

UNIVERSITÉ PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

Influence du greffage covalent de polymères bioactifs sur des surfaces de PDMS sur la biocompatibilité et les propriétés antibactériennes

THÈSE DE DOCTORAT
présentée par

Anna WOZNIAK

Laboratoire de Chimie Bioorganique, Biophysique et Biomatériaux pour la Santé

UMR CNRS 7244

OR Biomaterials Engineering and Surface Treatment

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE

soutenue le 13 décembre 2024 devant le jury d'examen constitué de :

TOURRETTE Audrey, Professeure des Universités, Université Toulouse III – Paul Sabatier, Rapportrice

BLANCHEMAIN Nicolas, Professeur des Universités, Université de Lille, Rapporteur

CHAUBET Frédéric, Professeur des Universités, Université Sorbonne Paris Nord, Examineur

TADIER Solène, Maîtresse de conférences, INSA Lyon, Examinatrice

VAYRON Romain, Maître de conférences, Université Polytechnique Hauts-de-France, Examineur

FALENTIN-DAUDRÉ Céline, Maîtresse de conférences-HDR, Université Sorbonne Paris-Nord, Directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite dans un premier temps remercier les membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail. Mes deux rapporteurs, le Pr. Nicolas Blanchemain et le Pr. Audrey Tourrette, pour le temps accordé à l'expertise de ces travaux. Le Dr. Romain Vayron pour avoir accepté d'être examinateur de la thèse mais également pour m'avoir permis de réaliser les essais mécaniques et les analyses topographiques au sein de son laboratoire, pour son accueil et son aide. Je remercie également le Pr. Frédéric Chaubet d'accepter d'évaluer ma thèse, ainsi que le Dr. Solène Tadier que j'ai plaisir à retrouver dans ce cadre, après un stage de fin d'études réalisé dans son laboratoire qui m'a donné envie de poursuivre dans la recherche.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, le Dr. Céline Falentin-Daudré, pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ces travaux et pour son suivi permanent lors de ces trois années. Vous avez toujours su trouver les mots pour m'encourager à persévérer. J'ai apprécié travailler à vos côtés au laboratoire, où j'ai pu explorer de nombreux aspects du projet. Je vous suis reconnaissante pour les collaborations que vous avez facilitées ainsi que les occasions de participer à divers événements scientifiques, qui ont enrichi mon parcours.

Mes remerciements vont également au Dr. Vincent Humblot, grâce à qui les analyses XPS et interprétations ont pu voir le jour, ainsi que pour le partage de connaissances concernant la réalisation des analyses microbiologiques. Je le remercie pour son accueil, le temps accordé à tous ces travaux et aux expériences enrichissantes.

Un grand merci en particulier à mes « coworkers », Khaoula et Mylan. Pour les nombreuses réflexions et partages scientifiques, mais également amicaux et tous les rires. Vous avez rendu le travail quotidien agréable et mémorable. Je peux dire que vous avez contribué à mon évolution au cours de ces trois années, vous m'avez aidée à « oser » et m'avez éclairée dans tous les moments de doute. Je suis immensément ravie d'avoir croisé votre route !

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire CB3S et ceux que j'ai pu croiser pendant ces 3 années, en particulier les membres de l'équipe BEST pour tous les bons moments. Je souhaite une bonne continuation à Gabriel, Marion, Luis et Amal. Merci à Emanuela pour son accompagnement administratif et sa gentillesse, et merci au Dr. JS, pour son aide et ses conseils bienveillants. Je remercie aussi Elsa et Israa, qui ont passé quelques temps au laboratoire, pour leur bonne humeur et la bonne ambiance de travail véhiculée. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Mes derniers remerciements vont à mes parents, mes frères et ma sœur (mes modèles) et toute la famille, qui ont toujours été là pour moi et qui ont cru en moi. J'espère vous rendre fiers. Je remercie aussi tous mes amis, de prépa, d'école, pour leurs encouragements et attentions. Enfin mon plus gros remerciement va à mon meilleur soutien, Sam, tu sais déjà tout !

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations	xvi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 – Étude bibliographique.....	5
1. Le PDMS dans les implants et dispositifs médicaux	6
1.1. Le PDMS, un matériau d'intérêt	6
1.2. Mécanismes à l'interface biomatériau/milieu biologique	13
2. La fonctionnalisation de surface comme solution.....	24
2.1. Conférer des propriétés de surface et prévenir des infections	24
2.2. Greffage de polymères bioactifs : une méthode de fonctionnalisation par voie covalente	28
2.3. Influence des groupements chimiques portés par les polymères et rôle de leur architecture sur l'environnement biologique	34
2.4. Influence du solvant	41
3. Proposition de stratégies.....	42
3.1. Antériorité du laboratoire : utilisation de polymères bioactifs porteurs de groupements carboxylate et sulfonate	42
3.2. Greffage du poly(NaSS) sur des implants mammaires en PDMS.....	44
3.3. Greffage de polymères porteurs de groupements carboxylate	46
4. Conclusion.....	53
Chapitre 2 – Matériels et méthodes.....	55
1. Matériels.....	56
1.1. Surfaces de PDMS.....	56
1.2. Monomères et solvants	56
2. Stratégie de greffage.....	59
2.1. Méthode directe « grafting from ».....	59
2.2. Méthode indirecte « grafting to »	60
3. Caractérisations physico-chimiques du greffage.....	65
3.1. Mesure de l'angle de contact apparent	65

