de bandes est formé. La position et l'intensité de ces bandes spectrales fournissent des informations sur la structure chimique de nos échantillons.

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectromètre Perkin Elmer Spectrum Two avec un module d'atténuation de transmission sur une gamme spectrale de 600 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

3.5. Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

La spectroscopie à rayon X permet l'évaluation précise de la composition élémentaire chimique ainsi que les états chimiques de ces derniers sur une surface à une profondeur allant de 2 à 10 nm. Chaque élément chimique est caractérisé par un spectre unique permettant de qualifier et quantifier les éléments présents de manière précise. Le principe de la technique repose sur l'analyse des énergies cinétiques des électrons réémis par l'échantillon après l'ionisation de ce dernier par des photons hautement énergétiques issus d'une source de rayons X (Figure 27). Les échantillons analysés doivent être complètement secs.

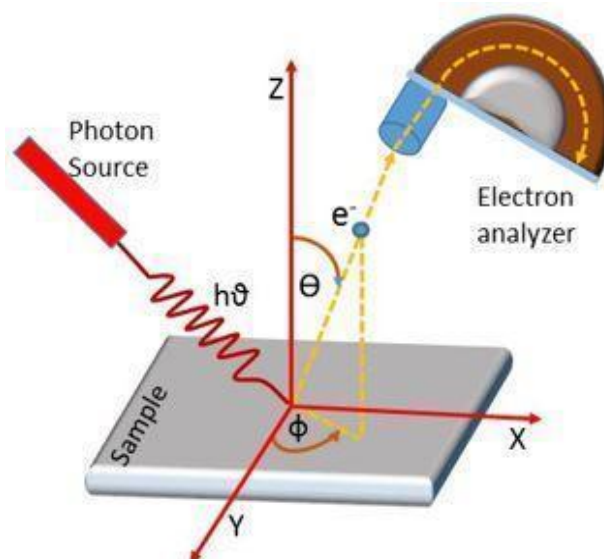


Figure 27: Principe de la spectrométrie à rayons X

Dans ces travaux de thèse, les analyses ont été réalisées avec le spectromètre Omicron Argus (Taanusstein, Allemagne) équipé d'une source de rayons X monochromatiques $AlK\alpha$ ($h\nu = 1486,6$ eV) avec un faisceau d'électrons d'une puissance de 300 W. Les photoélectrons émis ont été analysés sous un angle de 90° dans des conditions d'ultra-vide ($\leq 10^{-10}$ Torr) après introduction, via un sas, dans la chambre principale. Les spectres ont été obtenus en réglant un by-pass de 100 eV pour le spectre survey et un pass de 20 eV a été choisi pour les régions de hautes résolutions. Les énergies de liaison ont été calibrées par rapport à l'énergie de liaison de C1s d'un carbone aliphatique à 284,8 eV. Les intensités des pics ont été corrélées par les facteurs de Scofiel [183]. Le logiciel Casa XPS v.2.3.15 (Casa Software Ltd, UK) a été utilisé pour traiter les spectres et les ratio gaussien/Lorentzien ont été appliqués (G/L ratio = 70/30).

3.6. Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est une technique de haute résolution utilisée pour l'observation en détail de surfaces ou d'objets de très petites tailles (micro-nanomètre). Son principe repose sur le balayage de la surface par une pointe nanométrique maintenue à l'extrémité d'un micro levier permettant de restituer une image tridimensionnelle du matériau par réflexion d'un laser. C'est une technique utilisée entre autres pour observer la topographie d'une surface, les petits objets tels que des nanoparticules, cellules ou protéines (Figure 28).

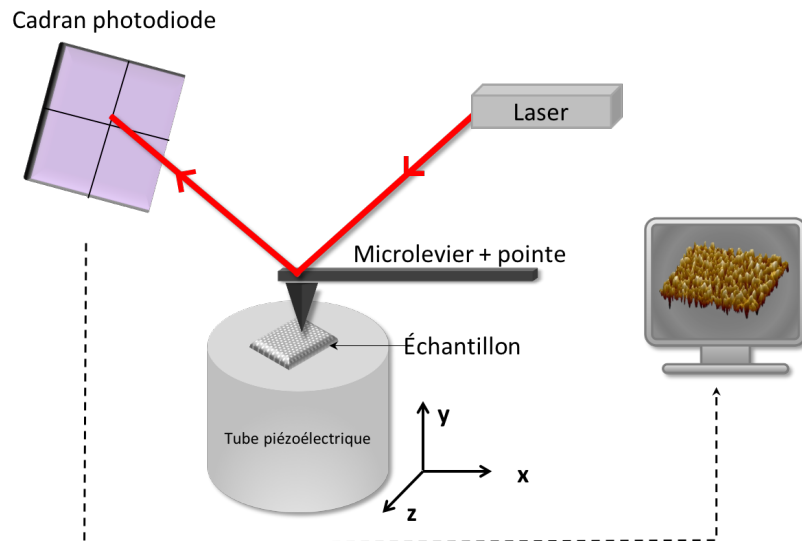


Figure 28: Principe de réflexion du laser de la microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique peut être utilisé selon trois modes de fonctionnement :

- Le mode **sans contact** où la pointe balaye la surface sans toucher l'échantillon, la pointe est maintenue à une distance constante de l'échantillon et la déviation du laser n'est due qu'aux forces attractives entre la pointe et l'échantillon.
- Le mode **avec contact** où la pointe touche la surface et est repoussée selon le principe de Pauli, le levier est donc infléchi et l'appareil mesure l'inflexion de celui-ci. Cela nous donne la hauteur de l'échantillon.
- Le mode « **tapping** » où le levier vibre à sa fréquence de résonance proche. Lorsque la pointe touche la surface, l'amplitude d'oscillation du levier diminue et nous avons accès à la hauteur locale.

Dans ces travaux de thèse, le mode **sans contact** est principalement utilisé pour analyser les surfaces de silicone chimiquement modifiées ou présentant des éléments biologiques à la surface tels que des cellules ou des protéines.

L'appareil utilisé est le Multimode 8 de Brüker couplé à un contrôleur Nanoscope V (Brüker). Les analyses sont réalisées grâce au logiciel *Nanoscope analysis 2.0* et peuvent se faire à sec ou en cellule liquide selon les éléments étudiés. .

- Analyses à sec (à l'air ambiant)

Les analyses à l'air libre concernent l'observation de la topographie de surface avant et après greffage par le polyNaSS, des protéines adsorbées, et des cellules fixées. Les images sont prises en mode scanassyst avec des pointes en nitrure de silicium (Constante de ressort = 0,40 N/m; fréquence de résonance = 70 kHz). Les paramètres d'acquisition incluent la taille de la zone de balayage, la fréquence de balayage, et la résolution de balayage allant de 256 à 1024 pixels. Ces paramètres diffèrent et sont adaptés selon les éléments étudiés.

Pour la préparation de l'échantillon, ce dernier doit être propre et totalement sec pour une image sans artéfacts et sans détérioration de la pointe.

- Analyses en cellule liquide

Les analyses des surfaces en milieu liquide permettent d'observer les surfaces greffées pour mettre en évidence le dépliement des chaînes de polyNaSS en solution. Cette manipulation a pour objectif d'estimer la longueur de ces chaînes.

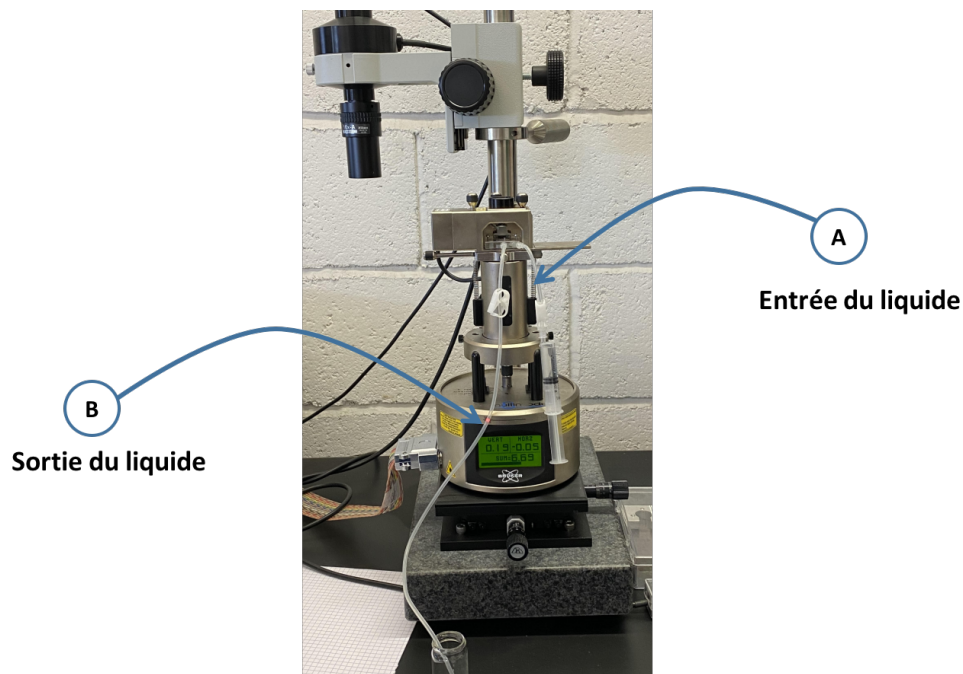


Figure 29: Mise en place de la cellule liquide dans le microscope à force atomique avec des tuyaux pour l'entrée et la sortie du liquide

Pour ce faire, l'échantillon est placé sur le porte-échantillon par-dessus lequel on place la cellule liquide qui porte la pointe adaptée aux analyses sous fluide (modèle Scanassyst-fluid/ $f_0 = 150 \text{ kHz}$ / $k=0,7 \text{ N/Mm}$). Ensuite, grâce à un tuyau d'entrée (A), le solvant est introduit à l'aide d'une seringue en plastique, dans notre cas, le liquide utilisé est le tampon phosphate salin (PBS). Le tuyau de sortie (B) permet au liquide de ressortir. L'immersion complète de l'échantillon est confirmée lorsque le liquide ressort par le tuyau B. A ce moment-là, nous bloquons l'écoulement de l'eau en fermant les barrettes situées sur les tuyaux, l'échantillon est prêt à être analysé (Figure 29).

Outre les données de morphologie ou topographie de surface, l'AFM permet d'accéder aux informations mécaniques locales de l'échantillon tel que le module de Young ou la force d'adhésion grâce au mode QNM (quantitative nanomechanical mapping). Cette option de l'AFM nécessite une étape de calibration au préalable à l'aide d'échantillons de référence pour calculer les valeurs de sensibilité de déflexion, constante de ressort, et taille de la pointe selon une méthode calibration absolue.

En fonction des éléments analysés en surface (topographie, cellules, protéines, polymères), il est nécessaire de modifier les paramètres de balayage en conséquence. Le détail de ces paramètres est donné dans la partie résultats/discussions. Enfin, les images et les paramètres de rugosités sont traités par le logiciel Gwyddion®.

4. Caractérisations des propriétés mécaniques

4.1. Test de traction

L'essai de traction est une méthode de routine facile et rapide à mettre en œuvre qui permet de caractériser la résistance mécanique des matériaux.

Techniquement, la traction est réalisée sur des échantillons de taille et de forme précise selon une éprouvette de dimensions standardisées. La méthode consiste à exercer une force de traction uni axiale sur l'échantillon.

Dans un premier temps, celui-ci subit une déformation dite « élastique », qui est réversible : lorsqu'on relâche la contrainte, l'échantillon revient à sa longueur initiale L_0 . Lorsqu'on pousse la traction plus loin, l'échantillon passe dans la zone de déformation dite « plastique » qui au contraire, est irréversible. En effet, dans ce cas, lorsque la contrainte est relâchée,

l'échantillon ne revient pas à sa longueur initiale, mais à une longueur L supérieure à L_0 . La fin de cette partie plastique correspond au point de rupture où le matériau est scindé (Figure 30).

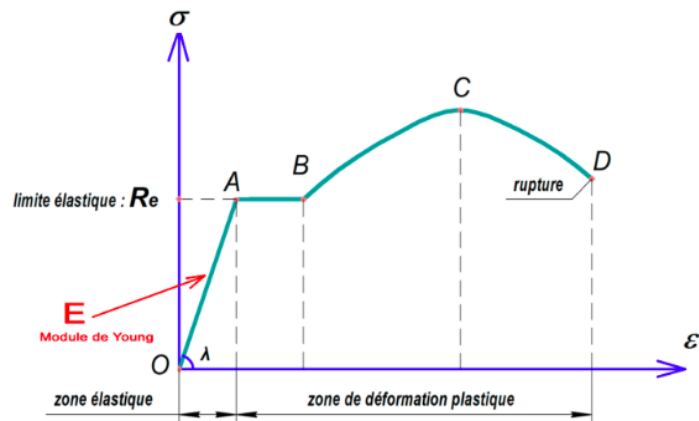


Figure 30: Principe générale d'une courbe contrainte-déformation

Dans nos études, des éprouvettes de type H3 ont été découpées des enveloppes de prothèses mammaires. Les tests de tractions ont été réalisés à température ambiante afin d'obtenir une réponse contrainte-déformation avec un grand strain (>300 %). En pratique, l'échantillon est maintenu par des pinces aux deux extrémités permettant d'éviter l'application d'une contrainte-déformation initiale à l'échantillon (Figure 31). La traction est réalisée sur un appareil ElectroPuls E3000 electro-magnetic possédant un linear stroke de 60 mm et une force dynamique de 3 kN.



Figure 31: Montage d'un test de traction uni axial

L'élasticité du matériau requiert l'utilisation d'une cellule de traction mono axiale et une mesure calibrée de 250 N avec une marge d'erreur de plus ou moins 0,1 N. A cause de la haute capacité de déformation du silicone et de la limite d'étirement, l'éprouvette choisie mesure 20 x 4,2 mm avec une épaisseur de 0,5 mm.

Les tests de traction sont réalisés à une vitesse équivalente à $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ taux de déformation. Les images sont prises avec une caméra Manta G : 12,4 million de pixels, haute résolutions : 4112 * 3008). La taille des pixels pour les essais est de 0,0245 mm. Les points blancs et noirs représentant la longueur de l'échantillon montrent la mesure directe des déformations transverses et longitudinales en fonction du temps dans la zone de jauge. La fréquence d'acquisition des images est synchronisée avec les données de forces.

4.2. Test de gonflement

Le gonflement est un moyen rapide permettant d'évaluer la densité de réticulation d'un matériau. Le principe repose sur l'interaction polymère-solvant où le solvant pénètre le réseau polymérique conduisant à l'augmentation de ses dimensions autrement dit le gonflement.

Le solvant choisi pour notre étude est le tétrahydrofuran-THF (Thermo Fischer). Pour cela, des surfaces de silicone de dimensions 2 x 1 cm ont été découpées puis immergées dans un grand volume de THF à température ambiante. On note t_0 , le moment où l'échantillon est mis au contact du solvant. Ensuite, toutes les 30 secondes celui-ci est rapidement retiré (afin de minimiser l'évaporation du solvant) pour mesurer les dimensions. L'expérience s'arrête lorsque la saturation est atteinte, le gonflement ne varie plus.

Les rapports entre les longueurs L au temps t et la longueur initiale permette d'établir la courbe de gonflement au cours du temps à l'aide l'équation suivante :

Équation 4 : Formule du taux de gonflement

$$\text{Taux de gonflement} = \frac{L}{L_0} * 100$$

L_0 : longueur initiale

L : longueur au temps t

Le gonflement maximal ou l'équilibre se traduit graphiquement par un plateau à partir duquel, il sera possible de calculer la densité de réticulation du silicone ainsi que la masse

molaire moyenne des chaînes entre deux nœuds de réticulation grâce à l'équation Flory-Rehner [184] :

Equation 5 : Equation Flory-Rehner

$$C_d = \frac{1}{M_c} = \frac{-[\ln(1 - v_2) + v_2 + X_1 v_2^2]}{V_1 \rho (v_2^{\frac{1}{3}} - \frac{v_2}{2})}$$

C_d : densité de réticulation (mol.g^{-1})

M_c : masse molaire entre deux nœuds de réticulation (g.mol^{-1})

X_1 : paramètre d'interaction Flory-Huggin

v_2 : fraction du polymère gonflé

V_1 : Volume molaire du solvant

ρ : masse volumique

5. Etude de la réponse biologique

5.1. Préparation des échantillons

Une étape dite de conditionnement est nécessaire avant la mise en contact des échantillons avec les cellules et/ou les protéines. Pour ce faire, les échantillons sont lavés successivement dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 1,5 M et à 0,15 M puis dans une solution tampon phosphate saline (PBS Gibco). Dans chacune de ces solutions, les surfaces sont lavées trois fois trois heures (ou une nuit) puis à chaque changement de solution, elles sont rincées à l'eau ultrapure pendant 10 minutes. À la fin de ce protocole de lavage, les échantillons sont stérilisés sous une lampe UV (30 W), pendant 15 minutes chaque face. Une fois stérilisées, les surfaces sont incubées dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Gibco) complété pendant une nuit à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Avant les expériences d'adsorption, le milieu est retiré et les surfaces sont rincées au PBS.

5.2. Adhésions protéiques

5.2.1. Adsorption de l'albumine de sérum bovin (BSA)

Une solution de BSA (Sigma-aldrich) de concentration physiologique de 4000 µg/mL a été préparée en dissolvant de la poudre de BSA dans du PBS stérile à 37 °C. Après agitation et dissolution complète du solide, la solution d'albumine a été maintenue dans un bain-marie à

37 °C avant utilisation. Les échantillons préparés ont ensuite été placés individuellement dans une plaque multipuits. Dans chaque puits, nous avons incubé précisément 1 mL de la solution de BSA. La plaque est ensuite conservée dans l'incubateur à 37 °C pendant une heure. Une fois l'adsorption réalisée, le milieu est retiré des plaques et les surfaces sont rincées avec du PBS, séchées sous vide à température ambiante puis conservées à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

5.2.2. Adsorption de la fibronectine

Avant d'absorber la fibronectine (FN), les échantillons subissent une étape dite de passivation pour bloquer les sites non spécifiques d'adsorption. Pour cela, la BSA est mise en contact avec tout le matériel qui sera utilisé pour adsorber la fibronectine pendant une heure dans l'incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂ (échantillons, puits, inserts, tip conique). La solution de BSA est ensuite retirée et un lavage au PBS est réalisé.

Après cette étape, la fibronectine est adsorbée. À partir d'une solution commerciale de fibronectine (Sigma Aldrich) de concentration 10⁻⁵ M, une solution de FN à 20 µg/mL est préparée dans du PBS à 37 °C. La solution est agitée manuellement et délicatement pendant 15 minutes pour permettre une bonne dissolution de la protéine tout en évitant le phénomène d'agrégation. Une fois les surfaces passivées, 1 mL de solution de FN est ajouté dans chacun des puits. La plaque est ensuite placée à 37 °C dans l'incubateur pendant une heure. À la fin de l'adsorption, la solution de FN est retirée et les surfaces sont lavées deux fois avec 400 µL de PBS. Les échantillons sont séchés à température ambiante sous vide puis sont conservés au réfrigérateur à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

5.3. Culture cellulaire

En conformité avec les normes ISO qui concernent les biomatériaux, les cellules utilisées pour les expériences de culture cellulaire sont les fibroblastes de souris L929.

- Mise en culture des cellules :

Les cellules sont mises en culture pour atteindre l'état de confluence afin d'être incubées avec les surfaces. Pour cela, les cryotubes (1 mL) de cellules ont été décongelés au bain marie 37°C puis re-suspendue dans 9 mL de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM

(Gibco) complémenté. La suspension est centrifugée à 100 CPF et 750 RPM pendant 5 minutes. Après avoir retiré le surnageant, le culot cellulaire est re-suspendu dans 10 mL de DMEM. La solution de cellules est transférée dans un flacon de culture cellulaire (Figure 32) et les cellules sont laissées en culture dans l'incubateur à 37 °C contenant 5 % de CO₂. Le milieu cellulaire est renouvelé tous les 2 à 3 jours. Lorsque les cellules ont bien poussé et qu'elles tapissent en grande partie le fond de la plaque, elles sont prêtes à être incubées dans le cadre d'expériences.

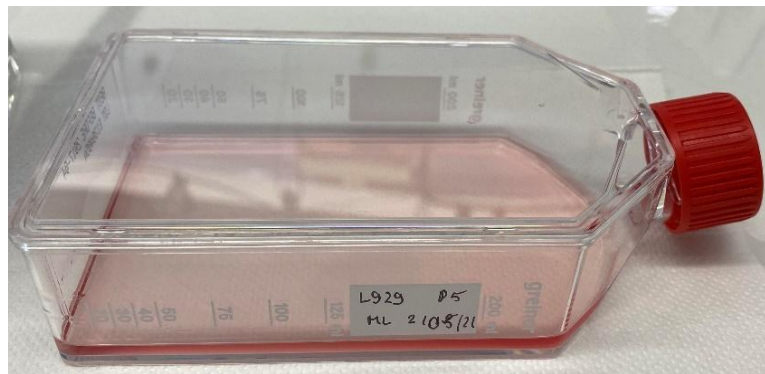


Figure 32: Flacon de culture cellulaire avec des fibroblastes dans du milieu DMEM

- Préparation du milieu cellulaire

Il est essentiel d'assurer un équilibre ionique et protéique à la surface de l'échantillon avant l'ensemencement cellulaire. Pour cela, les échantillons stérilisés sont mis dans un milieu non complémenté DMEM pendant 6 h à 37 °C et à 5 % de CO₂, puis transférés dans un milieu DMEM complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco) dans les mêmes conditions pendant une nuit.

Pour toutes les expériences de culture cellulaire, l'incubation des cellules dans des puits vides de la plaque multipuits (poly(styrène)) servira de contrôles (témoins).

5.3.1. Test de cytotoxicité (MTT) :

L'activité mitochondriale des cellules est un marqueur de la viabilité cellulaire. Au contact du MTT [bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium]] (Sigma Aldrich), les

déshydrogénases mitochondriales des cellules réduisent ce réactif en des cristaux de formazan violets. La coloration permettra de rendre compte du taux de viabilité cellulaire.

Les surfaces de silicone sont incubées avec les fibroblastes pendant 24 h à 37 °C dans une plaque multipuits avec une densité cellulaire de 5×10^4 cellules/mL/puits.

La solution de MTT est préparée en dissolvant une quantité de poudre de MTT correspondant au volume de milieu DMEM sans rouge de phénol souhaité à hauteur de 5 mg/mL. Après dissolution complète du solide, la solution est filtrée avec un filtre 0,22 μm pour retirer les éventuelles particules non solubilisées. Une fois la solution prête, 100 μL de la solution de MTT est ajouté dans les puits contenant les échantillons complétés avec 400 μL de DMEM sans rouge de phénol. La plaque est ensuite incubée pendant 4 h à 37 °C. À l'issue de cette étape, le milieu MTT est retiré, et les échantillons sont lavés avec 400 μL de PBS (2 fois).

Une fois lavés, 350 μL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) sont ajoutés à chaque échantillon pour décomplexer les cristaux de formazan violets de la surface. Les absorbances (densités optiques) des solutions colorées qui en résultent sont mesurées à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaque (ELx800, BioTek). À partir des densités optiques obtenues, la viabilité cellulaire (VC) est calculée selon la relation suivante :

$$VC = \frac{(DO_s - DO_b)}{(DO_c - DO_b)} * 100$$

DO_s correspond à l'absorbance de l'échantillon, DO_c correspond à l'absorbance du contrôle positif, et DO_b l'absorbance du contrôle négatif. Au moins, trois échantillons sont testés par condition et la différence statistique est établie par le calcul de la p-value.

5.3.2. Test de morphologie :

L'étude de la morphologie des fibroblastes au contact des surfaces de silicone est un bon indicateur pour évaluer l'affinité qu'ont les cellules pour une surface donnée.

La morphologie et l'étalement des cellules sont étudiés après différentes périodes d'incubation, soit à J1, J3, et J7 (3 échantillons/J).

Il est important de changer le milieu cellulaire (DMEM) tous les 2 jours pour le bon développement cellulaire.

Les surfaces sont incubées avec les cellules dans du milieu DMEM et placées dans l'incubateur. Aux différents temps, la plaque est retirée et les échantillons sont observés au microscope optique standard (Nikon Eclipse 80i microscope).

Pour les observations au microscope électronique à balayage (MEB), le milieu doit être retiré de chaque puits, et un premier rinçage avec 400 µL PBS est réalisé. Les échantillons sont transférés vers une nouvelle plaque où un 2^{ème} rinçage est réalisé avec 400 µL PBS pour enlever l'excédent de milieu en plus des cellules n'ayant pas adhérees. Les cellules adhérentes sont ensuite fixées avec 500 µL de formaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 4 °C après lesquelles les surfaces sont lavées avec de l'eau ultra pure 2 fois). Enfin elles sont conservées à 4 °C avant les analyses au MEB à l'aide de la platine Peltier (cf. paragraphe 2.2).

5.3.3. Test de prolifération :

C'est un test qui permet de quantifier le nombre de cellules qui ont adhéré à la surface d'un matériau. Comme pour la morphologie, les cellules sont comptées à J1, J3, et J7. Les surfaces et les cellules sont incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂. Après les différents temps, le milieu est retiré, les surfaces sont lavées une première fois avec 300 µL PBS puis sont transférées vers une nouvelle plaque multi-puits où un deuxième lavage PBS est réalisé. Pour détacher les cellules des surfaces, 300 µL de trypsine sont ajoutés à chaque puits, puis laissé 7 minutes dans l'incubateur à 37°C. Ensuite, 700 µL de DMEM y sont ajoutés. La suspension de 1 mL est mélangée plusieurs fois pour détacher le maximum de cellules des surfaces. Les solutions sont transférées dans des eppendorfs puis les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Millipore).

Chapitre III : Résultats et discussions

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 1 : Greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium sur des implants en silicone

Cette première partie est consacrée à la caractérisation physico-chimique des surfaces de silicone issues de l'enveloppe de prothèses mammaires ainsi qu'au développement d'une méthode de fonctionnalisation des surfaces par un polymère bioactif : le poly(styrène sulfonate) de sodium. Nous présenterons les différentes techniques mises en œuvre pour aboutir à un greffage covalent du polymère à la surface incluant les diverses méthodes d'activation et de greffage testées. La confirmation de la présence effective du polymère à la surface du silicone sera illustrée par les résultats de caractérisations chimiques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR), la spectrométrie photoélectronique (XPS), la mesure d'angle de contact, la microscopie électronique à balayage (MEB-EDX), le dosage colorimétrique et des expériences de physisorption. Ces résultats ont permis d'établir des hypothèses quant au mécanisme de couplage entre le polymère et les groupements chimiques à la surface du silicone.

1. Caractérisations des surfaces de silicone brutes

Dans le cas de prothèses entières (gel + enveloppe), les surfaces sont découpées et lavées plusieurs fois dans du tétrahydrofurane (THF) et à l'eau distillée (H_2O_d) avant d'être séchées pour une utilisation ultérieure comme illustrée dans la Figure 33.

La première étape de l'étude repose sur la caractérisation des surfaces brutes en vue d'en confirmer la nature physique et chimique de celles-ci. En effet, étant des matériaux de silicone issus d'implants mammaires, il est important de s'assurer de la composition exacte afin d'en comprendre la réactivité lors de modifications de surfaces.

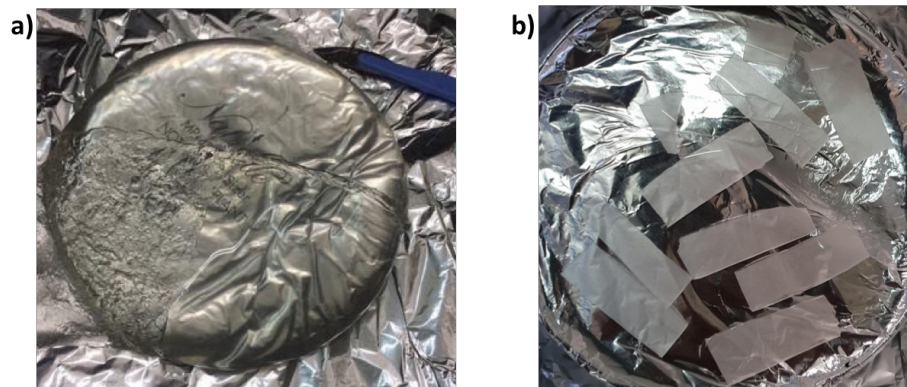


Figure 33: (a) Découpe d'un implant mammaire (b) échantillon de silicone après lavage et séchage

- Apparence et composition des surfaces de silicone

L'aspect des surfaces et l'étude de la composition élémentaire ont été évalués par microscopie électronique à balayage et par analyses dispersives en énergie (MEB-EDX).

Dans ce manuscrit, nous distinguerons la face interne de la face externe de l'enveloppe. La face interne est définie comme celle étant en contact avec le gel de silicone tandis que la face externe est celle qui sera en contact avec le milieu biologique une fois implantée. À l'œil nu, on distingue une différence d'aspect entre les deux. En effet, la face interne semble moins translucide avec un aspect plutôt mat et opaque alors que la face externe est plutôt brillante et transparente.

À l'échelle microscopique, les images obtenues par microscopie électronique à balayage confirment l'observation macroscopique décrite précédemment. L'apparence opaque de la face en contact avec le gel est attribuée à la présence de stries et de rainures aléatoires (Figure 34a). La face externe quant à elle, présente un aspect très lisse quasi sans imperfection (Figure 34b). En réalité, cette différence d'apparence est attribuée à la façon dont l'implant a été fabriqué. La face externe dont la texturation (lisse ou non) est contrôlée, est celle en contact avec le moule de fabrication dont la rugosité est précisément définie. En revanche, le côté opposé est exposé à l'air libre d'où la rugosité non contrôlée.

Dans notre étude, seule la face externe sera étudiée pour le greffage de polymère bioactif car c'est uniquement de ce côté qu'auront lieu les multiples réactions avec le milieu biologique une fois l'implant introduit dans le corps.

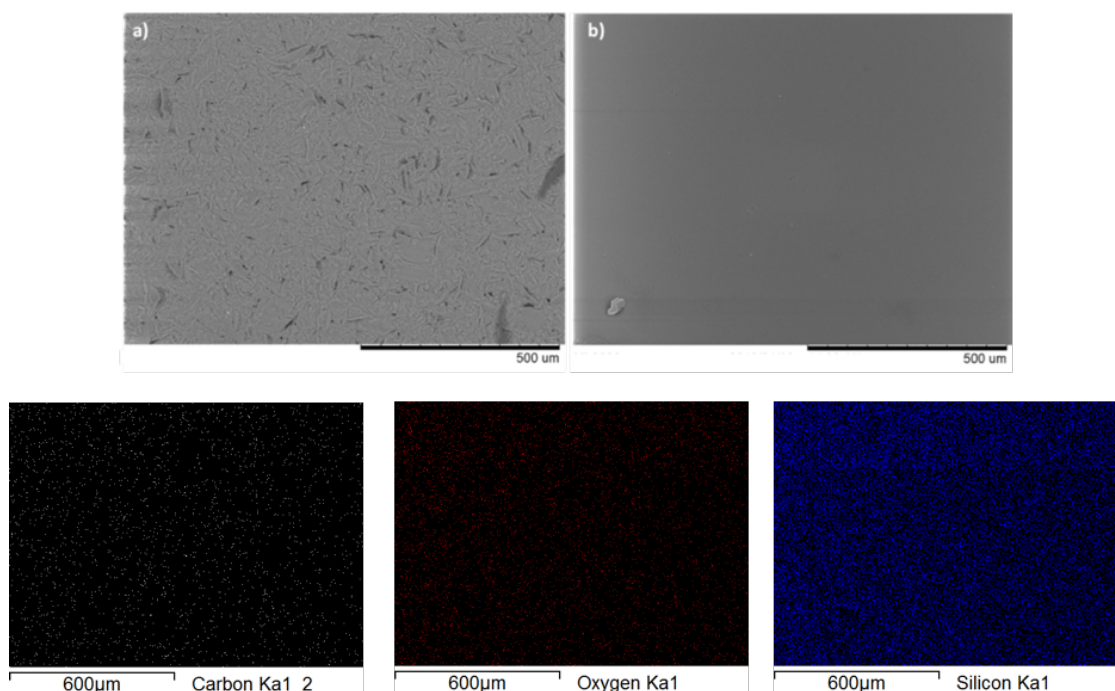


Figure 34: Images sous MEB de la (a) face interne / (b) face externe de l'enveloppe de silicone et cartographie de la répartition des éléments chimiques en surface

La composition en éléments des surfaces de silicone a été évaluée par le module d'analyse des énergies dispersives couplée au microscope électronique à balayage. Les pourcentages atomiques en éléments principaux sont similaires, qu'importe la face étudiée

avec des taux moyens de carbone, de silicium et d'oxygène respectivement de 42 %, 21 %, et 37 % (Tableau 3). Ces proportions en élément sont en accord avec la structure du silicone de type polydiméthylsiloxane. Cette observation souligne le fait que la différence entre les deux faces réside uniquement dans la rugosité. Par ailleurs, la cartographie qui en résulte décrit une répartition homogène de ces atomes à la surface de l'échantillon.

Tableau 3: Composition élémentaire des enveloppes de silicone en pourcentage atomique (%at.)

	Silicium (%at.)	Carbone (%at.)	Oxygène (%at.)
Face interne	21,74 ± 0,76	42,29 ± 0,95	35,97 ± 0,32
Face externe	20,56 ± 0,16	41,91 ± 0,57	37,53 ± 0,56

Par la suite, la structure chimique du matériau a été caractérisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Le spectre du silicone brut (Figure 35) montre les bandes caractéristiques d'un polydiméthylsiloxane conventionnel [122]. En effet, les élongations asymétriques -CH₃ entre 2960 cm⁻¹ et 2903 cm⁻¹, les déformations symétriques Si-CH₃ à 1258 cm⁻¹, les élongations asymétriques du Si-O-Si à 1070 cm⁻¹ et les Si-CH₃ à 786 cm⁻¹ sont clairement identifiables. De plus, ce spectre indique bien que la surface est essentiellement composée de silicone et qu'il n'y a pas d'impureté (absence d'autres molécules).

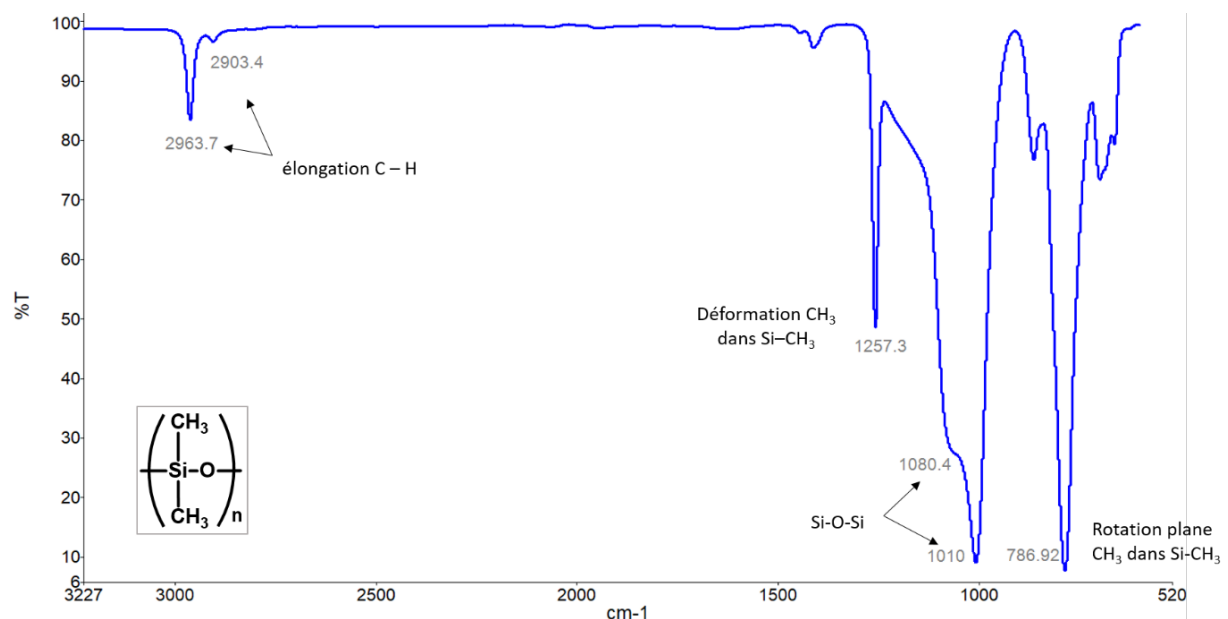


Figure 35: Spectre infrarouge d'une surface de silicone brute

- Mouillabilité

D'un point de vue chimique, le caractère polaire ou apolaire (hydrophile ou hydrophobe) d'une surface est mis en évidence par la mesure de l'angle de contact. Une goutte d'eau distillée (2 μ L) est déposée à la surface, et une fois stable, une capture de l'image est réalisée et l'angle de contact est mesuré par le logiciel Drop Shape Analysis.

La mesure de l'angle de contact à la surface d'un silicone brut montre des valeurs moyennes de $105^\circ \pm 1,00$ pour la face externe (Figure 36). Une valeur moyenne légèrement plus élevée est observée pour la face interne qui, on le rappelle, présente un aspect rugueux. Il est connu qu'une surface rugueuse favorise le caractère hydrophobe.

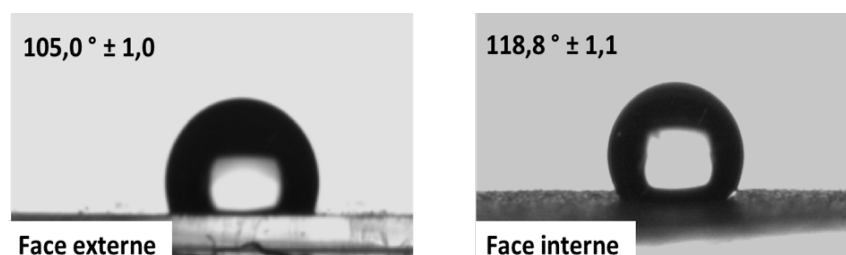


Figure 36: Evaluation de l'hydrophobicité des surfaces (face interne et face externe)

Cette faible mouillabilité des surfaces de silicone s'explique par la présence de groupements apolaires dans sa structure chimique. Les groupements méthyles portés par les atomes de silicium du squelette siloxane confèrent au silicone des propriétés hydrophobes qui s'avèrent limitantes pour certaines applications où un environnement hydrophile serait plus favorable. Par exemple, dans le cas des implants mammaires, une surface hydrophile permettrait une meilleure adhésion cellulaire et un contrôle de l'adsorption des protéines. La modification de surface pour de telles applications semble être une solution.

2. Activation/oxydation des surfaces de silicone

L'activation, autrement dit oxydation d'une surface, est généralement une étape clé dans la fonctionnalisation de celle-ci. Sur des surfaces ne possédant pas de groupements réactifs, l'activation vise à créer des groupements réactifs (-OH, -OOH) susceptibles d'interagir avec une tierce molécule biologiquement active. Comme décrit dans le chapitre

bibliographique, de multiples méthodes existent pour oxyder le silicone avec le plus souvent un recours au traitement par plasma.

Au laboratoire, de nombreuses méthodes d'oxydation ont été développées pour des surfaces de titane, des films et des membranes de poly(caprolactone) [174,176,178].

Dans le cadre de notre étude, nous avons dans un premier temps testé ces différentes méthodes sur le silicone en sachant que c'est un matériau hautement stable et peu sensible.

2.1. L'activation chimique

- Piranha

L'oxydation chimique dans un mélange acide (Piranha) est une méthode largement employée pour oxyder des surfaces métalliques comme le titane.

En suivant le même protocole, la surface de silicone a été mise en contact avec une solution piranha selon le ratio suivant 2 : 2 qui repose sur un mélange de 2 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de 2 mL d'eau oxygénée (H_2O_2). L'échantillon est d'abord immergé dans le H_2SO_4 pendant une minute après laquelle l'eau oxygénée est rajoutée. La réaction est ensuite laissée trois minutes. Le mélange qui en résulte est fortement exothermique et s'avère extrêmement agressif pour le silicone, qui devient instantanément blanc lorsque l'eau oxygénée est ajoutée.

Macroscopiquement et microscopiquement, la surface est dégradée avec le décollement en couche et le craquellement de la surface (Figure 37a-2/Figure 37 b-2). Les analyses élémentaires (Tableau 4) montrent une composition différente entre la surface oxydée et une surface non traitée. En effet, le taux d'oxygène après oxydation est plus élevé tandis que celui du carbone a diminué. Cela suppose qu'effectivement, que l'oxydation a conduit à la création d'une couche d'oxyde sur l'échantillon accompagnée d'une dégradation irréversible de la surface. L'activation par voie acide n'est alors pas adaptée aux surfaces de silicone.

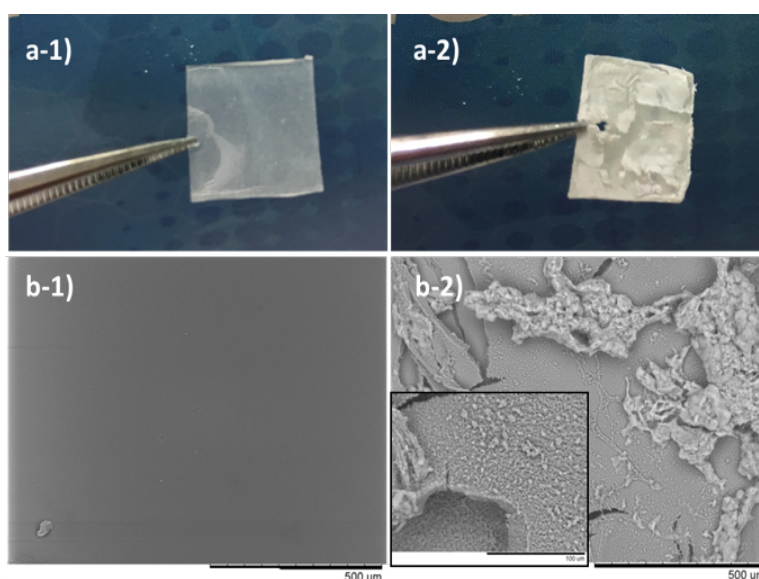


Figure 37: Photos et images MEB d'un silicone non traité (a-1)(b-1) puis oxydé par le mélange H_2SO_4/H_2O_2 (a-2)(b-2)

Tableau 4: Composition élémentaire des surfaces de silicone après oxydation acide (% atomique)

	Carbone (%at.)	Oxygène (%at.)	Silicium (%at.)
Silicone brut	$46,4 \pm 0,9$	$32,6 \pm 0,7$	$21,0 \pm 1,0$
Silicone oxydé par Piranha	$36,8 \pm 0,4$	$43,1 \pm 0,4$	$20,1 \pm 0,3$

Le spectre infrarouge du silicone oxydé par voie acide (Figure 38) ne montre pas de bandes spectroscopiques particulières. En effet, si l'on suppose qu'une couche de dioxyde de silicium se forme à l'issue de l'activation acide, les liaisons Si-O de celles-ci ne sont pas distinguables des liaisons Si-O du squelette siloxane du silicone. Aussi, la mesure de l'angle de contact ne montre pas de changement significatif en matière de mouillabilité de la surface.

- Ozonation

L'ozonation est une méthode largement employée pour oxyder des surfaces polymères telles que le poly(éthylène téréphtalate) – PET ou la poly(caprolactone) – PCL [176,185]. Un flux d'oxygène est transformé en ozone grâce à son passage dans un générateur. L'ozone généré passe dans le réacteur contenant de l'eau distillée dans lequel se

trouvent les échantillons pendant 20 minutes. L'angle de contact dans la Figure 38 montre une mouillabilité inchangée par rapport aux surfaces nues. Ainsi, aucun groupement polaire n'a été créé à l'issue du traitement par ozonation ce qui témoigne de l'échec d'activation du silicone par cette technique.

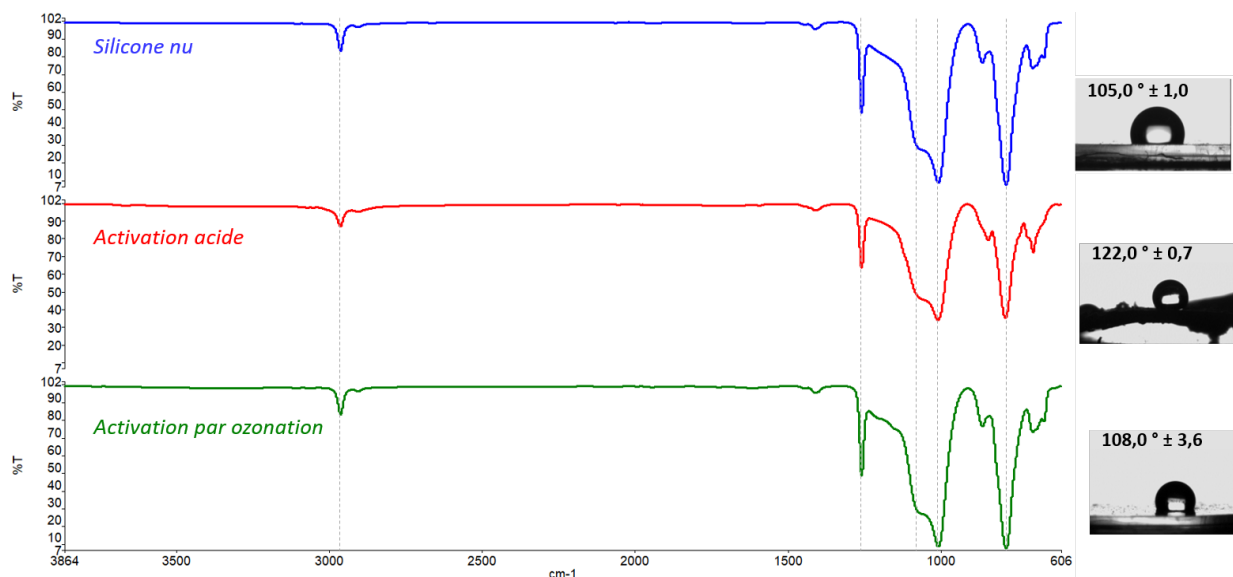


Figure 38: Spectres infrarouges des surfaces de silicone ayant subi différents types d'oxydation ainsi que la mouillabilité résultante

2.2. Du greffage sans activation à l'activation physique

L'utilisation des irradiations UV pour amorcer la polymérisation radicalaire des monomères de styrène sulfonate de sodium est une technique largement employée au laboratoire une fois les surfaces oxydées [127,174,176].