3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier et Réflectance Totale Atténuée (ATR-FTIR).....	65
3.3. Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS)	66
3.4. Dosage colorimétrique au bleu de toluidine (BT)	66
3.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton.....	68
4. Analyses topographiques des surfaces et essais mécaniques	70
4.1. Essais de Traction	70
4.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) – Module d’analyses dispersives en énergie (EDX).....	71
4.3. Rugosité de surface au profilomètre optique	72
4.4. Microscopie électronique à force atomique (AFM)	72
5. Etude de la réponse biologique	74
5.1. Culture cellulaire	74
5.2. Mise en évidence de la morphologie des cellules et de leur prolifération en surface ...	75
5.3. Tests de viabilité cellulaire	76
5.4. Adsorption de protéines	78
5.5. Caractérisations et quantification des protéines en surface	80
6. Évaluation de la réponse microbiologique	85
6.1. Matériels	85
6.2. Culture bactérienne et dépôt sur les surfaces.....	85
6.3. Analyses du développement bactérien en surface	86
Chapitre 3 – Fonctionnalisation chimique de surfaces de PDMS par des groupements carboxylates et caractérisations	91
1. Greffage covalent par irradiations UV des surfaces de PDMS	92
1.1. Mise en œuvre de la méthode de greffage	92
1.2. Stratégie de greffage.....	96
2. Adaptation du protocole de greffage et caractérisations du greffage covalent	106
2.1. Modification du protocole : contrôle du pH de la solution de monomère.....	106
2.2. Caractérisations du greffage des surfaces de PDMS par le PAAc dans des conditions de pH modifié en solution	114
2.3. Conclusion partielle.....	120
3. Etat de surface du PDMS greffé.....	122
3.1. Aspect de surface au microscope électronique à balayage	122
3.2. Comportement de surface et rugosités	125
4. Essais de traction.....	130

5.	Cinétique de greffage	132
6.	Conclusion partielle.....	136
Chapitre 4 – Analyses biologiques et microbiologiques des surfaces de PDMS greffées par le PAAc.....		139
1.	Premières réponses biologiques en surface de PDMS greffé par le PAAc-pH	140
1.1.	Viabilité cellulaire.....	140
1.2.	Morphologie et prolifération des cellules.....	141
2.	Adsorption de protéines et rôle dans les mécanismes de surfaces	147
2.1.	Choix des protéines et adsorption.....	147
2.2.	Interactions entre la surface de PDMS fonctionnalisée et les protéines.....	149
2.3.	Morphologie et prolifération des cellules en présence de protéines.....	153
2.4.	Quantification des protéines en surface.....	158
2.5.	Vers une analyse du comportement des protéines en surface	162
3.	Comparaison des effets de surface du PAAc et du PNaSS.....	169
3.1.	Morphologie et prolifération	169
3.2.	Adsorption de protéines.....	170
3.3.	Interactions entre les polymères bioactifs et le collagène, vers des perspectives d’immobilisation de composés en surface.....	174
3.4.	Conclusion partielle.....	180
4.	Analyses microbiologiques	183
4.1.	Choix des conditions et des bactéries.....	183
4.2.	Résultats	183
5.	Bilan	187
Chapitre 5 – Perspectives analytiques de la fonctionnalisation de surfaces de PDMS		191
1.	Rôle du motif moléculaire du polymère bioactif sur les propriétés de surface.....	192
1.1.	Choix des monomères	193
1.2.	Greffage en surface du PDMS.....	194
1.3.	Caractérisations	195
1.4.	Évaluation de la réponse biologique.....	203
1.5.	Bilan	210
2.	Vers un greffage de polymères bioactifs à architecture contrôlée.....	212
2.1.	Stratégies	212
2.2.	Autres stratégies.....	217
2.3.	Bilan	218

3. Greffage du copolymère AAc/NaSS en surface de PDMS	219
4. Conclusion partielle.....	223
Conclusion générale	225
Annexes	231
Annexe 1.....	231
Annexe 2.....	232
Annexe 3.....	234
Annexe 4.....	235
Annexe 5.....	237
Production scientifique.....	239
Publications scientifiques	239
Références bibliographiques	241

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique du poly(diméthylsiloxane).....	6
Figure 2 : Photographies d'échantillons de PDMS de différentes texturations issues d'enveloppes d'implants mammaires et mesures de leur angle de contact apparent [8].....	7
Figure 3 : Étapes clés autour du développement du silicone [3].....	9
Figure 4 : Images AFM du fibrinogène sur a) une surface hydrophile, b) une surface hydrophobe [35].....	15
Figure 5 : Schéma simplifié d'une protéine et de ses interactions principales [20]	16
Figure 6 : Illustration schématique du potentiel mécanisme représentatif de l'effet Vroman [41]	17
Figure 7 : Évolution temporelle de l'adhésion de protéines du sérum lors de l'exposition à un milieu de culture supplémenté par 2 % de PBS (ligne continue), et fraction de cellules adhérentes sur les SAMs-NH ₂ (pointillés). [42].....	17
Figure 8 : Schéma représentant la structure de la fibronectine et l'interaction de son domaine RGD avec les intégrines des cellules [43].....	18
Figure 9 : Schéma de la contracture capsulaire et ses effets	21
Figure 10 : Mécanisme de formation du biofilm bactérien en surface d'implant en silicone [11]	23
Figure 11 : Représentation schématique des effets bactériostatiques et bactéricides induits par la modification de matériau pour sonde [25].....	24
Figure 12 : Schéma regroupant les principales stratégies de fonctionnalisation de surface d'implants [11].....	25
Figure 13 : Représentation schématique des stratégies d'activation de surface de PDMS utilisant des sources d'énergie [11].....	28
Figure 14 : Observations en microscopie à fluorescence de l'adhésion de cellules de moelle osseuse humaine sur des surfaces de polyuréthane greffées par de l'acide méthacrylique par plasma ou irradiations UV [70].....	29
Figure 15 : Images par AFM des surfaces de polyuréthane non modifiées et modifiées [70] .	30
Figure 16 : Représentation schématique des stratégies de greffage : A) « grafting to », B) « grafting from » et C) « grafting through » [10].....	31
Figure 17 : Représentation schématique a) des configurations possibles adoptées par les chaînes de polymère greffées en surface, b) de la densité de chaînes pouvant être greffées en fonction de leur configuration [10]	32
Figure 18 : Comportement de la goutte de liquide a) sur une surface plane selon le modèle d'Young ; sur une surface rugueuse selon b) l'état de Wenzel et c) l'état de Cassie-Baxter [19]	34
Figure 19 : Changement des structures secondaires du BSA adsorbé à (A) 0,1 mg.mL ⁻¹ et (B) 1,0 mg.mL ⁻¹ sur les SAMs en comparaison à la conformation native de la protéine (n = 6 ; NS = non significatif ; p < 0,05) [79]	36