Après les tentatives d'oxydation non fructueuses par les voies usuelles, il a été imaginé un greffage du polyNaSS directement à partir des surfaces de silicone sans étape d'activation préalable. Ce greffage de type **direct** est notamment efficace pour fonctionnaliser des matériaux de type céramiques ou PCL qui dans leurs structures de départ possèdent déjà des groupements réactifs tels que des fonctions carboxyliques (-COOH) ou hydroxyles (-OH) permettant alors un greffage direct [176]. Dans le cas du silicone, nous avons supposé que les irradiations UV permettraient de créer des radicaux directement sur les groupements

méthyles et donc induire la polymérisation radicalaire directement à partir de ces méthyles radicalaires ($-\text{CH}_2^\bullet$).

D'un point de vue expérimental, étant donnée la forte hydrophobicité de la surface et de sa faible densité volumique, le silicone ne s'immerge pas en solution et flotte à la surface. Ainsi, nous avons mis en place un système de tige (trombone recouvert de téflon) au bout de laquelle l'échantillon (carrée de 2 x 2 cm) est accroché ce qui permet son maintien en immersion dans la solution.

L'avantage d'un tel montage c'est qu'il est possible de contrôler la face qu'on expose au faisceau et donc la face qu'on souhaite spécifiquement fonctionnaliser.

Pour le greffage **direct** (méthode A), l'échantillon de silicone a été placé dans un ballon contenant du monomère de styrène sulfonate de sodium à 0,7 M puis celui-ci est exposé aux irradiations UV pendant 1 heure à 160 mW/cm^2 .

Outre les propriétés antibactériennes et biocompatibles du poly(styrène sulfonate) de sodium, la présence de groupements sulfonates confère aussi aux surfaces des propriétés hydrophiles.

Toutes les expériences de greffage ont été caractérisées par :

- Un dosage colorimétrique au bleu de toluidine (évaluation du taux de polymère greffé)
- Une mesure d'angle de contact (évaluation de la mouillabilité de la surface)

En spectroscopie infrarouge, les bandes caractéristiques du silicone et du poly(styrène sulfonate) de sodium apparaissent dans les mêmes zones. De plus, les bandes spectrales du silicone étant intenses, il n'est pas possible de distinguer la contribution éventuelle du polyNaSS qui se greffe dans des quantités relativement faibles.

Les résultats (Figure 39) montrent que le taux de greffage suivant la méthode directe reste inchangé par rapport à la surface témoin UV qui a simplement été exposée aux UV sans monomère pendant une heure. De même, les angles de contact ne montrent pas une

augmentation évidente de l'hydrophilie qui pourrait témoigner de la présence du polyNaSS en surface. Nous en concluons donc que dans ces conditions, le polyNaSS n'a pu être greffé à la surface du silicone.

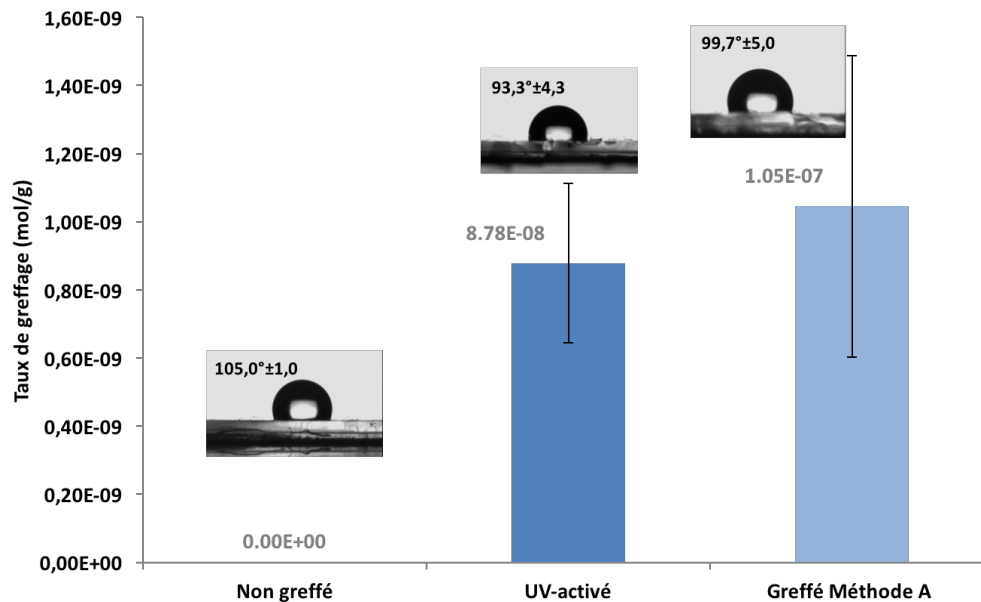


Figure 39: Dosage colorimétrique et mesure de l'angle de contact avant et après le greffage direct (méthode A)

Néanmoins, la détection d'un certain taux de bleu de toluidine survenant suite à l'exposition de l'échantillon aux UV témoigne d'un changement éventuel de la composition de la surface. En plus, de façon intéressante et qualitative, le spectre infrarouge (Figure 40) des surfaces greffées selon la méthode A, montre l'apparition évidente d'une bande d'intensité moyenne à 3600 cm^{-1} qui est attribué à l'apparition de groupements hydroxyles libres (-OH) comparé au spectre de silicone non traité où cette bande est absente. Cette nouvelle fonction chimique se caractérise également par une légère diminution de l'angle de contact observé dans la figure 36 et explique le taux de BT détecté.

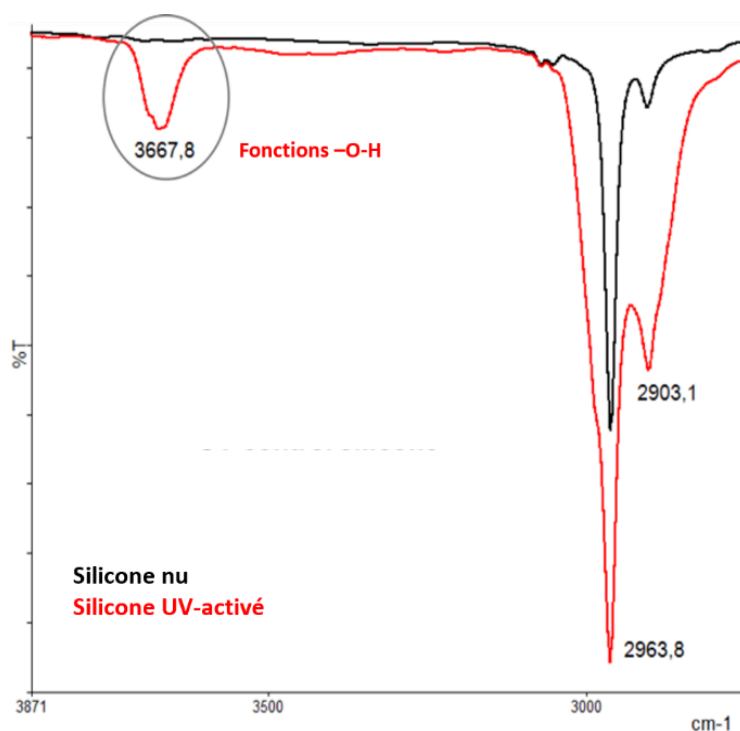


Figure 40: Spectres infrarouges des surfaces de silicone avant et après oxydation par des irradiations UV

Ces essais de greffage direct ont permis de mettre en évidence la nécessité d'activer les surfaces avant fonctionnalisation, d'autant plus que les surfaces de silicone semblent s'oxyder par voie physique avec l'utilisation des irradiations UV à 160 mW/cm^2 pendant une heure. En effet, cette activation aboutit à la formation de groupements réactifs tels que des fonctions hydroxyles.

Pour mettre en évidence l'efficacité de cette voie d'activation, nous avons testé le greffage du polyNaSS avec une activation préalable de la surface sous irradiations UV.

3. Greffage du polyNaSS avec une activation aux UV

- **Mécanisme de greffage**

Le mécanisme repose sur une méthode de greffage dite directe ou de « grafting from » qui consiste en la croissance des chaînes de polymère à partir d'espèces radicalaires en surface, elles-mêmes créées à partir des groupements réactifs. S'en suit une étape dite de propagation où le radical initié va attaquer une molécule de monomère, qui va ensuite lui-

même attaquer un autre monomère et ainsi de suite jusqu'à la formation d'une chaîne avec n motifs de monomères. La fin de la réaction est appelée l'étape de terminaison qui se traduit par une dismutation ou une recombinaison (Figure 41).

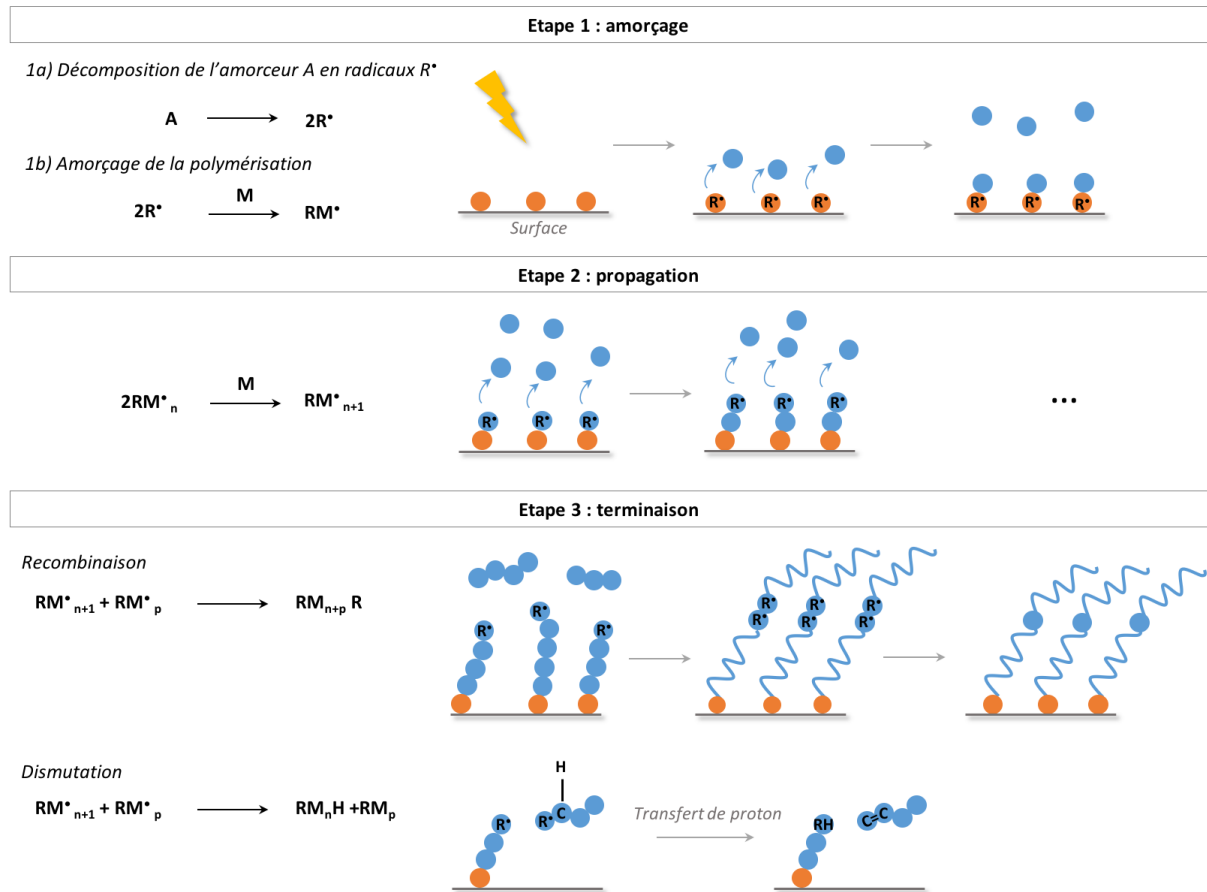


Figure 41: Mécanisme de polymérisation radicalaire à partir de la surface

Au laboratoire, deux techniques sont utilisées pour amorcer la polymérisation radicalaire à la surface d'un matériau : le chauffage thermique ou l'exposition aux irradiations UV.

3.1. Greffage avec activation UV (méthode B)

Comme décrit dans le chapitre bibliographique, la présence des groupements méthyles et la stabilité du squelette siloxane (liaisons Si-O) limitent fortement les réactions du silicone d'un point de vue chimique. L'emploi des irradiations UV apparaît alors comme un moyen efficace pour former des radicaux hautement énergétiques par rupture homolytique. C'est pourquoi les UV sont largement utilisés pour le greffage par polymérisation radicalaire à partir

d'espèces réactives en surface. Par rapport à la polymérisation thermique, les irradiations UV permettent également de raccourcir le temps de réaction.

Nous avons ici testé, le greffage du polyNaSS en deux étapes avec l'activation et la polymérisation sous UV selon le mécanisme de fonctionnalisation illustré dans la Figure 42.

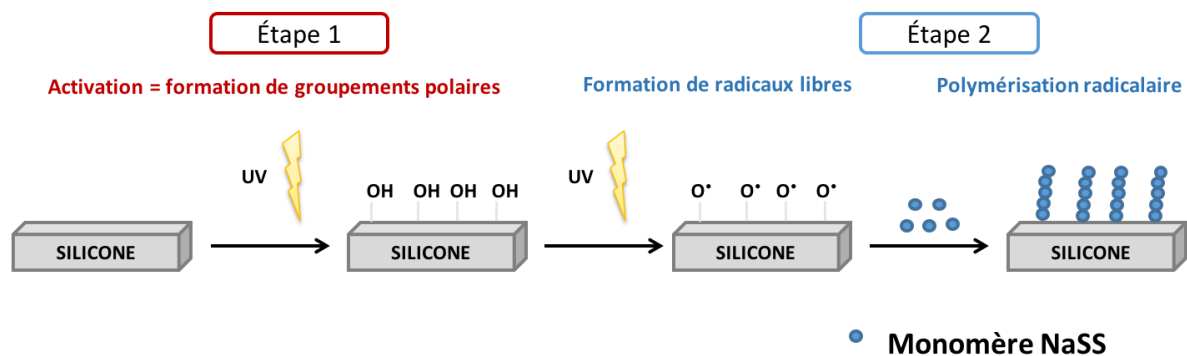


Figure 42: : Mécanisme de greffage du polyNaSS sur des surfaces en silicone à l'aide des irradiations UV

Les conditions expérimentales de cette nouvelle méthode de greffage qu'on appellera Méthode B sont les suivantes :

- **Activation** sous irradiations UV à 160 mW/cm^2 pendant une heure
- **Greffage** sous irradiations UV à 160 mW/cm^2 pendant une heure avec $[\text{NaSS}] = 0,7\text{M}$

Les échantillons restent des surfaces de $2 \times 2 \text{ cm}$ suspendues au bout d'une tige de téflon.

Le dosage colorimétrique des surfaces greffées avec une activation UV montre un taux de greffage plus conséquent et significatif comparé au témoin UV avec respectivement des taux moyens de $1,05 \times 10^{-7} \text{ mol/g}$ et $2,22 \times 10^{-7} \text{ mol/g}$ (Figure 43). Cette différence montre que les surfaces ont potentiellement été greffées.

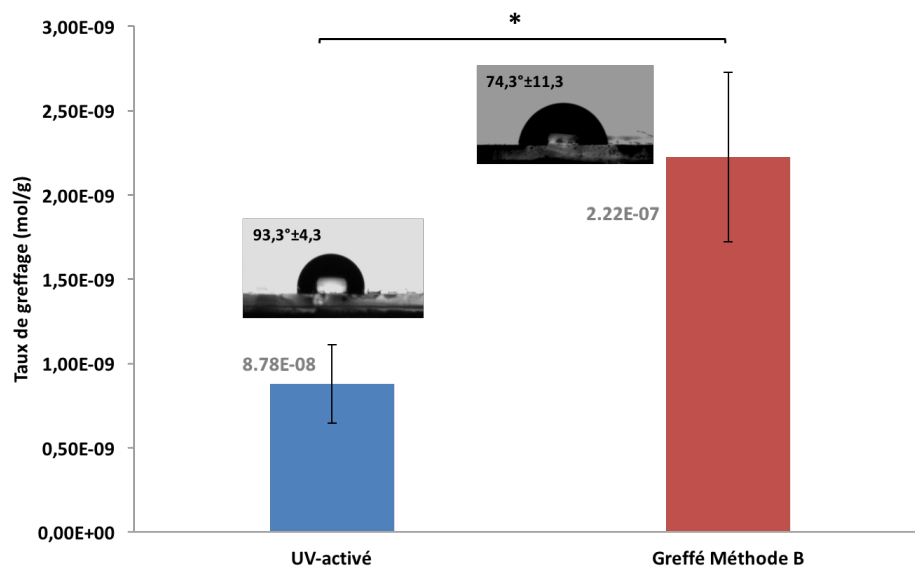


Figure 43: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avant et après greffage avec une activation UV au préalable (Méthode B) (* p-value =0,05)

Les mesures d'angle de contact appuient les observations précédentes. En effet, les surfaces sont plus hydrophiles après greffage, les angles de contact moyens passent de 93,3 ° à 74,3 °. Cependant, on note un écart-type assez important qui peut être attribué à un greffage non homogène à la surface. En effet, nous remarquons que les angles de contact les plus faibles sont concentrés dans une zone particulière à la surface des échantillons.

Les analyses XPS (Tableau 5) confirment également le greffage effectif du polyNaSS sur le silicone avec des taux de soufre (caractéristique des groupements SO_3) différents entre un échantillon greffé et non-greffé. Sur une surface greffée, le taux de soufre (S2p) est détecté à 2,6 % et tandis qu'il est de 0,0 % sur une surface nue à 168 eV. De même, le signal du soufre est absent sur le spectre d'un silicone non greffé tandis qu'il est bien intense sur celui de l'échantillon fonctionnalisé (Figure 44).

Tableau 5: Composition élémentaire des surfaces de silicones avant et après greffage (%atomique)

Elément	Position (eV)	Silicone nu (%at.)	Silicone activé aux UV (%at.)	Silicone greffé (%at.)
O 1s	531	19,5 ± 1,3	19,6 ± 0,4	19,9 ± 0,8
C 1s	283	50,4 ± 1,8	49,8 ± 0,8	52,6 ± 2,1
S 2p	174	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,6
Si 2p	101	30,0 ± 0,8	27,5 ± 7,4	24,9 ± 4,5

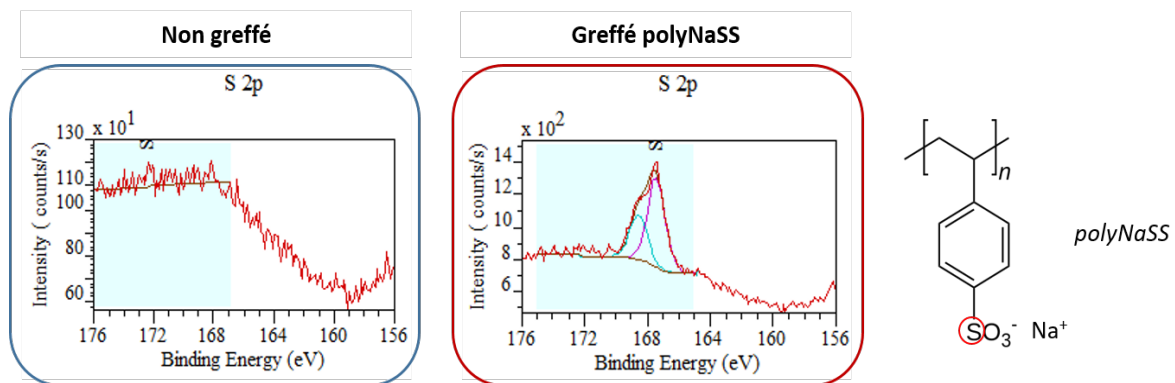


Figure 44: Spectres XPS du signal du soufre 2p (S2p) des surfaces de silicone non greffées et greffées au polyNaSS

Grâce à ces résultats, nous confirmons que le greffage du polyNaSS fonctionne avec une activation aux UV au préalable, mais que celui-ci peut être davantage optimisé.

3.2. L'importance des irradiations UV

Initialement, le greffage par la voie thermique était la stratégie de base utilisée au sein du laboratoire [130][175][178] pour la fonctionnalisation du polyNaSS sur différentes surfaces après activation. Cependant, il a été montré que les irradiations UV permettaient d'optimiser le protocole d'un point de vue cinétique. Ici, nous allons montrer l'importance de ces derniers par rapport à la voie thermique pour le greffage du silicone.

Les échantillons de silicone d'abord activés sous irradiations UV puis placés dans une solution de monomères préalablement dégazée. Le ballon est ensuite placé dans un bain d'huile pendant trois heures à 50 °C. Les résultats ne montrent aucune amélioration du taux

de greffage. En effet, la surface reste hydrophobe avec des angles de contact moyens de 108,1°. L'hypothèse avancée est celle de l'énergie thermique qui n'est pas assez élevée pour rompre les liaisons O-H (464 kJ/mol) des groupements hydroxyles issus de l'activation sous UV pour former des radicaux permettant d'amorcer la polymérisation. Les fonctions hydroperoxyde (O-O) générées par ozonation ou traitement acide requièrent moins d'énergie pour être rompu (142 kJ/mol) que les liaisons O-H. Ainsi, étant donné que les irradiations UV ne permettent que de générer des fonctions hydroxyles, le greffage thermique ne peut alors fonctionner dans le cas du silicone.

3.3. Optimisation des paramètres de greffage sous UV

Nous avons montré qu'il était possible de fonctionnaliser les surfaces de silicone avec une première étape d'activation sous irradiations UV sur des échantillons de 2 x 2 cm. Cependant, le greffage est hétérogène sur une même surface. Nous cherchons alors à améliorer la qualité du greffage avec un taux de greffage plus conséquent qui se traduit aussi par un gain d'hydrophilie important de la surface. Pour optimiser le protocole, nous pouvons jouer sur des paramètres tels **la taille de l'échantillon, la concentration en monomère** ou le **temps d'activation**.

3.3.1. Dimension de l'échantillon

La mesure des angles de contact sur les échantillons de 2 x 2 cm après greffage selon la méthode B a mis en évidence une hétérogénéité des valeurs. En effet, les angles les plus faibles étaient mesurés sur une même zone, de même pour les angles les plus élevés. Cela laisse penser que le greffage a été efficace dans une zone bien particulière qui s'explique par la zone où arrive le faisceau UV à la sortie de la lampe. En regardant plus attentivement, le faisceau sortant est concentré spécifiquement en un point et possède un diamètre d'environ 1,2 cm. Ainsi, il a été supposé que le faisceau n'étant pas aussi large que l'échantillon, le greffage n'a eu lieu qu'à l'endroit où il était concentré (Figure 45).

Dès lors, pour améliorer le greffage, nous avons dans un premier temps réduit la taille de l'échantillon comparable à la taille du faisceau. Nous sommes passés d'échantillons de 2 x

2 cm à des échantillons de 1 x 1 cm pour les essais qui vont suivre tout en maintenant les autres paramètres inchangés.

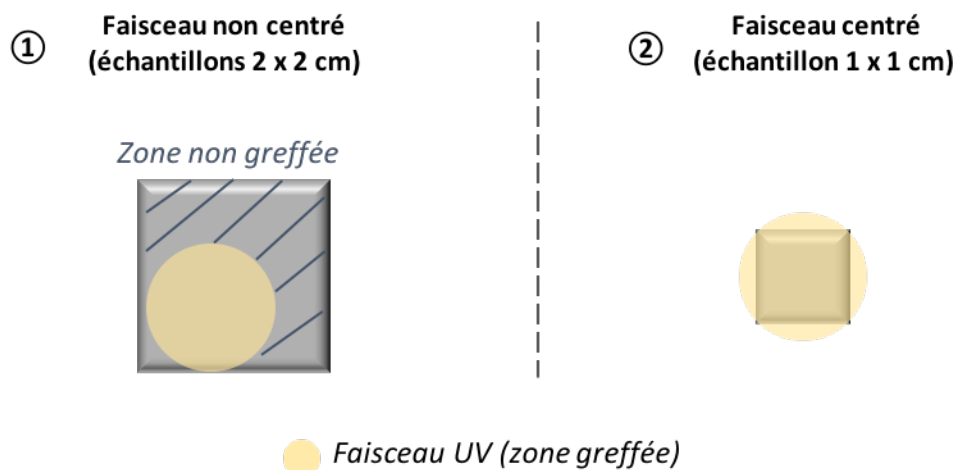


Figure 45: Importance du faisceau pour un greffage de qualité

Dans la Figure 46, le dosage du polymère à la surface montre un taux de greffage similaires aux surfaces de 2 x 2 cm : $2,56 \times 10^{-7}$ mol/g contre $2,22 \times 10^{-7}$ mol/g. Néanmoins, de façon plus marquante, nous observons une diminution significative de l'angle de contact et donc une augmentation de la mouillabilité de la surface avec des angles moyens de $40,6^\circ$ accompagnée également d'un écart-type moins important. L'homogénéité ainsi que la qualité de greffage ont été améliorés d'un premier pas avec la diminution de la taille de la surface et la prise en compte de l'importance de la concentration du faisceau UV en sortie lampe.

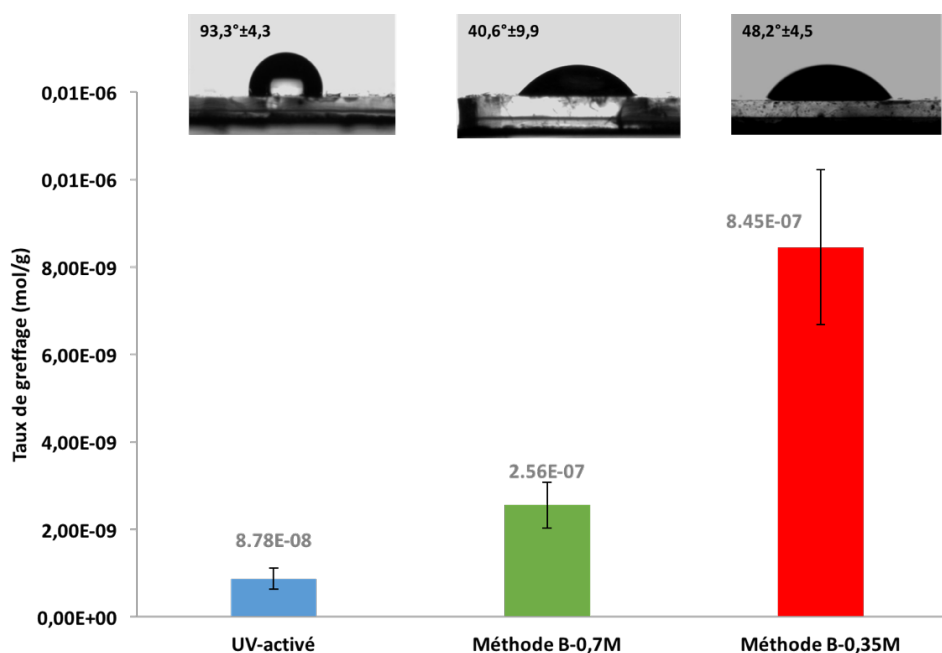


Figure 46: Comparaison des taux de greffage et de l'hydrophilie des surfaces de silicone après greffage avec une concentration en NaSS de 0,7 M ou de 0,35 M

3.3.2. Concentration en monomère

Au laboratoire, lors du développement du greffage du polyNaSS sur des surfaces de titane, l'étude de la concentration en monomère a montré que lorsque celle-ci était divisée par deux, soit de 0,35 M au lieu de 0,7 M, le taux de greffage a pu être significativement augmenté [174].

Dans le cas des surfaces de silicone, un échantillon activé sous UV a été immergé dans un ballon contenant une solution du styrène sulfonate de sodium à 0,35 M puis a été exposé aux UV pendant une heure à 220 mW/cm^2 .

Les résultats montrent qu'avec une concentration réduite par deux, le taux de greffage a été multiplié par 4 comparé à une concentration initiale en monomère de 0,7 M : $2,56 \times 10^{-7}$ contre $8,45 \times 10^{-7} \text{ mol/g}$ (Figure 46). Ces observations concordent avec les données des études précédentes. Pour expliquer ce phénomène, il est supposé qu'une grande densité de monomère va favoriser les réactions d'homopolymérisation en solution par rapport à la polymérisation à partir des radicaux créés en surface. Une densité moins importante va au contraire diminuer ces réactions d'homopolymérisation en solution au profit de la croissance

des chaînes de polymères en surface. De ce fait, l'accessibilité des monomères à la surface est meilleure conduisant à de meilleurs taux de greffage. En matière de mouillabilité, les angles de contact moyens sont similaires qu'avec une concentration de 0,7 M.

La réduction de la concentration par deux aura permis d'augmenter le taux de greffage et d'atteindre une même hydrophilie.

3.3.3. Réduction du temps d'activation

Après la diminution de la taille de la surface et la diminution de la concentration initiale en monomères, nous avons tenté de réduire le temps d'activation sous UV. Dans les expériences précédentes, ce temps a été fixé à une heure.

Pour démarrer, nous avons alors diminué de moitié le temps d'activation soit à 30 minutes. Les résultats dans la Figure 47, montrent que peu importe le temps d'activation, fixé à 60 minutes ou 30 minutes, le taux de greffage reste le même. Également, la mesure des angles de contact ne montre pas de variation significative de la mouillabilité que la surface ait été greffée après 60 ou 30 minutes d'activation. Ces résultats permettent encore une fois d'affiner les paramètres de greffage pour un protocole optimisé.

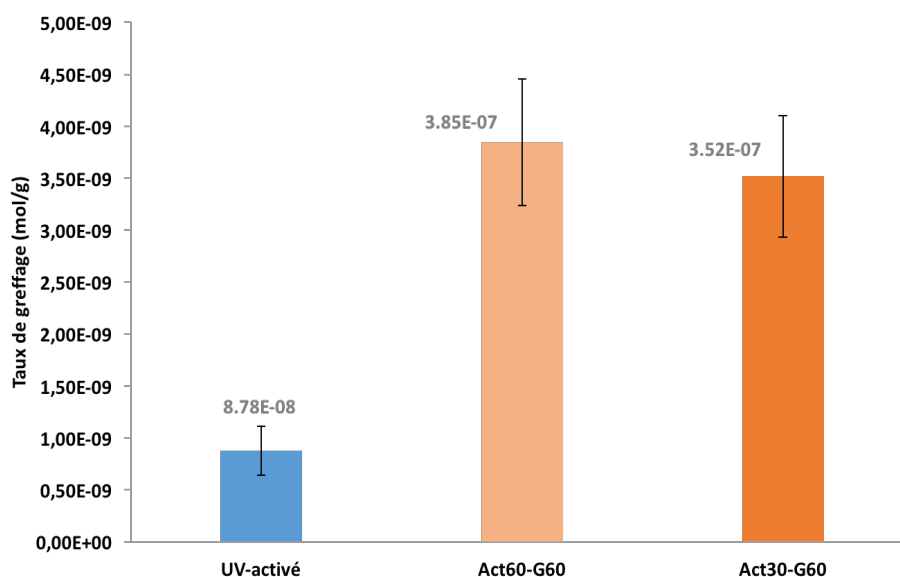


Figure 47: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone greffées après 60 ou 30 minutes d'activation

Tout de même, nous avons caractérisé les surfaces de silicone activées à différents temps sous irradiation UV pour de nouveau confirmer la création effective de fonctions hydroxyles en surface. Les spectres infrarouges (Figure 48) confirment qu'en effet après 30 minutes aux UV (spectre orange), les hydroxyles apparaissent avec la bande caractéristique à 3670 cm^{-1} . Évidemment ces groupements restent présents après 45 et 60 minutes. Après seulement 15 minutes d'exposition, aucun groupement polaire n'a été mis en évidence.

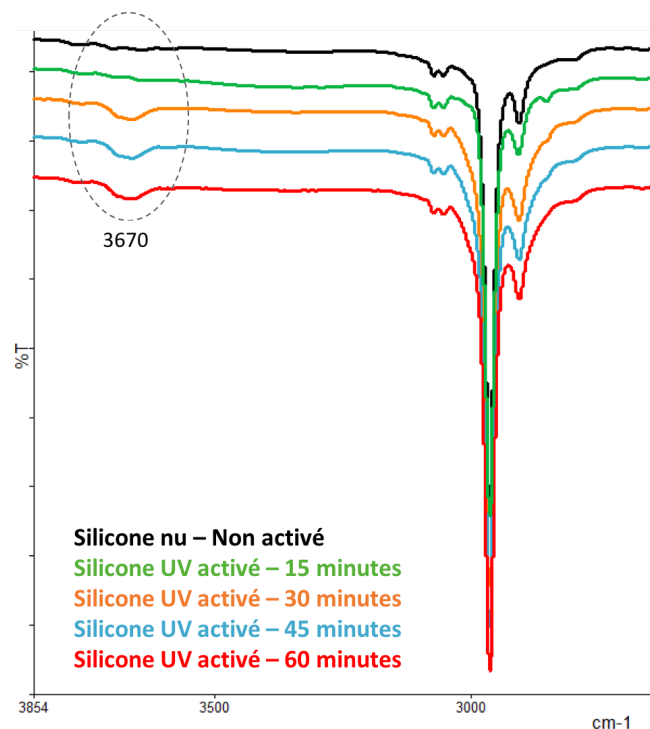


Figure 48: Spectres infrarouges des surfaces de silicone activées sous irradiations UV à 15, 30, 45, et 60 minutes

Pour conclure, à travers tous ces essais de greffage et surtout d'activation des surfaces de silicone, nous sommes parvenus à greffer avec succès le polyNaSS sur le silicone avec une étape d'activation utilisant les irradiations UV en milieu aqueux. Par la suite, nous avons affiné les paramètres de greffage afin d'optimiser le protocole de façon qualitative et quantitative en jouant sur les paramètres tels que la taille de l'échantillon, la concentration en styrène sulfonate de sodium ou encore le temps d'activation. Les résultats montrent que les conditions idéales consistent en **une surface de 1 x 1 cm, un temps d'activation de 30 minutes et une concentration en monomère de 0,35 M.**

3.4. Estimation de la taille des chaînes de polymère greffé

La caractérisation du polyNaSS greffé à la surface du silicone passe également par l'évaluation de la taille des chaînes de polyNaSS en surface. Celle-ci a été mise en évidence par microscopie à force atomique (AFM) en cellule liquide. En effet, en milieu aqueux, les chaînes de polymère se déplient ce qui permet d'estimer la longueur de ces dernières.

Pour ce faire, une surface de silicone non greffée a été d'abord caractérisée à sec par AFM. La Figure 49a montre que la surface de silicone dite « lisse » d'un point de vue commercial présente en réalité un degré de rugosité d'une dizaine de nanomètres ($19,06 \text{ nm} \pm 1,32$) qui se manifeste par une succession de pics et de vallées (surface en dents de scie). Sur une surface greffée en milieu liquide, le déploiement des chaînes en solution se traduit par des points clairs qui se démarquent de la surface par un contraste de couleurs (Figure 49b).

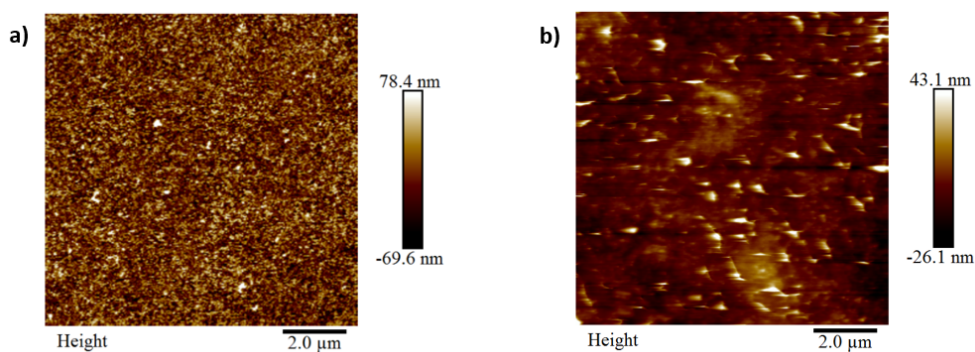


Figure 49: Représentation 2D des surfaces de silicone non greffées à sec (a) et des surfaces de silicone greffées en cellule liquide (b) par microscopie à force atomique

La hauteur moyenne des pics de la surface du silicone non greffé est de $6,26 \text{ nm} \pm 1,32$. Celle de la surface greffée en cellule liquide est de $9,80 \text{ nm} \pm 2,17$. La différence entre ces deux valeurs permet d'estimer la longueur moyenne des chaînes de polyNaSS qui est alors de $3,54 \text{ nm}$ (Figure 50). Ainsi, à partir de la taille d'un motif de NaSS qui est de $0,252 \text{ nm}$, on estime à 14 motifs de monomères la chaîne de polyNaSS greffée à la surface du silicone et donc une masse molaire moyenne de 2884 g.mol^{-1} .

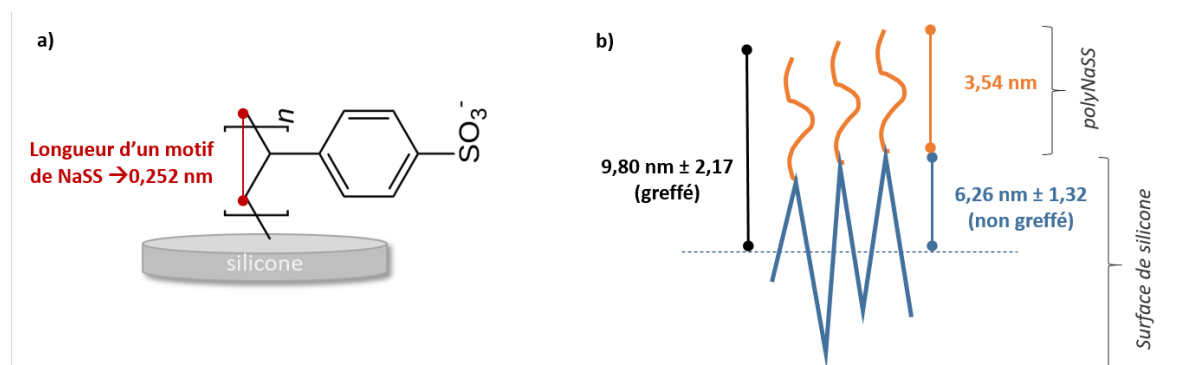


Figure 50: (a) Taille d'un motif de NaSS sur une surface de silicone (b) taille de la chaîne de polyNaSS sur une surface greffée en cellule liquide

4. Physisorption polyNaSS/silicone :

Le principe de physisorption s'oppose au principe de chimisorption (fonctionnalisation covalente) d'une molécule en surface qui s'appuie principalement sur des interactions faibles entre la molécule de greffage et le substrat.

Dans ces travaux où l'objectif premier est de fonctionnaliser de manière covalente le polyNaSS à la surface du silicone, il semblait nécessaire de conduire des tests de physisorption pour s'assurer de la nature covalente de notre protocole. Pour cela, des surfaces de silicone ont été immergées dans une solution de polyNaSS de même concentration que la solution de greffage. Ces derniers sont laissés 24 h pour permettre la physisorption. Nous avons regardé l'effet de physisorption sur des échantillons de silicone non traité ainsi que sur des échantillons activés sous irradiations UV à 160 mW/cm^2 et à différents temps : 15, 30, 45, 60 minutes. A l'issue de l'expérience, les échantillons sont lavés plusieurs fois pendant 24 h à l'eau distillée avant d'être mis à sécher pour des caractérisations ultérieures.

Les résultats d'angles de contact montrent une mouillabilité inchangée. Les surfaces demeurent hydrophobes avec des angles de contact variant autour de 105° comme pour un silicone non traité, quelle que soit la condition étudiée (Figure 51). En revanche, dans le cas d'un échantillon greffé sous UV, un gain d'hydrophilie significatif avait été observé avec une surface qui passe d'un état hydrophobe à hydrophile ($< 45^\circ$).

Le dosage colorimétrique de ces échantillons confirme également l'absence de physisorption du polyNaSS avec des taux de greffage inchangés par rapport au greffage sous UV (Figure 52).

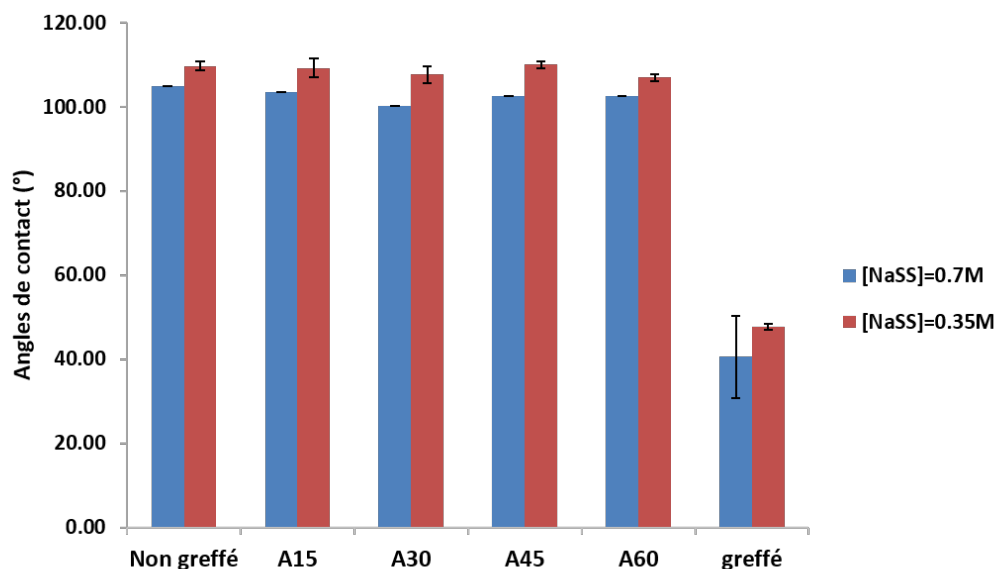


Figure 51: Mouillabilité des surfaces après physisorption du polyNaSS après plusieurs temps d'activation en comparaison avec des surfaces fonctionnalisées sous irradiations UV

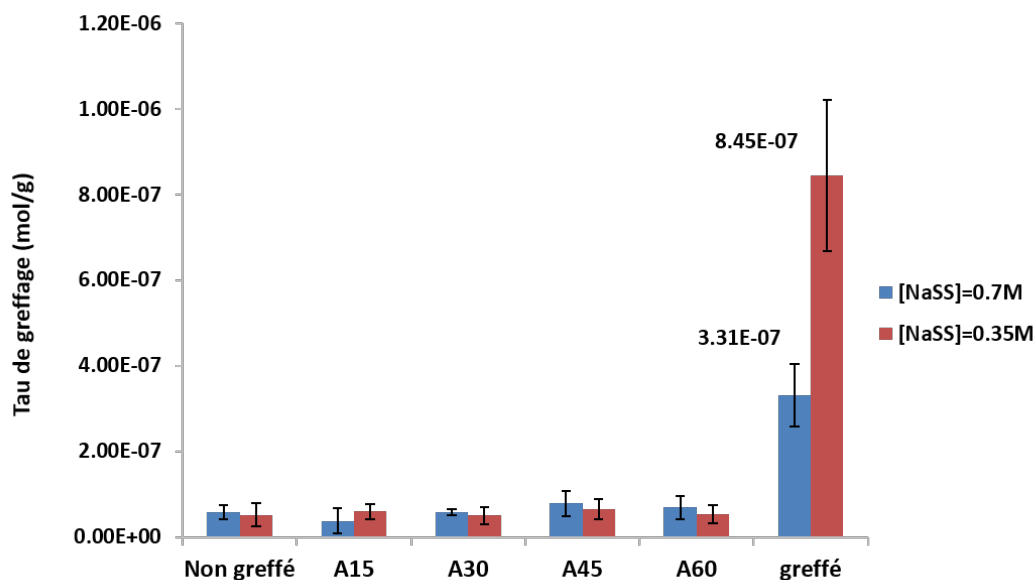


Figure 52: Dosage colorimétrique des surfaces après physisorption du polyNaSS après plusieurs temps d'activation en comparaison avec des surfaces fonctionnalisées sous irradiations UV

Ces résultats confirment donc le caractère covalent du protocole de greffage du polyNaSS sur le silicone sous irradiations UV et que celui-ci ne s'est pas simplement adsorbé en surface.

5. Compréhension du mécanisme de greffage :

La compréhension du mécanisme de greffage est essentielle pour rendre compte de l'action chimique des UV sur les différents groupements chimiques caractéristiques du silicone mais aussi de la façon dont se couple le polyNaSS à la surface par le biais de liaisons chimiques.