Figure 20 : Changements en structures secondaires du Fg adsorbé à (A) 0,1 mg.mL ⁻¹ , (B) 1,0 mg.mL ⁻¹ et (C) 10,0 mg.mL ⁻¹ sur les SAMs en comparaison à sa conformation native (n = 6 ; * = non significatif; p < 0,05) [39]	37
Figure 21 : Formule chimique de la molécule d'héparine	38
Figure 22 : Étude de la prolifération des cellules de McCoy sur des surfaces de PMMA fonctionnalisées par des terpolymères MMA/MA/NaSS de différentes compositions [24]	43
Figure 23 : Images AFM de surfaces de PDMS a) non greffé, b) greffé poly(NaSS), sur lesquelles la fibronectine a été adsorbée 60 minutes [96]	45
Figure 24 : Densité de vaisseaux sanguins autour d'implants en polypropylène non modifiés et modifiés après 2, 3 et 4 semaines [109]	48
Figure 25 : Schéma descriptif des étapes (a) et de la structure (b) de la multifonctionnalisation de sondes en silicone [112].....	50
Figure 26 : Schéma de la stratégie de fonctionnalisation de sondes avec immobilisation d'antibiotiques [114]	51
Figure 27 : Inhibition de l'adhésion de (d) <i>S. aureus</i> , (e) <i>E. coli</i> et (f) <i>P. aeruginosa</i> sur des surfaces de sondes en PVC greffées par du MAc avec immobilisation de ciprofloxacine [114]	51
Figure 28 : Implant mammaire en PDMS (ALLERGAN).....	56
Figure 29 : Schéma de greffage et méthode de polymérisation "grafting from"	60
Figure 30 : Photographies des dispositifs de source de rayonnements UV : a) lampe à mercure Lot Oriel (LO), b) pavé LED Omnicure.....	60
Figure 31 : Formules chimiques des molécules d'ancrage : Acrylamide de Dopamine et Acide Caféique	61
Figure 32 : Stratégies d'adhésion des polymères par la méthode "grafting to"	61
Figure 33 : Schéma de synthèse de l'acrylamide de dopamine	63
Figure 34 : Schéma de synthèse du pNaSS-SH.....	64
Figure 35 : Schéma de principe de mesure d'angle de contact apparent	65
Figure 36 : Formule chimique de la molécule de bleu de toluidine et schéma de complexation de la molécule de BT en surface de PDMS.....	67
Figure 37 : a) Courbe d'étalonnage des solutions de BT, b) Concentrations correspondantes. 68	
Figure 38 : Exemple de courbe représentative du comportement en contrainte-déformation d'un élastomère.....	70
Figure 39 : Capsule et appareil de traction utilisés, et éprouvette en PDMS	71
Figure 40 : Profilomètre optique RD ContourGT-K (Bruker).....	72
Figure 41 : Principe de fonctionnement du microscope à force atomique [123]	73
Figure 42 : Schéma de principe du test MTT	78
Figure 43 : Exemple de séparation de la bande amide I de fibronectine adsorbée sur une surface de PDMS greffée par le PNaSS. La somme des aires des bandes structurales correspond à l'aire sous la courbe d'ajustement (fittage) en orange	82
Figure 44 : Structure moléculaire du bleu de Coomassie G-250 (méthode de Bradford).....	82

Figure 45 : a) Concentration et absorbance des solutions de BSA utilisées pour réaliser la courbe d'étalonnage de la méthode de Bradford; b) Courbe d'étalonnage correspondante.....	83
Figure 46 : Exemple du changement de couleur des solutions de protéines en présence de solution de Bradford.....	84
Figure 47 : Exemple de structure d'une courbe de croissance bactérienne, représentant le nombre de bactérie N par unité de volume en fonction du temps, avec un taux d'accroissement μ	86
Figure 48 : a) Ensemenceur automatique, b) Appareil de comptage de colonies bactériennes et logiciel, c) Exemple de boîtes de géloses obtenues après croissance bactérienne	87
Figure 49 : Extrait du logiciel de comptage de colonies bactériennes	88
Figure 50 : Images acquises au MEB des faces externes, a) grossissement 150x, b) grossissement 500x et internes c) grossissement 150x, d) grossissement 500x d'enveloppes de PDMS d'implants mammaires	92
Figure 51 : Images MEB de la tranche d'un échantillon de PDMS, a) grossissement 150x, b) grossissement 400x	93
Figure 52 : Spectre FTIR de surface de PDMS étudiée	94
Figure 53 : Exemple de mesure d'angle de contact apparent sur une surface de PDMS déterminé grâce au système de mesure KRUSS GmbH DAS10.....	94
Figure 54 : Mise en évidence par spectroscopie FTIR de la présence de groupements réactifs hydroxyles sur des surfaces de PDMS activées sous irradiations UV [77].....	97
Figure 55 : Dispositif de greffage des échantillons de silicone sous irradiations UV	98
Figure 56 : Schéma du mécanisme de polymérisation radicalaire par la méthode « grafting from » sur une surface de PDMS	99
Figure 57 : État de surface d'un échantillon de PDMS greffé par le PMAc (0,35 M) sous irradiations UV (LO).....	100
Figure 58 : État de surface d'un échantillon de PDMS greffé sous irradiation UV LO (0,35 m) par a) PMAc, b) PAAc.....	100
Figure 59 : Spectres FTIR de surfaces de PDMS non greffée et a) greffée PAAc, b) greffée PMAc	101
Figure 60 : Taux de greffage moyens du PDMS non greffé, greffé PMAc et greffé PAAc ...	102
Figure 61 : a) aWCA et b) taux de greffage des surfaces de PDMS greffées par le PMAc et le PAAc sous irradiations UV-LO et UV-LED (0,35 M)	104
Figure 62 : a) aWCA et b) Taux de greffage, des surfaces de PDMS greffées par le PMAc à 0,35 M et 0,2 M sous UV-LO et UV-LED	105
Figure 63 : Schéma de la stratégie de greffage "grafting from" en surface du PDMS avec ajustement du pH de la solution de polymérisation	106
Figure 64 : a) aWCA des surfaces de PDMS greffées PMAc sous différentes conditions de pH du milieu, b) Taux de greffage du PMAc en surface du PDMS à $\text{pH} \approx \text{pKa}(\text{MAc}) + 1$	107
Figure 65 : Spectres FTIR du PDMS non greffé et greffé avec le PMAc et PMAc avec ajustement du pH du milieu à $\text{pKa}(\text{MAc}) + 1$	108
Figure 66 : a) WCA et b) taux de greffage du PMAc en surface du PDMS pour différents temps de polymérisation.....	109

Figure 67 : a) aWCA et b) Taux de greffage du PMAc-pH en surface de PDMS en présence d'amorceur de polymérisation	110
Figure 68 : a) aWCA et b) taux de greffage du PMAc en surface du PDMS dans différents solvants organiques	111
Figure 69 : Spectres FTIR des surfaces de PDMS greffées dans différents solvants organiques	112
Figure 70 : Etat de surface d'un échantillon de PDMS greffé par le PMAc dans du toluène	112
Figure 71 : Comparaison des états de surface du PDMS non greffé, greffé par le PAAc et par le PAAc-pH	113
Figure 72 : Comparaison des aWCA des greffages du PAAc et du PAAc-pH en surface du PDMS	114
Figure 73 : Comparaison des spectres FTIR des surfaces de PDMS non greffée, greffée PAAc et greffée PAAc-pH.....	115
Figure 74 : Comparaison des taux de greffage entre une surface non greffée, greffée PAAc et greffée PAAc-pH.....	116
Figure 75 : Comparaison des taux de greffages en surface du PDMS dans les conditions expérimentales retenues : greffage PMAc, PAAc et PAAc-pH.....	117
Figure 76 : Spectres XPS haute résolution pour (a) C1s et (b) O1s, montrant l'apparition des groupements caractéristiques liés au PMAc et au PAAc, en comparaison au PDMS témoin	119
Figure 77 : a) aWCA et b) Spectres FTIR obtenus après physisorption du MAc et de l'AAc en surface de PDMS.....	120
Figure 78 : Images MEB de PDMS non greffé : A1) 150x, A2) 3000x; PDMS greffé PMAc : B1) 150x, B2) 3000x; PDMS greffé PAAc : C1) 150x, C2) 3000x; PDMS greffé PAAc-pH : D1) 150x, D2) 3000x	124
Figure 79 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b) greffé PMAc, c) greffé PAAc et d) greffé PAAc-pH.....	126
Figure 80 : Topographies de surfaces de PDMS greffées par le poly(NaSS).....	128
Figure 81 : Rugosités de surface / Hauteurs moyennes arithmétiques de PDMS non greffé et greffé	128
Figure 82 : Courbe contrainte/déformation correspondantes aux essais de tractions effectués sur des échantillons de PDMS greffés dans différentes conditions.....	131
Figure 83 : Modules d'Young associés aux essais de traction du PDMS pour différents greffages de surface.....	131
Figure 84 : Spectres FTIR du greffage du PAAc-pH en surface du PDMS après différents temps de polymérisation.....	133
Figure 85 : aWCA en surface de PDMS greffée par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation	133
Figure 86 : Taux de greffages en surface de PDMS greffée par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation.....	134
Figure 87 : Images MEB des surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation : a) non greffée, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min et f) 90 min.....	135