En se basant sur les données de la littérature et les résultats obtenus précédemment suivant le greffage, nous proposons trois hypothèses de mécanismes (Figure 53) :

- ❖ **Mécanisme 1** : L'activation/oxydation sous UV permet de générer des fonctions hydroxyles sur les méthyles (rupture de la liaison CH₂-H) qui servent de point de départ à la polymérisation. En effet, à partir de ces groupements, les UV créent des radicaux oxygènes à la surface qui amorcent ensuite la polymérisation radicalaire du NaSS.
- ❖ **Mécanisme 2** : L'activation/oxydation sous UV permet de générer des fonctions hydroxyles après rupture de la liaison Si-CH₃ pour donner des liaisons Si-OH, qui ensuite, comme pour le mécanisme 1, amorce la polymérisation radicalaire.
- ❖ **Mécanisme 3** : Sur les groupements méthyles où l'oxydation n'a pas eu lieu, les irradiations UV créent directement des radicaux CH₂[•] qui vont amorcer la réaction de polymérisation.

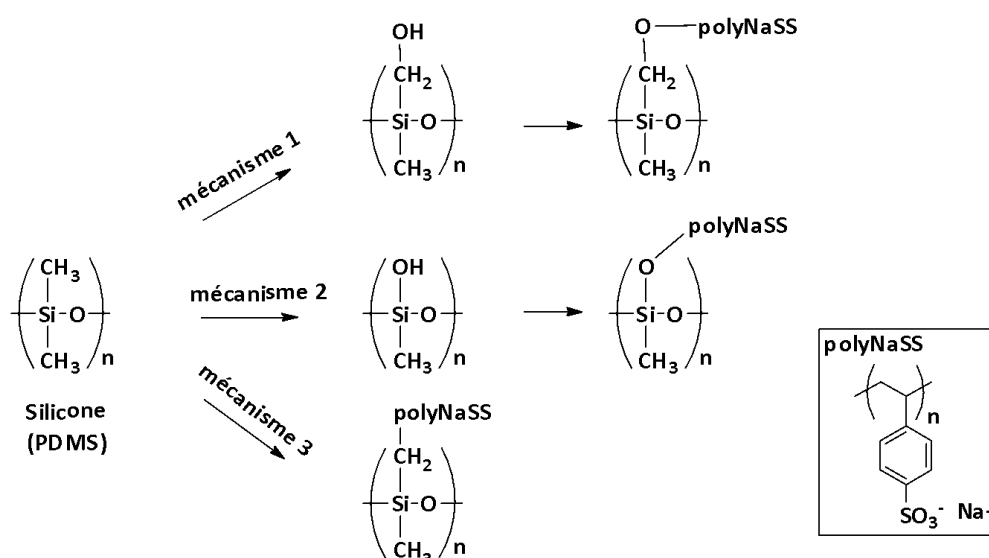


Figure 53: Suggestion de mécanismes chimiques de fonctionnalisation du polyNaSS sur des surfaces de silicone

En réalité, nous supposons que ces trois mécanismes peuvent avoir lieu simultanément avec éventuellement une prédominance du mécanisme 2 car nous avons prouvé l'apparition de fonctions hydroxyles après activation toujours avec la présence des bandes C-H méthyliques.

Pour conclure, du fait de sa structure chimique et donc de sa stabilité, le silicone est un matériau difficile à modifier de prime abord car il nécessite des techniques de hautes énergies pour perturber ses liaisons chimiques.

Nous avons réussi dans cette première partie à développer une nouvelle méthode permettant d'oxyder les surfaces de silicone par la simple utilisation des irradiations UV à 365nm en milieu aqueux. Cette activation nous a permis d'amorcer la polymérisation radicalaire en surface à partir des groupements hydroxyles et nous a permis de greffer efficacement le poly(styrène sulfonate) de sodium sur le silicone. Les différentes méthodes de caractérisations employées nous ont permis de confirmer le succès de la fonctionnalisation covalente par cette stratégie.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Les élastomères sont des matériaux semi-rigides qui possèdent d'excellentes propriétés mécaniques grâce à leurs flexibilités et élasticités qui dépendent étroitement du degré de réticulation [185]. Dans le domaine des biomatériaux, un cahier des charges précis est établi afin de garantir des produits sûrs et de qualité pour l'obtention des certifications nécessaires à la mise sur le marché. Ces prérequis sont régis par les normes ISO spécifiques des biomatériaux [187]. Ainsi, une attention particulière doit être portée au silicone qui est un élastomère très utilisé comme matériau implantable. En effet, il s'agit de contrôler ses propriétés mécaniques qui doivent être conservées malgré le traitement employé pour des fins de fonctionnalisation.

Comme largement décrit dans la partie I, le greffage d'un polymère bioactif tel que le poly(styrène sulfonate) de sodium sur des surfaces de silicone implique en grande partie l'utilisation des irradiations UV. Ces derniers sont employés pour activer les surfaces d'une part, puis pour polymériser le monomère à la surface en milieu aqueux (Figure 54). Toutefois, les irradiations UV sont grandement connues pour leur effet de vieillissement [187] qui se manifeste par une altération des propriétés mécaniques et/ou une altération de la rugosité de surface pouvant conduire à la rupture/dégradation de l'implant qui entraîne la perspiration du gel hors de l'implant pour se répandre dans le milieu biologique [189].

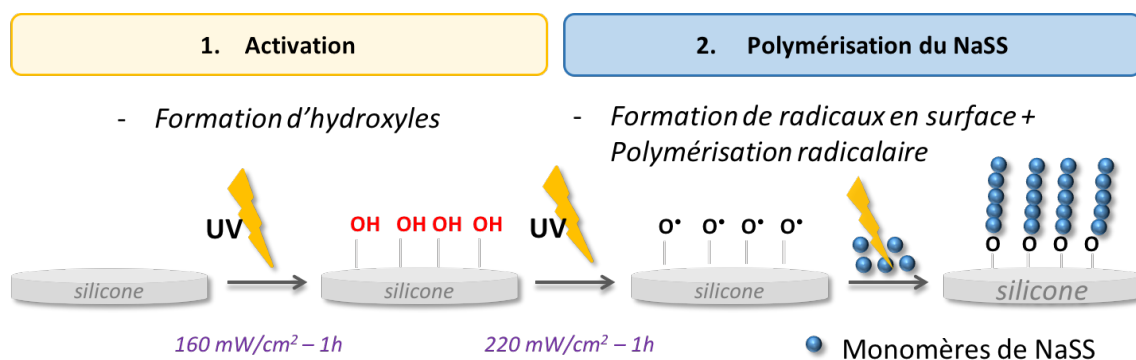


Figure 54: Mécanisme de greffage du polyNaSS sous irradiations UV sur des surfaces de silicone et conditions expérimentales

Ainsi, compte tenu du contexte décrit ci-dessus, il semble important de vérifier l'influence de chacun des paramètres impliqués dans le protocole de greffage sur les

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

propriétés intrinsèques du matériau en d'autres termes, l'impact des UV seuls et la présence du polyNaSS.

Outre l'effet biocompatible et antibactérien du polyNaSS, le greffage de celui-ci ne doit pas altérer de manière significative les propriétés initiales de l'implant.

Pour cela, cette partie portera sur :

- 1) L'étude de l'influence de ces paramètres sur les propriétés mécaniques du silicone
- 2) L'étude de l'influence de ces paramètres sur la réponse cellulaire

Le tableau ci-dessous récapitulent, les trois conditions qui seront étudiées dans cette partie : surfaces non-greffées (NG), surfaces UV-contrôles (UV) et surfaces greffées avec le polyNaSS

Groupes étudiés	Conditions expérimentales
1. Non greffé	Surfaces issues d'enveloppe de prothèse vide (sans gel) uniquement lavées (H ₂ O _d) puis séchées
2. UV-contrôle	Surfaces exposées 2h aux irradiations UV seules dans de l'eau
3. Greffé polyNaSS	Surfaces exposées 1h aux UV (activation) puis 1h aux UV en présence de monomère NaSS (polymérisation)

1. Étude de la réponse biomécanique des surfaces de silicone

Les élastomères de silicone sont des matériaux hautement flexibles et résistants à la déformation qui se caractérisent par un module de Young (module d'élasticité) faible. Cette valeur rend compte de la raideur/rigidité d'un matériau lorsqu'il est soumis à une force de traction : plus le module est faible, plus le matériau sera élastique et déformable. L'utilisation des rayonnements UV dans le processus de greffage du polyNaSS sur des surfaces de silicone peut entraîner la création de points ou de nœuds de réticulation au sein de la structure tridimensionnelle du matériau. L'augmentation de ces nœuds conduit à la rigidification du matériau qui peut profondément altérer ses propriétés intrinsèques (Figure 55). D'autant plus qu'il est connu que l'exposition accrue aux irradiations UV traduit le phénomène de vieillissement des matériaux élastiques en augmentant le degré de réticulation [188,190].

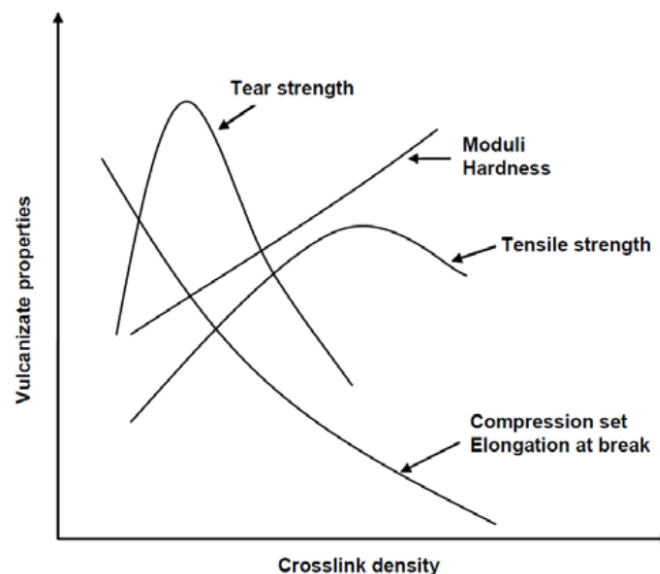


Figure 55: Evolution des propriétés en fonction du taux de réticulation [191]

Les irradiations UV employées pour le greffage des surfaces en silicone varient entre 160 et 220 mW/cm². L'évaluation des propriétés mécaniques doit alors être réalisée avant et après modification des surfaces afin de vérifier la conservation des propriétés mécaniques initiales des surfaces pour répondre à la réglementation appliquée aux implants mammaires. Les tests de traction sont menés selon la norme ISO 37 :2017 ou ASTM D412-16 [187].

1.1. Essais de traction

Les échantillons sont découpés dans des enveloppes de silicone fournies par l'industriel SEBBIN selon une éprouvette de type H3 dont les dimensions sont détaillées dans la Figure 56. Pour des questions de comparaison, les éprouvettes sont issues d'une même prothèse et proviennent de la même zone de l'enveloppe car les propriétés élastiques dépendent aussi de l'épaisseur de l'échantillon qui peut différer selon la zone choisie. Par exemple, par rapport au dôme de l'enveloppe, la base qui entoure la pastille d'occlusion est plus épaisse de quelques millimètres.

Un groupe d'éprouvettes subit un traitement UV (UV-contrôles) où elles sont successivement exposées pendant une heure à 160 mW/cm^2 puis une heure à 220 mW/cm^2 . Un autre groupe est greffé au polyNaSS selon le protocole développé. Ces lots d'échantillons (incluant le groupe de silicone non greffé) ont été envoyés au Laboratoire d'Automatique, de Mécanique et d'Informatique Industrielles et Humaines (LAMIH) à l'Université polytechnique Hauts de France. Les tests de tractions ont été réalisés par le Dr R. Vayron et le Dr R. Delille de l'Université polytechnique des Hauts de France.

Les courbes contrainte-déformation qui en résultent (Figure 56) présentent une allure caractéristique des matériaux de type élastomère. Elles se distinguent par une première portion linéaire qui correspond à la zone de déformation élastique où le relâchement de la contrainte permet au matériau de revenir à sa longueur initiale L_0 . Le point de rupture de cette linéarité marque la limite d'élasticité, au-delà, lorsque la contrainte est relâchée le matériau ne revient pas à sa longueur initiale mais à une longueur L supérieure à L_0 .

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

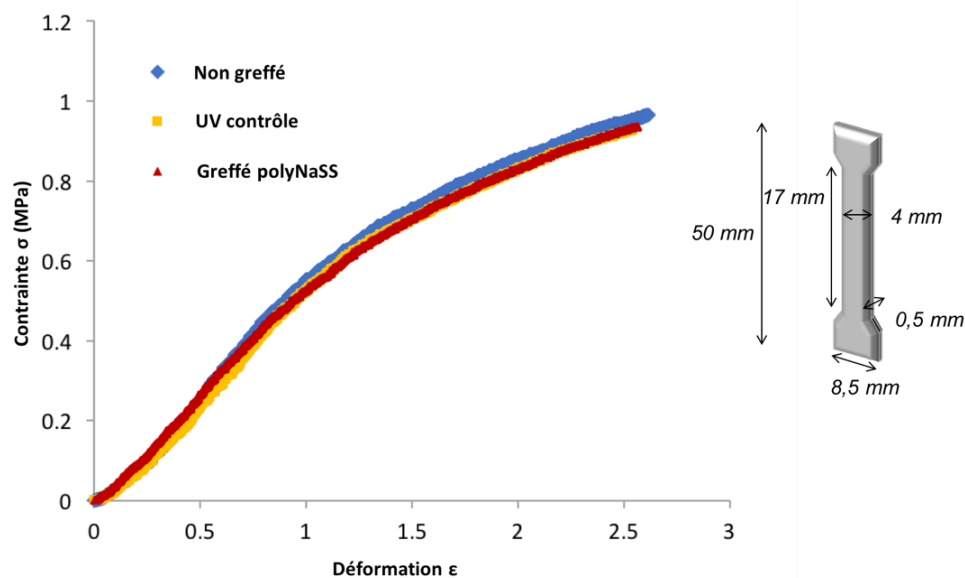


Figure 56: Courbes contrainte-déformation des différents groupes de silicone étudiés

La zone qui nous intéresse particulièrement est la première portion de la courbe entre 0 et 0,3 dont le coefficient directeur donne la valeur du module d'élasticité. À première vue, les courbes contrainte-déformation des différents groupes semblent identiques. Les modules d'élasticité extraits de chaque groupe sont résumés sur l'histogramme dans la Figure 57. En effet, nous constatons que les modules d'Young sont très proches et varient autour de 1,90 MPa. Toutefois, en regardant de plus près, les surfaces UV-contrôle et les surfaces greffées présentent respectivement des modules de 1,97 MPa et 1,93 MPa qui sont légèrement supérieurs à celui du groupe des non traités. Ceci peut s'expliquer par le rôle des irradiations UV dans l'augmentation du degré de réticulations des échantillons se traduisant par la légère hausse du module. Entre les groupes UV contrôle et greffé, la différence repose sur la présence de monomère en solution qui pourrait jouer un rôle de barrière entre le faisceau UV et la surface, ce qui explique la variation du module. Néanmoins, l'analyse statistique Anova montre qu'en réalité la différence n'est pas significative entre ces trois groupes d'échantillon. Cela suppose que les irradiations UV ont finalement peu d'impact sur les propriétés élastiques du silicone et que les propriétés mécaniques semblent être conservées malgré le traitement chimique.

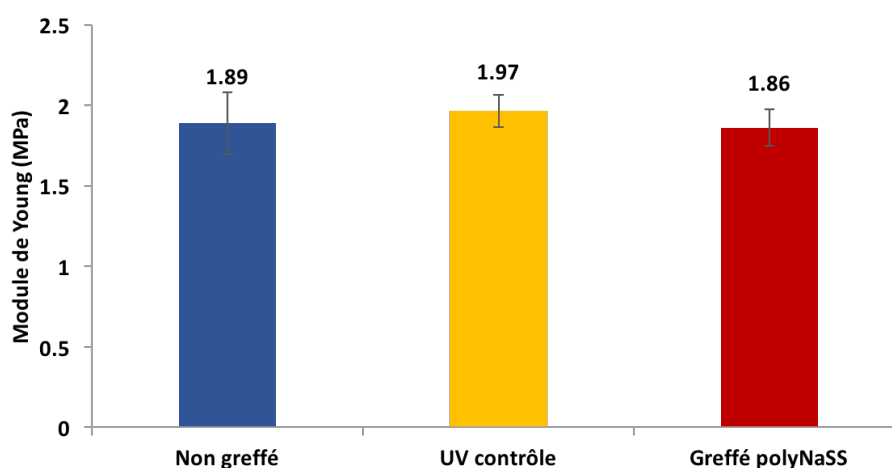


Figure 57: Histogramme des modules d'Young calculés à partir des courbes contrainte-déformation

1.2. Essais de gonflement des surfaces de silicone

Pour compléter et supporter les observations précédentes qui montrent que les irradiations ont un impact négligeable sur le matériau, des tests de gonflements ont été réalisés.

Le gonflement est une méthode simple et rapide qui permet d'évaluer la densité de réticulation d'un réseau tridimensionnel d'un matériau. La technique repose sur le principe de pénétration des molécules de solvants entre les chaînes de polymère se traduisant par l'éloignement de celles-ci les unes par rapport aux autres qui se caractérise macroscopiquement par l'augmentation des dimensions du matériau (Figure 58). De façon qualitative, plus un matériau gonfle, moins il est réticulé et rigide et inversement.

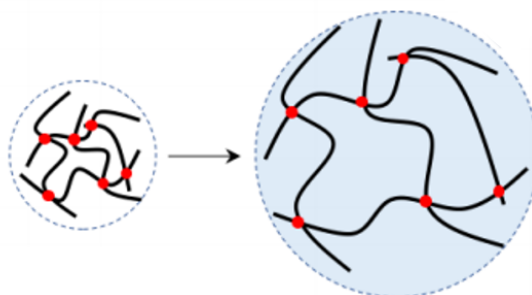


Figure 58: Principe de gonflement d'un élastomère dans un solvant (points rouges = nœuds de réticulation)

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Dans notre étude, le choix du solvant se porte sur le tétrahydrofurane (THF), un solvant étheré hautement polaire. Les expériences ont été réalisées le même jour pour être dans les mêmes conditions de température.

Ces essais ont été réalisés d'une part dans le but d'appuyer les observations des expériences de traction où aucune différence significative n'a été observée et d'autre part pour rendre compte quantitativement du niveau de réticulation. L'observation d'un plateau témoigne de la limite de gonflement, à ce stade, on dit que le réseau 3D est saturé en molécules de solvant. Cet état d'équilibre indique la valeur du taux de gonflement maximal qui est intimement associé au taux de réticulation de l'échantillon.

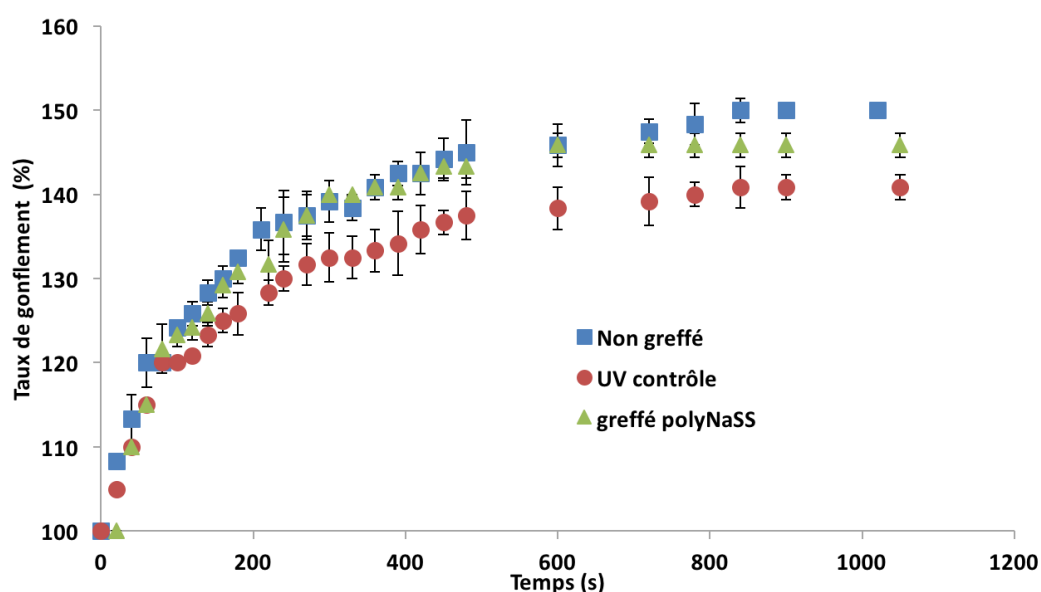


Figure 59: Courbes de gonflement à l'équilibre des différents groupes de silicone en fonction du temps

Les courbes de gonflement au cours du temps des différents groupes d'échantillons sont représentées dans la Figure 59. Au cours des deux premières minutes, le gonflement est rapide et quasi linéaire. Puis, celui-ci ralenti avant de se stabiliser jusqu'à atteindre un plateau décrit comme l'état d'équilibre. À cet instant, plus aucune molécule ne peut pénétrer davantage le réseau formé par les chaînes de polymères.

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Les résultats montrent des plateaux subtilement différents entre chaque groupe d'échantillons. En effet, le plateau diminue après le traitement UV ou le greffage au polyNaSS par comparaison avec le silicone non greffé. Cette diminution traduit un accroissement du taux de réticulation qui résulte de l'impact des irradiations UV.

Les taux de gonflement maximums des groupes non greffés, UV-contrôles et greffés sont respectivement de 150 %, 138 %, et 141 %. En réalité, la différence relative entre le groupe non-greffé et UV-contrôle est de 8,5 % et de 4,5 % entre les non-greffés et les greffés au polyNaSS, ce qui est relativement faible (limite 10 %).

De plus, la condition UV-contrôle est plutôt une condition extrême, car, l'échantillon est exposé deux heures d'affilée aux UV, tandis que dans le cas des échantillons greffés, ceux-ci subissent seulement une heure d'exposition directe aux UV puis une heure d'exposition en présence de monomères (étape de polymérisation). Ces résultats concordent alors avec les résultats de traction, où la présence de monomère agit comme « barrière » entre l'arrivée du faisceau et la surface ce qui minimise donc l'effet sur la surface exposée. Ces résultats confortent les précédentes observations où l'impact des UV sur les propriétés mécaniques des surfaces est négligeable.

Par ailleurs, l'inverse du taux de gonflement permet d'accéder à la densité de réticulation d'un matériau avec la possibilité de déterminer la masse molaire des chaînes de silicone entre deux nœuds de réticulation grâce à l'équation de Flory-Rehner [184].

Equation 2 : Equation Flory-Rehner

$$C_d = \frac{1}{M_c} = \frac{-[\ln(1 - v_2) + v_2 + X_1 v_2^2]}{V_1 \rho (v_2^{\frac{1}{3}} - \frac{v_2}{2})}$$

C_d : densité de réticulation (mol.g^{-1})

M_c : masse molaire entre deux nœuds de réticulation (g.mol^{-1})

X_1 : paramètre d'interaction Flory-Huggin

V_2 : fraction du polymère gonflé

P : masse volumique

Les densités de réticulation calculées et les masses molaires moyennes de chaque condition varient entre 2000 et 4000 g.mol⁻¹ (Tableau 6). Ces valeurs concordent avec celles de la littérature [192].

Tableau 6: Taux de réticulation et masses molaires moyennes du réseau polymérique des surfaces de silicone

	Non-greffé	UV-contrôle	polyNaSS greffé
Densité de réticulation (mol.g ⁻¹)	2,67 x 10 ⁻⁴	4,84 x 10 ⁻⁴	3,45 x 10 ⁻⁴
Masse molaire Mc (g.mol ⁻¹)	3752 ± 37	2066 ± 20	2900 ± 28

En bref, d'un point de vue mécanique, le greffage du polyNaSS sur des surfaces de silicone peut être aisément réalisé sans entraîner de dégradation et de dommage significatifs sur les propriétés mécaniques initiales des surfaces de silicone. Après fonctionnalisation, les propriétés mécaniques du silicone ont été conservées.

2. Topographie de surface

Les enveloppes d'implants mammaires étudiés dans cette partie sont commercialisées sous le nom « d'implants lisses ». À l'œil nu, la face externe de l'enveloppe a un aspect lisse et brillant tandis que la face interne (en contact avec le gel de silicone) présente une surface rugueuse. Les analyses au microscope électronique à balayage confirment l'aspect lisse de la face externe (cf partie I).

Cependant, des analyses plus approfondies et à plus petite échelle en utilisant le microscope à force atomique (AFM) ont révélé un aspect différent des surfaces de silicone. Les surfaces nues et lisses présentent en réalité une rugosité de l'ordre du nanomètre (Figure 60). En effet, le contraste de couleurs de façon homogène sur les captures 2D met en évidence une variation relative des hauteurs caractéristique d'une surface rugueuse. Les représentations 3D montrent clairement que la surface est en dent de scie se manifestant par une succession de pics vers le haut et de pics vers le bas donnant à la surface son caractère rugueux avec une rugosité moyenne de 19,1 nm. Les résultats montrent que l'exposition des surfaces aux UV a tendance à « re-lisser » celles-ci. En effet, la même allure de surface est

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

observée, mais avec une diminution du paramètre de rugosité S_a moyen qui est de $10,5 \pm 0,5$ comparé à $19,1 \pm 0,5$ sur les surfaces non traitées. Les surfaces greffées quant à elles montrent un aspect différent. En effet, on observe les chaînes de polyNaSS sur toute la surface qui ont tendance à se localiser au sommet des pointes avec comme la formation d'un réseau. La présence du polyNaSS se caractérise par une ré-augmentation de la rugosité de surface par rapport au témoin UV avec un épaissement des pics en général.

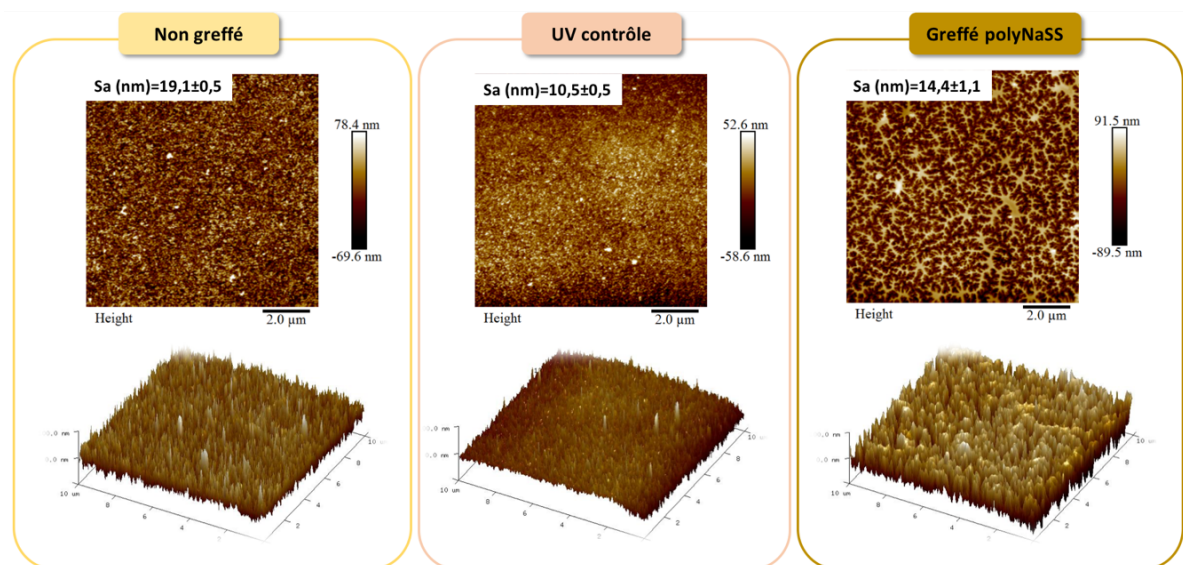


Figure 60: Analyses à sec des surfaces de silicone non greffées, UV contrôles, et greffées par microscopie à force atomique (images 2D et 3D)

À partir des images 2D, il est possible de déterminer les paramètres de rugosité surfacique (S_a , S_q , S_z , S_p) dont les détails sont récapitulés dans le Tableau 7. Le paramètre S_a correspond à la moyenne arithmétique des hauteurs ou rugosité moyenne et est utilisé comme référence pour comparer les variations de rugosité entre les trois groupes d'échantillons.

Tableau 7: Evaluation des paramètres de rugosité à partir des images AFM 2D des surfaces non greffées, UV-contrôles et greffées

	Non greffées	UV contrôles	Greffées
S_a hauteur moyenne arithmétique (nm)	$19,1 \pm 0,5$	$10,50 \pm 0,5$	$14,4 \pm 1,1$
S_z hauteur maximale (nm)	$211,0 \pm 12,5$	$162,4 \pm 22,0$	$158,9 \pm 31,4$
S_q moyenne quadratique des hauteurs (nm)	$23,8 \pm 0,9$	$13,9 \pm 0,7$	$17,4 \pm 1,8$
S_v profondeur maximal des creux (nm)	$81,0 \pm 3,7$	$61,9 \pm 12,3$	$78,2 \pm 5,2$
R_p hauteur maximal des pics (nm)	$130,1 \pm 14,2$	$100,5 \pm 16,8$	$80,8 \pm 26,1$

Les rugosités transversales donnent des informations au niveau local, mais ne rendent pas compte de la rugosité générale de la surface. La Figure 61 représente qualitativement la rugosité de profil des surfaces selon le traitement subi, cette visualisation montre qu'en réalité la différence n'est pas si importante entre les différents groupes si ce n'est qu'une légère diminution de l'amplitude des pics.

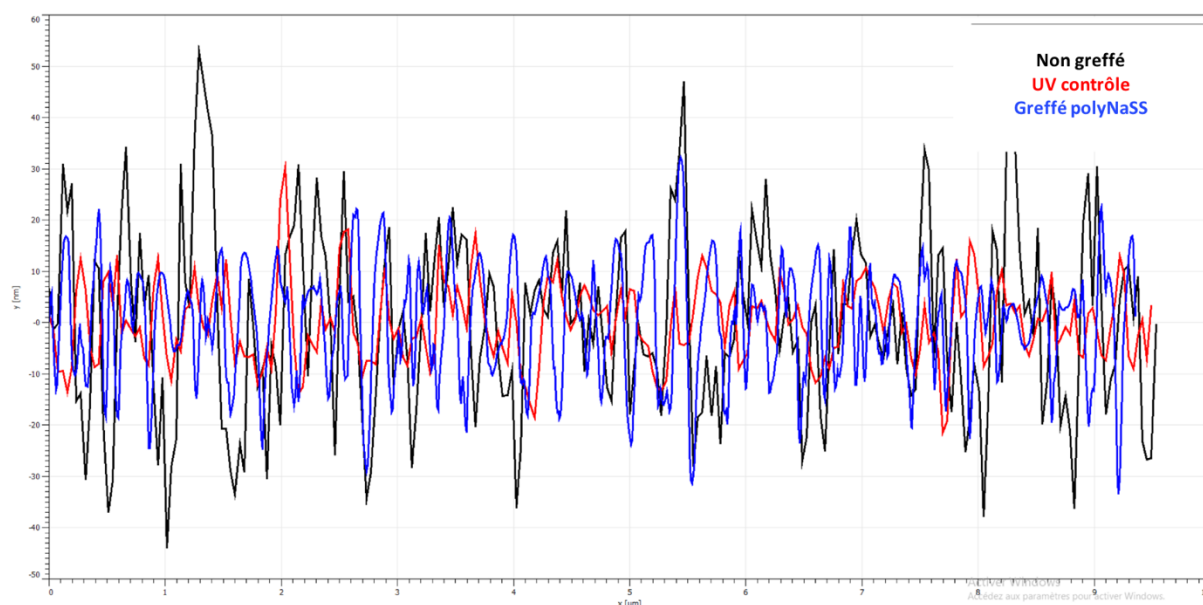


Figure 61: Rugosité de profil des surfaces de silicones non greffées (noir), UV-contrôles (rouge) et greffées (bleu)

D'une façon générale, ces observations au microscope à force atomique font l'objet d'informations essentielles pour comprendre et interpréter les interactions ultérieures de ces

surfaces avec des cellules ou des protéines par exemple. En effet, les données de la littérature montrent que des surfaces rugueuses ou poreuses permettraient une meilleure adhésion cellulaire par la présence de cavités qui servent de bons points d'accroche [57]. En revanche, cela peut aussi favoriser l'adhésion des bactéries [59,193].

3. Réponse biologique

L'évaluation de la réponse biologique dans ces travaux est réalisée avec la lignée standard L929 des fibroblastes de souris pour répondre aux tests standards requis dans les normes ISO. La viabilité cellulaire fait partie des tests de cytotoxicité qui sont nécessaires à la validation de tous dispositifs médicaux. Les normes ISO 10993-5 : 2009 (évaluation biologique des dispositifs médicaux) fixent à 70 % la limite minimale au-dessus de laquelle un matériau est qualifié de non cytotoxique [187]. Par ailleurs, l'emploi massif des matériaux à base de silicone médical-grade dans le domaine biomédical se justifie par le niveau de biocompatibilité dit acceptable du silicone en général [7].

3.1. Evaluation de la viabilité cellulaire

Le test de MTT mesure l'activité métabolique des cellules vivantes. C'est un bon indicateur de la viabilité cellulaire ainsi que de la cytotoxicité des surfaces et/ou du milieu avec lesquels les cellules sont en contact. Les résultats décrits dans la Figure 62 comparent les viabilités cellulaires des fibroblastes au contact de surface de silicone ayant subi différents traitements. Les taux de survie sont calculés à partir des densités optiques obtenues par spectroscopie UV- visible rapportées à la surface de l'échantillon (cf. chapitre II : matériels et méthodes).

Comme largement stipulé dans la littérature, les divers composants (enveloppe, gel) des implants mammaires commercialisables sont de type médical-grade et donc biocompatibles [7]. Ainsi de façon attendue, nous confirmons avec les résultats de viabilité (Figure 62) que les surfaces non greffées permettent déjà une viabilité supérieure à 70 %. Ces observations concordent avec les résultats observés par Li *et al.* [194] où les surfaces de silicones sont propices à la viabilité des fibroblastes.

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Le greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium a pour objectif d'améliorer la bio-intégration de l'implant avec un effet biocompatible. Les résultats de MTT montrent qu'effectivement, au contact de surfaces greffées, la viabilité cellulaire calculée excède 100 % ce qui montre que le polyNaSS confère une surface favorable à l'adhésion cellulaire. Ces observations confirment l'effet « biocompatible » du polyNaSS qui a déjà fait ses preuves sur des surfaces de titane par exemple [174].

De façon intéressante et curieuse, les surfaces UV-contrôles, quant à elles, présentent une viabilité plus faible (64 %). L'hypothèse suggérée pour expliquer cette légère baisse de viabilité est attribuée à la diminution de la rugosité de la surface mise en évidence par AFM précédemment. De ce fait, les cellules adhèrent moins à la surface [57].

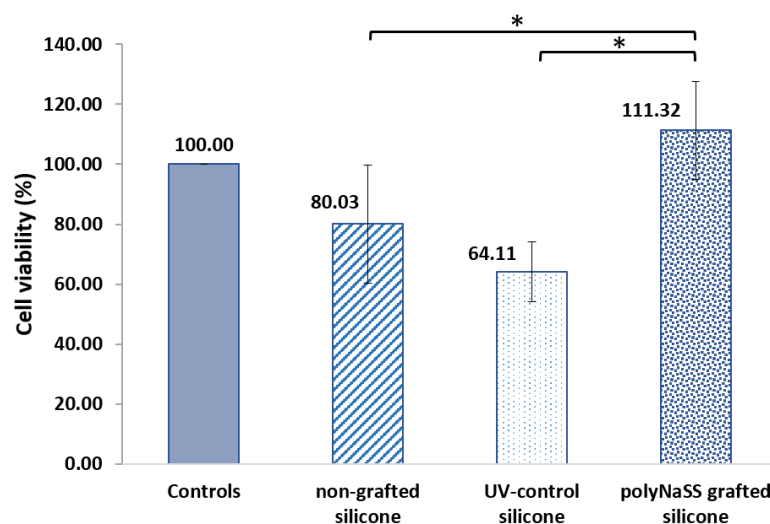


Figure 62: Taux de viabilité cellulaires des surfaces de silicone ayant subi des traitements différents

Pour appuyer ces résultats, des tests de prolifération ont été réalisés afin de compter les fibroblastes ayant effectivement adhéré à la surface. Le graphique de la Figure 63 montre une claire augmentation du nombre de cellules après 1 jour, 3 jours puis 7 jours d'incubation toutes conditions confondues. La variation du nombre de cellules entre les trois groupes n'est pas significative, mais ces résultats soutiennent le fait que le polyNaSS n'empêche pas le développement et la prolifération cellulaire.

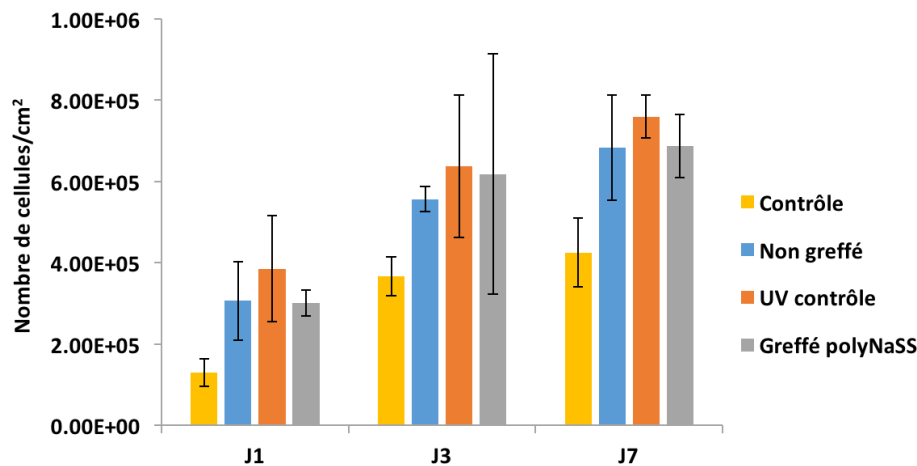


Figure 63: Taux de prolifération des fibroblastes sur des surfaces de silicone après différents temps d'incubation cellulaire (1, 3, 7 jours)

3.2. Evaluation de la morphologie cellulaire

La forme, l'étalement et la morphologie des cellules sont de bons indicateurs quant à la convenance des surfaces sur lesquelles elles adhèrent. Lorsque les fibroblastes sont mis en culture, dans les premiers temps ils sont sphériques. Puis au fur et à mesure du temps, si la surface leur est favorable, ces derniers s'allongent, s'étirent et s'étalent [195]. Inversement, lorsque la surface ne leur est pas propice, les fibroblastes ont tendance à rester sphériques. Pour l'étude de la morphologie cellulaire au contact des surfaces de silicone, les groupes d'échantillons ont été incubés avec 1 mL de suspension de fibroblastes pendant plusieurs jours, afin que les cellules adhèrent et se développent. L'observation de la morphologie des cellules est réalisée après 1 jour, 3 jours, et 7 jours d'incubation au microscope optique et au microscope électronique à balayage.

- Morphologie au microscope optique & au microscope électronique à balayage

Du fait de la transparence des échantillons de silicone, l'appréciation de la morphologie des cellules est meilleure au microscope optique grâce au contraste de couleur. Les images en microscopie à balayage permettent quant à elles d'évaluer plus précisément l'homogénéité et la densité du recouvrement cellulaire à la surface (Figure 64).

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

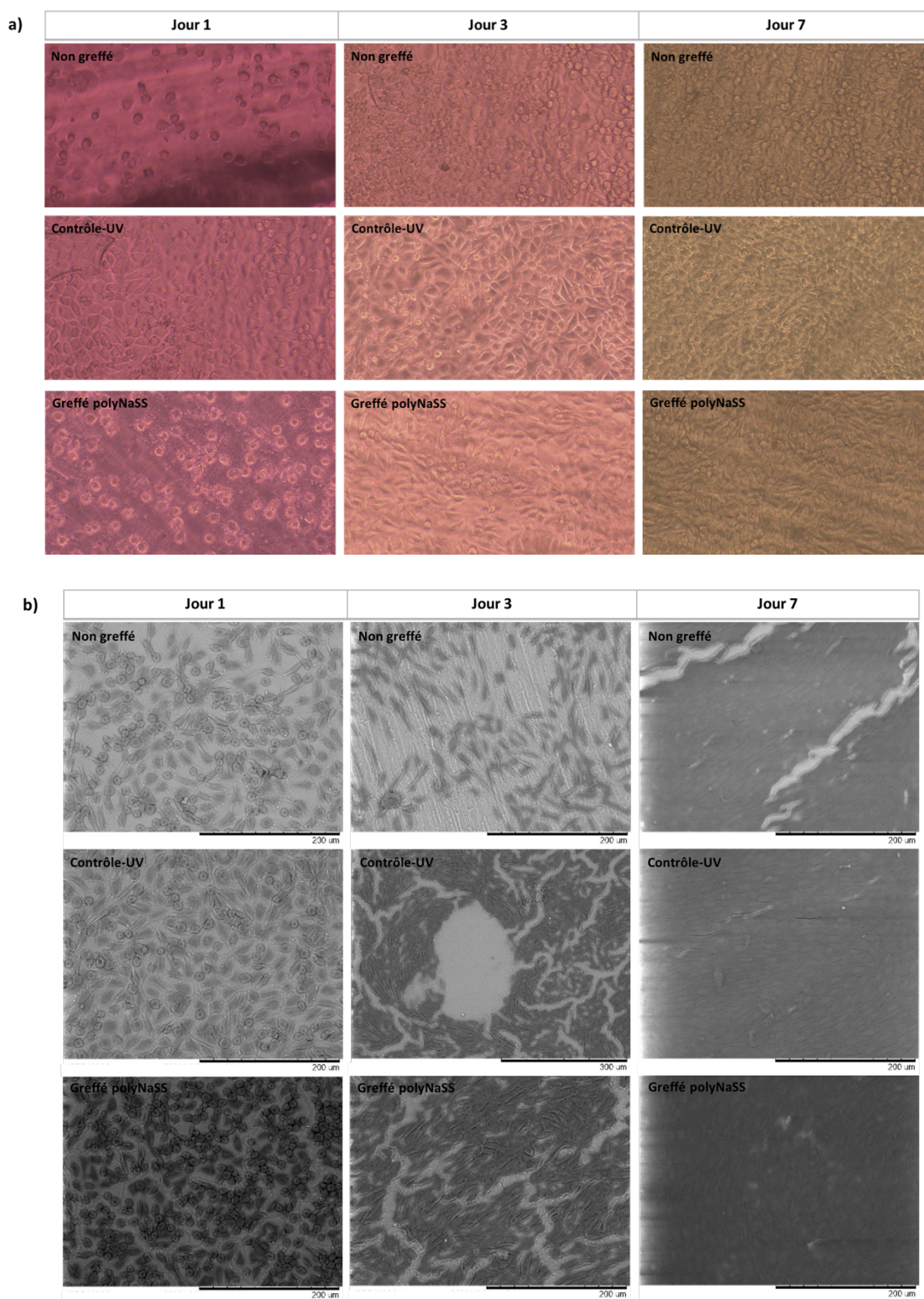


Figure 64: Observations de la morphologie des fibroblastes au contact des surfaces de silicone greffées ou non greffées sous (a) microscope optique et (b) microscope électronique à balayage après différents temps d'incubation cellulaire (1, 3, 7 jours)

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

Après seulement un jour d'incubation, nous observons des fibroblastes indépendants les uns des autres avec une forme sphérique dans les trois conditions. Après 3 jours, une élongation progressive des cellules est observée pour les groupes UV-contrôle et greffés. Puis, après 7 jours, une évolution morphologique plus significative est constatée surtout dans le cas des échantillons greffés au polyNaSS. Pratiquement toutes les cellules sont étirées, larges et étalées à la surface. On dit qu'elles sont fusiformes ou allongées. Au contraire, lorsque l'on regarde les surfaces non greffées, on ne voit aucune évolution de la forme des cellules si ce n'est que l'accroissement de la densité comme en témoigne les plaques cellulaires dans la Figure 64b.

Ces différences de comportement des fibroblastes d'une surface à une autre s'expliquent par l'effet biocompatible du poly(styrène sulfonate) de sodium qui favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire comparé à des surfaces non greffées. De façon intéressante, les surfaces UV-contrôles présentent un comportement intermédiaire, car on peut voir à la fois des cellules rondes et allongées sur la même surface.

Au cours du temps, ajouté aux changements morphologiques, une augmentation de la densité cellulaire est clairement notable. Du jour 1 au jour 7, les cellules sont effectivement plus nombreuses. Cette observation s'explique d'abord par le fait que les cellules ont eu plus de temps pour adhérer et proliférer à la surface. Cependant, on note une différence entre les trois groupes d'échantillons : sur les silicones greffés, il semble y avoir une densité cellulaire plus élevée que dans les deux autres groupes. Au jour 7, les cellules sont si nombreuses qu'elles forment comme des tapis cellulaires avec des couches de cellules. À l'inverse, on note que dans les groupes non greffés et UV-contrôle des zones de vide sont observées : le recouvrement est moins homogène. Ces observations qualitatives corrént bien avec l'augmentation du nombre de cellules mis en évidence par les tests de prolifération précédemment réalisés. La mise en évidence de l'effet biocompatible du silicone dû à la présence du polyNaSS est prometteur pour l'intégration cellulaire et tissulaire des prothèses mammaires modifiées.

Ces résultats soulignent le fait que l'adhésion et le comportement des cellules sont étroitement liés à la nature de la surface avec laquelle elles sont en contact. Les tests de MTT

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

confirment de manière quantitative l'effet favorable et non cytotoxique des surfaces avec la présence de polyNaSS.

- Morphologie au microscope à force atomique

La microscopie à force atomique permet une observation plus en détail des cellules et plus spécifiquement, elle permet de visualiser la morphologie d'une seule cellule. Cette technique de haute résolution et de pointe donne accès à des informations telles que la taille, la forme et les interactions avec les éléments voisins.