Figure 88 : a) Taux de viabilité cellulaire en surface de PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH. b) Photographie de l'expérience MTT réalisée sur la surface de PDMS fonctionnalisée à gauche et non greffé à droite	141
Figure 89 : Images au microscope optique de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH et incubées avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x.....	142
Figure 90 : Images au microscope optique de surfaces de PDMS non greffées et incubées avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x.....	143
Figure 91 : Étude de la prolifération des fibroblastes en surface de PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation.....	144
Figure 92 : (a) Schéma descriptif de la préparation de surfaces de PDMS greffées de différentes structures de PAAc par photolithographie; (b) Épaisseur de la capsule fibreuse formée autour des implants de PDMS et (c) densité de collagène présente dans la capsule [31]	146
Figure 93 : Représentation schématique des protéines utilisées : a) la BSA [137], b) la Fn [140], et c) le Fg [35]	148
Figure 94 : Spectres FTIR du PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH adsorbé par : a) la BSA, b) la Fn, c) le Fg	150
Figure 95 : Angles de contact apparents mesurés sur le PDMS a) non greffé et b) greffé par le PAAc-pH, avant et après adsorption des protéines	152
Figure 96 : Schéma représentant la structure d'une sous-unité de la fibronectine. L'acronyme BD (« Binding Domains ») indique les sites de liaisons spécifiques. [138].....	153
Figure 97 : Images au microscope optique de PDMS-Fn incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x	154
Figure 98 : Photographies de PDMS-Fn après a) 3 jours et b) 7 jours d'incubation avec des fibroblastes	154
Figure 99 : Images au microscope optique de PDMS-g-Fn incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x	155
Figure 100 : Photographies de PDMS-g-Fn après, a) 3 jours et b) 7 jours d'incubation avec des fibroblastes, et c) Image au microscope optique en bordure de PDMS-g-Fn à grossissement 4x après 7 jours d'incubation de fibroblastes.....	155
Figure 101 : Représentation schématique de l'adsorption d'une protéine (Fn) sur un échantillon de PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH et hypothèses sur les différentes interactions possibles.....	156
Figure 102 : Représentation schématique du changement d'orientation d'une protéine chargée, induite par les densités de charge de surface [38]	157
Figure 103 : Absorbances mesurées après dosage par la méthode de Bradford de solutions de a) BSA, b) Fn et c) Fg, déposées sur du PDMS non greffé et greffé	160

Figure 104 : Représentation schématique des structures secondaires des protéines en hélice α , mélange d'hélice α et feuillet β , et feuillet β [127].....	163
Figure 105 : Exemple de la déconvolution de la bande amide I de protéine adsorbée sur une surface de PDMS fonctionnalisée par le PAAc-pH.....	164
Figure 106 : Spectre FTIR du PDMS greffé par le PAAc-pH (trait jaune) et du PDMS-g-Fn (trait bleu pointillé).....	165
Figure 107 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées et greffées par le PAAc-pH.....	167
Figure 108 : Images au microscope optique de la prolifération des fibroblastes en surface d'échantillon de PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et le PNaSS après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation.....	169
Figure 109 : Étude de la prolifération des fibroblastes en surface de PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et par le PNaSS, après 3 jours et 7 jours d'incubation.....	170
Figure 110 : Spectre FTIR de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH (trait pointillé bleu) et par le PNaSS (trait orange continu) adsorbé par la Fn.....	171
Figure 111 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées, greffées par le PAAc-pH et par le PNaSS.....	173
Figure 112 : Essais d'adsorption de collagène sur du PDMS non greffé et greffé PAAc-pH pendant 1 heure et 24 heures.....	176
Figure 113 : État des surfaces de PDMS colorées après incubation de fibroblastes pendant 2 heures puis adsorption de collagène pendant 24 heures, pour des surfaces non greffées, greffées PAAc-pH et greffées PNaSS à grossissements 4x et 10x.....	177
Figure 114 : État des surfaces de PDMS colorées après incubation en présence d'un mélange de fibroblastes et de collagène pendant 24 heures, pour des surfaces non greffées, greffées PAAc-pH et greffées PNaSS à grossissements 4x et 10x.....	178
Figure 115 : Images AFM du Fg déposé sur des surfaces hydrophobes a) chargées positivement, b) chargées négativement, la forme en « U » de certaines protéines est visible sur l'image (B) [150].....	181
Figure 116 : Concentration en <i>S. epidermidis</i> adhérent sur les surfaces de PDMS (CFU/mL) (a) sans adsorption préalable de protéines, (b) avec pré-adsorption de Fn et (c) avec pré-adsorption de Fg.....	185
Figure 117 : Schéma illustratif des interactions possibles entre le PDMS greffé (PAAc ou PNaSS), les protéines et les cellules.....	192
Figure 118 : Schéma moléculaire de a) l'acide vinylbenzoïque et b) l'acide 4-(4-(acryloyloxy)butoxy)benzoïque.....	193
Figure 119 : Mesures d'angles de contact apparents sur les surfaces de PDMS greffées par le PVAc et le PAbAc en comparaison au PDMS non greffé.....	196
Figure 120 : Taux de greffage moyens du PDMS non greffé et a) greffé PVAc et b) greffé PAbAc.....	197
Figure 121 : Spectres FTIR de surfaces de PDMS non greffée et a) greffée PVAc, b) greffée PAbAc.....	198