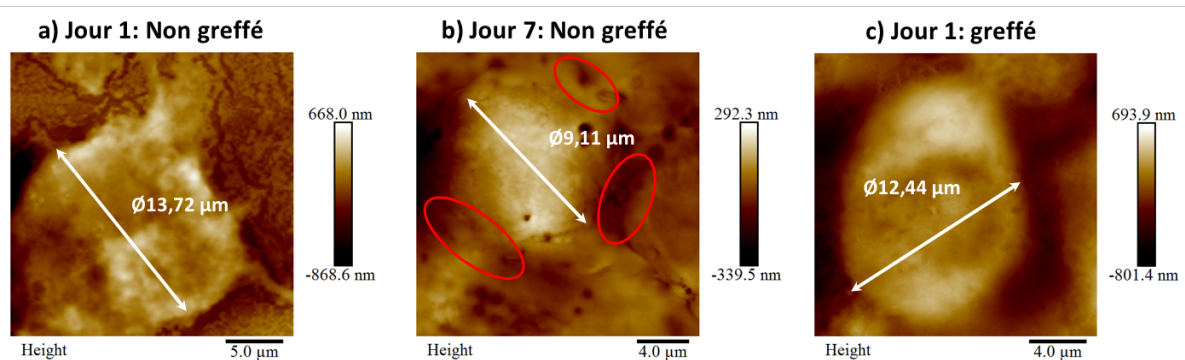


Figure 65: Observations d'une cellule par AFM sur des surfaces de silicone non greffées et greffées après 1 et 7 jours

Il a été montré précédemment que la différence entre les jour 1 et jour 7 des surfaces non greffées reposait uniquement sur une augmentation de la densité cellulaire avec des cellules sphériques. De ce fait, la Figure 65b montre une cellule plus rétractée au jour 7 avec un diamètre légèrement inférieur au jour 1 (Figure 65a) : 9,11 µm contre 13,72 µm. En effet, les cellules sont étroitement entourées de cellules voisines avec des parois qui se touchent (cercles rouges) d'où leur rétractation. La Figure 65c montre une cellule sur une surface greffée au jour 1. La cellule a la même tendance qu'une cellule sur une surface non greffée au jour 7. Cela souligne encore une fois que les surfaces greffées sont plus favorables à l'adhésion cellulaire. Du fait d'une densité cellulaire trop importante sur des surfaces greffées au jour 7, l'acquisition d'une image de cellule à ce stade a été impossible.

Pour ces mêmes raisons et pour des images claires et hautement résolues, les morphologies cellulaires ont été observées au jour 3 pour les surfaces fonctionnalisées. En

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

effet, à partir du 3ème jour, les cellules commencent à s'étirer et pour devenir fusiformes. Les Figure 66a-c illustrent les diverses formes allongées que peuvent adopter les fibroblastes sur une surface favorable. De façon remarquable, les cellules semblent établir des interactions avec les cellules voisines (Figure 66a-1) sous forme de filaments. Cette observation est plus visible dans la Figure 66d) où la zone de connexion est plus intense entre l'extrémité de deux cellules distinctes. Pour finir, la Figure 66e) montre un comportement particulier comme une cellule en phase de mitose c'est-à-dire en phase de dédoublement. Par ailleurs, les captures de force maximale (Figure 66f-g) permettent l'appréciation plus en détail des éléments composant les cellules avec comme la présence de fibres qui sont plus marquées sur les extrémités de la cellule. Ces dernières peuvent éventuellement être attribuées aux filaments d'actine du cytosquelette responsables du déplacement/mouvement cellulaire. Pour confirmer ces hypothèses, il faudrait bien évidemment des analyses complémentaires par microscopie à fluorescence par exemple.

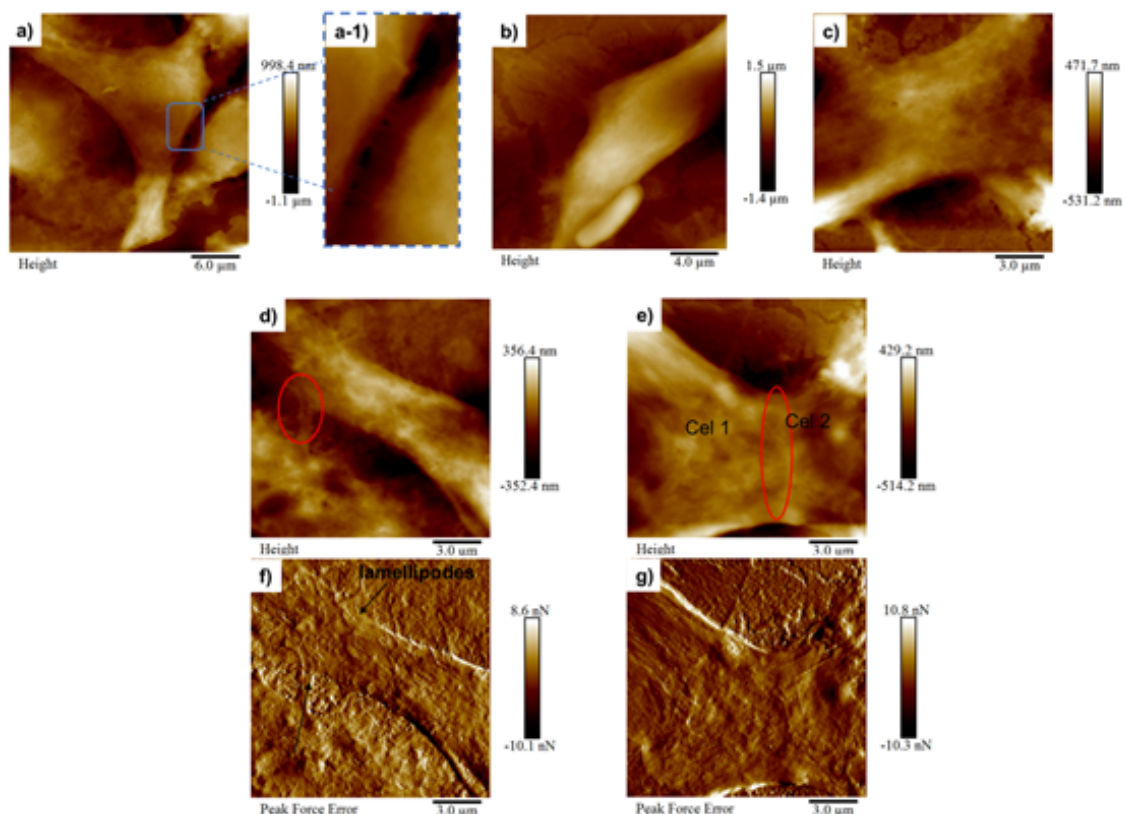


Figure 66: (a-c) Différentes morphologies des fibroblastes au contact d'un silicone greffé, (d-e) interactions entre deux cellules voisines

Partie 2 : Etudes de l'influence des paramètres de greffage sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique du silicone

De manière générale, ces résultats sont intéressants et prometteurs. Ils soulignent et confirment le fait que l'adhésion et le comportement cellulaire dépendent étroitement de la nature de la surface. Premièrement, les résultats de MTT confirment une meilleure viabilité cellulaire en présence du polymère bioactif à la surface. Deuxièmement, grâce aux différentes techniques de microscopie employées, nous confirmons que le polyNaSS confère une surface favorable aux fibroblastes avec une amélioration de leurs morphologies. L'étude de la réponse biologique renforce l'idée que les groupements sulfonates en surface améliorent grandement la biocompatibilité du silicone en conférant un environnement approprié pour le développement et la croissance des cellules. Ces résultats sont encourageants et doivent être complétés par une étude bactériologique car la spécificité du polyNaSS repose aussi sur son effet antibactérien par mécanisme d'anti-adhésion. Ces travaux sont en cours d'investigation dans le cadre des travaux de thèse du Dr Vivien Moris.

Les objectifs de cette partie étaient d'étudier l'influence du protocole de greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium des surfaces de silicone sur (1) leurs propriétés mécaniques initiales et sur (2) la réponse biologique en comparant les résultats avec des témoins non greffés. En conclusion, nous avons effectivement montré que la présence du polyNaSS a significativement amélioré la biocompatibilité des surfaces de silicone sans impact conséquent sur ses propriétés mécaniques. Les surfaces greffées ont permis d'augmenter la viabilité cellulaire tout en conférant une surface propice à l'adhésion et l'étalement des cellules. D'un point de vue mécanique, malgré l'utilisation des irradiations UV dans le procédé de greffage, le matériau n'est pas altéré et conserve ses propriétés mécaniques initiales.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 3 : Etudes de la texturation de surface

Dans le jargon des prothèses mammaires, la texturation est un mot couramment employé pour qualifier et décrire la rugosité de la surface de ces implants. Cette particularité de surface a été développée pour des raisons biologiques, esthétiques et techniques.

Les premières prothèses texturées ont été développées pour offrir un meilleur maintien tissulaire, et aussi une certaine fermeté donnant un aspect esthétique particulier. Plus tard, des études ont été menées pour évaluer l'effet biologique de ces surfaces à l'échelle cellulaire et leur implication dans l'apparition des complications comme les contractures capsulaires ou les lymphomes anaplasiques. En effet, les surfaces rugueuses sont la base de solides points d'accroches qui favorise en réalité l'adhérence des cellules, leurs proliférations et leurs croissances. De la même manière, elles favorisent l'adhésion des bactéries et augmentent les chances de développer un biofilm. Cette dualité des surfaces texturées suggère que la prothèse idéale devra tout de même présenter une certaine rugosité pour une adhésion cellulaire correcte.

Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à la structuration et à la texturation d'enveloppes d'implants mammaires. Des enveloppes de silicone à différent degré de rugosité ont été fournies par l'industriel SEBBIN pour cette étude. Une première partie sera consacrée à la caractérisation de ces surfaces pour mettre en évidence les spécificités de celles-ci. Puis, nous nous intéresserons à l'étude du greffage du polyNaSS sur des surfaces de texture variables selon un protocole expérimental similaire à celui développé dans la partie 1. Aussi, un autre type de silicone connu sous le nom de poly(diphényl siloxane) sera étudié.

L'étude repose sur l'investigation de 4 niveaux de texturation distincts. Pour des raisons pratiques, les différentes rugosités seront appelées T0, T1, T2, et T3. Le niveau T0 correspond en réalité aux enveloppes lisses sur lesquelles nous avons travaillé jusqu'à présent.

1. Les surfaces texturées

1.1. Caractérisations des surfaces nues

- **Rugosité et mouillabilité**

La différence de texture est visible à l'œil nu et au toucher (Figure 67). Les surfaces T0 sont plutôt brillantes, lisses et présentent un aspect ventouse, c'est-à-dire qu'elles adhèrent naturellement bien au contact d'une surface plane par exemple. Les surfaces T1 se distinguent par leurs aspects matifiés et opaques, mais de la même façon que les T0, on observe un effet ventouse. La différence est moindre au toucher. En revanche, une différence plus marquée est observée sur les surfaces T2. La rugosité est palpable au simple toucher, et des sortes d'irrégularités de surface sont visibles au même titre que les surfaces T3. La différence entre ces deux derniers niveaux repose principalement sur le type de rugosité.

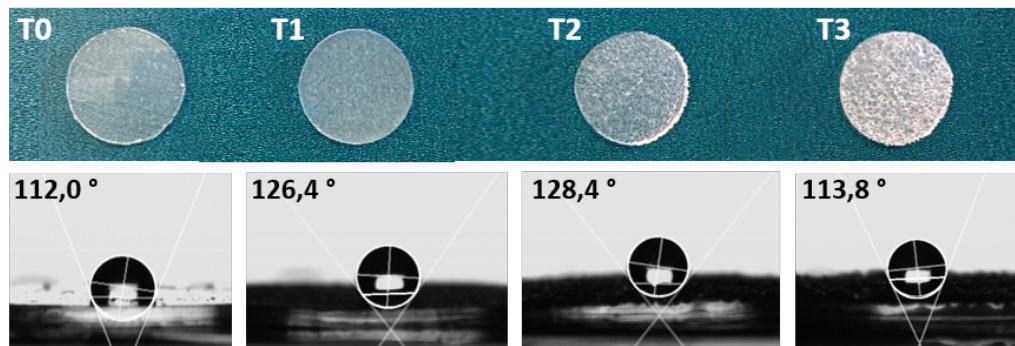


Figure 67: Photos des différents niveaux de texturation et leurs mouillabilités (à l'état brut) correspondantes

La tendance d'une surface à être mouillée par un solvant polaire tel que l'eau dépend étroitement de la composition de la surface de travail, mais également la rugosité de celle-ci. En effet, il est largement connu et rapporté dans la littérature qu'une rugosité accrue diminue considérablement la mouillabilité d'une surface [196]. Ce phénomène est comparable à l'effet Lotus qui décrit la superhydrophobicité que présentent certains êtres vivants dus à la présence de nanotexturation. Cette hydrophobicité s'accroît aussi avec la nature du matériau de base.

La mesure des angles de contact sur les différentes surfaces de silicone confirme la théorie. Le matériau est hydrophobe, et ce, de façon plus importante avec la rugosité qui se traduit

par des angles de contact moyens supérieurs à 110 °. Entre les niveaux T2 et T3, l'hydrophobicité est comparable (Figure 67).

- **Surfaces vues par microscopie électronique à balayage**

En plus de définir la taille et la forme des implants mammaires, l'enveloppe externe joue un rôle essentiel dans la régulation des réponses biologiques, car elle compose l'interface entre l'implant et le milieu biologique. Pour cette raison, la conception/fabrication de l'enveloppe doit également être méticuleusement étudiée. Ainsi, la texturation peut se manifester sous diverses formes selon l'effet et les propriétés physico-chimiques recherchés.

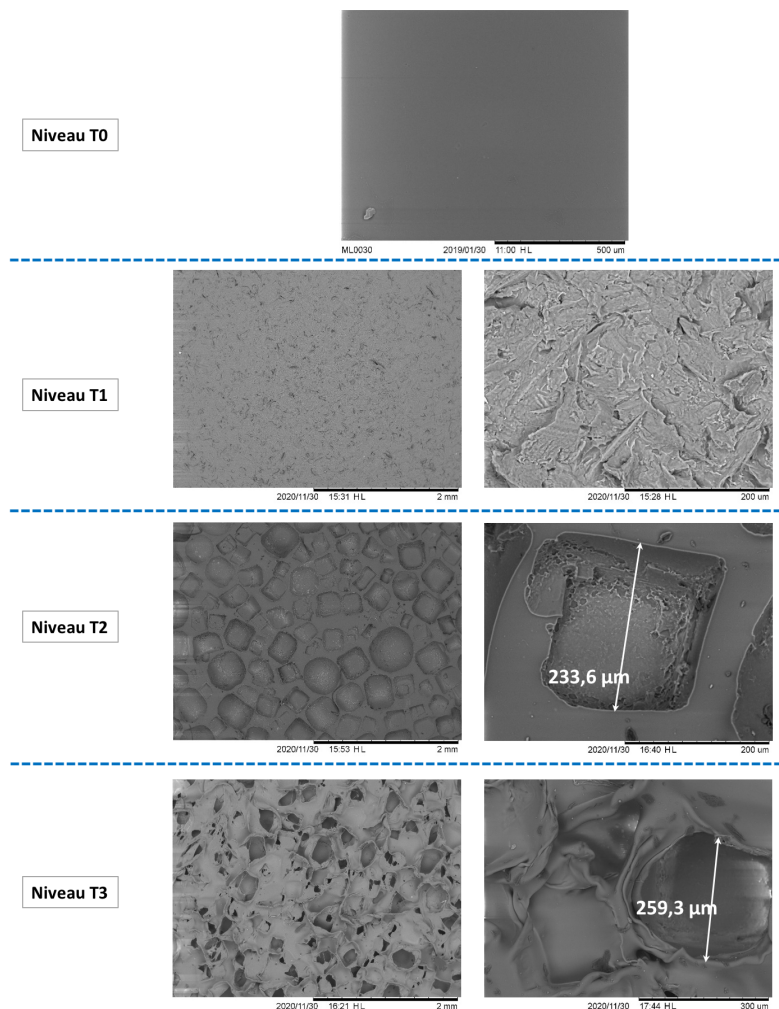


Figure 68: Images de microscopie électronique à balayage des surfaces (T0 à T3) à différents grossissements

La Figure 68 illustre la texturation à l'échelle microscopique des différentes texturations de surface observées au microscope électronique à balayage. Le niveau T0 correspond aux enveloppes lisses avec lesquelles toute l'étude sur le développement du greffage a été réalisée dans la partie 1. L'aspect lisse et brillant de la surface est confirmé par MEB. À l'inverse, nous observons des irrégularités pour les niveaux T1 à T3 qui sont cependant très différentes les unes des autres.

En effet, les surfaces T1 présentent une rugosité qui se manifeste par des scarifications de la surface, avec la présence de stries/rainures aléatoires lui donnant un aspect plutôt mat/opaque au visuel. Les surfaces T2 et T3 montrent quant à elles une texturation basée sur la présence de cavités plus ou moins régulières avec respectivement des cavités cubiques et des cavités sphériques ou en éponge de taille variant autour de 250 μm .

Industriellement, la texturation est obtenue par différentes méthodes, soit par le choix d'un moule de rugosité contrôlée soit par l'utilisation d'un procédé de sablage où l'enveloppe non « solidifiée » est imprégnée plusieurs fois dans un bac à sable ce qui donne la forme cubique des cavités par exemple.

Les observations au MEB ont permis de mettre en évidence la forme et la taille des cavités, ce qui nous permet de classer les surfaces selon la classification de Barr *et al.* [50]. Finalement, malgré un type de rugosité différent, les texturations T2 et T3 présentent des tailles de pores similaires. Les surfaces sont alors classées à la limite entre la micro et la macro texturation (200-300 μm).

1.2. Greffage du polyNaSS sur les différentes surfaces texturées

Le greffage du polyNaSS a été réalisé sur ces surfaces de texturation variable. Le dosage colorimétrique ainsi que l'angle de contact ont permis de montrer que le greffage selon le protocole UV développé était efficace. Pour ce faire, nous avons adapté les paramètres de greffage à une lampe UV différente. La lampe LED utilisée permet une diffusion plus large de la lumière ce qui permet de pallier le problème du faisceau de la précédente ce qui nous a permis de greffer des surfaces plus grandes. Le greffage a été réalisé sur des

échantillons de 3 x 1 cm (au lieu de 1 x 1 cm) avec une activation à 160 mW/cm² et une polymérisation à 220 mW/cm² [127].

Après fonctionnalisation, les taux de greffage sont significativement améliorés entre les surfaces texturées et leurs homologues non greffés (Figure 69). Néanmoins, le niveau T2 paraît moins bien greffé avec un taux de greffage inférieur aux autres. Cette différence peut être attribuée à la particularité de rugosité des surfaces qui consiste en des irrégularités de formes cubiques de profondeurs variables. En effet, le greffage se faisant en surface, on peut supposer que la polymérisation en surface est prédominante par rapport à celle en cavité par souci d'accessibilité.

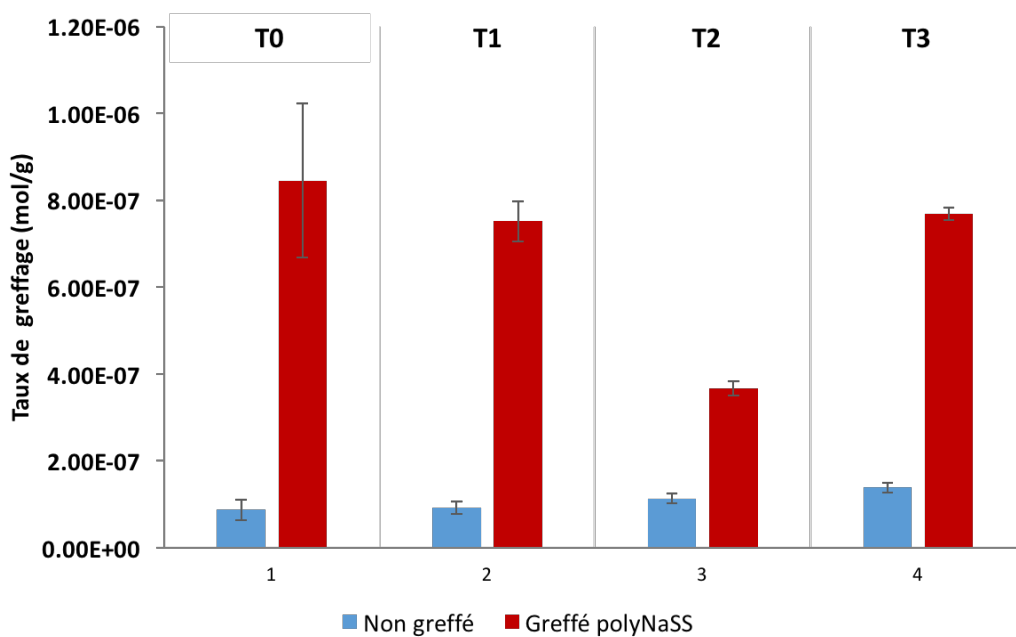


Figure 69: Comparaison des taux de greffage des surfaces texturées et de leurs homologues non greffés

En matière de mouillabilité, la présence effective du poly(styrène sulfonate) de sodium a été également confirmée par un gain d'hydrophilie des surfaces avec une diminution des angles de contact de l'ordre de 50 ° en moyenne (Figure 70).

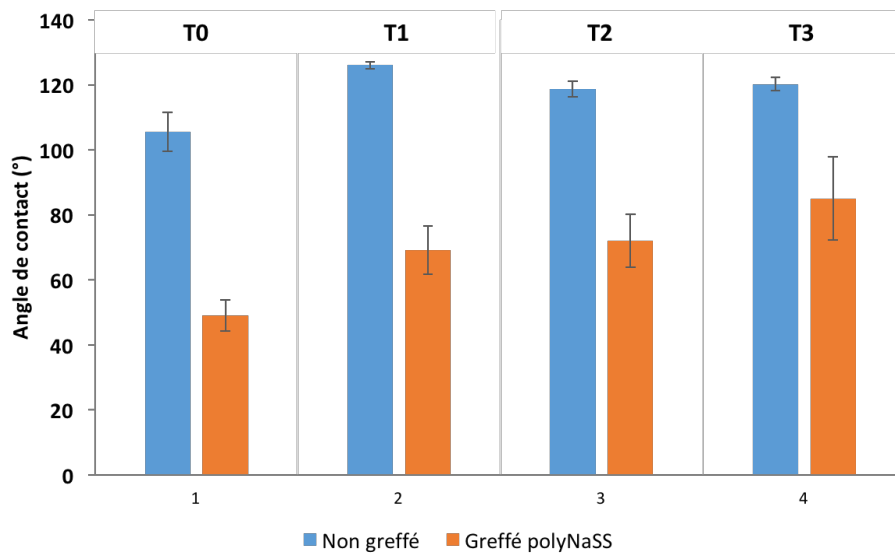


Figure 70: Comparaison de la mouillabilité des surfaces texturées et de leurs homologues non greffés

Dans cette partie, nous avons montré que les surfaces texturées peuvent être efficacement fonctionnalisées dans les mêmes conditions que les surfaces lisses. Nous avons également souligné que selon le mode de texturation, la qualité de greffage pouvait être légèrement impactée (T2).

2. Du polydiméthylsiloxane au polydiphéthylsiloxane

2.1. Vue latérale des surfaces de silicone par microscopie électronique à balayage

L'observation de la tranche des surfaces de l'enveloppe externe a permis d'apprécier la texturation sous un autre angle, mais surtout, elle a permis de rendre compte de la structuration en couche particulière de l'enveloppe.

Dans la Figure 71, sont représentées les coupes transversales des surfaces T0 à T3. De ce point de vue, les informations structurales sont nombreuses. En effet, nous observons tout d'abord que l'épaisseur de l'enveloppe augmente avec le niveau de texturation allant de 500 à 780 μm . L'épaisseur plus importante compense la rugosité croissante de la surface (zone de rugosité irrégulière) afin de conserver les mêmes propriétés mécaniques qu'une surface dénuée de toutes irrégularités.

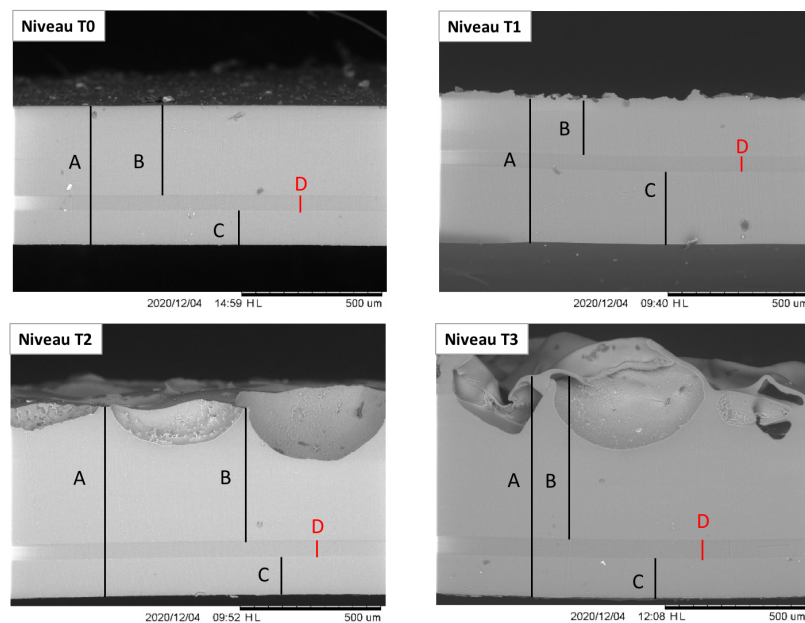


Figure 71: Observation des coupes transversales des surfaces de silicones de différents niveaux de rugosité (T0 à T3)

Tableau 8: Détails des épaisseurs des diverses sous couches qui composent l'enveloppe d'implants mammaires

	T0	T1	T2	T3
A (μm)	500	530	670	780
B (μm)	330	206	466	140
C (μm)	126	259	140	142
D (μm)	55	55	57	64

De la même manière, la vue latérale a mis en lumière une structure multicouche des enveloppes d'implants mammaires. En effet, qu'importe le degré de texturation, nous révélons la présence d'une couche particulière (point D, Figure 71) insérée dans l'enveloppe avec une épaisseur moyenne de 57,8 μm. La position de cette couche intermédiaire semble assez aléatoire en fonction de l'échantillon (Tableau 8).

En réalité, il s'agit d'une couche utilisée par les industriels appelée « couche barrière » qui est utilisée dans le but d'imperméabiliser l'enveloppe afin de réduire les phénomènes de perspiration du gel de silicone à travers l'implant [197].

Il a été rapporté dans la littérature, et selon l'industriel Sebbin que cette couche se compose de silicone de type polydiphénylsiloxane-PDPS ou d'un copolymère constitué de PDMS et

PDPS. D'un point de vue structural, le PDPS se compose d'un squelette siloxane comme le PDMS à l'exception des deux groupements méthyles (-CH₃) qui sont remplacés par deux cycles aromatiques (phényles) (Figure 72). Ces cycles aromatiques volumineux de part et d'autre de l'atome de silicium, par effet de gêne stérique limitent grandement la diffusion de petites chaînes de PDMS de l'intérieur de l'implant vers l'extérieur, évitant ainsi tout effet secondaire attribué au relargage de silicone gélifié dans l'organisme.

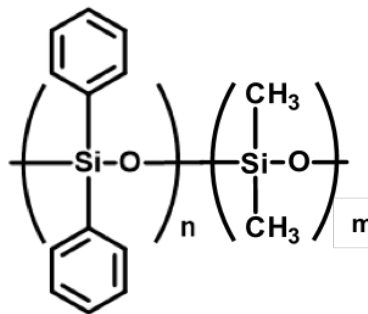


Figure 72: Structure chimique du poly(diméthyl siloxane-co-diphenyl siloxane)

L'analyse de la composition élémentaire de cette couche comparée à celle du silicone PDMS a été évaluée par une analyse dispersive en énergie couplée au MEB. Pour cela, différentes zones de chaque partie ont été analysées pour rendre compte de l'homogénéité de la composition. Les résultats montrent que le pourcentage atomique du carbone augmente dans le PDPS justifiant la contribution des cycles aromatiques qui apportent 10 carbones en plus comparé au PDMS. Inversement, les taux d'oxygène et de silicium diminuent, car le cycle aromatique par encombrement stérique masque le squelette siloxane Si-O-Si (Figure 73).

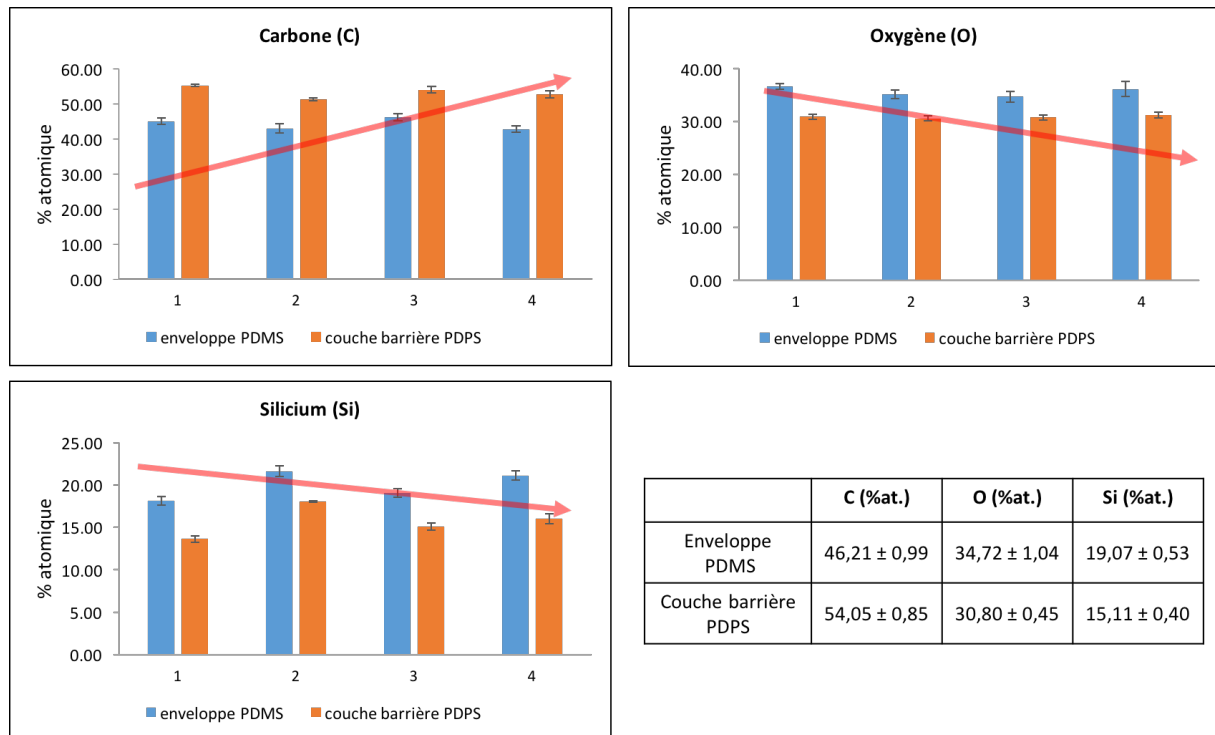


Figure 73: Comparaison de la composition élémentaire de l'enveloppe de PDMS et de la couche barrière de PDPS

Dans le cadre de l'objectif de base du projet qui était de fonctionnaliser la silicone pour améliorer la biocompatibilité, nous avons pensé à étudier le greffage sur des surfaces de PDPS. En effet, en raison de la présence d'insaturation sur les cycles aromatiques, le greffage de polyNaSS sur une telle surface peut potentiellement être optimisé. Les cycles aromatiques étant plus réactifs sous UV, on pourrait avoir un temps d'activation ou un temps de greffage réduit par exemple en créant directement des radicaux à partir des doubles liaisons.

2.2. Le greffage du polyNaSS sur le PDPS

Le polydiphénylsiloxane est un silicone qui a la particularité d'avoir des groupements aromatiques portés par l'atome de silicium du squelette siloxane. De tels groupes chromophores et insaturés peuvent être le siège de la formation des radicaux par absorption des irradiations UV.

Des enveloppes fabriquées uniquement à base de PDPS ont été fournies par l'industriel SEBBIN. La composition de ces enveloppes a été confirmée par spectroscopie infrarouge (Figure 74) avec la présence des bandes caractéristiques des C-H aromatiques entre 3050-3070 cm^{-1} et des liaisons C-C aromatiques à 1592 cm^{-1} et 1429 cm^{-1} . Les bandes à 2962 cm^{-1} et 2904 cm^{-1} issues des élongations $-\text{CH}_3$ montrent la contribution du PDMS.

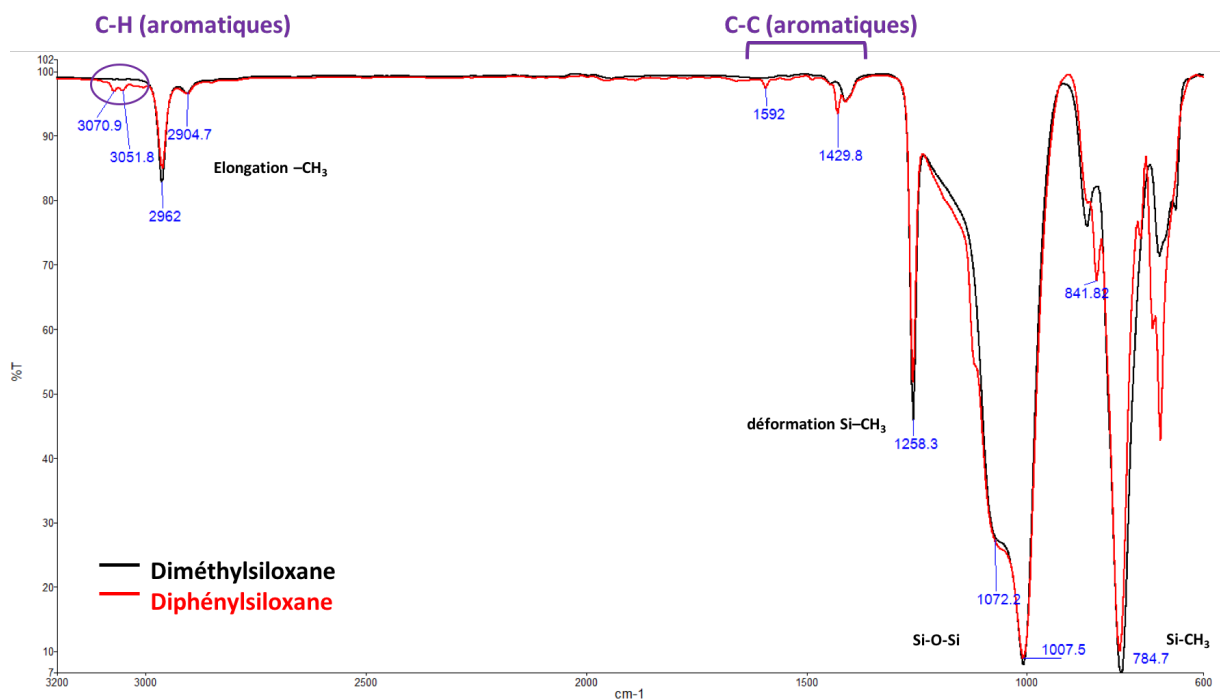


Figure 74: Spectres infrarouges des surfaces de PDMS et PDPS brutes

Une première étape consiste à tester le protocole de greffage développé sur du silicone-PDMS lisse c'est-à-dire une activation à 160 mW/cm^2 puis polymérisation à 220 mW/cm^2 .

Les résultats montrent que sur le PDPS, le greffage semble plus efficace avec des angles de contact avoisinant les 30-40 ° comparé au PDMS. D'autant plus que la surface de PDPS est à la base plus hydrophobe.

Nous avons ensuite testé d'autres conditions de greffage dans le but d'optimiser le protocole.

Dans un premier temps, le temps d'activation a été réduit à 30 minutes et les résultats d'angle de contact montrent une mouillabilité comparable au greffage avec une heure d'activation aux UV (~ 45 °). Ces résultats sont similaires à ceux mis en évidence dans la partie 1.

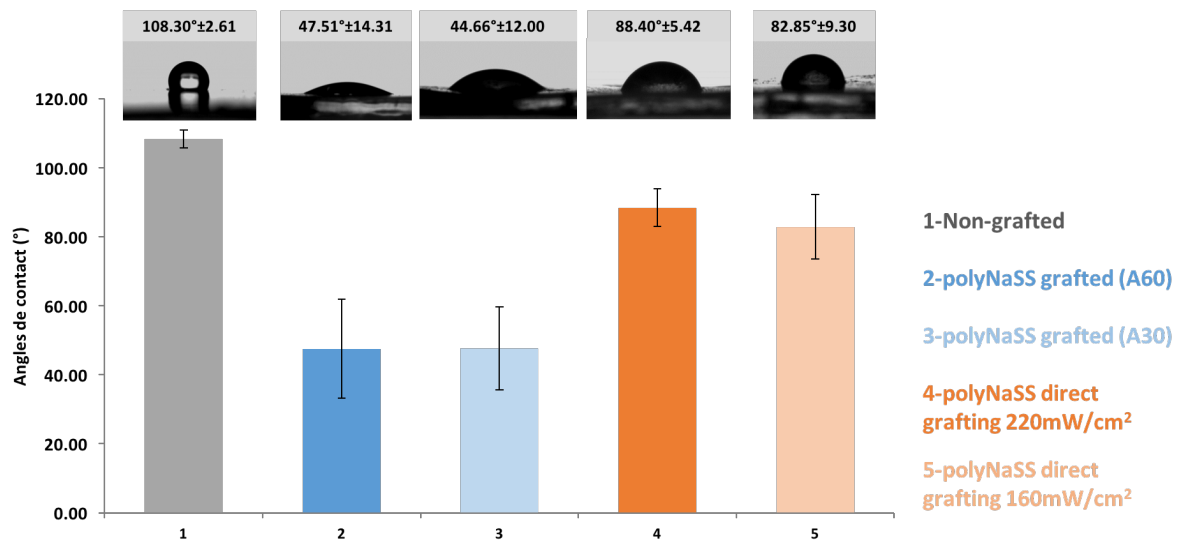


Figure 75: Mesure des angles de contact après le greffage du polyNaSS sur des surfaces de PDPS suivant différentes conditions expérimentales

Dans le même objectif, la présence de groupements aromatiques laisse penser qu'un greffage direct sans activation peut être envisageable. Un greffage direct à 160 mW/cm² ou 220 mW/cm² a donc été réalisé sur des surfaces de PDPS.

Les résultats d'angle de contact (Figure 75) montrent un gain d'hydrophilie même si celui-ci est moins marqué que lorsqu'une étape d'activation est impliquée. L'angle moyen s'élève à 80 ° que le greffage direct ait été réalisé à 160 ou 220 mW/cm².

Ces résultats de mouillabilité sont confirmés par le dosage des groupements sulfonates à la surface. En effet, comme dit précédemment, lorsque la surface est activée pendant 30 minutes, le taux de greffage est similaire au greffage classique : 8.0×10^{-7} mol/L (Figure 76). Cependant, pour le greffage direct même si le taux élevé témoigne de la présence du polyNaSS, de grandes barres d'erreurs sont observées. En effet, il serait possible que le

greffage ne soit pas contrôlé et que le greffage direct ne permettrait pas d'avoir un taux contrôlé de sites réactifs pendant la réaction (radicaux aromatiques) ce qui justifierait l'hétérogénéité d'un échantillon à l'autre.

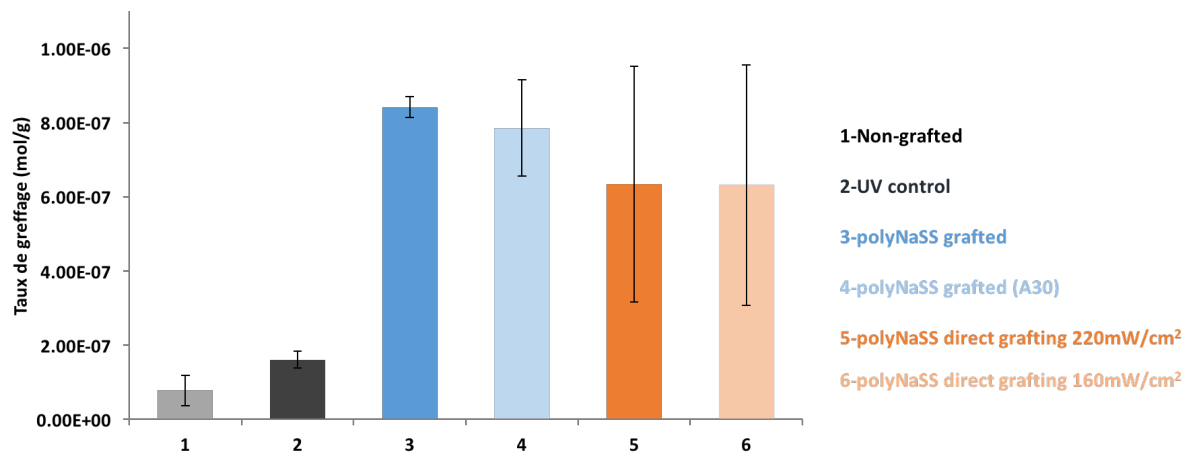


Figure 76: Dosage colorimétrique après le greffage du polyNaSS sur des surfaces de PDPS suivant différentes conditions expérimentales

2.3. Test de cytotoxicités

Le polydiphénylsiloxane n'est pas un type de silicone utilisé de façon courante. Dans le domaine biomédical, il n'est utilisé que comme couche barrière dans l'enveloppe des prothèses mammaires. C'est pourquoi les données relatives au PDPS sont si peu nombreuses.

L'évaluation de la cytotoxicité d'un tel matériau est importante si on envisage son utilisation directe dans le corps humain.

Nous avons alors réalisé des tests de cytotoxicité (Figure 77) en utilisant le MTT avec des fibroblastes L929 incubés au contact des surfaces pendant 24 h. Ces essais de viabilité cellulaire montrent qu'une surface de PDPS brute non greffée permet un taux de viabilité assez faible autour de 30 % ce qui est largement inférieur au seuil fixé par les normes ISO. Même si le greffage polyNaSS a permis un taux de viabilité légèrement amélioré, la performance est loin d'une surface de PDMS non greffé médical grade.

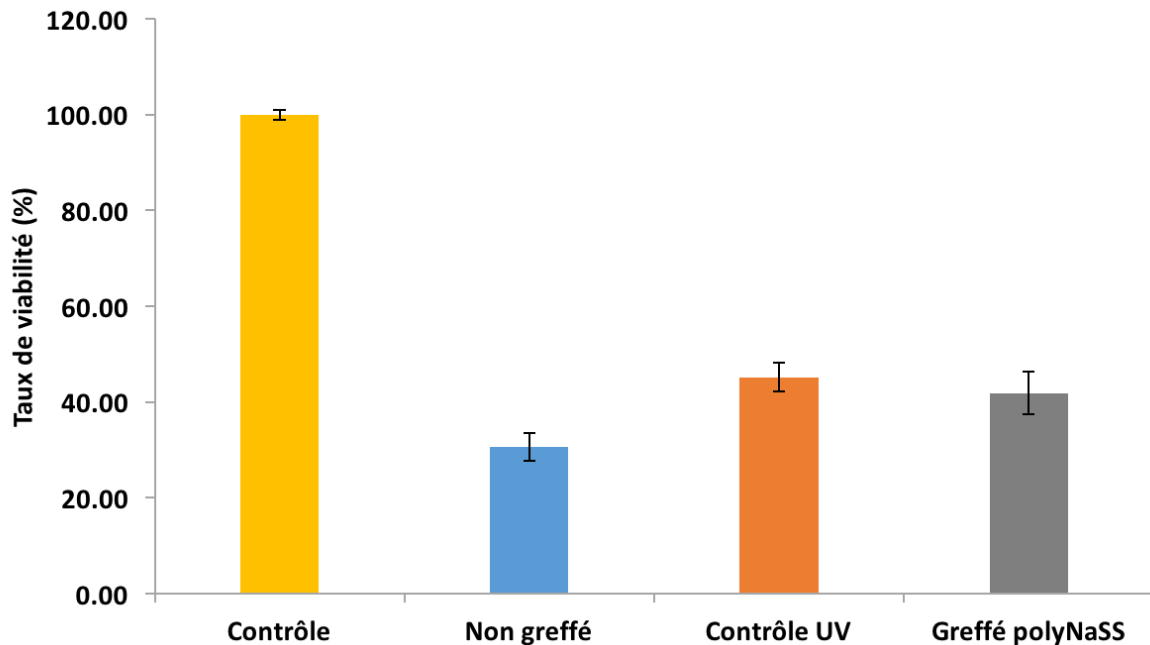


Figure 77: Evaluation par MTT de la viabilité cellulaire des surfaces du polydiphénylsiloxane (non greffées, UV contrôles, greffées polyNaSS)

À travers ces résultats, nous avons montré que malgré une meilleure réactivité des surfaces de PDPS en raison des groupements phényles, et donc un meilleur greffage, les données cytotoxiques ne sont pas favorables. L'emploi de ces surfaces comme substitution au silicone classique n'est alors pas idéal. Toutefois, il n'y a pas de problème lorsque celui-ci est intercalé dans la structure en couche de l'enveloppe de la prothèse dans le but d'éviter la fuite du gel hors de l'implant. En aucune façon le PDPS ne sera en contact avec le milieu biologique.

Cette partie a permis de mettre en évidence, la structuration particulière des enveloppes de silicone. Elle a aussi permis de montrer que la rugosité des surfaces n'a pas d'influence sur la qualité de greffage.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 4 : Etude des interactions silicone/protéines avec le greffage polyNaSS

Les précédentes parties ont été principalement consacrées au développement d'une technique de fonctionnalisation du poly(styrène sulfonate) de sodium sur le silicone d'implants mammaires suivie de l'évaluation de la réponse mécanique et de la réponse cellulaire.

La partie suivante est dédiée à l'étude de l'adsorption de protéines à la surface de silicone non traitée (lisse – T0) puis en présence du polyNaSS. En effet, dans le domaine des biomatériaux, l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface relève du processus naturel qui survient instantanément après l'implantation dans le corps. Cette couche de protéines joue un rôle primordial dans la biocompatibilité du matériau, car elle est le siège des principales réactions biochimiques qui en découlent.

Le greffage du polymère bioactif sur le silicone induit des changements physicochimiques avec en premier lieu une mouillabilité modifiée puis la présence de nouvelles fonctionnalités chimiques (sulfonates) qui peuvent directement influencer l'adsorption des protéines.

L'étude qui suit consiste d'abord à trouver les conditions expérimentales adaptées pour adsorber isolément l'albumine et la fibronectine sur le silicone. Puis, elle vise à comprendre leur comportement et leur organisation à la surface en fonction de la nature de celle-ci (greffée ou non). La compréhension et le contrôle de ces protéines permettront de moduler indirectement la réponse biologique recherchée.

Comme décrit dans la partie bibliographique, l'adsorption des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) résulte de la réaction à un corps étranger qui opère à la suite de l'implantation. Cette couche de protéines est le siège de réactions biologiques et agit comme une interface dans l'attachement avec les cellules environnantes. Cependant, si des bactéries se trouvent en périphérie, ces dernières peuvent également s'y adhérer et former un biofilm responsable de complications ultérieures.

L'adsorption protéique à la surface d'un biomatériau est un phénomène complexe et inévitable qui constitue une des premières étapes de la réponse à un corps étranger [198][199]. Les nombreuses protéines de la MEC viennent en reconnaissance afin de contenir et neutraliser l'objet dans les premiers instants et induire ou non une réaction inflammatoire [40]. Une protéine est une chaîne polypeptidique définie comme une macromolécule formée par la succession d'acides aminés lui conférant des propriétés diverses. Selon la nature des acides aminés qui la compose, elle peut établir avec une tierce molécule ou surface des interactions hydrophobes, hydrophiles, ou électrostatiques (présence de charges).

À la surface d'un matériau, les protéines constituent une interface avec le système biologique. Pour cette raison, il semble pertinent que contrôler l'adsorption des protéines soit un moyen de moduler la réponse cellulaire et bactérienne [180][198]. Par ailleurs, selon les conditions dans lesquelles elles se trouvent, les protéines adoptent des conformations différentes (secondaire, tertiaire, quaternaire).

Chacune des protéines possède un rôle dans la régulation de la réponse biologique avec notamment l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire [200]. De nombreux paramètres tels que le pH [201], la charge de surface [202] ou la composition chimique permettent de réguler leur adsorption [168]. En effet, ces paramètres surfaciques orientent physiquement la protéine selon le type d'interactions ou de liaisons établies avec les acides aminés qui la composent. De ce fait, en contrôlant les protéines en surface, il sera possible d'atteindre une performance améliorée d'un dispositif médical se traduisant soit par une biocompatibilité meilleure, soit par l'apparition de propriétés biologiques nouvelles (effet antibactérien par exemple).

Parmi les critères qui peuvent influencer l'adsorption protéique, nous retrouvons le paramètre de rugosité [203][204]. En effet, Vlachopoulou *et al.* [205] ont montré que la

nanotexturation du silicone influe sur l'adsorption des protéines, car elle offre une surface spécifique plus importante. La présence d'irrégularités crée également des sortes de « nids » dans lesquelles les protéines peuvent s'y nicher.

Enfin, une des particularités des protéines repose sur leur capacité à adopter des conformations différentes leur conférant ainsi des propriétés diverses. Ce changement structural peut influencer leurs interactions avec les éléments environnants (cellules, protéines, bactéries). Pour illustrer ce propos, il a été largement démontré dans les travaux du laboratoire que les groupements sulfonates du polyNaSS influent sur la conformation/orientation de la fibronectine ce qui a conduit à la réduction significative de l'adhésion bactérienne. En effet, les marqueurs de la fibronectine habituellement reconnaissables par les adhésines des bactéries étaient moins apparents au contact du polyNaSS [168].

Les deux protéines que l'on va étudier sont l'albumine et la fibronectine aux concentrations physiologiques. L'albumine est étudiée, car c'est une protéine modèle et majoritaire dans la MEC puis aussi, car elle joue un rôle dans le blocage des régions d'adsorption non spécifiques. La fibronectine, quant à elle, est étudiée pour son mode d'action spécifique dans l'effet antibactérien associé au polyNaSS avec lequel elle a une affinité plus élevée qu'avec l'albumine [206]. La fibronectine est également étudiée pour son rôle dans la reconnaissance spécifique des récepteurs membranaires des cellules qui permettent l'attachement de ces derniers au matériau (biocompatibilité).

Dans cette partie, deux groupes d'échantillons sont testés pour chacune des expériences d'adsorption menées : des surfaces de silicone non greffées et de silicone greffée au polyNaSS.

1. Adsorption de l'albumine

L'albumine est la protéine plasmatique la plus abondante (60 %) de la matrice MEC présente à 4 g.L^{-1} . C'est une protéine globulaire ayant une structure tridimensionnelle en forme de cœur avec des replis au sein de sa chaîne polypeptidique constituée d'environ 585 acides aminés et d'un faible poids moléculaire de 65 kDa (Figure 78). L'albumine est une protéine dite non adhésive. En présence d'autres protéines, celle-ci est rapidement remplacée. En biologie, l'albumine sérique bovine (BSA) est principalement utilisée et étudiée comme protéine modèle dans les interactions protéine-matériaux grâce à sa haute stabilité et sa grande disponibilité. De plus, sa structure et sa réactivité sont comparables à l'albumine sérique humaine ce qui constitue un avantage d'un point de vue scientifique. Généralement, la BSA a une faible implication dans les réactions biochimiques.

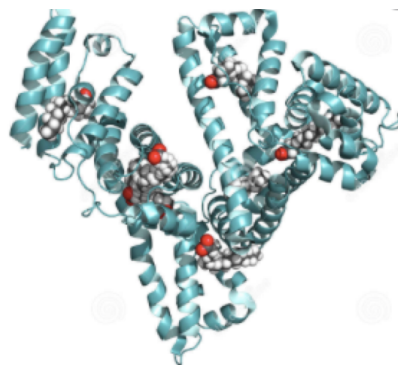


Figure 78: Structure de la BSA

L'adsorption de l'albumine en surface intervient généralement en premier lieu et va initier l'adsorption des autres protéines telles que la fibronectine ou la vitronectine qui sont des protéines adhésives.

Les surfaces de silicone brutes étant fortement hydrophobes (angle de contact moyen 105°), l'adsorption de l'albumine devrait augmenter la mouillabilité de la surface avec une diminution de l'angle de contact. En effet, les domaines hydrophobes de la BSA vont avoir tendance à s'orienter vers la surface de silicone de même mouillabilité tandis que les domaines hydrophiles se tourneront plutôt vers l'extérieur. À l'inverse, lorsque la surface est hydrophile (surface greffée polyNaSS), le phénomène contraire est attendu (Figure 79).

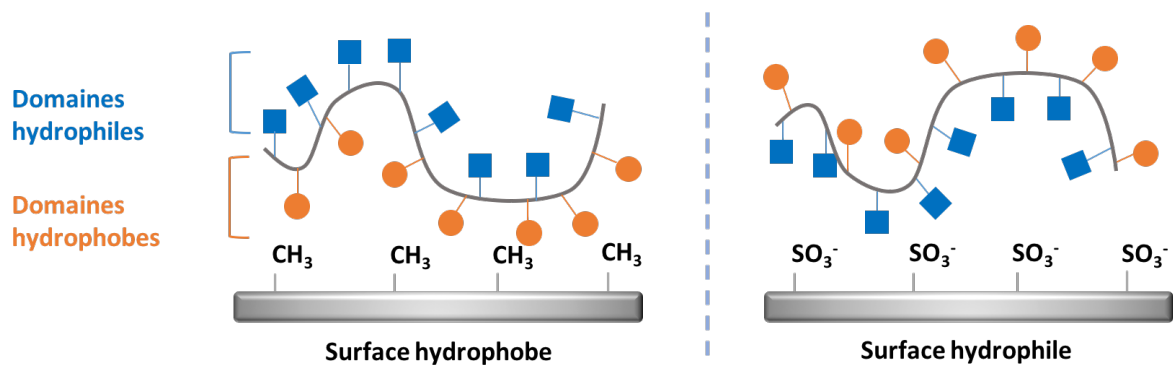


Figure 79: Schéma de l'orientation d'une protéine et de ses domaines hydrophobes ou hydrophiles selon la mouillabilité de la surface d'adsorption

Dans les études qui vont suivre, l'albumine est adsorbée à une concentration physiologique de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur des surfaces de silicone lisse afin d'assurer les mêmes conditions que l'incubation cellulaire, tous les échantillons ont été stérilisés puis incubés dans du Dulbecco's modified eagle medium complété pendant une nuit avant les expériences d'adsorption.

1.1. Adsorption de la BSA sur des surfaces non greffées

Après une heure d'incubation avec une solution de BSA à $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, les échantillons de silicone sont rincés, séchés sous vide à température ambiante puis conservés à 4°C pour les caractérisations ultérieures.

Les surfaces ont été dans un premier temps caractérisées par spectroscopie infrarouge (FTIR-ATR) pour mettre en évidence la présence effective de l'albumine sur les surfaces avec ce protocole d'adsorption (cf. partie matériel et méthodes). En effet, comme toute protéine en général, la BSA est aisément identifiable par spectroscopie infrarouge grâce à la présence des bandes caractéristiques de la liaison peptidique entre chaque acide aminé qui s'établit entre la fonction carboxylique porté par un acide aminé et la fonction amine de l'acide aminé suivant. Cette liaison particulière est caractérisée par les vibrations des liaisons N-H (amide A), C=O (amide I), et C-N (amide II) apparaissant respectivement aux alentours de 3200 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} et 1525 cm^{-1} . Ces bandes caractéristiques se confirment dans le spectre de la BSA seule (sous forme de poudre) qui constitue le spectre témoin (Figure 80). D'intensités fortes, ces dernières se trouvent exactement à $3287,5 \text{ cm}^{-1}$, $1640,3 \text{ cm}^{-1}$ et $1525,5 \text{ cm}^{-1}$.

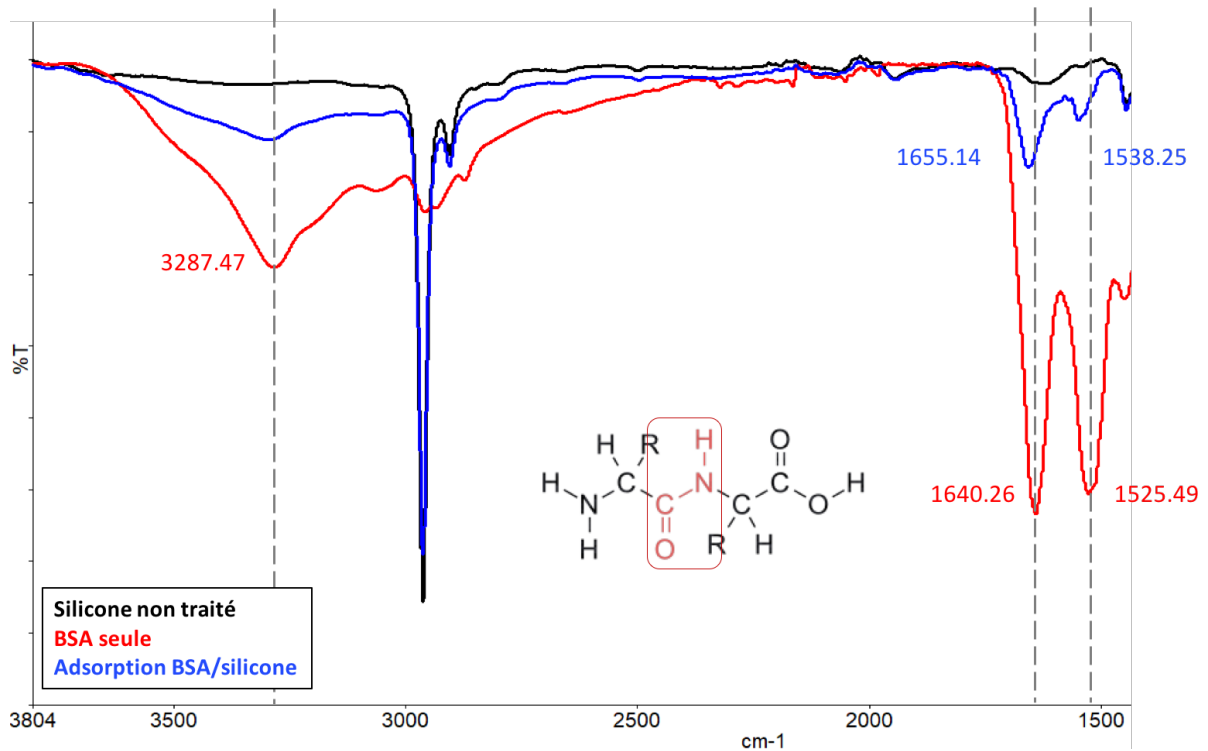


Figure 80: Spectres infrarouges des surfaces de silicone non greffées avant et après adsorption de la BSA en comparaison avec le spectre de la poudre de BSA seule

Par comparaison, nous retrouvons bien ces mêmes bandes sur le spectre d'une surface de silicone après adsorption de la BSA, à quelques nombres d'onde de différences respectivement à $3287,5 \text{ cm}^{-1}$, $1655,1 \text{ cm}^{-1}$, et $1538,3 \text{ cm}^{-1}$. Évidemment, ces dernières sont moins intenses en raison de la contribution des autres bandes associées à la structure du silicone lui-même et d'une concentration moins élevée que la poudre de BSA pure. Par ailleurs, nous montrons clairement que les bandes nouvellement formées sont attribuées spécifiquement à la présence de la BSA adsorbée relativement au spectre de silicone non traité (Figure 80-spectre noir) où elles sont absentes.

Par la suite, nous avons évalué la mouillabilité de ces mêmes échantillons pour confirmer la présence de la BSA en surface. En effet, la présence de la BSA a entraîné une diminution de l'angle de contact qui traduit alors un léger gain d'hydrophilie (Figure 81). La surface passe de 105° à 87° environ. Cette observation confirme le principe où les domaines hydrophobes s'assemblent pour exposer le domaine hydrophile vers l'extérieur.

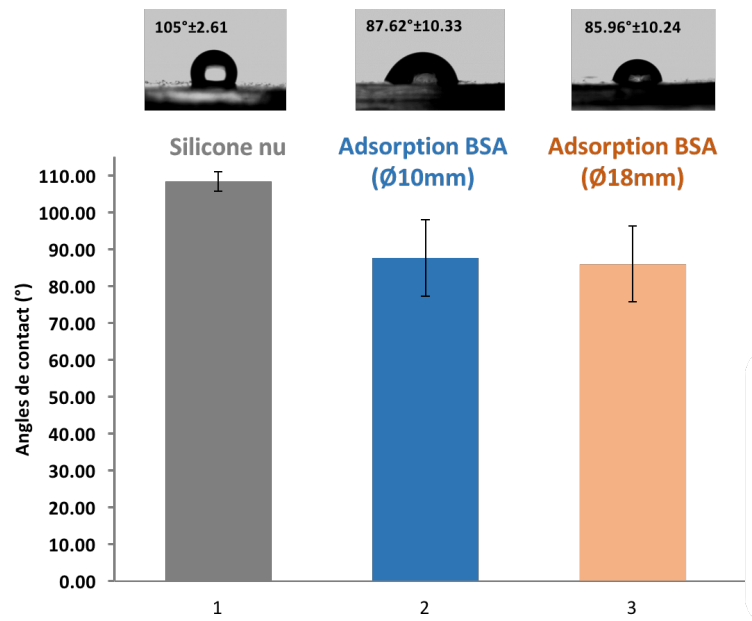


Figure 81: Evaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone nues (Ø1,0 & 1,8 cm) avant et après une heure d'incubation avec la BSA

Néanmoins, d'un point de vue expérimental, les surfaces de silicone étudiées dans les expériences ci-dessus sont de dimensions identiques aux surfaces optimisées pour le greffage du polyNaSS sous irradiations UV soit des disques de 1 cm de diamètre. Par conséquent, en tenant compte du diamètre des puits d'adsorption qui est de 1,8 cm, la possibilité d'une compétition d'adsorption entre la surface de silicone et le fond du puits non couvert se pose. D'autant plus qu'à l'inverse du silicone, le fond est de nature hydrophile. En d'autres termes, il s'agit de voir si la protéine adhère préférentiellement sur une surface hydrophile ou sur une surface hydrophobe au contact des deux. En effet, si la possibilité se confirme, cela peut s'avérer problématique pour la suite de l'étude.

Ainsi, pour valider les conditions expérimentales d'adsorption sur des surfaces de Ø 1,0 cm et les précédentes observations, nous avons étudié l'adsorption de la protéine sur des surfaces de silicone de Ø 1,8 cm (recouvrement total de la surface du puits).

Les résultats d'angle de contact illustrés dans la Figure 81 montrent qu'il n'y a pas d'effet de compétition avec le fond du puits. En effet, on atteint une valeur moyenne d'angle de contact similaire, quel que soit le diamètre de l'échantillon. Ces résultats permettent de

confirmer le protocole d'adsorption de l'albumine sur des surfaces de silicone non greffées de 1,0 cm de diamètre.

1.2. Adsorption de la BSA sur des surfaces greffées

Pour rendre compte de l'influence du polyNaSS sur l'adsorption des protéines, nous avons réalisé l'adsorption de la BSA dans les mêmes conditions que précédemment sur des échantillons de silicone greffés et donc hydrophiles (45 °). En effet, malgré la stabilité de la BSA, comme toute protéine, celle-ci peut être sujette à des perturbations en réponse au changement de l'environnement extérieur. Contrairement à la configuration précédente, il est supposé que les domaines hydrophiles seront cette fois préférentiellement tournés vers la surface greffée tandis que les domaines hydrophobes seront orientés vers l'extérieur. Comme attendu, l'évaluation de la mouillabilité confirme la théorie avec le passage d'un angle de contact moyen de 45° à un angle moyen de 97,8 ° ± 8,9 en présence de BSA.

Par la suite, une analyse qualitative de la topographie des surfaces avec l'albumine adsorbée a été réalisée grâce à la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique de pointe permet une visualisation en détail de l'organisation de la protéine à l'échelle nanométrique. En effet, la BSA étant une protéine de très petite taille (quelques dizaines de nm), elle est alors difficilement observable par microscopie électronique à balayage par exemple.

Les analyses AFM ont été réalisées sur des échantillons complètement secs et qui ont été délicatement conservés pour éviter tout phénomène d'altération ou de dénaturation de la protéine (Cf. Chapitre II-Matériels et méthodes).

Les images par AFM des surfaces de silicone nues et greffées après adsorption de la BSA sont illustrées dans la Figure 82. L'aspect général de la surface est différent après adsorption de la protéine comparé à une surface sans traitement décrite comme nano texturée dans la partie 2. Cette observation confirme une fois de plus la présence de l'albumine effective de la BSA sur les surfaces de silicone en complément des techniques de spectroscopie infrarouge et de mesure d'angle de contact.

Sur une surface de silicone nue, la présence de l'albumine se traduit par la présence d'amas de petites sphères/globules de densités variables qui sont associés à la structure globulaire de la BSA que l'on aperçoit plus nettement sur l'image 2D. Cette globularité apparaît de manière plus ou moins intense avec le contraste de couleur ce qui pourrait s'expliquer par une concentration en albumine variable suivant la zone. En complément, la représentation 3D montre que l'albumine conduit à une certaine rugosité de surface assez hétérogène de l'ordre de 3,75 nm. Par ailleurs, le diamètre moyen de la BSA globulaire est estimé à $55,29 \mu\text{m} \pm 4,63$.

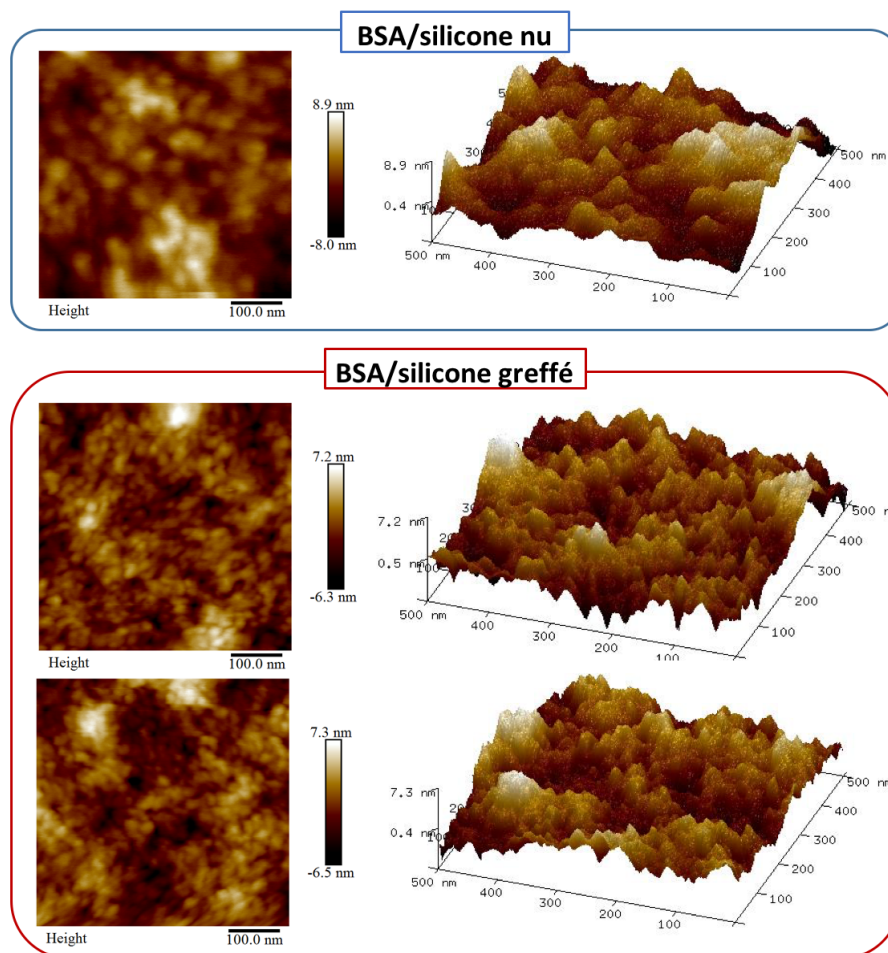


Figure 82: Représentation 2D et 3D de la topographie des surfaces de silicone nues et greffées après adsorption de la BSA

De façon intéressante, dans le cas des surfaces greffées, la même tendance est observée de prime abord avec une protéine qui se met en amas (Figure 82). Néanmoins, en regardant de plus près, on distingue des globules nettement plus petits (diamètre moyen de

25,62 nm \pm 4,25) avec une densité plus élevée. Cette différence semble aussi réduire l'ordre de rugosité avec une topographie un peu plus détaillée. La rugosité de surface S_a moyenne calculée est de 3,02 nm. Cependant, nous soulignons que l'albumine conserve malgré tout sa structure globulaire en dépit de la présence du polyNaSS en surface.

Pour conclure, mis à part une densité plus importante de la BSA sur les surfaces de silicones hydrophiles, le greffage du polyNaSS à la surface du silicone n'a pas d'impact conséquent sur la conformation ou orientation de la protéine.

2. Adsorption de la fibronectine

La fibronectine (FN) est une protéine qui intervient activement dans de nombreuses processus biologiques. Notamment, elle a un rôle essentiel dans la régulation de l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. À l'inverse de l'albumine, la fibronectine est une protéine fibrillaire, plus grande en taille (100 nm) et en masse (450-500 kDa) (Figure 83).

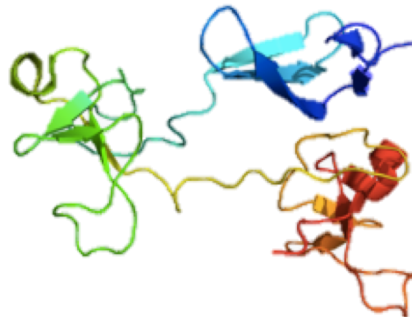


Figure 83: Structure 3D de la fibronectine

D'un point de vue structural (Figure 84), la FN est une glycoprotéine avec des domaines plus ou moins rigides [207]. La présence de ces domaines lui confère des propriétés diverses et des fonctions variées. Par exemple, les domaines rigides vont favoriser les interactions avec certains composés de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou les protéoglycanes. Tandis que les autres domaines peuvent être impliqués dans les liaisons avec les cellules environnantes. En effet, la fibronectine possède dans sa structure un motif peptidique formé de l'arginine, la glycine, et l'acide aspartique (RGD) qui lui permet de se lier aux intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_5\beta_3$ (protéines transmembranaires) des cellules [208]. Lorsque ces

séquences RGD ne sont pas exposées, l'attachement cellulaire ne peut avoir lieu [209]. Ajoutée à cela, la fibronectine est impliquée dans les processus de guérison, mais participe également au processus de formation d'un biofilm car, elle peut être le siège de développement des microorganismes [210]. Ces derniers sont capables de reconnaître certains marqueurs de la FN grâce à leurs récepteurs appelés adhésines localisés à la surface de leurs structures.

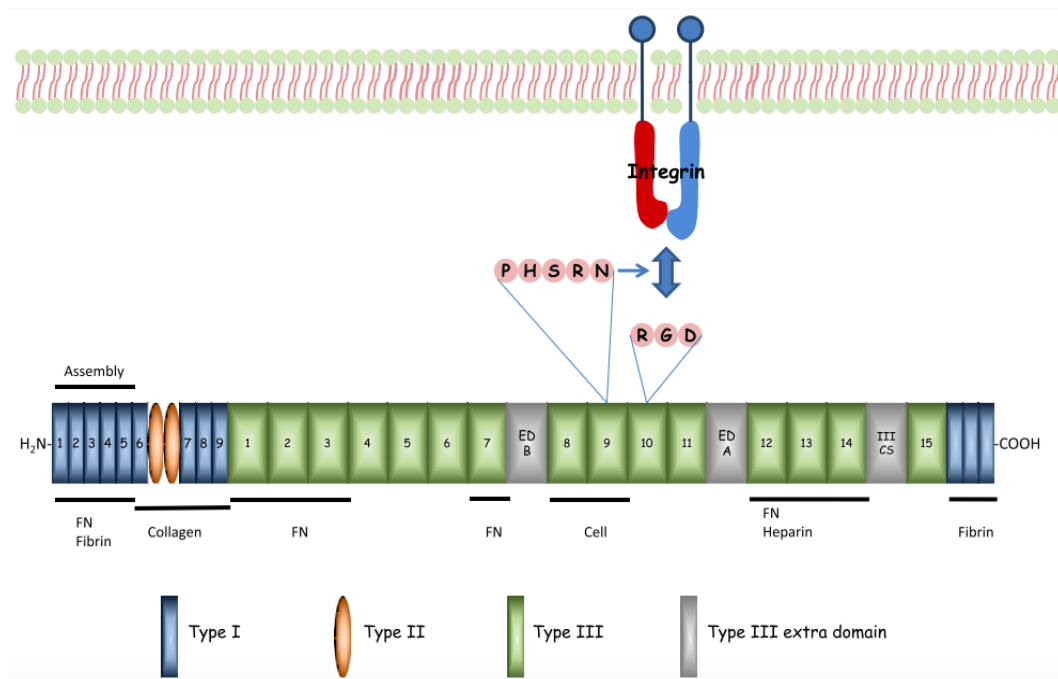


Figure 84: Représentation de la fibronectine avec ses différents domaines et ses sites d'interactions avec la membrane des cellules [207]

Au niveau bactérien, il a été montré que la fibronectine était impliquée dans le mécanisme d'anti-adhésion bactérienne du polyNaSS greffé à la surface d'un matériau. Il a été montré par Felgueiras *et al.* [168] qu'en présence de polyNaSS les bactéries étaient incapables de reconnaître certains domaines de la FN. Ces dernières se trouvaient alors dans l'impossibilité d'adhérer à la couche protéique et de former un biofilm en surface. Pour expliquer ce phénomène, il a été supposé un changement de conformation ou d'orientation de la FN en présence du polyNaSS rendant moins visibles ou accessibles les domaines de liaisons aux adhésines des bactéries ce qui a permis de réduire significativement l'adhésion bactérienne.

Pour ces raisons, la compréhension et le contrôle de l'adsorption d'une telle protéine à la surface d'un matériau semble essentielle pour réguler les réactions chimiques/biologiques survenant après l'introduction d'un implant.

2.1. Adsorption de la FN sur des surfaces non greffées

Expérimentalement, la préparation de la solution de FN est plus délicate que la solution de la BSA (cf. Chapitre II-Matériels et méthodes). En effet, la fibronectine est une protéine fragile qui peut facilement s'agréger en solution, c'est pourquoi la dilution de la FN dans le PBS doit se faire sous agitation légère et manuelle pour éviter tout phénomène d'agrégation. Autrement, le protocole d'adsorption reste le même avec une étape de passivation à la BSA en amont. Cette étape consiste à « rincer » avec une solution d'albumine tout le matériel (échantillons compris) qui servira à l'adsorption de la FN pendant 30 minutes dans le but de bloquer les sites d'adsorption non spécifiques afin de garantir une adhésion de la FN optimale.

La fibronectine a été adsorbée à concentration physiologique soit à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Un spectre FTIR (Figure 85) a été réalisé après une heure d'adsorption pour confirmer la présence de la FN. Celui-ci montre effectivement l'apparition des bandes caractéristiques de la liaison amide de la protéine à 3293 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} et 1547 cm^{-1} comparée au spectre de silicone sans traitement. Par ce protocole, la FN a bien été adsorbée sur les surfaces de silicone.

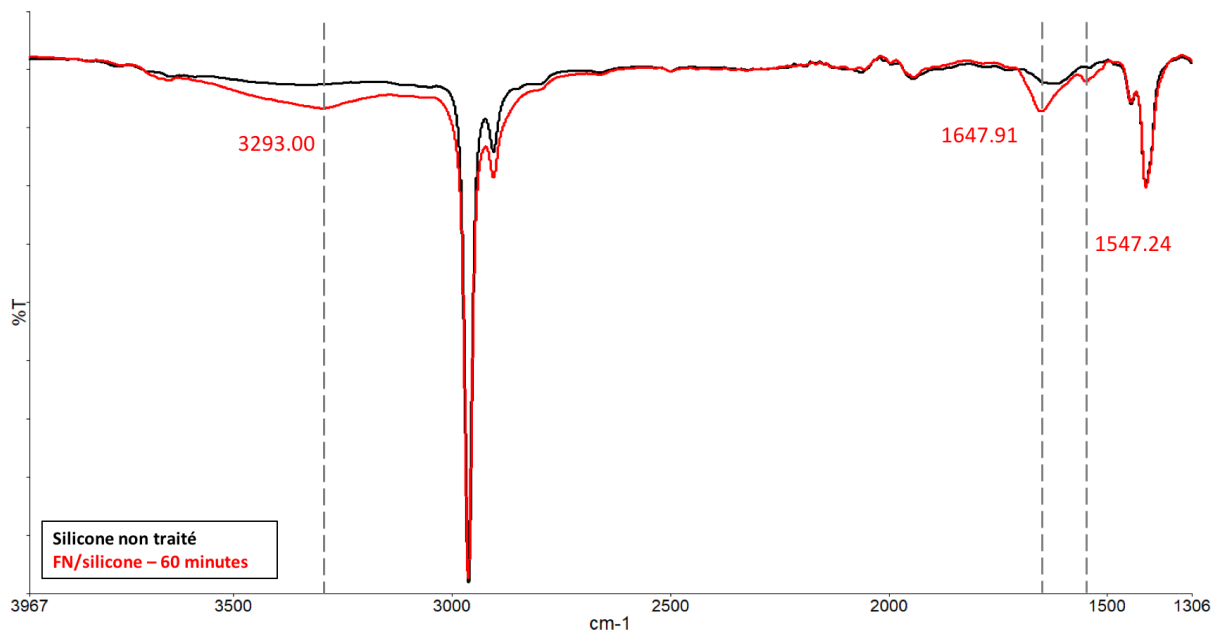


Figure 85: Spectres infrarouges des surfaces de silicone nues avant et après adsorption de la fibronectine après une heure d'incubation

2.2. Adsorption de la FN sur des surfaces greffées

Les modifications de surfaces, quelle que soit leur nature, ont une influence sur l'adsorption des protéines. En contraste avec la BSA, la FN est plus susceptible de voir sa structure ou sa conformation modifiée en fonction des variations extérieures (temps d'adsorption, nature de la surface, pH, charge ...[201][202]). Pour cette raison, il est important d'étudier le changement des propriétés de surfaces de silicone apporté par le greffage du polyNaSS sur l'adhésion de la fibronectine. Le polymère bioactif apporte une certaine hydrophilie de surface et des groupements sulfonates chargés négativement.

Le spectre infrarouge ci-dessous (Figure 86) montre l'apparition de bandes intenses caractéristiques de la liaison peptidique de la fibronectine adsorbée sur une surface de silicone greffée après une heure d'incubation. On remarque aussi que l'intensité de ces trois bandes est globalement plus marquée que dans le cas de l'adsorption sur les surfaces nues.

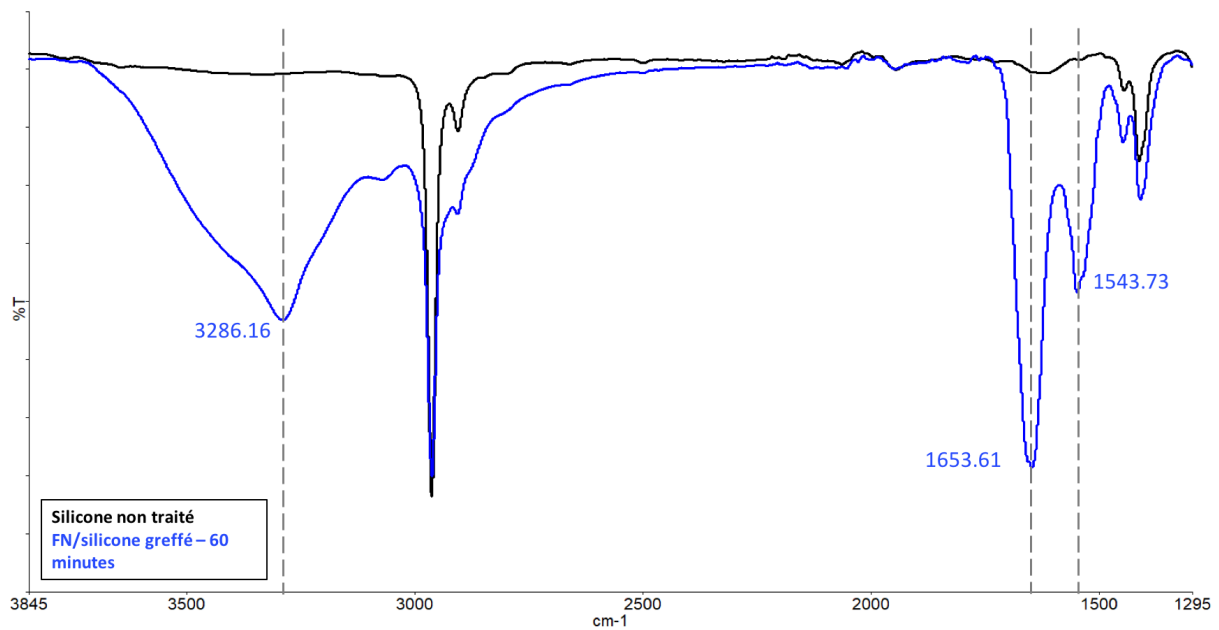


Figure 86: Spectres infrarouges du silicone greffé avant et après adsorption de la fibronectine après une heure d'incubation

En effet, en comparant les intensités, les bandes à 3286 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} des FN/silicone nu et FN/silicone greffé sont qualitativement plus intenses (Figure 87). Cette différence d'intensité d'environ 90 % pour chacune des bandes peut être attribuée aux raisons suivantes (l'une n'exclut pas l'autre) :

- 1) Une quantité plus élevée de FN adsorbée sur une surface fonctionnalisée qui est favorisée par le caractère hydrophile de celle-ci.
- 2) La fibronectine s'est adsorbée en même quantité, mais elle voit son orientation ou sa conformation modifiée et ainsi ses liaisons peptidiques plus exposées.

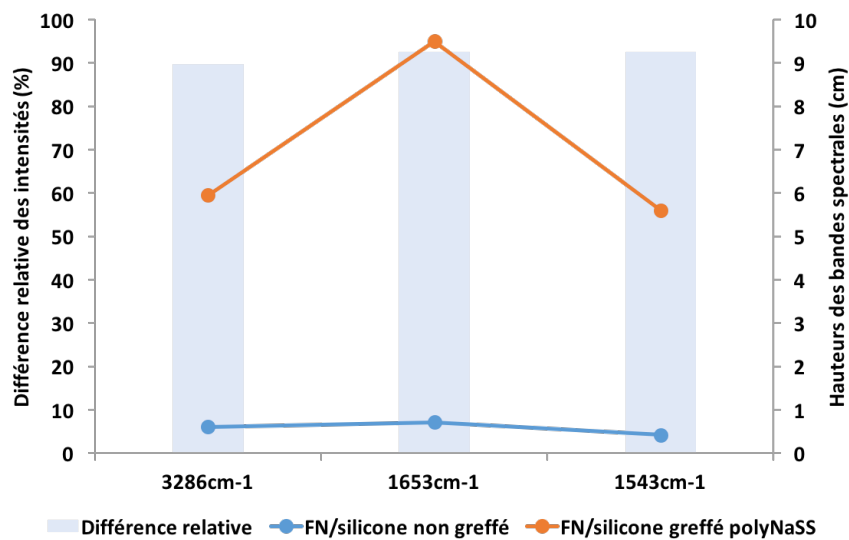


Figure 87: Représentation de la différence relative des intensités des bandes spectrales après adsorption de la fibronectine entre des surfaces de silicone nues et greffée au polyNaSS

Toutefois, la spectroscopie infrarouge n'étant qu'une technique dite semi-quantitative, cette hypothèse doit être vivement vérifiée par une quantification de la fibronectine.

2.3. Etude cinétique d'adsorption de la fibronectine

La fibronectine est une protéine fibrillaire dont l'organisation/conformation peut changer au cours du temps. La cinétique d'adsorption vise à mettre en exergue l'évolution de la FN d'un point de vue structural à la surface du silicone au cours du temps. Pour cela, nous avons incubé individuellement des surfaces de silicone nues ou greffées avec une solution de fibronectine à 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant 5, 10, 30 et 60 minutes.

- **Surfaces de silicones non greffées**

D'un point de vue qualitatif, la fibronectine s'adsorbe en effet très rapidement après seulement 5 minutes d'incubation (Figure 88/spectre orange). En effet, les bandes caractéristiques d'intensités moyennes de la liaison amide (3293 cm^{-1} , 1647 cm^{-1} et 1547 cm^{-1}) sont clairement identifiables. Néanmoins, après seulement 5 minutes, il se peut qu'il

s'agisse encore de la BSA issue de l'étape de passivation et non de la fibronectine. (Nous vérifierons cette hypothèse par technique de microscopie dans la suite du manuscrit.)

Par ailleurs, l'allongement du temps d'adsorption se traduit par une faible intensification des bandes comme observé dans la Figure 88 sans corrélation apparente avec la durée d'incubation.

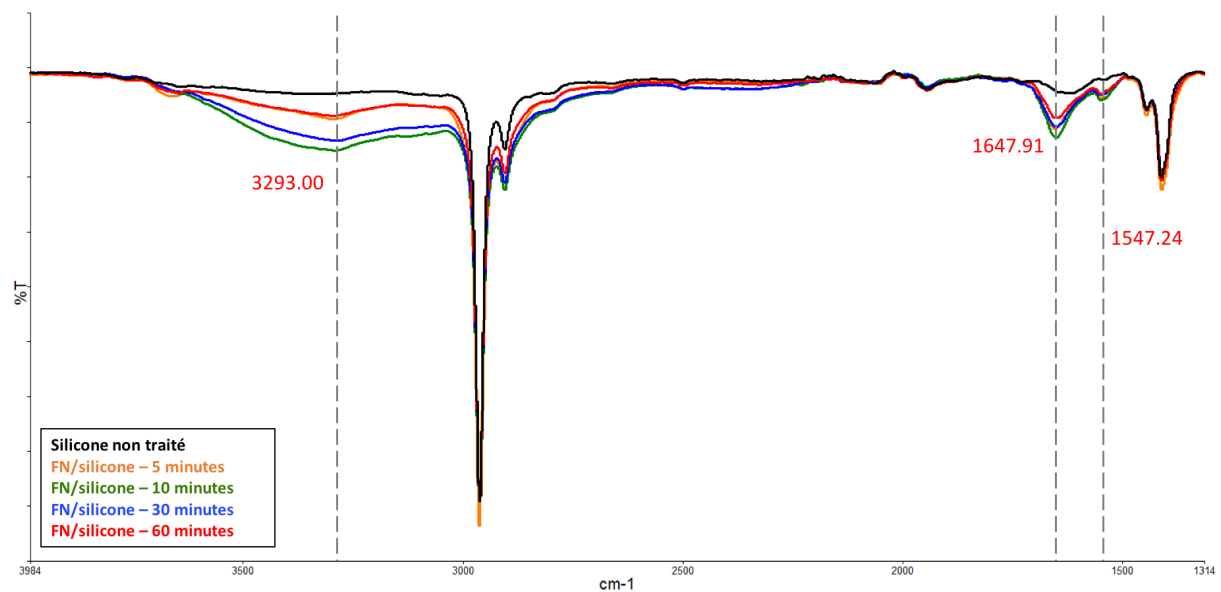


Figure 88: Spectres infrarouges des surfaces de silicone nues avant et après 5 (orange), 10 (vert), 30 (bleu), 60 minutes (rouge) d'adsorption de la fibronectine

La cinétique d'adsorption a été ensuite caractérisée par la mesure d'angle de contact des surfaces (Figure 89). En effet, on observe une baisse de l'hydrophobicité moyenne après adsorption, ce qui confirme dans un premier temps la présence indéniable de la fibronectine à la surface. De façon intéressante, nous remarquons que la diminution de l'angle de contact s'accroît avec le temps. Cette diminution est de l'ordre d'une douzaine de degrés ($\approx 95^\circ$) après 10 et 30 minutes puis d'une vingtaine de degrés ($\approx 82^\circ$) après 60 minutes. La variation de la mouillabilité au cours du temps est associée à une concentration de FN plus conséquente et/ou à un changement de la conformation de la protéine avec une exposition plus évidente de ses domaines hydrophiles. Comparativement au cas de la BSA, les données d'angle de contact de la FN sont similaires après le même temps d'adsorption.

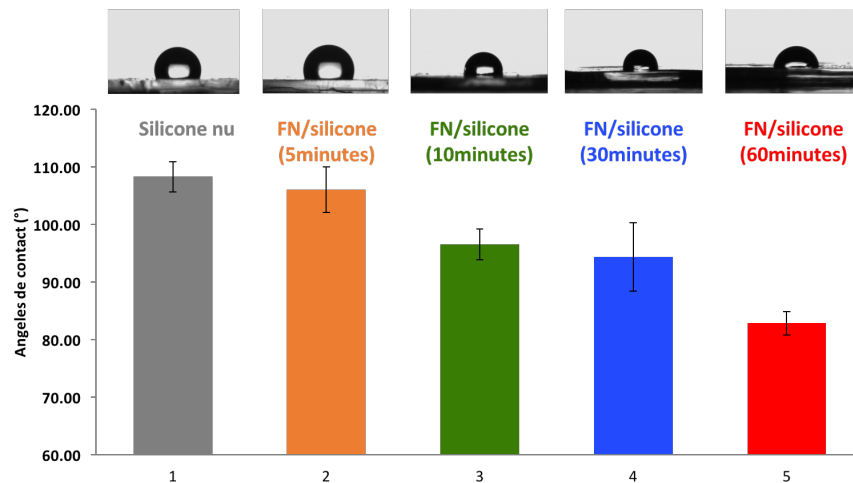


Figure 89: Évaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone nues après différents temps d'adsorption de la fibronectine

- Sur des surfaces de silicones greffées au polyNaSS

La caractérisation par spectroscopie infrarouge des échantillons greffés après différents temps d'adsorption (Figure 90) montre que l'intensité des bandes de la liaison peptidique s'intensifie significativement avec le temps. Une différence significative est observée entre 5 minutes et 60 minutes, ce qui signifie que la fibronectine se déploie totalement après un certain temps et s'adsorbe en quantité.