Figure 122 : Images MEB du PDMS greffé PVAc à grossissement A1) 150x, A2) 3000x ; et greffé PAbAc à grossissement B1) 150x, B2) 3000x.....	200
Figure 123 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b), c) et d) greffé PVAc sur différents échantillons et différentes zones	201
Figure 124 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b), c) et d) greffé PAbAc sur différents échantillons et différentes zones	202
Figure 125 : Rugosités de surface / Hauteurs moyennes arithmétiques du PDMS non greffé et greffé	203
Figure 126 : Viabilité cellulaire en surface d'échantillon non greffé et a) greffé PVAc, b) greffé PAbAc.....	204
Figure 127 : Images au microscope optique de PDMS greffé par le PVAc incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x, f) grossissement 40x.....	205
Figure 128 : Images au microscope optique de PDMS non greffé incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x, f) grossissement 40x.....	206
Figure 129 : Viabilité cellulaire en surface de PDMS non greffé et greffé PVAc avec adsorption préalable de Fn	207
Figure 130 : Taux de prolifération des cellules sur le PDMS greffé par le PVAc par rapport au PDMS non greffé a) directement sur les surfaces, b) avec adsorption préalable de Fn sur le PDMS.....	207
Figure 131 : Mise en évidence des positions spectrales des bandes amide I des protéines (BSA, Fn et Fg) adhérees sur les surfaces de PDMS fonctionnalisées par le PVAc.....	208
Figure 132 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées, greffées par le PAAc-pH, par le PNaSS et par le PVAc.....	209
Figure 133 : Stratégie "grafting to" par la voie n°1.....	212
Figure 134 : Spectres FTIR a) de l'ADOPA (10 mg.mL ⁻¹ dans l'eau) adhéree en surface du PDMS, b) de l'acide caféique (10 mg.mL ⁻¹ dans l'éthanol) adhéree sur le PDMS	214
Figure 135 : Stratégie "grafting to" par la voie n°2.....	215
Figure 136 : Mesure du taux de greffage en surface du PDMS adhéree par le produit click ADOPA-pNaSS-SH en comparaison au PDMS non greffé	216
Figure 137 : a) Pourcentage de <i>S. epidermidis</i> calculé sur des surfaces de silicone contrôles (DW) en comparaison à des surfaces fonctionnalisées avec la ZW-DOPA. b) Épaisseur de la capsule formée autour d'implant en silicone contrôles et fonctionnalisés par la ZW-DOPA, implantés chez la souris [99].....	217
Figure 138 : Photographies d'expériences de polymérisation oxydative de l'ADOPA à a) début d'expérience, b) 0,5 mg.mL ⁻¹ et c) 1 mg.mL ⁻¹	218
Figure 139 : a) aWCA et b) taux de greffages obtenus pour le greffage du copolymère PAAc/PNaSS avec et sans ajustement du pH, en comparaison au PDMS non greffé	219

Figure 140 : a) aWCA et b) taux de greffages obtenus du copolymère PMAc/PNaSS en comparaison au PDMS non greffé 221

Figure 141 : Images au microscope optique de la prolifération des fibroblastes en surface d'échantillons de PDMS non greffé, greffé CoMA et greffé PMAc après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation..... 222

Figure 142 : Scans AFM de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH a) seul, b) avec adsorption de Fn, c) avec adsorption de Fg..... 226

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales propriétés d'un PDMS Sylgard 184® [5].....	6
Tableau 2 : Matériaux constitutifs des sondes et leurs caractéristiques [3].....	11
Tableau 3 : Rugosités de surface R_a (nm) de polyuréthane non modifié et modifié [70]	30
Tableau 4 : Résumé des stratégies de greffage du PDMS utilisées dans la littérature, classées en fonction de la méthode d'oxydation utilisée	33
Tableau 5 : Angle de contact des SAMs porteurs de différents groupements (n = 7) [79]	36
Tableau 6 : Angle de contact des SAMs porteurs de différents groupements (n = 7)	37
Tableau 7 : Monomères et polymères utilisés pour fonctionnaliser les surfaces de PDMS.....	58
Tableau 8 : Réactifs et leur quantité pour la synthèse de l'acrylamide de dopamine	62
Tableau 9 : Réactifs et leur quantité pour la formation du pNaSS-SH.....	64
Tableau 10 : Résumé des expériences réalisées en présence de collagène	80
Tableau 11 : Conditions étudiées en microbiologie	85
Tableau 12 : Détermination par EDX de la composition de l'enveloppe d'implant mammaire en PDMS	93
Tableau 13 : Détermination par EDX de la composition du poly(diphénysiloxane) inséré dans l'épaisseur de l'échantillon en PDMS	93
Tableau 14 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surface de PDMS greffées dans différentes conditions. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné).....	118
Tableau 15 : Pourcentages atomiques des fractions chimiques de chaque élément, obtenus à partir de la décomposition des spectres XPS haute résolution pour C1s et O1s présentés Figure 76	119
Tableau 16 : Résumé des propriétés de surface du PDMS greffé dans les conditions retenues	121
Tableau 17 : Concentrations surfaciques en protéines adsorbées sur le PDMS non greffé et greffé, obtenues après dosage par la solution de Bradford.....	161
Tableau 18 : Positions des maxima des bandes spectrales attribuées à l'amide I et l'amide II sur les spectres FTIR Figure 94 et rapports des intensités des bandes amide I/II	162
Tableau 19 : Position des maxima des bandes spectrales attribuées à l'amide I et l'amide II sur les spectres FTIR du PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et le PNaSS, et rapports des intensités des bandes amide I/II.....	171
Tableau 20 : Concentrations surfaciques calculées en surface d'échantillon de PDMS greffé par le PNaSS adsorbé par les différentes protéines après dosage indirect utilisant la solution de Bradford.....	172
Tableau 21 : Résumé des tendances à la diminution ou à l'augmentation de la proportion en différentes structures secondaires des protéines sur des surfaces greffées par le PAAc-pH et le PNaSS en comparaison aux surfaces de PDMS non greffées	174
Tableau 22 : Bilan des principales différences observées en surface de PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH et le PNaSS à l'égard des cellules, des protéines et bactéries étudiées	188