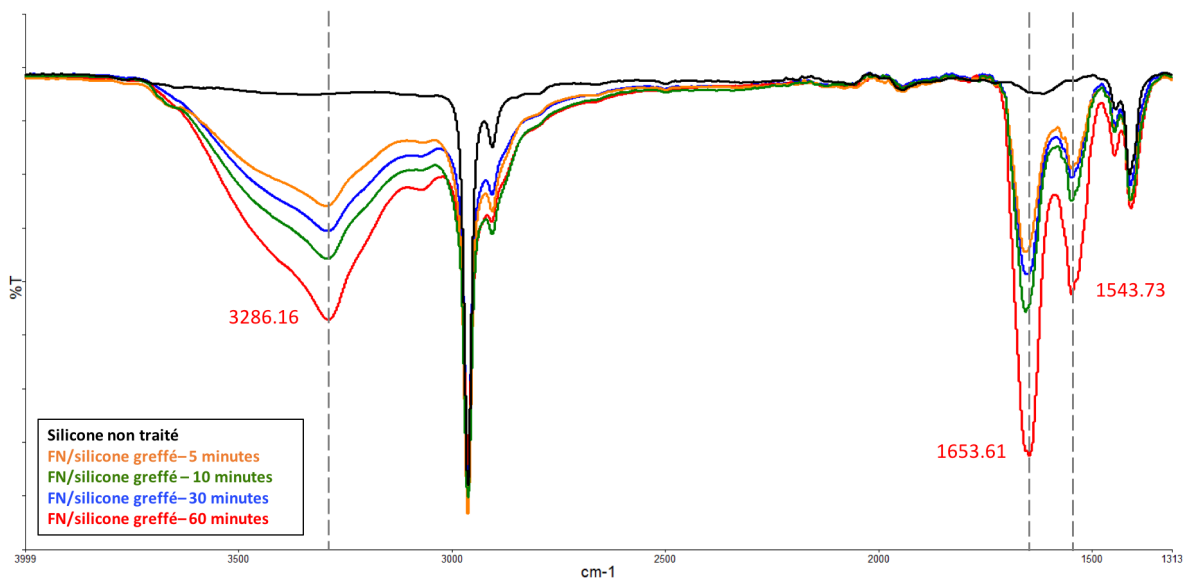


Figure 90: Spectres infrarouges des surfaces de silicone greffées au polyNaSS avant et après 5 (orange), 10 (vert), 30 (bleu), 60 minutes (rouge) d'adsorption de la fibronectine

La courbe ci-dessous (Figure 91) permet de mettre en avant la variation relative des intensités des bandes spectrales en fonction du temps d'adsorption. Les trois positions évoluent dans le même sens avec un maximum qui se détache après une heure.

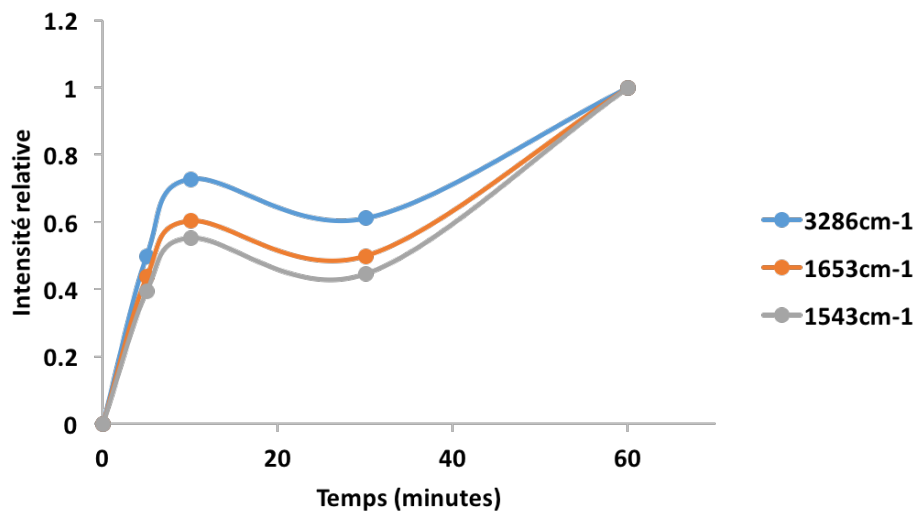


Figure 91: Variation des intensités relatives au cours du temps des trois bandes caractéristiques de la liaison peptidique issue de la présence de la FN sur une surface de silicone greffée

De manière générale, la fibronectine semble mieux s'adhérer aux surfaces de silicone greffées, et ce, dès les premières minutes. En effet, l'angle de contact moyen augmente seulement après 5 minutes d'incubation ce qui témoigne de l'adsorption rapide de la protéine. Une perte d'hydrophilie est observée avec des angles moyens de 110° (Figure 92). Le même niveau d'hydrophobicité est atteint, peu importe le temps d'adsorption, contrairement aux résultats de spectroscopie infrarouge où des variations ont été observées. Cette constatation suggère qu'un effet du polyNaSS au cours du temps sur la structure/organisation de la FN a lieu. En effet, si la variation d'intensité soulignée en infrarouge était attribuée à la concentration en FN au cours du temps cela se traduirait par une augmentation progressive de l'hydrophobicité, or ceci n'est pas le cas.

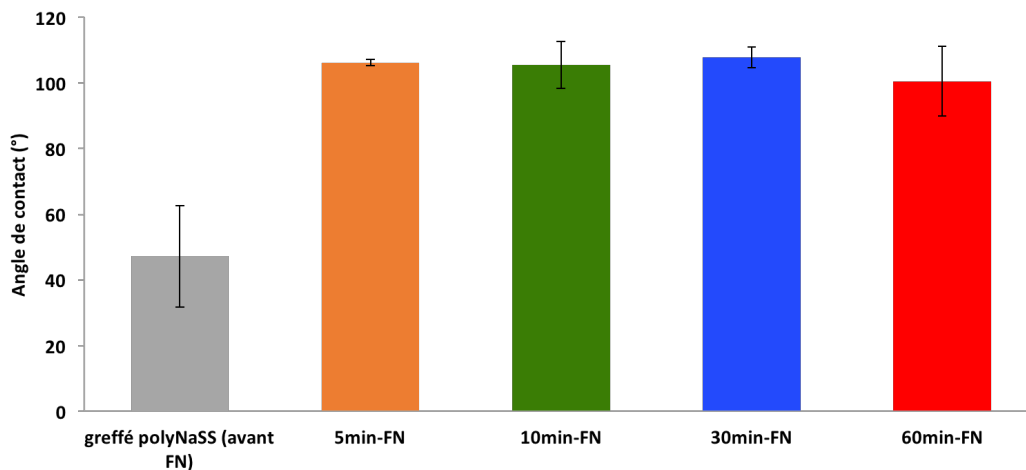


Figure 92: Évaluation de la mouillabilité des surfaces de silicone greffées au polyNaSS après différents temps d'adsorption de la fibronectine

Pour aller un peu plus loin dans la compréhension de ces résultats, nous avons caractérisé les surfaces par microscopie à force atomique afin d'imager l'adsorption de la FN sur le silicone au cours du temps.

2.4. Organisation en surface de la fibronectine

En général, la fibronectine possède une organisation de type fibrillaire qui se manifeste par une organisation en réseau de nano fibrilles comparable à de petits filaments lorsqu'elle s'adsorbe en surface [211]. Pourtant, selon les propriétés physicochimiques des surfaces, la fibronectine peut adapter sa conformation en fonction des interactions qu'elle établit avec ces derniers.

Les surfaces de silicone greffées caractérisées précédemment, ont été analysées par microscopie à force atomique à sec pour mettre en évidence l'organisation de la fibronectine au contact des surfaces après des temps d'adsorption différents. La fibronectine étant plus grande en taille que la BSA, la zone de balayage a été choisie plus large soit de 5 μm x 5 μm .

Les résultats représentés dans la Figure 93 nous montre en effet une organisation de la fibronectine en réseau fibrillaire lorsque celle-ci est adsorbée sur les surfaces nues. Une organisation similaire de la FN a été mise en évidence par Cantini *et al.* [212] sur des surfaces

de poly(acrylate d'éthyle) de même mouillabilité. De manière intéressante, ces fibrilles sont clairement observables seulement après 5 minutes d'adsorption. Dès lors, on confirme que l'apparition des bandes peptidiques mis évidence dans la figure 88 correspond bien à la FN et non à la BSA issue de la passivation. L'épaisseur estimée de la couche de FN est de l'ordre d'une soixantaine de nanomètres avec une largeur moyenne de fibrilles de 130 nm. Au cours du temps, cette organisation en réseau hexagonal comparable à la structure d'une ruche d'abeille semble se fusionner jusqu'à s'agréger en un bloc au bout d'une heure.

Dans le cas des silicones greffés au polyNASS, une tout autre tendance a été observée. En effet, cette modification de surface engendre une augmentation de la mouillabilité de celle-ci qui en réalité a induit une organisation complètement différente de la protéine en surface. À 5 minutes, on devine timidement un réseau fibrillaire tellement compacté et dense qu'on décrirait comme une multitude de nano fibrilles disposées aléatoirement sur toute la surface. Avec le temps, cette organisation particulière laisse place à une organisation en masse formée de minuscules granules (points) largement visibles après une heure. À ce stade, la structure fibrillaire semble avoir laissé place à une structure plutôt globulaire de la FN.

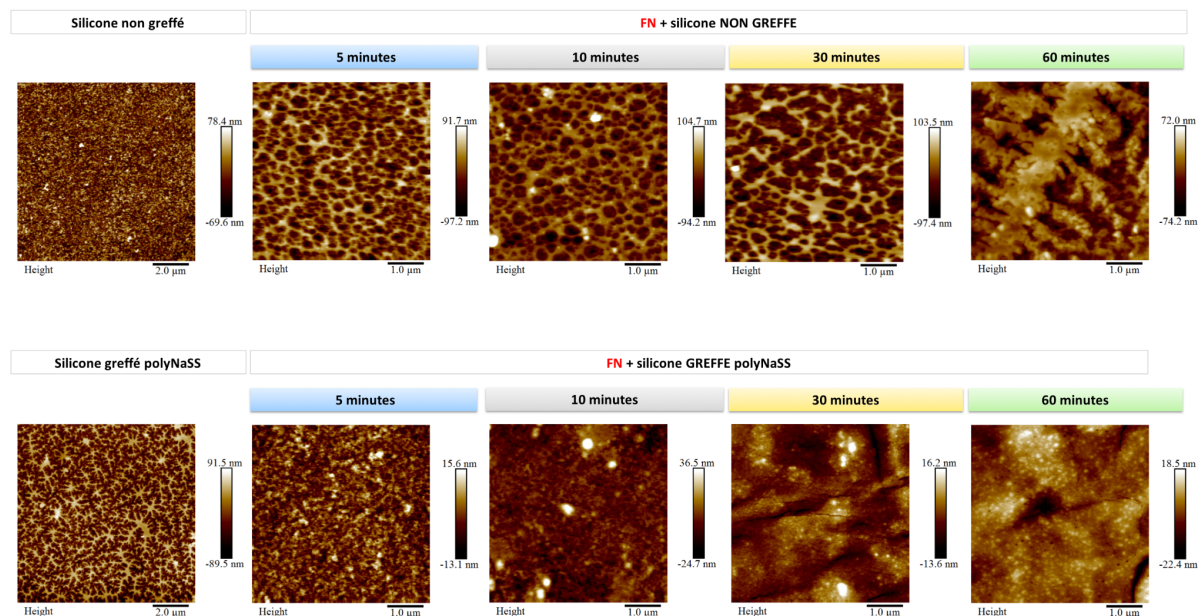


Figure 93: Analyses de l'organisation de la fibronectine à la surface de silicone nu et greffé après adsorption de la fibronectine à différents temps en comparaison avec des surfaces sans protéines par AFM sur une zone de balayage de 5 x 5 µm

Pour une meilleure interprétation, une vision plus détaillée des surfaces (Figure 94) est donnée par un balayage d'une zone plus réduite soit de 500 x 500 nm. En réalité, après une heure d'adsorption dans le cas d'une surface non greffée, le bloc décrit auparavant est en fait une masse dans laquelle on distingue des structures sphériques. Lorsqu'on regarde les images des surfaces greffées, on voit que la protéine adopte la même tendance, mais ceci dès les 5 premières minutes.

Avec le temps, la densité semble plus importante. Elle se manifeste par une multitude de tous petits globules empaquetés les uns à côté des autres. Cet accroissement de densité s'accompagne d'une baisse du diamètre général des globules à partir de 30 minutes. L'observation de cette structure globulaire de la fibronectine au contact du polyNaSS s'accorde avec les résultats obtenus par Kowalczyńska *et al.* [213] qui ont mis en évidence la même globularité de la FN sur des couches minces de polyNaSS.

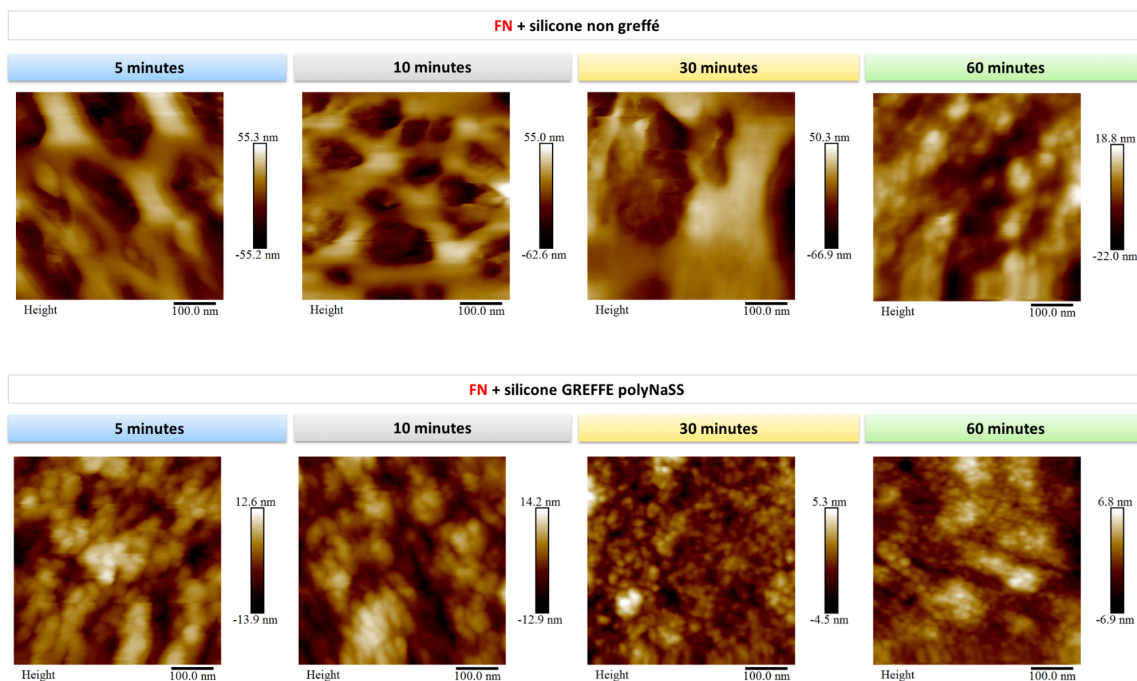


Figure 94: Analyses de l'organisation de la fibronectine à la surface de silicone nu et greffé après adsorption de la fibronectine à différents temps par AFM sur une zone de balayage de 500 x 500 nm

Ce changement structural s'explique par la modification de la mouillabilité de la surface, mais aussi par la présence d'une nouvelle fonction chimique (sulfonate) apportée par le greffage du polyNaSS. Ces résultats soulignent la sensibilité particulière de la FN aux

perturbations extérieures. Son organisation et sa structure qui en dépendent étroitement sont spécifiques pour un environnement donné. Par exemple, Bathawab *et al.* [214] ont montré que la variation de longueur de la chaîne latérale des poly(acrylate d'alkyle) orientait la structure de la FN vers une structure globulaire ou une structure fibrillaire.

Dans le cas des surfaces de silicone, la fibronectine adopte une structure fibrillaire ou globulaire respectivement au contact de surfaces non greffées ou greffées.

3. Influence du changement de conformation de la fibronectine sur l'adhésion cellulaire

Dans cette dernière partie, nous avons étudié la morphologie des fibroblastes sur des surfaces de silicone non greffées et fonctionnalisées en présence de fibronectine. Comme décrit plus tôt, la FN est une protéine clé qui joue un rôle dans l'adhésion des cellules. Nous avons montré par AFM qu'au contact du polyNaSS la FN voit sa conformation modifiée. Ainsi, le but de cette étude ici est de montrer que d'un point de vue cellulaire, le changement de conformation de la FN faisant suite au greffage du polyNaSS n'a pas d'impact sur l'adhésion cellulaire.

Pour cela, la FN à la concentration physiologique a été mise en contact avec le silicone (greffée ou non) avec une passivation par l'albumine (BSA) de la surface au préalable suivie de l'incubation des fibroblastes (Figure 95). Le temps d'incubation a été fixé à 2, 4 et 7 jours.

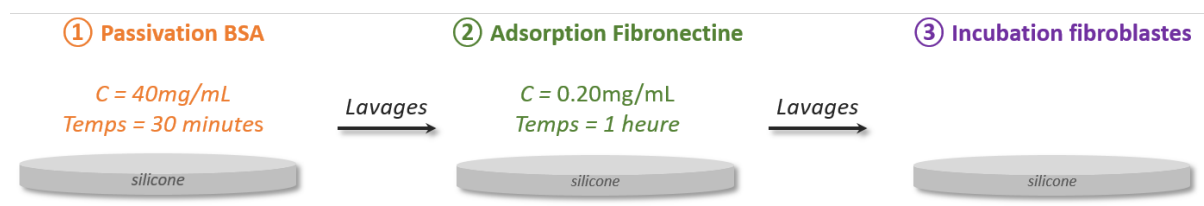


Figure 95: Etapes du protocole expérimental pour l'étude de l'interaction fibronectine/fibroblastes

À chaque point, les surfaces sont analysées au microscope optique (Figure 96). Les résultats après deux jours d'incubation ont montré une différence visible entre les surfaces nues et les surfaces greffées. En effet, on observe des fibroblastes sphériques en majorité sur

les surfaces nues avec la présence de quelques fibroblastes sous leur forme active, c'est-à-dire dont la morphologie est plus allongée. Une tendance inverse est observée en présence de polyNaSS avec une majorité de fibroblastes actifs, c'est-à-dire étirés et allongés.

Après 4 jours, une augmentation de la densité cellulaire est observée toujours avec la différence mise en évidence dès le 2^{ème} jour. Néanmoins après 7 jours, des fibroblastes sphériques sont observés dans les deux conditions. Cela s'explique par la densité cellulaire croissante qui provoque la rétractation des cellules par gêne stérique ou par le fait que les cellules en culture soient en constante phase de mitose, et qu'au 7^{ème} jour ces dernières sont en fin de mitose d'où leurs formes.

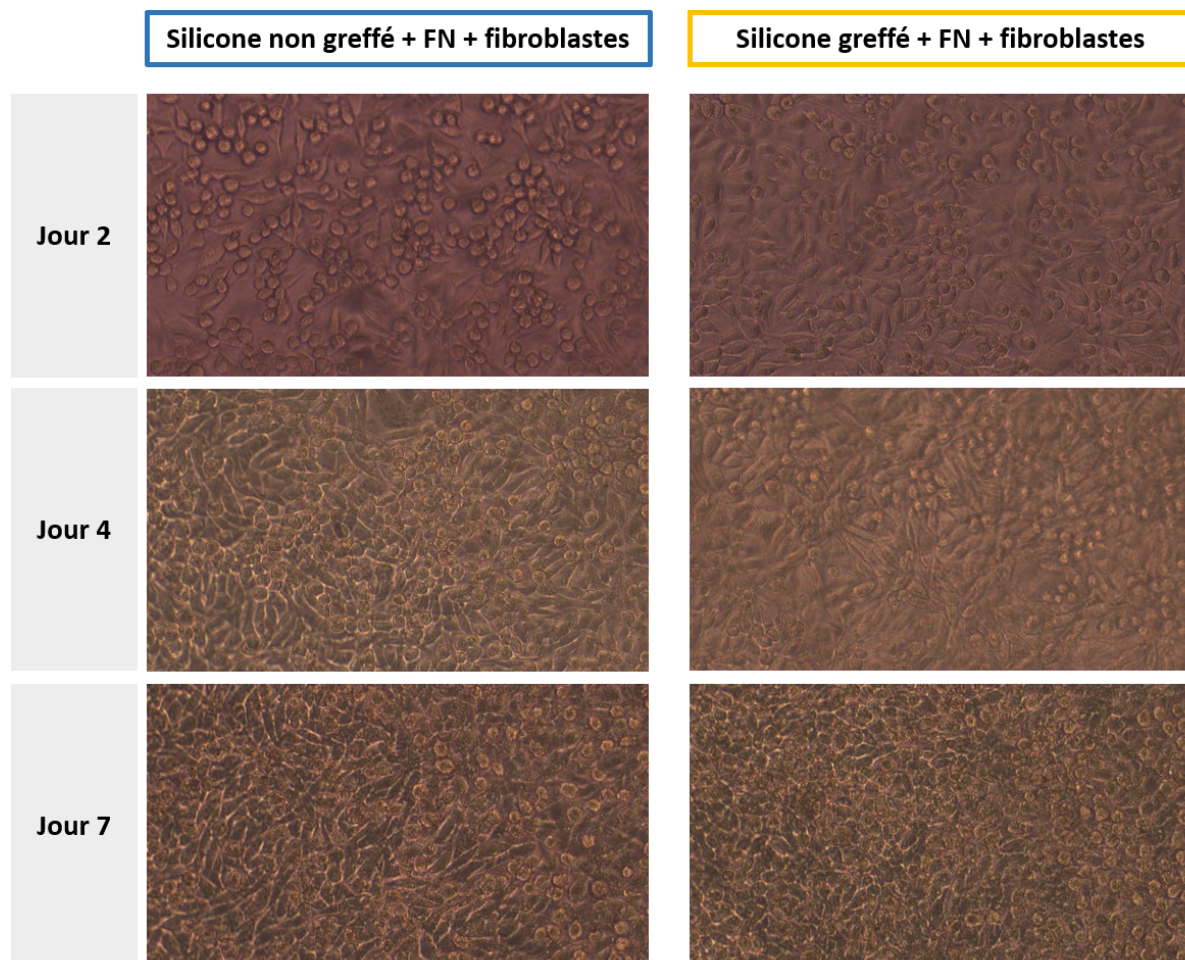


Figure 96: Observations de la morphologie des fibroblastes au contact des surfaces de silicone non greffées et greffées en présence de fibronectine au microscope optique à différents jours d'incubation (2, 4, 7 jours)

Ces résultats montrent que le changement de conformation de la FN n'influe pas l'adhésion des fibroblastes.

Pour conclure, dans cette partie, nous avons étudié l'influence du greffage du poly(styrène sulfonate) de sodium sur l'adsorption individuelle de l'albumine et de la fibronectine.

En ce qui concerne l'albumine, nous avons montré que la fonctionnalisation du polyNaSS sur les surfaces de silicone n'avait pas d'incidence significative sur l'adsorption de celle-ci en surface. La protéine conserve sa structure globulaire. Ceci confirme la haute stabilité de la protéine en dépit des modifications extérieures.

En revanche, nous avons montré que la fibronectine était plus sensible aux variations de conditions et qu'elle interagissait spécifiquement avec le polyNaSS. En effet, au contact du polymère, la fibronectine passe d'une organisation en réseau fibrillaire à une organisation globulaire qui s'intensifie plus le temps d'adsorption est long. Ce changement de structure souligne effectivement l'existence d'interactions spécifiques entre le polyNaSS et la fibronectine.

Felgueiras *et al.* [168] ont mis en évidence par une technique de reconnaissance spécifique d'anticorps des domaines actifs (séquences RGD) de la FN que la présence du polyNaSS améliorait significativement l'exposition de ces domaines conduisant à une réponse cellulaire améliorée. Des résultats similaires ont été observés pour l'expression plus marquée des domaines héparine sur des surfaces de PMMA [180]. Pour expliquer ce phénomène, il a été suggéré un changement de conformation ou d'orientation de la protéine avec le polyNaSS. Dans ce contexte, les résultats AFM de notre étude permettent de trancher plutôt pour un changement de conformation de la FN de fibrilles à globules après greffage sur les surfaces de silicone issues de prothèses mammaires. Aussi, ce changement structural n'impacte pas l'adhésion des fibroblastes en surface.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 5 : Optimisation des procédés en accord avec les expériences ultérieures

L'optimisation est un principe qui vise à améliorer un procédé expérimental déjà existant dans le but de maximiser les rendements et de réduire les coûts (temps, énergie, matières premières) tout en conservant la même qualité de produit final. En chimie, l'optimisation inclut aussi tout ce qui concerne l'extrapolation (scale up) d'un protocole à plus grande échelle. En d'autres termes, il convient d'adapter les conditions expérimentales pour reproduire les mêmes résultats qu'au niveau du laboratoire.

Dans la cadre de ces travaux de thèse, il s'agit dans un premier temps d'optimiser le protocole de greffage du polyNaSS sur le silicone. Jusqu'à présent, les conditions de fonctionnalisation ont été mises en place pour une seule surface unilatérale de 1 cm² par expérience. Ces conditions s'avèrent limitantes pour certaines études qui requièrent un grand nombre d'échantillons. Ajouté à cela, le projet comporte un volet d'étude bactériologique (Thèse du Dr Moris) qui vise à étudier l'activité bactérienne au contact des surfaces de silicone bioactivés. Ces expériences demandent quant à eux un greffage non plus unilatéral, mais bilatéral. S'ensuit, une étude microbiologique *in vivo* (modèle animal) qui nécessite de pouvoir greffer des mini-implants entiers. Pour ces raisons, il sera alors indispensable d'optimiser la technique de greffage pour chacun de ces cas particuliers.

Afin d'aller plus loin dans l'optimisation du procédé, nous avons acquis une lampe UV à source LED qui offre une fenêtre de diffusion des rayonnements UV plus conséquente que le faisceau de la lampe Mercure utilisée jusqu'à présent. De ce fait, on s'attend à pouvoir greffer des surfaces plus grandes et ainsi, plus d'échantillons greffés par expérience.

La partie 1 du chapitre III a été dédiée au développement d'une technique facile à mettre en œuvre pour fonctionnaliser les surfaces de silicone issues d'enveloppes de prothèses mammaires avec le poly(styrène sulfonate) de sodium. La méthode développée est simple et repose sur l'utilisation des irradiations UV à 365 nm [127]. En premier, elle permet la création de groupements réactifs puis l'amorçage de la polymérisation radicalaire du styrène sulfonate de sodium à partir de la surface. Malgré la facilité de la méthode d'un point de vue pratique, la faible réactivité du silicone demande que celui-ci soit bien centré dans le faisceau UV ($\varnothing 1,3$ cm) qui arrive. De ce fait, un seul et unique échantillon de 1 cm^2 ne peut être greffé à la fois.

La faible réactivité et stabilité chimique du silicone sont associées à sa structure particulière. Le squelette siloxane et surtout la double présence des groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) réagissent difficilement en dépit des changements extérieurs sauf dans des conditions extrêmes [215]. C'est pourquoi l'irradiation directe du silicone sous UV à 160 ou 220 mW/cm^2 a été montrée efficace pour « perturber » le matériau aboutissant au greffage covalent du polymère bioactif en surface. Cependant, la faible ouverture du faisceau UV de lampe Mercure est une contrainte qui limite la surface de greffage. De plus, cette technique ne permet le greffage que d'un seul côté de l'échantillon qui s'avère être un frein pour certaines expériences où un greffage double-face est requis pour une interprétation plus judicieuse des résultats (évaluation de l'adhésion bactérienne).

Dans la littérature, des travaux consistent à réticuler des polymères adhésifs avec la technologie des UV [216]. Pour cela, les chercheurs utilisent des lampes UV à source LED qui offrent une plus grande surface de diffusion des rayonnements (jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres). Dans le cas du greffage du polyNaSS sur le silicone, un tel système pourrait permettre de contourner la contrainte de l'unique échantillon par expérience, mais aussi d'ouvrir à de nouvelles perspectives d'optimisation .

1. Vers des surfaces de fonctionnalisation plus grandes

Le premier objectif est d'agrandir la surface de fonctionnalisation afin d'obtenir plusieurs échantillons greffés ($n > 1$) par expérience. Dans ce but, et en s'inspirant des techniques employées dans la littérature, nous avons acquis le même modèle de lampe UV qui repose sur l'utilisation d'une source LED.

1.1. Comparaison des lampes UV-Mercure et UV LED

La lampe LED (Omniculture A475) délivre une puissance maximale de sortie équivalente à 8 W/cm^2 . Ce système de lampe est doté d'ampoules LED disposées sur toute la surface de la fenêtre optique qui offre une illumination à grande distance et uniforme. Sur le long terme, la lampe LED est moins sujette à une perte de puissance contrairement à la lampe Mercure. De plus, elle est équipée d'un contrôleur extérieur qui permet de moduler la puissance en sortie de lampe ce qui permettra alors d'adapter les distances de travail (distance lampe/échantillon) (Figure 97). Ce contrôle offre alors une large flexibilité de réglage comparé à la lampe Mercure de puissance fixe avec une irradiance maximale détectée à 300 mW/cm^2 .

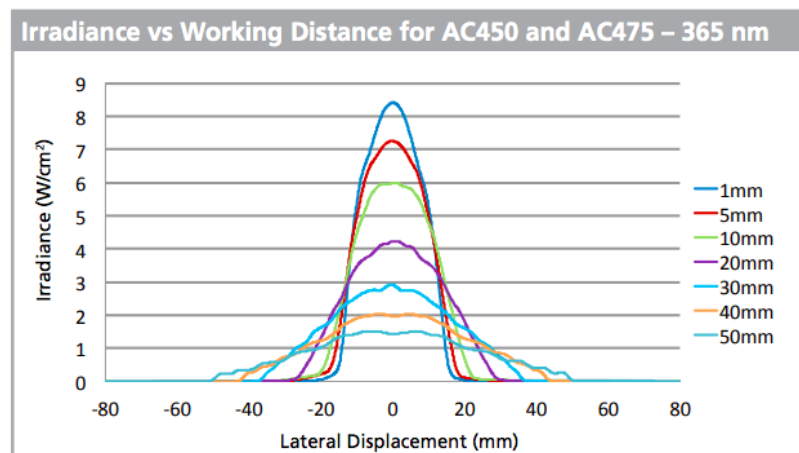


Figure 97: Irradiance en fonction de la distance de travail selon la puissance maximale de sortie [217]

Enfin, d'un point de vue écologique, la lampe LED ne dégage pas d'ozone et ne surchauffe pas pendant son utilisation grâce à son système de ventilation interne.

1.2. Adaptation des paramètres de greffages

Cette première étape consiste à trouver les réglages adéquats pour fonctionnaliser les surfaces de silicone avec ce nouveau système UV. En effet, la source étant différente, la simple transposition des conditions expérimentales ne fonctionne pas.

Avant de poursuivre, le détail des conditions de greffage développé et optimisé sur les surfaces de silicone \varnothing 1cm dans la partie 1 est rappelé dans le Tableau 9.

Tableau 9: Conditions expérimentales de greffage développées sur lampe UV Mercure sur des surfaces de silicone

▪ Provenance de l'échantillon	- silicone lisse (enveloppe de prothèse)
▪ Taille de l'échantillon	- Carrée de 1 x 1 cm ou - disque de \varnothing 1 cm
▪ Conditions d'activation (création de groupements hydroxyles)	- Milieu aqueux (H ₂ O _d) - Irradiation UV: 1 h à 160 mW/cm ²
▪ Conditions de polymérisation (greffage NaSS à partir de la surface activée)	- Milieu aqueux (H ₂ O _d) - Irradiation UV: 1 h à 160 ou 220 mW/cm ² ([NaSS] = 0,7 M ou 0,35 M)

La régulation de la puissance en sortie de la lampe LED se fait en réglant un pourcentage de la puissance maximale de 8 W/cm² (P). Par exemple, en réglant la puissance à 50 (P50%), la puissance de sortie est de 4 W/cm². Réduit de moitié, les distances de travail sont aussi diminuées pour une même irradiance. De cette manière, une irradiance de 160 mW/cm² peut aussi bien être obtenue à 6 cm comme à 15 cm de la lampe en fonction de la puissance P fixée.

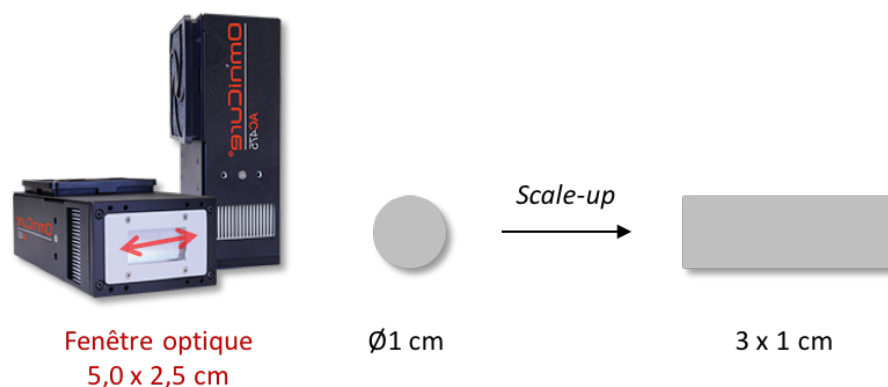


Figure 98: Lampe UV LED (Omnicure A475) et objectif du scale-up en taille

La fenêtre optique de l’Omnicure A475 s’illumine sur une surface de 5 cm de long et 2,3 cm de large, idéale pour augmenter les dimensions des surfaces de silicone à fonctionnaliser.

Expérimentalement, notre objectif est de greffer le polyNaSS sur une surface de silicone rectangulaire de 3 x 1 cm à partir de laquelle nous pourrions ensuite découper trois échantillons greffés de 1 cm² (Figure 98). Le choix de cette dimension a été fixé selon les autres paramètres techniques tels que la taille du ballon (100 mL) et le volume de solution (60 mL) que nous voulions volontairement garder inchangés pour n’étudier que l’influence d’un seul paramètre à la fois qui est la taille de l’échantillon et évidemment le changement de lampe.

1.2.1. Activation des surfaces sous UV LED

L’activation est une méthode incontournable dans le processus du greffage covalent du polyNaSS sur le silicone. C’est pourquoi il convient de commencer par trouver les conditions de puissance et de distance d’activation sous UV LED à l’instar de l’activation sous la lampe Mercure pour parvenir à la création de fonctions réactives.

Pour cela, de nombreux essais ont été réalisés par l’exposition de la surface à 160 mW/cm² en faisant varier le temps d’exposition avec une puissance fixe (1h, 2h, 4h), l’irradiance au-delà de 160 mW/cm² et également la puissance P séparément, mais sans succès (caractérisation par FTIR).

Tout comme la lampe Mercure, un réglage particulier semble nécessaire pour parvenir à l'activation. Dans l'élaboration de la technique de greffage sous la lampe Mercure, nous avons mis en évidence dans la partie 1 l'importance de la concentration du faisceau sur l'échantillon pour atteindre une qualité de greffage optimale. En effet, selon la distance qui sépare la lampe de l'échantillon, le faisceau de diffusion peut être plus ou moins diffus bien que l'irradiance détectée soit la même. Dans cette optique, nous avons arbitrairement placé le ballon à 6 cm de la lampe LED puis avec le contrôleur nous avons fait varier la puissance graduellement à partir de P20% (puissance minimale de l'appareil) puis observer à l'œil nu l'évolution de la forme du faisceau à la surface. Lorsque la puissance augmente, le faisceau se précise et est de moins en moins diffus. Finalement, le faisceau semble optimal à P38%. Une fois la puissance réglée nous avons simplement ajusté de quelques millimètres la distance pour obtenir une irradiance de 160 mW/cm^2 .

Selon ces conditions, nous avons caractérisé une surface de silicone après une heure d'exposition aux UV-LED. Le spectre infrarouge de la surface après activation (Figure 99) montre finalement l'apparition de la bande caractéristique des fonctions hydroxyles (-OH) à 3677 cm^{-1} qui témoigne du succès de l'activation avec une lampe réglée à 38 %.

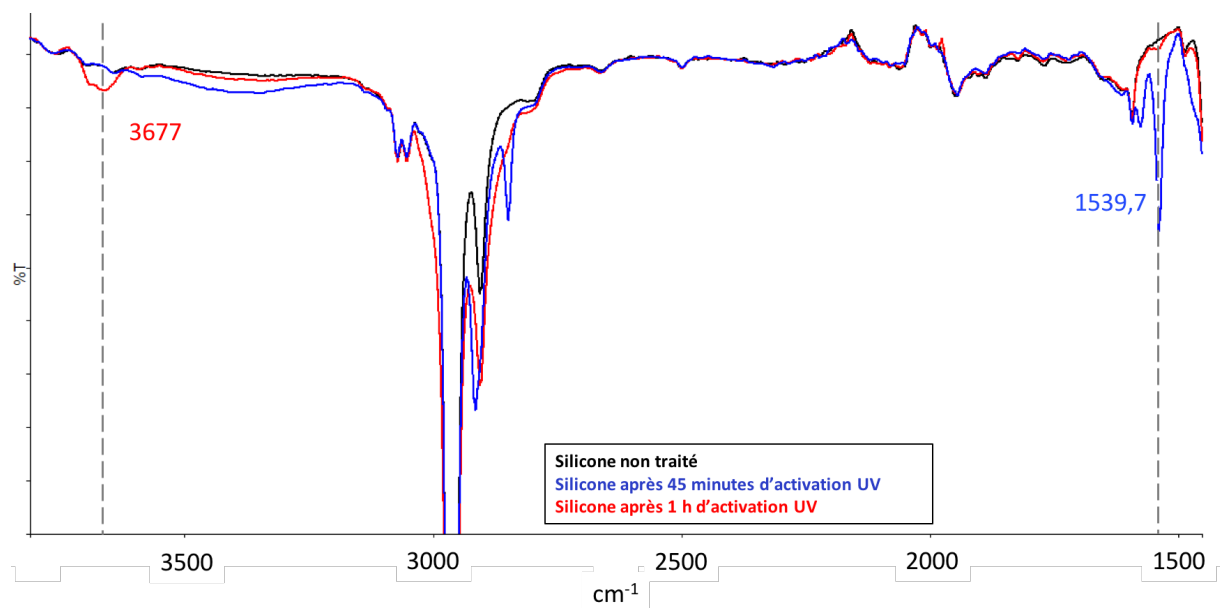


Figure 99: Spectres infrarouges des surfaces de silicone avant et après activation sous UV-LED

Rapidement, nous avons testé un temps d'activation légèrement plus court dans les mêmes conditions pour voir s'il était possible de réduire la durée. Mais comme illustré dans la Figure 99 après 45 minutes aucun signe d'activation de la surface n'est encore visible.

L'activation sous UV-LED se fait alors en exposant la surface pendant **1 heure à 160 mW/cm²** avec une **puissance de lampe de 38 %**.

1.2.2. Greffage du polyNaSS après activation à P38% des surfaces de silicone sous UV LED

L'étape suivante consiste à tester l'impact de cette activation sur le greffage du polyNaSS à la surface du silicone. Pour ce faire, une fois l'échantillon (3 x 1 cm) activé, celui-ci est rapidement transféré dans le ballon qui contient la solution de monomère préalablement dégazé à l'argon. Ce dernier est ensuite placé sous irradiations UV dans la même condition de puissance (P38%) à 160 ou 220 mW/cm² pendant une heure respectivement pour des concentrations en monomère de 0,7 M et 0,35 M.

Les résultats d'angle de contact montrent une diminution significative de l'angle moyen qui passe de 106 ° sur une surface non greffée à 43 ° et 58 ° respectivement dans les conditions de greffage avec une concentration en monomère de 0,7 M et 0,35 M (Figure 100). Cette diminution traduit un gain d'hydrophilie qui témoigne de la présence du polyNaSS greffé. Comparativement, ces valeurs concordent avec les résultats trouvés avec la source Mercure sur des échantillons de silicone uniques de 1 cm² [127]. Néanmoins, on observe que le greffage à 0,7 M offre une meilleure mouillabilité comparée au greffage à 0,35 M avec une différence de 15 ° en moyenne. Cet écart peut s'expliquer par une densité de greffage plus élevée qui est à confirmer par le dosage des sulfonates par la méthode colorimétrique au bleu de toluidine.

Par ailleurs, on note des écarts-types très faibles sur les échantillons greffés ce qui signifie que ces conditions ont permis un greffage homogène sur toute la surface de l'échantillon (3 x 1 cm).

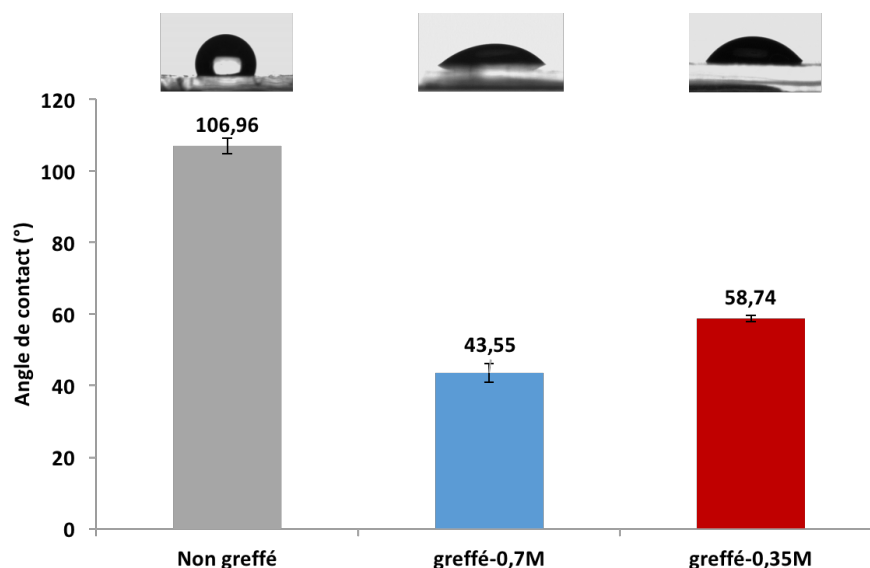


Figure 100: Mesure des angles de contact avant et après greffage avec une activation et un greffage à P38% sous lampe LED à différentes concentrations de monomères

Les taux de greffage ont été évalués et les résultats confirment le gain d'hydrophilie mis en évidence précédemment (Figure 101). En effet, on observe des taux de greffage très proches entre les deux conditions et significativement supérieurs au témoin non greffé. Cela permet de confirmer le succès du greffage sur des surfaces de silicone plus grandes avec la lampe LED dans des conditions expérimentales finalement très similaires.

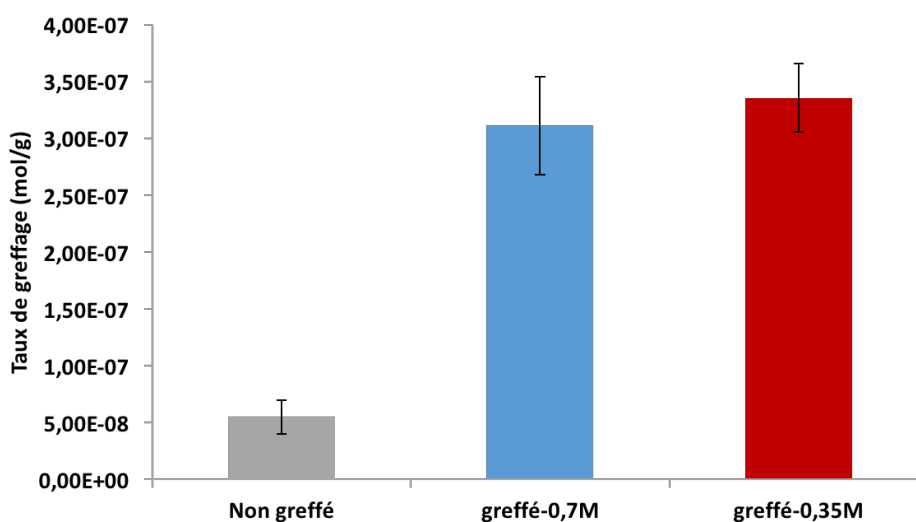


Figure 101: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avant et avec une activation et un greffage à P38% sous lampe UV-LED à différentes concentrations en monomère

Dans la partie 2, nous avons mis en évidence l'organisation particulière du polyNaSS en surface du silicone sous la forme de points qui s'étendent à partir des « pics » qui constituent la nanotexturation de la surface. Dans les mêmes conditions d'analyse à l'aide du microscope à force atomique, l'organisation du polyNaSS sur les échantillons greffés à P38% est comparable à celle observée après le greffage sur la lampe Mercure avec éventuellement une organisation plus en masse à certains endroits (Figure 102). La présence du polymère bioactif en surface augmente la rugosité de surface moyenne à $19,28 \text{ nm} \pm 0,29$.

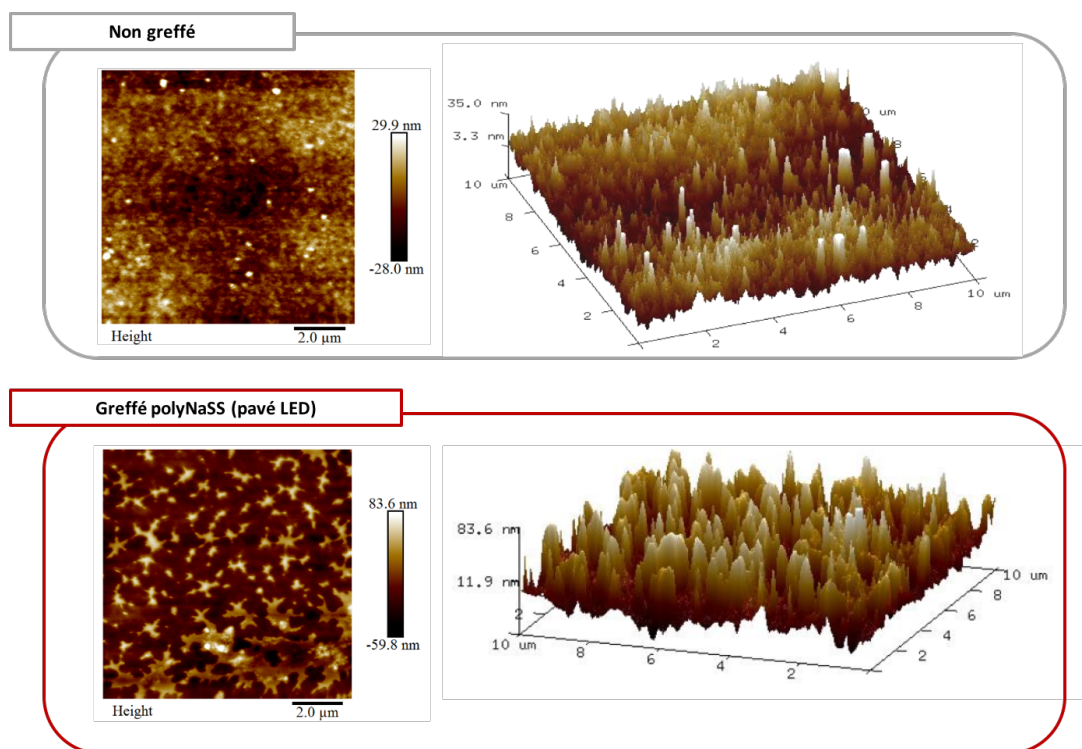


Figure 102: Captures AFM des surfaces de silicone avant et après greffage à P38%

Pour conclure, nous avons trouvé les conditions idéales qui ont permis de fonctionnaliser efficacement de plus grandes surfaces de silicone grâce à la lampe UV-LED comme en témoignent les résultats précédents. Le paramètre clé qui a permis le succès du greffage sous UV-LED est le paramètre de puissance optimisé à 38% et la grande fenêtre optique qu'offre ce type de lampe. Cette méthode de greffage constitue alors un gain de temps considérable dans l'élaboration des surfaces greffées destinées à des analyses ultérieures.