Tableau 23 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surface de PDMS non greffé et greffé PVAc. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné).....	199
Tableau 24 : Tableau résumé des principaux résultats de caractérisations des différents greffages réalisés en surface de PDMS	211
Tableau 25 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surfaces de PDMS non greffées et avec fixation d'ADOPA-pNaSS-SH. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné).....	216
Tableau 26 : Rapports de réactivité des monomères NaSS, MAc et AAc.....	220
Tableau 27 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surfaces de PDMS non greffées et greffées CoMA. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné)	221

Liste des abréviations

AAc : Acide Acrylique

ACVA : Acide 4,4'-Azobis(4-cyanovalérique)

AFM : Microscopie à Force Atomique

aWCA : Angle de contact apparent (« Apparent Water Contact Angle »)

BIA-ALCL : Lymphome anaplasique à grandes cellules (« Breast Implant Associated – Anaplastic Large Cell Lymphoma »)

BSA : Albumine de sérum bovin (« Bovin Serum Albumin »)

BT : Bleu de toluidine

CC : Contracture Capsulaire

CVD : Dépôt chimique en phase gazeuse (« Chemical Vapor Deposition »)

DMEM : « Dulbecco's Modified Eagle Medium »

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDX : Spectroscopie d'analyse dispersive en énergie (« Energy-Dispersive X-ray spectroscopy »)

FBR : Réaction à un corps étranger (« Foreign Body Reaction »)

Fg : Fibrinogène

Fn : Fibronectine

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (« Fourier Transform Infrared Spectroscopy »)

ISO : Organisation internationale de normalisation (« International Organization for Standardization »)

LAGC : Lymphome anaplasique à grandes cellules

LbL : Layer-by-Layer

LO : Lot Oriel

MAc : Acide Méthacrylique

MEMS : Systèmes électromécaniques (« Micro Electro-Mechanical Systems »)

MEB : Microscopie électronique à balayage

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaSS : Styène Sulfonate de Sodium

NG : Non greffé

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PAbAc : Acide 4-(4-poly(Acryloyloxy)butoxy)benzoïque

PAAc : Acide poly(acrylique)

PEG : Poly(éthylène glycol)

PEO : Oxyde de poly(éthylène)

PBS : Tampon Phosphate Salin (« Phosphate Buffered Saline »)

PCL : Poly(caprolactone)

PDMS : Poly(diméthylsiloxane)

PMAc : Acide poly(méthacrylique)

PNaSS ou PolyNaSS : Poly(styène sulfonate) de sodium

PSM : Poste de sécurité microbiologique

PVAc : Acide poly(vinylbenzoïque)

QCM : Microbalance en cristal de quartz (« Quartz Crystal Microbalance »)

R. Pickettii : *Ralstonia Pickettii*

RAFT : « Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer »

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAM : Monocouches auto-assemblées (« Self-Assembled Monolayer »)

S. aureus : *Staphylococcus Aureus*

S. epidermidis : *Staphylococcus Epidermidis*

TA : Température ambiante

TCP : Flasque de culture tissulaire en poly(styrène) (« Tissue Culture Plastic »)

THF : Tétrahydrofurane

UV : Ultra-Violet

Introduction générale

L'utilisation du matériau poly(diméthylsiloxane) (PDMS) dans les implants et dispositifs médicaux est très répandue dans le domaine biomédical. Le matériau est biocompatible, hautement avantageux d'un point de vue mécanique, facile à fabriquer et peu coûteux. Il convient de l'utiliser par exemple pour l'élaboration d'implants mammaires, intégrant la classe III des dispositifs implantables donc à risque élevé pour la santé, mais également pour des dispositifs semi-implantés comme les sondes. En raison de ses nombreuses propriétés, le PDMS est également adapté au développement de micro- et nano-systèmes fluidiques. Ce biomatériau est donc adapté pour soigner les patients tout en maintenant l'intégrité du corps humain le plus longtemps possible.

Néanmoins, ces implants peuvent être soumis à des complications. Des rejets, ou encore des infections bactériennes sont observés, nécessitant une nouvelle opération après plusieurs années. De la même manière, les dispositifs médicaux sont sujets à de nombreuses infections nosocomiales dangereuses pour le patient et nécessitant le remplacement du dispositif. À titre d'exemple, par jour, environ 4 sondes sur 1000 sont infectées aux États-Unis. La situation nécessite alors une intervention et entraîne un coût d'environ 46 000 \$ par infection. Les propriétés du matériau peuvent contribuer au développement de ces infections. Le PDMS, par son caractère hautement hydrophobe, engendre l'adhésion et l'accumulation d'organismes biologiques à sa surface, dont certaines bactéries, et favorise l'encrassement. En conséquence les surveillances sanitaires s'accroissent et les normes se font de plus en plus strictes. De nos jours, les chercheurs mettent alors au point de nouveaux biomatériaux toujours plus performants ou les modifient afin de prévenir ou limiter ces problèmes.