En parallèle de la précédente étude, nous avons développé une technique qui a permis de fonctionnaliser les deux faces de l'échantillon simultanément. En effet, jusqu'à présent, seule la face exposée (face externe) était greffée selon le protocole UV. Cependant, pour répondre à des besoins techniques dans le cadre des études *in vitro*, il paraissait important de travailler sur cet aspect.

2. Du greffage unilatéral à double-face

Le greffage double face est un challenge étant donné les nombreuses contraintes techniques imposées par le matériau en lui-même (tige de maintien, centrage du faisceau, échantillon unique). Une des premières idées consiste à greffer l'échantillon en deux fois avec les mêmes conditions expérimentales. En d'autres termes, il s'agirait de dépenser deux fois plus de temps et deux fois plus de matière, ce qui s'avérerait trop coûteux et peu pratique.

Dans l'idéal, il suffirait de faire tourner l'échantillon tout au long de l'expérience sur le faisceau UV ce qui permettrait alors d'exposer les deux faces quasiment en même temps.

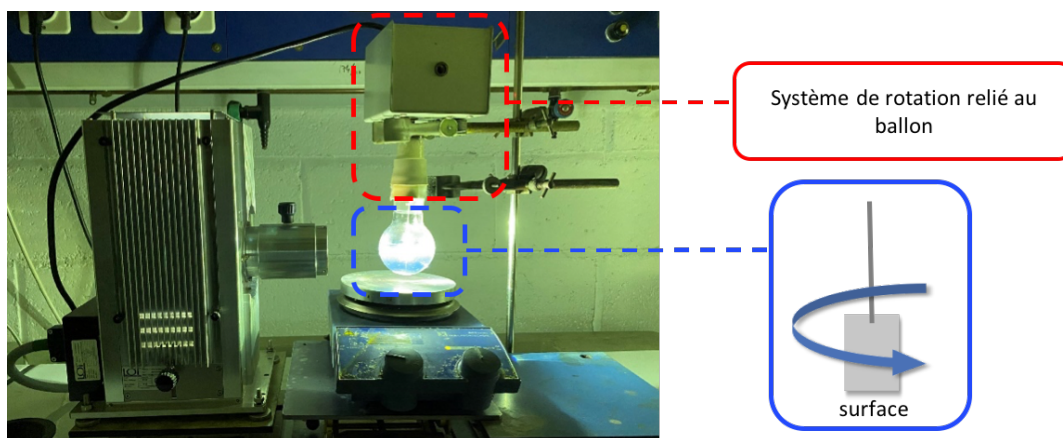


Figure 103: Montage du système rotatif pour le greffage double face du silicone

Pour ce faire, nous avons mis en place un système de rotation automatique qui permet de faire tourner le ballon pendant l'expérience (Figure 103). Le système repose sur l'utilisation d'un tourne-tube que l'on a retourné vers le bas à l'extrémité duquel nous avons fixé un septum par lequel nous fixons ensuite le ballon. L'échantillon est toujours suspendu au bout d'une tige en téflon. Lorsque le système rotatif est en route, il faut simplement s'assurer que

l'échantillon soit bien centré sur le faisceau UV auquel cas, le greffage ne sera pas de bonne qualité.

Pour la suite, nous distinguerons les faces selon la face extérieure et la face intérieure qui correspondent respectivement au côté de l'enveloppe en contact avec le milieu biologique et au côté en contact avec le gel de silicone. Nous rappelons que les surfaces non greffées sont hydrophobes, et ce de façon plus marquante du côté intérieur à cause de la légère rugosité (cf. Chapitre III, partie I).

Les mesures des angles de contact post greffage montrent une diminution significative des angles moyens sur les deux faces ($\approx 45^\circ$), et cela de manière équivalente (Figure 104). De plus, le gain d'hydrophilie qui témoigne de la présence effective du polyNaSS en surface est homogène sur les deux faces et aux deux concentrations.

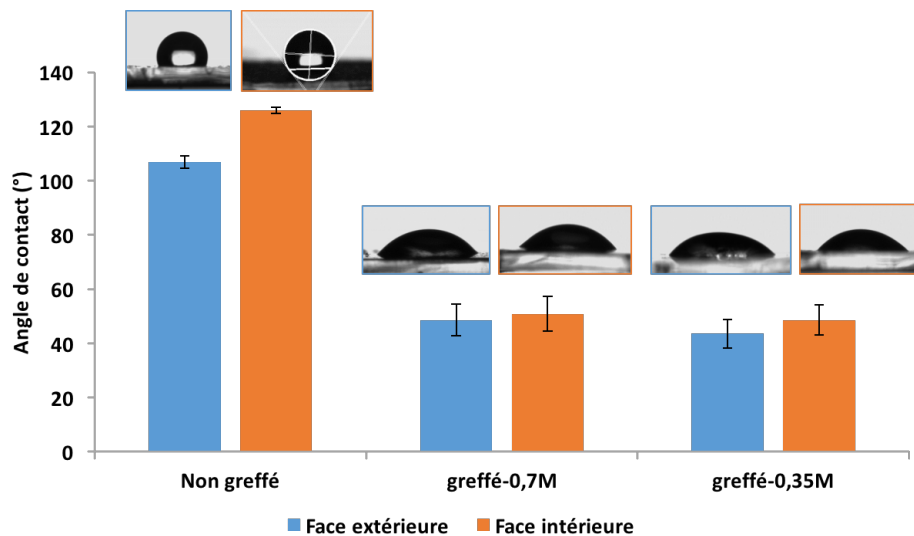


Figure 104: Mesure de l'angle de contact des faces extérieures et intérieures après greffage par rotation

En ce qui concerne le dosage du polyNaSS en surface, les taux de greffage sont significativement plus élevés comparé à un silicone non greffé pour les deux concentrations (Figure 105). Cependant, à 0,7 M, il semblerait que le greffage soit un peu moins homogène d'un échantillon à l'autre comme en témoigne l'écart type un plus grand.

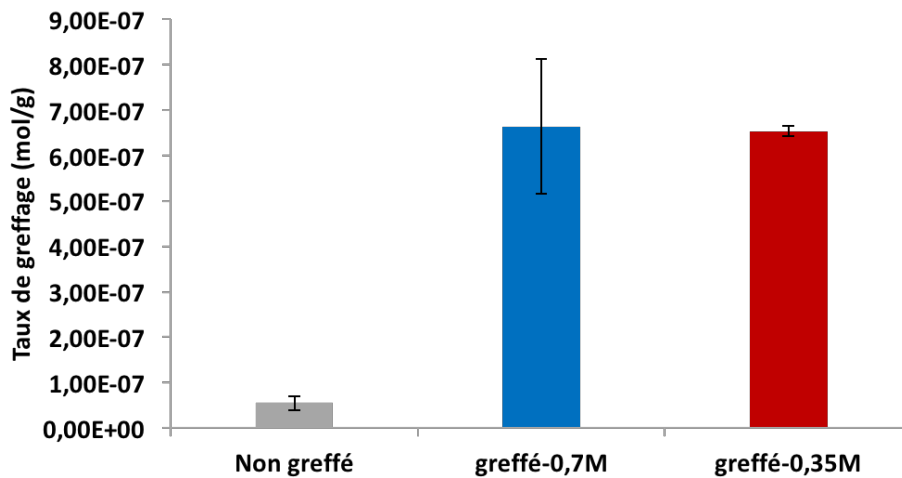


Figure 105: Dosage colorimétrique des surfaces de silicone avec une activation et un greffage à P38% sous lampe LED à différentes concentrations de monomère

Au final, ces résultats confirment l'efficacité de ce système rotatif pour le greffage bilatéral des surfaces de silicone avec exactement les mêmes conditions expérimentales que le greffage unilatéral développées dans la partie 1. La rotation a permis un greffage homogène sur les deux faces avec des résultats concordants avec ceux obtenus dans le cas d'un greffage à l'état statique où une concentration en monomère de 0,35 M était optimale au regard de la concentration plus élevée.

Par ailleurs, ce système de greffage bilatéral est une première étape vers l'extrapolation du procédé vers l'application aux mini-implants destinée à l'implantation *in vivo*.

3. La fonctionnalisation de mini-implants en silicone

Pour l'étude microbiologique *in vivo*, il sera indispensable de fonctionnaliser des prothèses entières avec un dispositif adapté au laboratoire. Ces prothèses sont en réalité des mini-implants qui ont été fabriqués et dimensionnés spécifiquement pour l'implantation chez l'animal. Dans la rubrique qui suit, nous nous intéresserons au greffage du polyNaSS sur deux types de mini-implants (MI). D'une part des implants de la marque MOTIVA de surface micro-texturé et d'autre part des implants lisses fournis par SEBBIN dont les caractéristiques sont identiques aux enveloppes de silicone lisse étudiées jusqu'à présent.

- **Les implants MOTIVA**

Les implants MOTIVA fournis sont nanotexturés avec une texture qui se manifeste par des irrégularités de surface homogène. Ces implants, semblables à des demi-sphères, ont un diamètre moyen de 1 cm (Figure 106), ce qui est de bon augure pour un greffage sous la lampe Mercure dont le greffage en rotation a été optimisé pour des surfaces de mêmes dimensions.

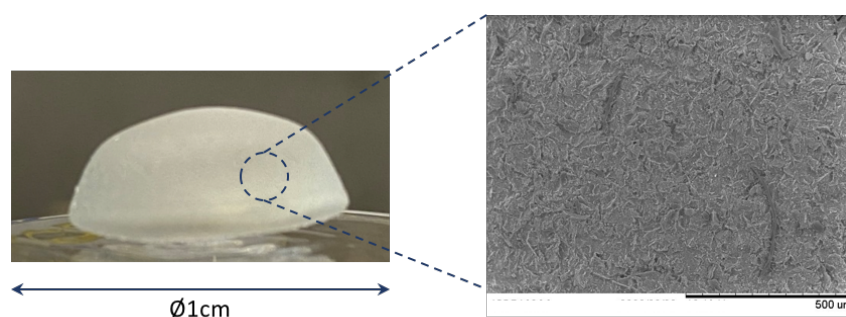


Figure 106: : Modèle de mini implant MOTIVA et sa texturation de surface vue au microscope électronique à balayage

L'analyse de la composition élémentaire (Tableau 10) a tout de même été réalisée pour s'assurer de la composition des surfaces étant donnée le changement de fabricant. Une composition différente pourrait influencer le greffage du polyNaSS en surface.

Tableau 10: Analyse élémentaire de la composition de la surface des mini-implants MOTIVA (%atomique)

	Carbone (%at.)	Oxygène (%at.)	Silicium (%at.)
MI-Motiva	53,71 ± 4,84	29,64 ± 2,38	16,31 ± 2,53

Les taux de carbone, d'oxygène et de silicium sont comparables aux enveloppes d'implants sur lesquelles nous avons travaillé jusqu'à présent. La caractérisation de ces mini-implants se poursuit avec l'analyse de la structure chimique par spectroscopie infrarouge (Figure 107). En effet, dans la formule de fabrication, il est possible que les industriels ajoutent des molécules (additifs/perméabilisant) en plus qui peuvent dans notre cas, interférer sur la qualité de greffage par exemple. En comparaison avec un spectre de silicone nu, on distingue la présence particulière d'une bande hydroxyle (-OH) à 3667 cm^{-1} qui souligne l'existence de fonctions

hydroxyles dans la formulation de l'enveloppe. Par rapport à la structure d'un silicone - PDMS traditionnel, les implants semblent présenter quelques fonctions -OH à la place des méthyles portés par les atomes de silicium. Cependant, la bande à 2953 cm^{-1} montre que les groupements méthyles sont toujours bien présents. Globalement, nous sommes sur une même composition de matériau.

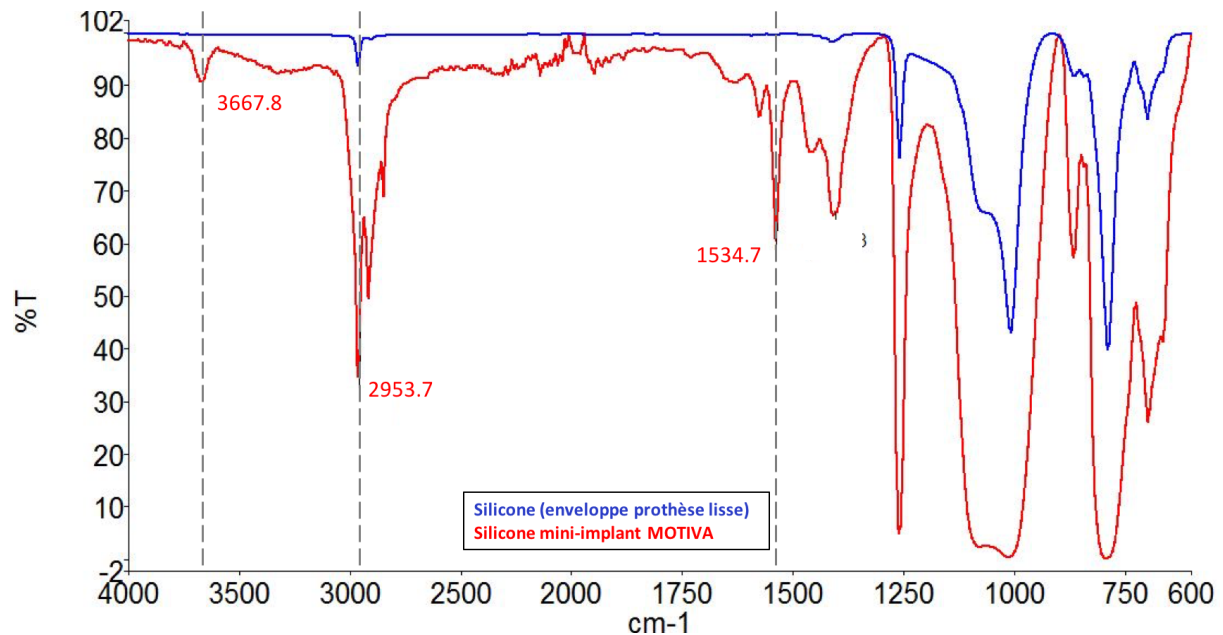


Figure 107: Comparaison des spectres infrarouges de la surface des mini implants MOTIVA et de la surface de silicone issue d'une enveloppe de prothèse SEBBIN

Le greffage des MI demande une légère ré-adaptation technique du montage mis en place précédemment avec le système de rotation. Dans cette configuration, l'échantillon était fixé au bout d'une tige. Dans ce cas, le MI ne peut être percé par la tige pour être maintenu, car cela risque de conduire à la fuite du gel à l'intérieur.

Il convient alors de trouver une méthode pour maintenir en place le MI en solution pour qu'il soit centré sur le faisceau UV et tourner tout au long de l'expérience. Pour cela, deux techniques ont été mises en œuvre pour le greffage des mini-implants (Figure 108) :

- Suspension par une tige (système réadapté) avec une extrémité repliée servant de support pour poser l'implant en équilibre
- Suspension sans tige par simple création d'un vortex à l'aide du barreau aimanté et de l'agitateur magnétique

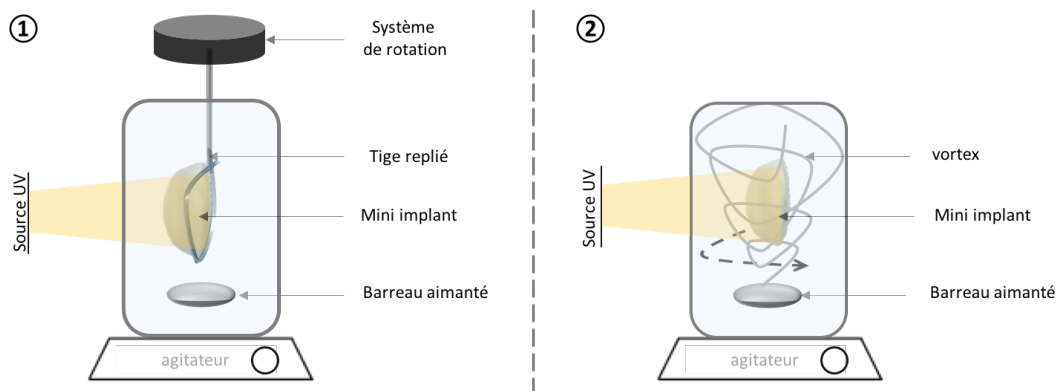


Figure 108: Schéma du (1) montage du système rotatif avec suspension de l'implant par une tige et du (2) système de maintien par création d'un vortex

Ici, les paramètres de greffage sous UV (temps d'activation, polymérisation, concentration en monomère) restent inchangés, les paramètres techniques (maintien de l'échantillon) sont les seuls qui changent.

Comme illustré dans la Figure 109, un changement de mouillabilité est observé à la surface des MI après fonctionnalisation. Cette diminution de l'angle de contact moyen prouve que le greffage du polyNaSS a bien eu lieu avec ces deux approches. En effet, la surface passe d'un caractère fortement hydrophobe avec un angle moyen supérieur à 120° du fait la texturation à un caractère hydrophile avec un écart d'environ 67° et 47° respectivement avec la technique du vortex et le système de tige.

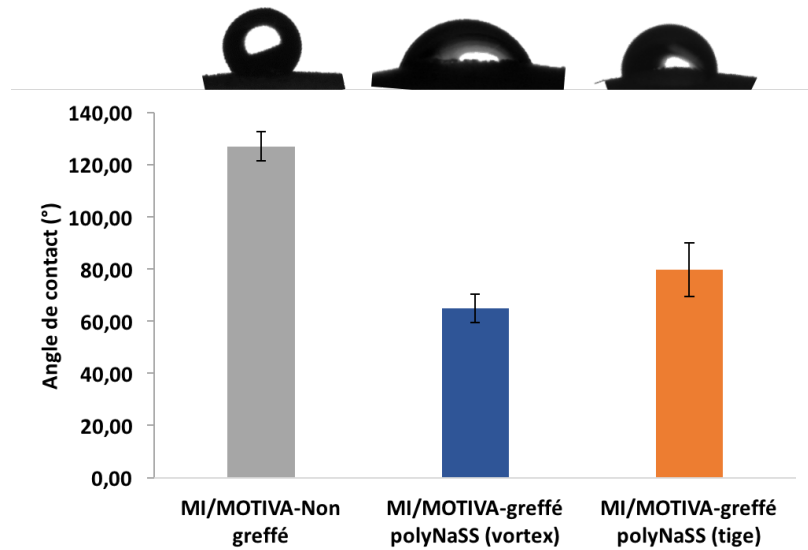


Figure 109: Evaluation de la mouillabilité des surfaces greffées selon deux techniques de greffage

D'un point de vue quantitatif, ces premiers essais de greffage montrent une différence du taux de greffage entre les implants greffés et non greffés (Figure 110). La technique du vortex donne un taux plus élevé que la technique de la tige ce qui conforterait les observations décrites avec les angles de contact. Néanmoins, l'étude est à compléter pour confirmer ou non la différence significative entre des implants greffés ou non greffés.

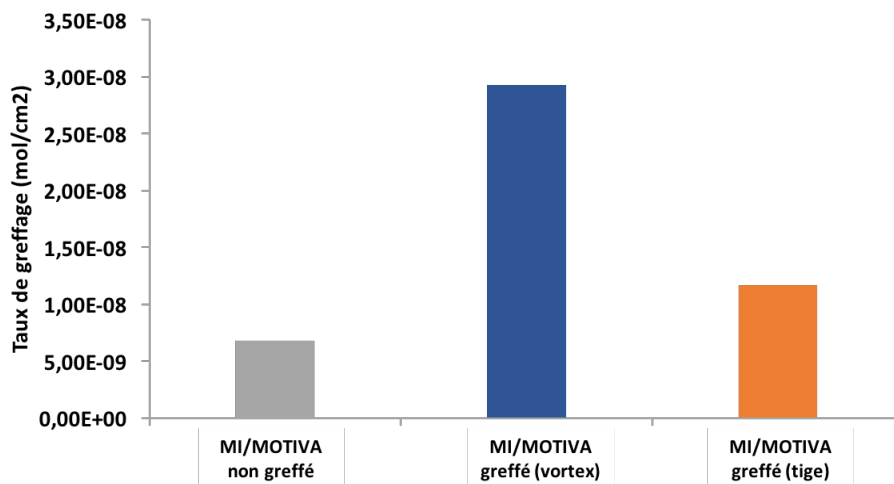


Figure 110: Evaluation du degré de greffage des surfaces greffées selon deux techniques de greffage

Ces résultats ne sont que préliminaires mais sont encourageants pour la suite des expériences.

- Les mini-implants SEBBIN

Les mini-implants SEBBIN, à l'inverse des implants MOTIVA, sont lisses. Les taux de greffage sont significativement plus élevés par rapport au témoin non greffé (Figure 111). Cependant, à cause des contraintes de dimensions (implants trop larges), il faudrait davantage optimiser le protocole.

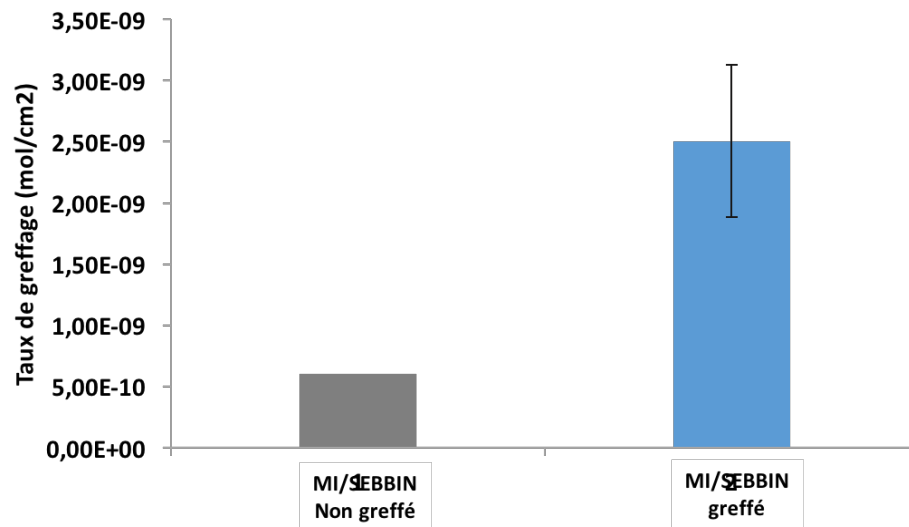


Figure 111: Evaluation du degré de greffage des mini-implants SEBBIN

Les résultats préliminaires sont encourageants et doivent être complétés. Des études sont en cours de réalisation.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'optimisation du protocole de greffage du polyNaSS sur les surfaces de silicone. Nous avons en effet amélioré le protocole de différentes façons pour répondre à des demandes spécifiques.

Dans un premier temps, nous avons agrandi avec succès la surface de greffage avec l'utilisation de la lampe UV-LED. Le greffage des bandes de silicone de 3 x 1 cm a permis de multiplier par trois le nombre d'échantillons greffés par expérience avec une qualité de greffage comparable au greffage optimisé sur une surface de 1 cm² sous la lampe Mercure.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au développement d'une méthode qui nous a permis de greffer les deux faces d'une surface de silicone en une seule fois. Pour cela, un système de rotation a été mis en place et a permis d'exposer les deux faces simultanément au faisceau UV. Les résultats obtenus sont similaires au greffage simple face, ce qui prouve l'efficacité de ce dispositif.

Par la suite, en s'inspirant de cette technique nous avons pu greffer des mini implants et les résultats préliminaires sont encourageants pour la suite de l'étude.

Finalement, l'optimisation est un concept qui englobe une multitude de variables qu'on pourrait pousser encore plus loin en faisant des cinétiques d'activation ou de greffages (temps, concentration en monomère).

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

Pour améliorer la bio intégration des implants mammaires en silicone afin d'éviter l'apparition des complications à long terme, nous nous sommes appuyés sur l'expertise du LBPS qui utilise un polymère bioactif dont les propriétés permettent de pallier le problème de la biocompatibilité d'un matériau. Pour cela des modifications chimiques ou physiques de la surface peuvent être réalisées. Dans ce contexte, l'idée du projet est de fonctionnaliser le silicone par un polymère bioactif, le poly(styrène sulfonate) de sodium, afin de lui conférer de nouvelles propriétés biologiques et antibactériennes.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de développer une méthode simple pour greffer de polymères bioactifs de manière covalente sur des surfaces de silicone lisses directement issues de l'enveloppe de prothèses mammaires. Nous avons montré que l'activation des surfaces de silicone se faisait efficacement sous irradiations UV au bout d'une heure en observant l'apparition de groupements hydroxyles à la surface du matériau. Ces fonctions réactives ont ensuite servi de support à la croissance des chaînes de polymère par un mécanisme de « grafting from » toujours sous irradiations UV. À l'aide de différentes techniques de caractérisation de surface (FTIR ATR, XPS, dosage colorimétrique, mesure d'angle de contact), nous avons mis en évidence la présence covalente du polyNaSS à la surface avec la technologie des UV. Une fois le protocole approuvé, les paramètres expérimentaux ont été optimisés afin d'atteindre le meilleur taux de greffage et la meilleure homogénéité de surface.

Finalement, les conditions de greffage optimales sont les suivantes : taille de l'échantillon de 1 cm^2 , temps d'activation sous irradiations UV pendant une heure à 160 mW/cm^2 , temps de greffage sous irradiations UV pendant une heure à 220 mW/cm^2 avec une concentration en monomère de 0,35 M.

La suite de l'étude a porté sur l'évaluation de la réponse cellulaire (fibroblastes L929) et mécanique du silicone avant et après fonctionnalisation. Nous avons montré une amélioration significative de la réponse cellulaire en présence du polyNaSS en comparaison avec des surfaces de silicone nues (110 % versus 80 %). L'amélioration du taux de survie a été confirmée par les tests de morphologie qui ont montré une variation de la morphologie de cellules en fonction entre une surface de silicone modifiée ou non. Des fibroblastes étirés et

fusiformes ont été observés sur les surfaces greffées. Sur les surfaces nues, ces derniers sont sphériques et ne s'étalent pas à la surface. Cela suggère que la présence du polyNaSS confère aux cellules un support propice à leur adhésion et développement. D'un autre côté, les tests mécaniques ont montré que l'emploi des irradiations UV n'a pas d'impacts significatifs sur les propriétés mécaniques des surfaces quel que soit le traitement comme en témoigne les valeurs des modules d'élasticité similaires.

La réaction à un corps étranger qui intervient à la suite de l'introduction d'un quelconque dispositif médical se manifeste dans les tous premiers instants par l'arrivée des protéines plasmatiques. Chacune de ces protéines ont un rôle dans la régulation de la réponse biologique et aussi bactériologique. C'est pourquoi dans ces travaux de thèse il a semblé indispensable d'étudier le comportement en surface de ces dernières afin d'en comprendre les réponses qui en découlent. L'étude au microscope à force atomique n'a montré aucun changement de conformation ou d'orientation de l'albumine selon qu'elle ait été adsorbée sur une surface modifiée ou non modifiée. En revanche, les résultats qui concernent la fibronectine ont été plus marquants. En effet, la conformation de la FN est dépendante des propriétés physicochimiques de la surface sur laquelle elle s'adsorbe. Sur des surfaces de silicone nues, la FN adopte une conformation fibrillaire, en réseau de nano fibrilles, tandis que sur du silicone greffé, sa conformation devient globulaire.

Il a été largement démontré dans les travaux ultérieurs du laboratoire LBPS que la FN intervenait dans le processus antibactérien du polyNaSS du fait d'un changement d'orientation ou de conformation. De ce fait, la protéine rend moins accessible ses sites de reconnaissance aux bactéries ce qui réduit le risque de formation d'un biofilm bactérien.

Une fois les conditions de greffage mis en place et l'évaluation de la réponse cellulaire effectuée, nous avons étudié l'impact de la rugosité de surface sur la technique de greffage développée. Les résultats ont montré que la rugosité n'avait aucun impact significatif sur le greffage, mais que parfois, selon le type de rugosité, la qualité de greffage pouvait être légèrement altérée. Néanmoins, l'étude approfondie de la structure des enveloppes de silicone nous a permis de mettre en évidence, une couche particulière insérée dans l'enveloppe de silicone (PDMS). Celle-ci correspond en réalité à une couche barrière composé

de polydiphénylsiloxane (PDPS) dont le rôle est d'empêcher la diffusion du gel de silicone à travers l'enveloppe responsable du phénomène de perspiration. L'étude du greffage du polyNaSS sur ce « nouveau » type de silicone a montré que le protocole pouvait être optimisé au niveau du temps d'activation. En effet, les groupements phényles sont plus réactifs du fait des doubles liaisons des cycles aromatiques par rapport au PDMS. Cependant, le test de cytotoxicité a montré que le PDPS n'était pas biocompatible.

Enfin, le dernier volet de cette thèse concerne l'optimisation de diverses façons du greffage du polyNaSS sur le silicone pour répondre à des contraintes particulières imposées par certaines analyses. Ainsi, nous avons montré que les surfaces pouvaient être greffées des deux faces et qu'il était alors possible de fonctionnaliser des mini-implants pour les implantations *in vivo* par un système rotatif.

En termes de perspective, le volet qui porte sur l'évaluation de l'effet antibactérien est en cours d'investigation dans le cadre des travaux de thèse du Dr. Vivien Moris. Cette partie du projet consiste à évaluer la réponse bactériologique et microbiologique *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* permet d'étudier le comportement des bactéries au contact des surfaces greffées pour rendre compte de l'effet antibactérien du polyNaSS en présence de protéines plasmatiques. Sur un plus long terme, l'étude *in vivo* quant à elle vise à :

- Doser les divers facteurs inflammatoires au cours du temps autour de l'implant nu ou greffé (Taux de lymphocytes T, dosage des interleukines IL-1 β , IL-6 et TNF- α).
- Mesurer l'épaisseur de la capsule qui se forme autour de l'implant
- Doser la concentration du biofilm bactérien
- Doser l'expression des gènes TIMP-1, TIMP-2

Actuellement des mini-implants sont en cours de préparation pour une implantation chez l'animal au mois de Novembre 2021.

ANNEXES

Listes des publications :

- **M. Lam**, C. Falentin-Daudré, Implication of the nature of silicone surfaces on the grafting of polyNaSS a bioactive polymer (IRBM, submitted)
- **M. Lam**, R. Vayron, R. Delille, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Grafting impacts on silicone breast implants' mechanical properties and cell responses (Acta Biomateriala, submitted)
- **M. Lam**, V. Migonney, C. Falentin-Daudre, Review of silicone surface modification techniques and coatings for antibacterial/antimicrobial applications to improve breast implant surfaces, Acta Biomateriala (2021) <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.020>.
- **M. Lam**, V. Moris, V. Humblot, V. Migonney, C. Falentin-Daudre, A simple way to graft a bioactive polymer – Polystyrene sodium sulfonate on silicone surfaces, European Polymer Journal. 128 (2020) 109608. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109608>.

Enseignements :

- Introduction à la chimie, niveau L1, Université Sorbonne Paris Nord - USPN (45h CM/TD)
- Nouveaux biomatériaux, niveau M2 - USPN (18h CM)
- Biocompatibilité, niveau M2 - USPN (18h CM)
- Introduction aux outils informatiques, niveau L1 -USPN (6h TD)
- Chimie des solutions, niveau L1 - USPN (12h TD)

Posters et communications :

- Communication orale, congrès JEPO, Ile de Porquerolles, France, Octobre 2021
 - Communication orale, congrès GDR, Toulouse - France, Septembre 2021
 - Communication orale, congrès EMRS, septembre 2021
 - Séminaire du laboratoire CSPBAT, Juillet 2021
 - Communication orale, MIPOL 2021, Milan - Italie, Juillet 2021
 - Communication orale, congrès TMS, Orlando - États Unis, Mars 2021
 - Poster GFP, Mulhouse - France, Novembre 2019 (Prix du meilleur Poster)
 - Poster 80 ans du CNRS, Université Sorbonne Paris Nord, Juin 2019
- Formations transversales : 60 heures validées
 - Formation disciplinaires : 60 heures validées

Bibliographie

-
- [1] I. Wong, C.-M. Ho, Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices, *Microfluid Nanofluid.* 7 (2009) 291. <https://doi.org/10.1007/s10404-009-0443-4>.
- [2] M.J. Whitford, The chemistry of silicone materials for biomedical devices and contact lenses, *Biomaterials.* (1984) 298–300.
- [3] J.-S. Chen, T.-Y. Liu, H.-M. Tsou, Y.-S. Ting, Y.-Q. Tseng, C.-H. Wang, Biopolymer brushes grown on PDMS contact lenses by in situ atmospheric plasma-induced polymerization, *J Polym Res.* 24 (2017) 69. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1230-7>.
- [4] G.J. Im, Y.S. An, J. Choi, J.J. Song, S.W. Chae, H.H. Jung, Analysis of Bacterial Biofilms on a Cochlear Implant Following Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection, *J Audiol Otol.* 19 (2015) 172–177. <https://doi.org/10.7874/jao.2015.19.3.172>.
- [5] K. Stenzelius, L. Laszlo, M. Madeja, H. Pessah-Rasmusson, M. Grabe, Catheter-associated urinary tract infections and other infections in patients hospitalized for acute stroke: A prospective cohort study of two different silicone catheters, *Scandinavian Journal of Urology.* 50 (2016) 483–488. <https://doi.org/10.1080/21681805.2016.1194459>.
- [6] <https://www.fda.gov/medical-devices/implants-and-prosthetics/breast-implants>, (2020). <https://www.fda.gov/medical-devices/implants-and-prosthetics/breast-implants>.
- [7] A. Daniels, Silicone breast implant materials, *Swiss Med Wkly.* (2012). <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13614>.
- [8] J.C. McDonald, G.M. Whitesides, Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 491–499. <https://doi.org/10.1021/ar010110q>.
- [9] S. Chen, L. Li, C. Zhao, J. Zheng, Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials, *Polymer.* 51 (2010) 5283–5293. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.08.022>.
- [10] ANSM, (n.d.). <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/dispositifs-de-surveillance-des-implants-mammaires/les-implants-mammaires-informations-generales>.
- [11] <https://247wallst.com/>, (n.d.). <https://247wallst.com/>.
- [12] <https://www.plasticsurgery.org/>, (n.d.). <https://www.plasticsurgery.org/>.
- [13] A. Marra, G. Viale, S.A. Pileri, G. Pravettoni, G. Viale, F. De Lorenzi, F. Nolè, P. Veronesi, G. Curigliano, Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: A comprehensive review, *Cancer Treatment Reviews.* 84 (2020) 101963. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.101963>.
- [14] P. S V V S Narayana, P. S V V Srihari, Biofilm Resistant Surfaces and Coatings on Implants: A Review, *Materials Today: Proceedings.* 18 (2019) 4847–4853. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.475>.
- [15] U.M. Rieger, J. Mesina, D.F. Kalbermatten, M. Haug, H.P. Frey, R. Pico, R. Frei, G. Pierer, N.J. Lüscher, A. Trampuz, Bacterial biofilms and capsular contracture in patients with breast implants: Breast capsular contracture and bacterial biofilm, *Br J Surg.* 100 (2013) 768–774. <https://doi.org/10.1002/bjs.9084>.
- [16] C.P. Virden, M.K. Dobke, P. Stein, C.L. Parsons, D.H. Frank, Subclinical infection of the silicone breast implant surface as a possible cause of capsular contracture, *Aesth. Plast. Surg.* 16 (1992) 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00450610>.
- [17] B.D. Ratner, S.J. Bryant, *Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6 (2004) 41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>.
- [18] A.K. Deva, W.P. Adams, K. Vickery, The Role of Bacterial Biofilms in Device-Associated Infection, *Plastic and Reconstructive Surgery.* 132 (2013) 1319–1328.

<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182a3c105>.

- [19] I.-S. Yeo, H.-Y. Kim, K.S. Lim, J.-S. Han, Implant Surface Factors and Bacterial Adhesion: A Review of the Literature, *The International Journal of Artificial Organs*. 35 (2012) 762–772. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000154>.
- [20] H. Chen, M.A. Brook, H.D. Sheardown, Y. Chen, B. Klenkler, Generic Bioaffinity Silicone Surfaces, *Bioconjugate Chem.* 17 (2006) 21–28. <https://doi.org/10.1021/bc050174b>.
- [21] J.-F. Yala, P. Thebault, A. Héquet, V. Humblot, C.-M. Pradier, J.-M. Berjeaud, Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide, *Appl Microbiol Biotechnol.* 89 (2011) 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2930-7>.
- [22] R.O. Darouiche, Treatment of Infections Associated with Surgical Implants, *New England Journal of Medicine*. 350 (2004) 1422–1429. <https://doi.org/10.1056/nejmra035415>.
- [23] H.-O. Rennekampff, K. Exner, G. Lemperle, B. Nemsman, Reduction of Capsular Formation Around Silicone Breast Implants by D-Penicillamine in Rats, *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. 26 (1992) 253–255. <https://doi.org/10.3109/02844319209015267>.
- [24] A. Gokaltun, M.L. Yarmush, A. Asatekin, O.B. Usta, Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology, *Technology*. 05 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1142/S2339547817300013>.
- [25] P.G. Cordeiro, P. Ghione, A. Ni, Q. Hu, N. Ganesan, N. Galasso, A. Dogan, S.M. Horwitz, Risk of breast implant associated anaplastic large cell lymphoma (BIA-ALCL) in a cohort of 3546 women prospectively followed long term after reconstruction with textured breast implants, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 73 (2020) 841–846. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2019.11.064>.
- [26] Y. Yang, K. Kulangara, R.T.S. Lam, R. Dharmawan, K.W. Leong, Effects of Topographical and Mechanical Property Alterations Induced by Oxygen Plasma Modification on Stem Cell Behavior, *ACS Nano*. 6 (2012) 8591–8598. <https://doi.org/10.1021/nn301713d>.
- [27] N. Khavanin, M.W. Clemens, A.L. Pusic, N.A. Fine, J.B. Hamill, H.M. Kim, J. Qi, E.G. Wilkins, J.Y.S. Kim, Shaped versus Round Implants in Breast Reconstruction: A Multi-Institutional Comparison of Surgical and Patient-Reported Outcomes, *Plastic and Reconstructive Surgery*. 139 (2017) 1063–1070. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000003238>.
- [28] J.J. Keech, B.J. Creech, Anaplastic T-cell lymphoma in proximity to a saline-filled breast implant, (1997). <https://doi.org/10.1097/00006534-199708000-00065>.
- [29] A. K Groth, R. Graf, Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma (BIA-ALCL) and the Textured Breast Implant Crisis, *Aesth Plast Surg*. 44 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00266-019-01521-3>.
- [30] M. Mempin, H. Hu, D. Chowdhury, A. Deva, K. Vickery, The A, B and C's of Silicone Breast Implants: Anaplastic Large Cell Lymphoma, Biofilm and Capsular Contracture, *Materials*. 11 (2018) 2393. <https://doi.org/10.3390/ma11122393>.
- [31] W. Dolores, R. Christian, N. Harald, P. Hildegunde, W. Georg, Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions, *Journal of Autoimmunity*. 23 (2004) 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.03.005>.
- [32] S.L. Spear, J.L. Baker, Classification of Capsular Contracture after Prosthetic Breast Reconstruction, *Plastic and Reconstructive Surgery*. (1995) 1119–1123. <https://doi.org/10.1097/00006534-199510000-00018>.
- [33] The william dictionary of biomaterials, (n.d.).

- [34] N. Mehta-Shah, M.W. Clemens, S.M. Horwitz, How I treat breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma, *Blood*. 132 (2018) 1889–1898. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-785972>.
- [35] A. Chacko, T. Lloyd, Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: a pictorial review, *Insights Imaging*. 9 (2018) 683–686. <https://doi.org/10.1007/s13244-018-0652-z>.
- [36] E. Berlin, K. Singh, C. Mills, I. Shapira, R.L. Bakst, M. Chadha, Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma: Case Report and Review of the Literature, *Case Reports in Hematology*. 2018 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/2414278>.
- [37] H. Hu, K. Johani, A. Almatroudi, K. Vickery, B. Van Natta, M.E. Kadin, G. Brody, M. Clemens, C.Y. Cheah, S. Lade, P.A. Joshi, H.M. Prince, A.K. Deva, Bacterial Biofilm Infection Detected in Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma:, *Plastic and Reconstructive Surgery*. 137 (2016) 1659–1669. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002010>.
- [38] H. Busch, Silicone toxicology, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 24 (1994) 11–17. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(94\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0049-0172(94)90104-X).
- [39] H. Headon, A. Kasem, K. Mokbel, Capsular Contracture after Breast Augmentation: An Update for Clinical Practice, *Arch Plast Surg*. 42 (2015) 532. <https://doi.org/10.5999/aps.2015.42.5.532>.
- [40] D.W. Grainger, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, M. Josefowicz, Assessment of fibronectin conformation adsorbed to polytetrafluoroethylene surfaces from serum protein mixtures and correlation to support of cell attachment in culture, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 14 (2003) 973–988. <https://doi.org/10.1163/156856203322381456>.
- [41] J.W. Costerton, G.G. Geesey, K.-J. Cheng, How Bacteria Stick, *Sci Am*. 238 (1978) 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>.
- [42] H.M. Lappin-Scott, C. Bass, Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces, *American Journal of Infection Control*. 29 (2001) 250–251. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115674>.
- [43] T.J. Foster, J.A. Geoghegan, V.K. Ganesh, M. Höök, Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*, *Nat Rev Microbiol*. 12 (2014) 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.
- [44] A.-C. Crémieux, G. Pavon-Djavid, A.S. Mghir, G. Hélyary, V. Migonney, Bioactive Polymers Grafted on Silicone to Prevent *Staphylococcus Aureus* Prosthesis Adherence: In Vitro and in VIVO Studies, (n.d.) 8.
- [45] J.M. Anderson, S. Jiang, Implications of the Acute and Chronic Inflammatory Response and the Foreign Body Reaction to the Immune Response of Implanted Biomaterials, (2017). https://doi.org/10.1007/978-3-319-45433-7_2.
- [46] B.H. Shin, B.H. Kim, S. Kim, K. Lee, Y.B. Choy, C.Y. Heo, Silicone breast implant modification review: overcoming capsular contracture, *Biomater Res*. 22 (2018) 37. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0147-5>.
- [47] D.G. Castner, B.D. Ratner, Biomedical surface science: Foundations to frontiers, *Surface Science*. 500 (2002) 28–60. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01587-4](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01587-4).
- [48] P.D. Cook, B.M. Osborne, R.L. Connor, J.F. Strauss, Follicular lymphoma adjacent to foreign body granulomatous infection and fibrosis surrounding silicone breast prosthesis, *The American Journal of Surgical Pathology*. (1995) 712–717.
- [49] D.J. Collett, H. Rakhorst, P. Lennox, M. Magnusson, R. Cooter, A.K. Deva, Current Risk Estimate of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma in Textured Breast

- Implants:, Plastic and Reconstructive Surgery. 143 (2019) 30S-40S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000005567>.
- [50] S. Barr, E.W. Hill, A. Bayat, Functional biocompatibility testing of silicone breast implants and a novel classification system based on surface roughness, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 75 (2017) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.06.030>.
- [51] T. Brown, Surface Areas of Textured Breast Implants: Implications for the Biofilm Theory of Capsule Formation, (2018) 5.
- [52] S. Fischer, C. Hirche, M.A. Reichenberger, J. Kiefer, Y. Diehm, S. Mukundan, M. Alhefzi, E.M. Bueno, U. Kneser, B. Pomahac, Silicone Implants with Smooth Surfaces Induce Thinner but Denser Fibrotic Capsules Compared to Those with Textured Surfaces in a Rodent Model, *PLoS ONE*. 10 (2015) e0132131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132131>.
- [53] C.M. Malata, L. Feldberg, D.J. Coleman, I.T. Foo, D.T. Sharpe, Textured or smooth implants for breast augmentation? Three year follow-up of a prospective randomised controlled trial, *British Journal of Plastic Surgery*. 50 (1997) 99–105. [https://doi.org/10.1016/S0007-1226\(97\)91320-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1226(97)91320-5).
- [54] C.A. Carpaneda, Inflammatory Reaction and Capsular Contracture Around Smooth Silicone Implants, *Aesthetic Plastic Surgery*. 21 (1997) 110–114. <https://doi.org/10.1007/s002669900094>.
- [55] H. Hoflehner, G. Pierer, M. Ratschek, P. Rehak, E. Scharnag, Subjective and objective assessment of capsular contracture: Results obtained with textured silicone implants and histological correlation, *Eur J Plast Surg*. 17 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00176918>.
- [56] M. Atlan, G. Nuti, H. Wang, S. Decker, T. Perry, Breast implant surface texture impacts host tissue response, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 88 (2018) 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.08.035>.
- [57] A.A. Valencia-Lazcano, T. Alonso-Rasgado, A. Bayat, Characterisation of breast implant surfaces and correlation with fibroblast adhesion, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 21 (2013) 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.02.005>.
- [58] N. Poeppel, S. Schreml, F. Lichtenegger, A. Lenich, M. Eisenmann-Klein, L. Prantl, Does the Surface Structure of Implants Have an Impact on the Formation of a Capsular Contracture?, *Aesth Plast Surg*. 31 (2007) 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00266-006-0091-y>.
- [59] A. Loch-Wilkinson, K.J. Beath, R.J.W. Knight, W.L.F. Wessels, M. Magnusson, T. Papadopoulos, T. Connell, J. Lofts, M. Locke, I. Hopper, R. Cooter, K. Vickery, P.A. Joshi, H.M. Prince, A.K. Deva, Breast Implant–Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma in Australia and New Zealand: High-Surface-Area Textured Implants Are Associated with Increased Risk, *Plastic and Reconstructive Surgery*. 140 (2017) 645–654. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000003654>.
- [60] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, 284 (1999) 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- [61] J.N. Walker, C.L. Pinkner, J.S. Pinkner, S.J. Hultgren, T.M. Myckatyn, The Detection of Bacteria and Matrix Proteins on Clinically Benign and Pathologic Implants:, *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*. 7 (2019) e2037. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002037>.
- [62] G.A. James, L. Boegli, J. Hancock, L. Bowersock, A. Parker, B.M. Kinney, Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Textured Breast Implant Shell Materials, *Aesth Plast Surg*. 43 (2019) 490–497. <https://doi.org/10.1007/s00266-018-1234-7>.

- [63] S. Manav, M.S. Ayhan, E. Deniz, E. Özkoçer, Ç. Elmas, M. Yalinay, E. Şahin, Capsular contracture around silicone mini-implants following bacterial contamination: An in-vivo comparative experimental study between smooth, textured and polyurethane implants, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. (2020) S1748681520301327. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.02.049>.
- [64] I.Y. Park, J.H. Cho, K.S. Kim, Y.-B. Kim, M.S. Kim, S.C. Kim, Helix Stability Confers Salt Resistance upon Helical Antimicrobial Peptides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13896–13901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311418200>.
- [65] A. Fleming, On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology*. 10 (1929) 226–236.
- [66] J.J. Drinane, R.S. Bergman, B.L. Folkers, Revisiting Triple Antibiotic Irrigation of Breast Implant Pockets: A Placebo-controlled Single Practice Cohort Study, (2013) 8.
- [67] J.E. Baker, R.M. Boudreau, A.P. Seitz, E. Gulbins, M. Edwards, R.M. Gobble, Doxycycline-Coated Silicone Breast Implant Reduces Surgical Site Infections Compared with Standard Gentamycin/Cefazolin/Bacitracin Wash, *Journal of the American College of Surgeons*. 227 (2018) S206–S207. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2018.07.452>.
- [68] F.M.J. Reischies, R. Krause, J. Holzer, F. Tiefenbacher, R. Winter, G. Eylert, T. Meikl, A. Tuca, M.J. Köfer, L.P. Kamolz, D.B. Lumenta, What can we learn from sonication results of breast implants?, *PLoS ONE*. 12 (2017) e0182267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182267>.
- [69] K.E. Miller, B. Hontanilla, A. Cabello, D. Marre, L. Armendariz, J. Leiva, The effect of late infection and antibiotic treatment on capsular contracture in silicone breast implants: A rat model, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 69 (2016) 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2015.08.027>.
- [70] Y. Barnea, D.C. Hammond, Y. Geffen, S. Navon-Venezia, K. Goldberg, Plasma Activation of a Breast Implant Shell in Conjunction With Antibacterial Irrigants Enhances Antibacterial Activity, *Aesthetic Surgery Journal*. 38 (2018) 1188–1196. <https://doi.org/10.1093/asj/sjy020>.
- [71] H. Li, Marilyn R Fairfax, F. Dubocq, A.W.L. Rajpurkar, C.B. Dhabuwala, Antibacterial activity of antibiotic coated silicone grafts, *Journal of Urology*. 160 (1998) 1910-1913. [https://doi.org/10.1016/S00225347\(01\)62442-X](https://doi.org/10.1016/S00225347(01)62442-X)
- [72] H. Hanna, R. Benjamin, I. Chatzinikolaou, B. Alakech, D. Richardson, P. Mansfield, T. Dvorak, M.F. Munsell, R. Darouiche, H. Kantarjian, I. Raad, Long-Term Silicone Central Venous Catheters Impregnated With Minocycline and Rifampin Decrease Rates of Catheter-Related Bloodstream Infection in Cancer Patients: A Prospective Randomized Clinical Trial, *JCO*. 22 (2004) 3163–3171. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.04.124>.
- [73] M.C. McBride, R. Karl Malcolm, A. David Woolfson, S.P. Gorman, Persistence of antimicrobial activity through sustained release of triclosan from pegylated silicone elastomers, *Biomaterials*. 30 (2009) 6739–6747. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.047>.
- [74] H. Phuengkham, N. Nasongkla, Development of antibacterial coating on silicone surface via chlorhexidine-loaded nanospheres, *J Mater Sci: Mater Med*. 26 (2015) 78. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5418-2>.
- [75] M. Ramasamy, J. Lee, Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices, *BioMed Research International*. 2016 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/1851242>.
- [76] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,

- Biotechnology Advances. 27 (2009) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>.
- [77] H.R. Ghorbani, M. Molaei, Antibacterial nanocomposite preparation of polypropylene-Silver using Corona discharge, *Progress in Organic Coatings*. 112 (2017) 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.07.020>.
- [78] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J.-B. Roullet, Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61 (2008) 869–876. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn034>.
- [79] F. Martinez-Gutierrez, P.L. Olive, A. Banuelos, E. Orrantia, N. Nino, E.M. Sanchez, F. Ruiz, H. Bach, Y. Av-Gay, Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6 (2010) 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>.
- [80] U. Kadiyala, N.A. Kotov, J.S. VanEpps, Antibacterial Metal Oxide Nanoparticles: Challenges in Interpreting the Literature, *CPD*. 24 (2018) 896–903. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180219130659>.
- [81] K. Gold, B. Slay, M. Knackstedt, A.K. Gaharwar, Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles, *Adv. Therap.* 1 (2018) 1700033. <https://doi.org/10.1002/adtp.201700033>.
- [82] D. Depan, R.D.K. Misra, On the determining role of network structure titania in silicone against bacterial colonization: Mechanism and disruption of biofilm, *Materials Science and Engineering: C*. 34 (2014) 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.025>.
- [83] M. Okada, S. Yasuda, T. Kimura, M. Iwasaki, S. Ito, A. Kishida, T. Furuzono, Optimization of amino group density on surfaces of titanium dioxide nanoparticles covalently bonded to a silicone substrate for antibacterial and cell adhesion activities, *J. Biomed. Mater. Res.* 76A (2006) 95–101. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30513>.
- [84] E. Ozkan, F.T. Ozkan, E. Allan, I.P. Parkin, The use of zinc oxide nanoparticles to enhance the antibacterial properties of light-activated polydimethylsiloxane containing crystal violet, *RSC Adv.* 5 (2015) 8806–8813. <https://doi.org/10.1039/C4RA13649G>.
- [85] S. Noimark, J. Weiner, N. Noor, E. Allan, C.K. Williams, M.S.P. Shaffer, I.P. Parkin, Dual-Mechanism Antimicrobial Polymer-ZnO Nanoparticle and Crystal Violet-Encapsulated Silicone, *Adv. Funct. Mater.* 25 (2015) 1367–1373. <https://doi.org/10.1002/adfm.201402980>.
- [86] S. Tavakoli, S. Nemati, M. Kharaziha, S. Akbari-Alavijeh, Embedding CuO Nanoparticles in PDMS-SiO₂ Coating to Improve Antibacterial Characteristic and Corrosion Resistance, *Colloid and Interface Science Communications*. 28 (2019) 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2018.11.002>.
- [87] E. Jäger, J. Schmidt, A. Pfuch, S. Spange, O. Beier, N. Jäger, O. Jantschner, R. Daniel, C. Mitterer, Antibacterial Silicon Oxide Thin Films Doped with Zinc and Copper Grown by Atmospheric Pressure Plasma Chemical Vapor Deposition, *Nanomaterials*. 9 (2019) 255. <https://doi.org/10.3390/nano9020255>.
- [88] C.G. Kumar, P. Sujitha, Green synthesis of Kocuran-functionalized silver glyconanoparticles for use as antibiofilm coatings on silicone urethral catheters, *Nanotechnology*. 25 (2014) 325101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/32/325101>.
- [89] S. Park, J. Park, J. Heo, S.-E. Lee, J.-W. Shin, M. Chang, J. Hong, Polysaccharide-based superhydrophilic coatings with antibacterial and anti-inflammatory agent-delivering capabilities for ophthalmic applications, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 68 (2018) 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.07.049>.
- [90] M. Bračič, L. Fras-Zemljič, L. Pérez, K. Kogej, K. Stana-Kleinschek, R. Kargl, T. Mohan,

- Protein-repellent and antimicrobial nanoparticle coatings from hyaluronic acid and a lysine-derived biocompatible surfactant, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 3888–3897. <https://doi.org/10.1039/C7TB00311K>.
- [91] T. Mohan, A. Čas, M. Bračič, O. Plohl, A. Vesel, M. Rupnik, L.F. Zemljič, J. Rebol, Highly Protein Repellent and Antiadhesive Polysaccharide Biomaterial Coating for Urinary Catheter Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 5825–5832. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01288>.
- [92] L. Yang, L. Li, Q. Tu, L. Ren, Y. Zhang, X. Wang, Z. Zhang, W. Liu, L. Xin, J. Wang, Photocatalyzed Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) with Polysaccharides and Assay of Their Protein Adsorption and Cytocompatibility, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6430–6439. <https://doi.org/10.1021/ac100544x>.
- [93] H. Ai, D. Mills, A. Jonathan, A.A. Jones, Gelatin-glutaraldehyde cross-linking on silicone rubber to increase endothelial cell adhesion and growth, (n.d.) 6.
- [94] J.K. Bronk, B.H. Russell, J.J. Rivera, R. Pasqualini, W. Arap, M. Höök, E.M. Barbu, A multifunctional streptococcal collagen-mimetic protein coating prevents bacterial adhesion and promotes osteoid formation on titanium, *Acta Biomaterialia.* 10 (2014) 3354–3362. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.005>.
- [95] J. Hauser, J. Zietlow, M. Köller, S.A. Esenwein, H. Halfmann, P. Awakowicz, H.U. Steinau, Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification, *J Mater Sci: Mater Med.* 20 (2009) 2541–2548. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3826-x>.
- [96] B.J. Nablo, H.L. Prichard, R.D. Butler, B. Klitzman, M.H. Schoenfisch, Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release, *Biomaterials.* 26 (2005) 6984–6990. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.017>.
- [97] E. Ozkan, C.C. Crick, A. Taylor, E. Allan, I.P. Parkin, Copper-based water repellent and antibacterial coatings by aerosol assisted chemical vapour deposition, *Chem. Sci.* 7 (2016) 5126–5131. <https://doi.org/10.1039/C6SC01150K>.
- [98] P. Kumar, P. Huo, R. Zhang, B. Liu, Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials, *Nanomaterials.* 9 (2019) 737. <https://doi.org/10.3390/nano9050737>.
- [99] Y. Liu, J. Wen, Y. Gao, T. Li, H. Wang, H. Yan, B. Niu, R. Guo, Antibacterial graphene oxide coatings on polymer substrate, *Applied Surface Science.* 436 (2018) 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.006>.
- [100] R.N. Gomes, I. Borges, A.T. Pereira, A.F. Maia, M. Pestana, F.D. Magalhães, A.M. Pinto, I.C. Gonçalves, Antimicrobial graphene nanoplatelets coatings for silicone catheters, *Carbon.* 139 (2018) 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.06.044>.
- [101] P.H. Zeplin, N.C. Maksimovikj, M.C. Jordan, J. Nickel, G. Lang, A.H. Leimer, L. Römer, T. Scheibel, Spider Silk Coatings as a Bioshield to Reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation, *Adv. Funct. Mater.* 24 (2014) 2658–2666. <https://doi.org/10.1002/adfm.201302813>.
- [102] A. Mata, A.J. Fleischman, S. Roy, Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems, *Biomed Microdevices.* 7 (2005) 281–293. <https://doi.org/10.1007/s10544-005-6070-2>.
- [103] S. Pinto, P. Alves, C.M. Matos, A.C. Santos, L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, M.H. Gil, Poly(dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its characteristics towards biomedical applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 81 (2010) 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.014>.
- [104] S.H. Tan, N.-T. Nguyen, Y.C. Chua, T.G. Kang, Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel, *Biomicrofluidics.* 4 (2010)

032204. <https://doi.org/10.1063/1.3466882>.

[105] L.H. Zhao, J. Lee, P.N. Sen, Long-term retention of hydrophilic behavior of plasma treated polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces stored under water and Luria-Bertani broth, *Sensors and Actuators A: Physical*. 181 (2012) 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2012.04.038>.

[106] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974–4984. <https://doi.org/10.1021/ac980656z>.

[107] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey, D. Johnson, On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*. 137 (1990) 11–24. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(90\)90038-P](https://doi.org/10.1016/0021-9797(90)90038-P).

[108] D. Bodas, C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 123 (2007) 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>.

[109] S. Hemmilä, J.V. Cauich-Rodríguez, J. Kreutzer, P. Kallio, Rapid, simple, and cost-effective treatments to achieve long-term hydrophilic PDMS surfaces, *Applied Surface Science*. 258 (2012) 9864–9875. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.06.044>.

[110] Y. Yan, Y. Qi, W. Chen, Strategies to hydrophilize silicones via spontaneous adsorption of poly(vinyl alcohol) from aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 546 (2018) 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.03.024>.

[111] L.B. Carneiro, J. Ferreira, M.J.L. Santos, J.P. Monteiro, E.M. Giroto, A new approach to immobilize poly(vinyl alcohol) on poly(dimethylsiloxane) resulting in low protein adsorption, *Applied Surface Science*. 257 (2011) 10514–10519. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.07.031>.

[112] N. Maheshwari, A. Kottantharayil, M. Kumar, S. Mukherji, Long term hydrophilic coating on poly(dimethylsiloxane) substrates for microfluidic applications, *Applied Surface Science*. 257 (2010) 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.07.010>.

[113] G. Cortese, F. Martina, G. Vasapollo, R. Cingolani, G. Gigli, G. Ciccarella, Modification of micro-channel filling flow by poly(dimethylsiloxane) surface functionalization with fluorine—Substituted aminonaphthols, *Journal of Fluorine Chemistry*. 131 (2010) 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2009.11.017>.

[114] G.S. Ferguson, M.K. Chaudhury, H.A. Biebuyck, G.M. Whitesides, Monolayers on disordered substrates: self-assembly of alkyltrichlorosilanes on surface-modified polyethylene and poly(dimethylsiloxane), *Macromolecules*. 26 (1993) 5870–5875. <https://doi.org/10.1021/ma00074a007>.

[115] Y.J. Chuah, S. Kuddannaya, M.H.A. Lee, Y. Zhang, Y. Kang, The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 383–390. <https://doi.org/10.1039/C4BM00268G>.

[116] Z. Qian, D. Ross, W. Jia, Q. Xing, F. Zhao, Bioactive polydimethylsiloxane surface for optimal human mesenchymal stem cell sheet culture, *Bioactive Materials*. 3 (2018) 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.01.005>.

[117] N. Sellin, J.S. de C. Campos, Surface composition analysis of PP films treated by corona discharge, *Mat. Res.* 6 (2003) 163–166. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000200009>.

[118] J. Kim, M.K. Chaudhury, M.J. Owen, T. Orbeck, The Mechanisms of Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomers Exposed to Partial Electrical Discharges, *Journal of Colloid and Interface Science*. 244 (2001) 200–207. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7909>.

[119] M. Meincken, T.A. Berhane, P.E. Mallon, Tracking the hydrophobicity recovery of

- PDMS compounds using the adhesive force determined by AFM force distance measurements, *Polymer*. 46 (2005) 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.11.012>.
- [120] J. Kim, M.K. Chaudhury, M.J. Owen, Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomer Exposed to Partial Electrical Discharge, *Journal of Colloid and Interface Science*. 226 (2000) 231–236. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6817>.
- [121] S. Bilgin, M. Isik, E. Yilgor, I. Yilgor, Hydrophilization of silicone–urea copolymer surfaces by UV/ozone: Influence of PDMS molecular weight on surface oxidation and hydrophobic recovery, *Polymer*. 54 (2013) 6665–6675. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.10.019>.
- [122] K. Efimenko, W.E. Wallace, J. Genzer, Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment, *Journal of Colloid and Interface Science*. 254 (2002) 306–315. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8594>.
- [123] Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman, Y.-H. Lo, UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 97 (2004) 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2003.09.022>.
- [124] W. Zhang, S. Lin, C. Wang, J. Hu, C. Li, Z. Zhuang, Y. Zhou, R.A. Mathies, C.J. Yang, PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics, *Lab Chip*. 9 (2009) 3088. <https://doi.org/10.1039/b907254c>.
- [125] K. Efimenko, J.A. Crowe, E. Manias, D.W. Schwark, D.A. Fischer, J. Genzer, Rapid formation of soft hydrophilic silicone elastomer surfaces, *Polymer*. 46 (2005) 9329–9341. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.046>.
- [126] H. Shamsavari, J. Quinn, J. d'Eon, B. Zhao, Surface modification of polydimethylsiloxane elastomer for stable hydrophilicity, optical transparency and film lubrication, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 482 (2015) 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.024>.
- [127] M. Lam, V. Moris, V. Humblot, V. Migonney, C. Falentin-Daudre, A simple way to graft a bioactive polymer – Polystyrene sodium sulfonate on silicone surfaces, *European Polymer Journal*. 128 (2020) 109608. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109608>.
- [128] N. Marín-Pareja, E. Salvagni, J. Guillem-Martí, C. Aparicio, M.-P. Ginebra, Collagen-functionalised titanium surfaces for biological sealing of dental implants: Effect of immobilisation process on fibroblasts response, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 122 (2014) 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.038>.
- [129] K.-S. Koh, J. Chin, J. Chia, C.-L. Chiang, Quantitative Studies on PDMS-PDMS Interface Bonding with Piranha Solution and its Swelling Effect, *Micromachines*. 3 (2012) 427–441. <https://doi.org/10.3390/mi3020427>.
- [130] H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Grafting bioactive polymers onto titanium implants by UV irradiation, *RSC Adv*. 6 (2016) 13766–13771. <https://doi.org/10.1039/C5RA24497H>.
- [131] L. Yang, L. Li, Q. Tu, L. Ren, Y. Zhang, X. Wang, Z. Zhang, W. Liu, L. Xin, J. Wang, Photocatalyzed Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) with Polysaccharides and Assay of Their Protein Adsorption and Cytocompatibility, *Anal. Chem*. 82 (2010) 6430–6439. <https://doi.org/10.1021/ac100544x>.
- [132] J.E. Mark, C.Y. Jiang, M.Y. Tang, Simultaneous curing and filling of elastomers, *Macromolecules*. 17 (1984) 2613–2616. <https://doi.org/10.1021/ma00142a026>.
- [133] J.E. Mark, S.-J. Pan, Reinforcement of Polydimethylsiloxane Networks by in-situ Precipitation of Silica: A New Method for Preparation of Filled Elastomers, *Makromol. Chem., Rapid Commun*. 3 (1982) 681–685. <https://doi.org/10.1002/marc.1982.030031006>.

- [134] C.-Y. Jiang, J.E. Mark, The effects of various catalysts in the in-situ precipitation of reinforcing silica in polydimethylsiloxane networks, *Makromol. Chem.* 185 (1984) 2609–2617. <https://doi.org/10.1002/macp.1984.021851212>.
- [135] G.T. Roman, C.T. Culbertson, Surface Engineering of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices Using Transition Metal Sol–Gel Chemistry, *Langmuir*. 22 (2006) 4445–4451. <https://doi.org/10.1021/la053085w>.
- [136] G.T. Roman, T. Hlaus, K.J. Bass, T.G. Seelhammer, C.T. Culbertson, Sol–Gel Modified Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices with High Electroosmotic Mobilities and Hydrophilic Channel Wall Characteristics, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1414–1422. <https://doi.org/10.1021/ac048811z>.
- [137] R. Gomez-Sjoberg, A.A. Leyrat, B.T. Houseman, K. Shokat, S.R. Quake, Biocompatibility and Reduced Drug Absorption of Sol–Gel-Treated Poly(dimethyl siloxane) for Microfluidic Cell Culture Applications, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8954–8960. <https://doi.org/10.1021/ac101870s>.
- [138] O. Girshevitz, Y. Nitzan, C.N. Sukenik, Solution-Deposited Amorphous Titanium Dioxide on Silicone Rubber: A Conformal, Crack-Free Antibacterial Coating, *Chem. Mater.* 20 (2008) 1390–1396. <https://doi.org/10.1021/cm702209r>.
- [139] V. Silverio, P.A.G. Canane, S. Cardoso, Surface wettability and stability of chemically modified silicon, glass and polymeric surfaces via room temperature chemical vapor deposition, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 570 (2019) 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.03.032>.
- [140] A. Gokaltun, M.L. Yarmush, A. Asatekin, O.B. Usta, Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology, *Technology*. 05 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1142/S2339547817300013>.
- [141] J. Martin, J. Martinez, A. Mehdi, G. Subra, Silicone grafted bioactive peptides and their applications, *Current Opinion in Chemical Biology*. 52 (2019) 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.012>.
- [142] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance, *Pharmacol Rev.* 55 (2003) 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- [143] X. Li, P. Li, R. Saravanan, A. Basu, B. Mishra, S.H. Lim, X. Su, P.A. Tambyah, S.S.J. Leong, Antimicrobial functionalization of silicone surfaces with engineered short peptides having broad spectrum antimicrobial and salt-resistant properties, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014) 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.009>.
- [144] C. Pinese, S. Jebors, C. Echali er, P. Licznar-Fajardo, X. Garric, V. Humblot, C. Calers, J. Martinez, A. Mehdi, G. Subra, Simple and Specific Grafting of Antibacterial Peptides on Silicone Catheters, *Adv. Healthcare Mater.* 5 (2016) 3067–3073. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600757>.
- [145] K. Lim, R.R.Y. Chua, R. Saravanan, A. Basu, B. Mishra, P.A. Tambyah, B. Ho, S.S.J. Leong, Immobilization Studies of an Engineered Arginine–Tryptophan-Rich Peptide on a Silicone Surface with Antimicrobial and Antibiofilm Activity, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 6412–6422. <https://doi.org/10.1021/am401629p>.
- [146] K. Lim, R.R.Y. Chua, B. Ho, P.A. Tambyah, K. Hadinoto, S.S.J. Leong, Development of a catheter functionalized by a polydopamine peptide coating with antimicrobial and antibiofilm properties, *Acta Biomaterialia*. 15 (2015) 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.015>.
- [147] P. Schendzielorz, K. Rak, K. Radeloff, J. V olker, T. Gehrke, A. Scherzad, N. Kleinsasser, R. Hagen, A. Radeloff, A polydopamine peptide coating enables adipose-derived stem cell growth on the silicone surface of cochlear implant electrode arrays: A POLYDOPAMINE PEPTIDE

- COATING ENABLES ASC ADHESION, *J. Biomed. Mater. Res.* 106 (2018) 1431–1438. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33947>.
- [148] B. Li, J. Chen, J.H.-C. Wang, RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* 79A (2006) 989–998. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30847>.
- [149] S.S. Lateef, S. Boateng, T.J. Hartman, C.A. Crot, B. Russell, L. Hanley, GRGDSP peptide-bound silicone membranes withstand mechanical flexing in vitro and display enhanced fibroblast adhesion, *Biomaterials.* 23 (2002) 3159–3168. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00062-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00062-5).
- [150] B. Mishra, A. Basu, R.R.Y. Chua, R. Saravanan, P.A. Tambyah, B. Ho, M.W. Chang, S.S.J. Leong, Site specific immobilization of a potent antimicrobial peptide onto silicone catheters: evaluation against urinary tract infection pathogens, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 1706. <https://doi.org/10.1039/c3tb21300e>.
- [151] J.W. Bartels, P.M. Imbesi, J.A. Finlay, C. Fidge, J. Ma, J.E. Seppala, A.M. Nystrom, M.E. Mackay, J.A. Callow, M.E. Callow, K.L. Wooley, Antibiofouling Hybrid Dendritic Boltorn/Star PEG Thiol-ene Cross-Linked Networks, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 2118–2129. <https://doi.org/10.1021/am200337q>.
- [152] M.D. Dimitriou, Z. Zhou, H.-S. Yoo, K.L. Killops, J.A. Finlay, G. Cone, H.S. Sundaram, N.A. Lynd, K.P. Barteau, L.M. Campos, D.A. Fischer, M.E. Callow, J.A. Callow, C.K. Ober, C.J. Hawker, E.J. Kramer, A General Approach to Controlling the Surface Composition of Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers for Antifouling Coatings, *Langmuir.* 27 (2011) 13762–13772. <https://doi.org/10.1021/la202509m>.
- [153] P.M. Imbesi, N.V. Gohad, M.J. Eller, B. Orihuela, D. Rittschof, E.A. Schweikert, A.S. Mount, K.L. Wooley, Noradrenaline-Functionalized Hyperbranched Fluoropolymer–Poly(ethylene glycol) Cross-Linked Networks As Dual-Mode, Anti-Biofouling Coatings, *ACS Nano.* 6 (2012) 1503–1512. <https://doi.org/10.1021/nn204431m>.
- [154] P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, N. Gadegaard, L. Gram, Covalent Attachment of Poly(ethylene glycol) to Surfaces, Critical for Reducing Bacterial Adhesion, *Langmuir.* 19 (2003) 6912–6921. <https://doi.org/10.1021/la034032m>.
- [155] M. Li, K.G. Neoh, L.Q. Xu, R. Wang, E.-T. Kang, T. Lau, D.P. Olszyna, E. Chiong, Surface Modification of Silicone for Biomedical Applications Requiring Long-Term Antibacterial, Antifouling, and Hemocompatible Properties, *Langmuir.* 28 (2012) 16408–16422. <https://doi.org/10.1021/la303438t>.
- [156] Z. Zhang, X. Feng, F. Xu, X. Hu, P. Li, B.-F. Liu, An improved surface modification of poly(dimethylsiloxane) via a green chemistry approach for on-chip biomolecular separation, *Anal. Methods.* 5 (2013) 4694. <https://doi.org/10.1039/c3ay40494c>.
- [157] A. Geissler, M.-F. Vallat, P. Fioux, J.-S. Thomann, B. Frisch, J.-C. Voegel, J. HemmerlÃ©, P. Schaaf, V. Roucoules, Multifunctional Stretchable Plasma Polymer Modified PDMS Interface for Mechanically Responsive Materials, *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 64–77. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900098>.
- [158] X. Ding, C. Yang, T.P. Lim, L.Y. Hsu, A.C. Engler, J.L. Hedrick, Y.-Y. Yang, Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-b-cationic polycarbonate diblock copolymers, *Biomaterials.* 33 (2012) 6593–6603. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.001>.
- [159] C. S guin, J.M. McLachlan, P.R. Norton, F. Lagugn -Labarthe, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) for microfluidic assay applications, *Applied Surface Science.* 256 (2010) 2524–2531. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.10.099>.

- [160] E.P. Magennis, A.L. Hook, P. Williams, M.R. Alexander, Making Silicone Rubber Highly Resistant to Bacterial Attachment Using Thiol-ene Grafting, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 30780–30787. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10986>.
- [161] I. Fundeanu, H.C. van der Mei, A.J. Schouten, H.J. Busscher, Polyacrylamide brush coatings preventing microbial adhesion to silicone rubber, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 64 (2008) 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.005>.
- [162] B. Wang, T. Jin, Y. Han, C. Shen, Q. Li, J. Tang, H. Chen, Q. Lin, Surface-initiated RAFT polymerization of p (MA POSS-*co*-DMAEMA⁺) brushes on PDMS for improving antiadhesive and antibacterial properties, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 65 (2016) 55–64. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1055631>.
- [163] Z.X. Voo, M. Khan, Q. Xu, K. Narayanan, B.W.J. Ng, R. Bte Ahmad, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, Antimicrobial coatings against biofilm formation: the unexpected balance between antifouling and bactericidal behavior, *Polym. Chem.* 7 (2016) 656–668. <https://doi.org/10.1039/C5PY01718A>.
- [164] H. Chen, Z. Zhang, Y. Chen, M.A. Brook, H. Sheardown, Protein repellent silicone surfaces by covalent immobilization of poly(ethylene oxide), *Biomaterials*. 26 (2005) 2391–2399. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.068>.
- [165] J. Xu, Y. Yuan, B. Shan, J. Shen, S. Lin, Ozone-induced grafting phosphorylcholine polymer onto silicone film to improve hemocompatibility, (n.d.) 1.
- [166] F. El Khadali, G. Hélarly, G. Pavon-Djavid, V. Migonney, Modulating Fibroblast Cell Proliferation with Functionalized Poly(methyl methacrylate) Based Copolymers: Chemical Composition and Monomer Distribution Effect, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 51–56. <https://doi.org/10.1021/bm015563x>.
- [167] A.-C. Crémieux, G. Pavon-Djavid, A.S. Mghir, G. Hélarly, V. Migonney, Bioactive Polymers Grafted on Silicone to Prevent Staphylococcus Aureus Prosthesis Adherence: In Vitro and in VIVO Studies, (n.d.) 8.
- [168] H.P. Felgueiras, S.D. Sommerfeld, N.S. Murthy, J. Kohn, V. Migonney, Poly(NaSS) Functionalization Modulates the Conformation of Fibronectin and Collagen Type I To Enhance Osteoblastic Cell Attachment onto Ti6Al4V, *Langmuir*. 30 (2014) 9477–9483. <https://doi.org/10.1021/la501862f>.
- [169] H.I. Meléndez-Ortiz, C. Alvarez-Lorenzo, G. Burillo, B. Magariños, A. Concheiro, E. Bucio, Radiation-grafting of N-vinylimidazole onto silicone rubber for antimicrobial properties, *Radiation Physics and Chemistry*. 110 (2015) 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.01.025>.
- [170] P. Yammine, G. Pavon-Djavid, G. Helary, V. Migonney, Surface Modification of Silicone Intraocular Implants To Inhibit Cell Proliferation, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 2630–2637. <https://doi.org/10.1021/bm058010l>.
- [171] S. Kang, J. Kim, S. Kim, M. Wufuer, S. Park, Y. Kim, D. Choi, X. Jin, Y. Kim, Y. Huang, B. Jeon, T.H. Choi, J.-U. Park, Y. Lee, Efficient reduction of fibrous capsule formation around silicone breast implants densely grafted with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymers by heat-induced polymerization, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 1580–1591. <https://doi.org/10.1039/C9BM01802F>.
- [172] J.U. Park, J. Ham, S. Kim, J.-H. Seo, S.-H. Kim, S. Lee, H.J. Min, S. Choi, R.M. Choi, H. Kim, S. Oh, J.A. Hur, T.H. Choi, Y. Lee, Alleviation of capsular formations on silicone implants in rats using biomembrane-mimicking coatings, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014) 4217–4225. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.07.007>.
- [173] V. Migonney, J.S. Baumann, C. Falentin-Daudre, H. Chouirfa, Process for grafting

- bioactive polymers onto metallic materials, WO/2017/025519, 2017.
- [174] H. Chouirfa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Grafting bioactive polymers onto titanium implants by UV irradiation, *RSC Adv.* 6 (2016) 13766–13771. <https://doi.org/10.1039/C5RA24497H>.
- [175] C. Vaquette, V. Viateau, S. Guérard, F. Anagnostou, M. Manassero, D.G. Castner, V. Migonney, The effect of polystyrene sodium sulfonate grafting on polyethylene terephthalate artificial ligaments on in vitro mineralisation and in vivo bone tissue integration, *Biomaterials.* 34 (2013) 7048–7063. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.058>.
- [176] G. Amokrane, C. Falentin-Daudré, S. Ramtani, V. Migonney, A Simple Method to Functionalize PCL Surface by Grafting Bioactive Polymers Using UV Irradiation, *IRBM.* 39 (2018) 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2018.07.002>.
- [177] G. Amokrane, V. Humblot, E. Jubeli, N. Yagoubi, S. Ramtani, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Fiber Scaffolds Functionalized by the Covalent Grafting of a Bioactive Polymer: Surface Characterization and Influence on in Vitro Biological Response, *ACS Omega.* 4 (2019) 17194–17208. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01647>.
- [178] A. Leroux, C. Egles, V. Migonney, Impact of chemical and physical treatments on the mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone) fibers bundles for the anterior cruciate ligament reconstruction, *PLoS ONE.* 13 (2018) e0205722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205722>.
- [179] S. Berlot, Z. Aissaoui, G. Pavon-Djavid, J. Belleney, M. Jozefowicz, G. Hélyary, V. Migonney, Biomimetic Poly(methyl methacrylate)-Based Terpolymers: Modulation of Bacterial Adhesion Effect, *Biomacromolecules.* 3 (2002) 63–68. <https://doi.org/10.1021/bm015580m>.
- [180] C. Latz, V. Migonney, G. Pavon-Djavid, P. Rieck, C. Hartmann, C. Latz, G. Renard, J.M. Legeais, Inhibition of lens epithelial cell proliferation by substituted PMMA intraocular lenses, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 238 (2000) 696–700. <https://doi.org/10.1007/s004170000153>.
- [181] M.L. Jewell, W.P.A. Jr, Betadine and Breast Implants, *Aesthetic Surgery Journal.* (2018) 4.
- [182] K. Kato, Y. Ikada, Selective adsorption of proteins to their ligands covalently immobilized onto microfibers, *Biotechnol. Bioeng.* 47 (1995) 557–566. <https://doi.org/10.1002/bit.260470508>.
- [183] J.H. Scofield, HARTREE-SLATER subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV, *J Electron Spectros Relat Phenomena.* 8 (1976) 129–137. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(76\)80015_1](https://doi.org/10.1016/0368-2048(76)80015_1).
- [184] P.J. Flory, J. Rehner, Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling, *The Journal of Chemical Physics.* 11 (1943) 521–526. <https://doi.org/10.1063/1.1723792>.
- [185] Nguyen et al. - 2021 - Influence of spin finish on degradation, functiona.pdf, (n.d.).
- [186] Q. Xu, M. Pang, L. Zhu, Y. Zhang, S. Feng, Mechanical properties of silicone rubber composed of diverse vinyl content silicone gums blending, *Materials & Design.* 31 (2010) 4083–4087. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2010.04.052>.
- [187] ISO (the International Organization for Standardization), (n.d.). <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:14607:ed-3:v2:en> (accessed February 11, 2021).
- [188] J. Wu, K. Niu, B. Su, Y. Wang, properties of silicone elastomer, *Polymer Degradation and Stability.* (2018) 10.
- [189] S. Necchi, D. Molina, S. Turri, F. Rossetto, M. Rietjens, G. Pennati, Failure of silicone gel

- breast implants: Is the mechanical weakening due to shell swelling a significant cause of prostheses rupture?, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 4 (2011) 2002–2008. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.06.019>.
- [190] D. Oldfield, T. Symes, Long term natural ageing of silicone elastomers, *Polymer Testing*. 15 (1996) 115–128. [https://doi.org/10.1016/0142-9418\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0142-9418(95)00018-6).
- [191] A.Y. Coran, Chemistry of the vulcanization and protection of elastomers: A review of the achievements, *J. Appl. Polym. Sci.* 87 (2003) 24–30. <https://doi.org/10.1002/app.11659>.
- [192] Z. Tan, R. Jaeger, G.J. Vancso, Crosslinking studies of poly(dimethylsiloxane) networks: a comparison of inverse gas chromatography, swelling experiments and mechanical analysis, *Polymer*. 35 (1994) 3230–3236. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90127-9).
- [193] P. Jones, M. Mempo, H. Hu, D. Chowdhury, M. Foley, R. Cooter, W.P. Adams, K. Vickery, A.K. Deva, The Functional Influence of Breast Implant Outer Shell Morphology on Bacterial Attachment and Growth:, *Plastic and Reconstructive Surgery*. 142 (2018) 837–849. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004801>.
- [194] M. Li, K.G. Neoh, L.Q. Xu, R. Wang, E.-T. Kang, T. Lau, D.P. Olszyna, E. Chiong, Surface Modification of Silicone for Biomedical Applications Requiring Long-Term Antibacterial, Antifouling, and Hemocompatible Properties, *Langmuir*. 28 (2012) 16408–16422. <https://doi.org/10.1021/la303438t>.
- [195] M. Ravikanth, K. Manjunath, C. Ramachandran, P. Soujanya, T. Saraswathi, Heterogeneity of fibroblasts, *J Oral Maxillofac Pathol*. 15 (2011) 247. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84516>.
- [196] J. Wang, Y. Wu, Y. Cao, G. Li, Y. Liao, Influence of surface roughness on contact angle hysteresis and spreading work, *Colloid Polym Sci*. 298 (2020) 1107–1112. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04680-x>.
- [197] International Organization for Standardization, “UNI EN ISO ISO 14607:2018” Non-Active Surgical Implants – Mammary Implants Particular Requirements., International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2009, (n.d.).
- [198] D.A. Puleo, R. Bizios, eds., *Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses*, Springer US, New York, NY, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98161-1>.
- [199] D.J. Fabrizio-Homan, S.L. Cooper, Competitive adsorption of vitronectin with albumin, fibrinogen, and fibronectin on polymeric biomaterials, *J. Biomed. Mater.* 25 (1991) 953–971. <https://doi.org/10.1002/jbm.820250804>.
- [200] B.-H. Choi, Y.S. Choi, D.G. Kang, B.J. Kim, Y.H. Song, H.J. Cha, Cell behavior on extracellular matrix mimic materials based on mussel adhesive protein fused with functional peptides, *Biomaterials*. 31 (2010) 8980–8988. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.027>.
- [201] J.R. Sharpe, R.L. Sammons, P.M. Marquis, Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics, *Biomaterials*. 18 (1997) 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00157-3).
- [202] C. Ribeiro, J.A. Panadero, V. Sencadas, S. Lanceros-Méndez, M.N. Tamaño, D. Moratal, M. Salmerón-Sánchez, J.L. Gómez Ribelles, Fibronectin adsorption and cell response on electroactive poly(vinylidene fluoride) films, *Biomed. Mater.* 7 (2012) 035004. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/3/035004>.
- [203] S.A. Hacking, E.J. Harvey, M. Tanzer, J.J. Krygier, J.D. Bobyn, Acid-etched microtexture for enhancement of bone growth into porous-coated implants, *The Journal of Bone and Joint Surgery*. British Volume. 85-B (2003) 1182–1189. [xix](https://doi.org/10.1302/0301-</p></div><div data-bbox=)

620X.85B8.14233.

- [204] I. Firkowska-Boden, X. Zhang, K.D. Jandt, Controlling Protein Adsorption through Nanostructured Polymeric Surfaces, *Adv. Healthcare Mater.* 7 (2018) 1700995. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700995>.
- [205] M.-E. Vlachopoulou, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, A. Tserepi, K. Beltsios, E. Gogolides, Effect of surface nanostructuring of PDMS on wetting properties, hydrophobic recovery and protein adsorption, *Microelectronic Engineering.* 86 (2009) 1321–1324. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2008.11.050>.
- [206] D. Le Guillou-Buffello, C. Chesneau, M. Gindre, G. H elary, P. Laugier, V. Migonney, Inhibition of angiogenesis in vitro with soluble copolymers monitored with a quartz crystal resonator, *IRBM.* 31 (2010) 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2010.10.001>.
- [207] T. Nishida, M. Inui, M. Nomizu, Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin–integrin interactions, *Progress in Retinal and Eye Research.* 47 (2015) 38–63. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.01.004>.
- [208] J.R. Potts, I.D. Campbell, Structure and function of fibronectin modules, *Matrix Biology.* 15 (1996) 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(96\)90133-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(96)90133-X).
- [209] L. Liu, C. Qin, W.T. Butler, B.D. Ratner, S. Jiang, Controlling the orientation of bone osteopontin via its specific binding with collagen I to modulate osteoblast adhesion, *J. Biomed. Mater. Res.* 80A (2007) 102–110. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30858>.
- [210] B. Henderson, S. Nair, J. Pallas, M.A. Williams, Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins, *FEMS Microbiol Rev.* 35 (2011) 147–200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00243.x>.
- [211] M.K. Bieniek, V. Llopis-Hernandez, K. Douglas, M. Salmeron-Sanchez, C.D. Lorenz, Minor Chemistry Changes Alter Surface Hydration to Control Fibronectin Adsorption and Assembly into Nanofibrils, *Adv. Theory Simul.* 2 (2019) 1900169. <https://doi.org/10.1002/adts.201900169>.
- [212] M. Cantini, K. Gomide, V. Moulisova, C. Gonz alez-Garc a, M. Salmer on-S anchez, Vitronectin as a Micromanager of Cell Response in Material-Driven Fibronectin Nanonetworks, *Adv. Biosys.* 1 (2017) 1700047. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700047>.
- [213] H.M. Kowalczy ska, R. Ko os, M. Nowak-Wyrzykowska, J. Dobkowski, D. Elbaum, A. Szczepankiewicz, J. Kami nski, Atomic force microscopy evidence for conformational changes of fibronectin adsorbed on unmodified and sulfonated polystyrene surfaces: Atomic Force Microscopy Evidence, *J. Biomed. Mater. Res.* 91A (2009) 1239–1251. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32473>.
- [214] F. Bathawab, M. Bennett, M. Cantini, J. Reboud, M.J. Dalby, M. Salmer on-S anchez, Lateral Chain Length in Polyalkyl Acrylates Determines the Mobility of Fibronectin at the Cell/Material Interface, *Langmuir.* 32 (2016) 800–809. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03259>.
- [215] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6544–6554. <https://doi.org/10.1021/ac0346712>.
- [216] A. Wagner, M. M uhlberger, C. Paulik, Photoinitiator-free photopolymerization of acrylate-bismaleimide mixtures and their application for inkjet printing, *J Appl Polym Sci.* 136 (2019) 47789. <https://doi.org/10.1002/app.47789>.
- [217] Polydispensing, (n.d.). https://polydispensing.com/wp-content/uploads/2017/06/FT_AC450-AC475-1.pdf.

Greffage d'un polymère bioactif sur des surfaces de silicone pour améliorer la réponse biologique

Dans ces travaux, nous avons développé une méthode simple qui a permis la fonctionnalisation des surfaces de silicone par le poly(styrène sulfonate) de sodium - polyNaSS grâce à la seule utilisation des irradiations UV à 365 nm. D'une part, pour activer la surface avec la création de groupements hydroxyles, et d'autre part, pour amorcer la polymérisation radicalaire en solution.

Au contact de cellules fibroblastiques L929, les surfaces fonctionnalisées ont permis une viabilité cellulaire augmentée avec des taux de survie supérieurs à 100% en comparaison avec des surfaces non modifiées. D'un point de vue morphologique, en présence du polyNaSS, les fibroblastes adoptent leurs formes actives c'est-à-dire totalement allongées et étirées sur la surface.

D'un point de vue mécanique, les irradiations UV connues pour leurs effets de réticulation et de vieillissement n'ont montré aucun impact significatif sur le module d'élasticité et le taux de réticulation avant et après modifications. Enfin, en complément des travaux ultérieurs du laboratoire où le rôle de la fibronectine dans l'adhésion cellulaire et la réponse bactérienne a été mise en évidence, nous avons montré avec la microscopie à force atomique un changement de la conformation de la protéine au contact d'une surface greffée avec un passage d'une structure fibrillaire à globulaire. Malgré le changement de conformation rendant moins visibles les domaines d'attachement aux adhésines des bactéries, les domaines RGD de la FN restent visibles aux intégrines des cellules ce qui assure leur attachement et prolifération.

Pour conclure, le greffage du polyNaSS à la surface de silicone consiste en une stratégie prometteuse pour lutter contre les issues bactériennes tout en améliorant la biocompatibilité. Cette stratégie ouvre la voie à d'autres applications biomédicales employant aussi le silicone comme matériau.

Grafting of a bioactive polymer on silicone surfaces to improve the biological response

In this work, we have successfully developed a simple way to graft a bioactive polymer carrying sulfonate groups, the poly(styrene sodium sulfonate) – polyNaSS, on silicone surfaces using UV irradiations at 365 nm. Firstly, to activate the surface by creating hydroxyls groups and secondly, to initiate the surface polymerization of NaSS monomers in an aqueous solution.

Once in contact with L929 fibroblasts, grafted surfaces have allowed improving morphologies of these cells. Observed elongated or spindle-shaped forms have highlighted the grafted surface's suitability. From a mechanical point of view, UV irradiations largely known for material aging have been demonstrated alteration-free on the elasticity modulus and crosslinking densities before and after surface modifications. Finally, complementary to the laboratory's previous work, the fibronectin's role in the adhesion and the bacterial response with the presence of polyNaSS has been highlighted. We have shown a modification of FN conformation in the presence of polyNaSS using atomic microscopy with a transition from a fibrillar to a globular structure. Moreover, the presence of fibronectin has allowed higher cell density. Despite the conformation change of the protein hiding its attachment sites to bacteria adhesins, their RGD domains responsible for cell attachment remain available to cells' integrins allowing their attachments and proliferation.

To sum up, the grafting of polyNaSS on silicone surfaces consists of a promising strategy to overcome bacterial issues while improving the material's biocompatibility. This method opens up solutions for other applications involving silicone as the main compound.