Motivé par les scandales PIP (Poly Implant Prothèses) et le développement du lymphome anaplasique à grandes cellules, le laboratoire CB3S s'est intéressé aux problématiques liées aux implants mammaires en PDMS. Deux thèses se sont consacrées à ce sujet, pour lesquelles les objectifs se rejoignent autour de la prévention ou de la limitation des risques d'infections. La fonctionnalisation de surface du PDMS par un polymère bioactif, le poly(styrène sulfonate) de sodium, spécialité du laboratoire, s'est présenté comme une solution de choix. En effet, l'immobilisation covalente de ces polymères permet de conférer de nouvelles propriétés au matériau, tout en conservant ses caractéristiques initiales. Dans le cas de l'implant mammaire, les caractéristiques mécaniques doivent être conservées : le matériau doit rester élastique et ne pas être altéré pour éviter la rupture et la libération du gel de silicone. Bien évidemment, le maintien de la biocompatibilité de l'implant, voire son amélioration est également au cœur des enjeux.

Cette stratégie s'est montrée pertinente. Un protocole simple a été mis en œuvre afin de greffer de manière covalente le polymère. En outre, les caractérisations biologiques ont permis

de mettre en évidence l'amélioration de l'intégration de l'implant. Néanmoins les essais microbiologiques ne sont pour le moment pas concluants. Alors, dans un souci d'optimisation, le greffage de nouveaux polymères bioactifs présentant d'autres propriétés s'est présenté comme une alternative.

L'objectif de cette thèse est alors de conférer de nouvelles caractéristiques de surface au PDMS, notamment par le greffage de polymères bioactifs ayant des propriétés antiadhésives. Le but est de limiter l'accumulation de matériel biologique et de prévenir les infections bactériennes. Par ailleurs, il est souhaitable d'étendre ces stratégies de fonctionnalisation à d'autres dispositifs en PDMS. Cependant, les mécanismes se produisant à l'interface entre le matériau et le milieu biologique sont complexes. Notamment ceux impliquant l'adhésion de bactéries et la formation d'un biofilm. Ils mettent en jeu de nombreux paramètres physico-chimiques (hydrophilie, pH, charges, etc.) et sont dépendants du matériau et des organismes biologiques. En conséquence, il est difficile d'élaborer une stratégie universelle de fonctionnalisation de matériaux. Dans ces travaux de thèse, il a alors également été question de réaliser de plus amples investigations concernant la compréhension de ces mécanismes à l'interface entre le matériau et le milieu biologique. Elles permettront de collecter des paramètres permettant à l'avenir de faciliter le choix de la méthode de fonctionnalisation la plus adaptée à une application visée.

Le présent manuscrit s'articule ainsi :

- Un premier chapitre fait l'état de l'art des avancées concernant la fonctionnalisation de surface du PDMS. Après avoir décrit les avantages concernant son utilisation en tant que biomatériau, quelques applications biomédicales avec leurs problématiques et les risques encourus sont présentés. Pour mieux les comprendre, l'étude s'est donc ensuite centrée sur les interactions à l'interface entre le matériau et l'environnement biologique. Alors, la seconde partie a été dédiée aux stratégies de fonctionnalisation de surface existantes pour pallier les problèmes. Elle s'est notamment concentrée sur le greffage covalent de polymères bioactifs. Cette partie insiste sur l'importance du choix des polymères : les groupements portés par la molécule, son architecture, mais également sur le protocole de fonctionnalisation. Enfin, en prenant appui sur l'expertise du laboratoire et les innovations courantes, la dernière partie propose une stratégie fondée sur l'utilisation de polymères porteurs de groupements carboxylates. Ces derniers sont choisis pour leur propriétés antiadhésives, antibactériennes, mais également pour permettre à l'avenir une multifonctionnalisation des surfaces.
- Le second chapitre présente en détail les matériels et méthodes employées au cours de ces travaux. Elle comprend la stratégie de greffage mise en place, les méthodes de

caractérisations physico-chimiques des surfaces fonctionnalisées, les procédés d'analyses topographiques et mécaniques, ainsi que les protocoles liés aux analyses biologiques et microbiologiques.

- Le troisième chapitre est consacré à la mise en place du greffage de polymères bioactifs porteurs de groupements carboxylates sur le PDMS. Une fois établi, les caractérisations physico-chimiques et mécaniques sont présentées et critiquées.
- Le quatrième chapitre porte sur l'étude des premières réponses biologiques et microbiologiques au contact des surfaces fonctionnalisées. Il regroupe les analyses morphologiques et de prolifération de fibroblastes, d'adsorption de protéines et d'adhésion bactérienne. L'interprétation de ces résultats est réalisée, en faisant un parallèle avec les précédents greffages mis en place au laboratoire avec des polymères bioactifs porteurs de groupements sulfonates.
- Un dernier chapitre se consacre aux perspectives de travail débutées afin d'optimiser la fonctionnalisation et d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes à l'interface. Elle comprend deux parties consacrées au rôle du motif moléculaire et à la longueur des chaînes de polymères sur le greffage et la réponse biologique. Une dernière partie porte sur de premiers essais de greffages de copolymères à partir des polymères étudiés.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives terminent ce manuscrit.

Chapitre 1 – Étude bibliographique

Ce premier chapitre a pour objectif de faire l'état de l'art des applications mettant en jeu le PDMS dans le domaine médical, en passant par son élaboration et l'étude de ses propriétés. Il sera alors intéressant de cerner l'enjeu des travaux autour de l'amélioration du matériau afin de l'adapter au mieux aux applications souhaitées. Il faudra donc passer par l'analyse des mécanismes biologiques résultants de l'implantation, et en comprendre les limites. Ces investigations ouvriront la voie à des propositions de méthode de fonctionnalisation adaptées aux problématiques et aux pathologies générées, et à les discuter.

La première partie est consacrée à la description du matériau PDMS et ses avantages et inconvénients inscrits dans les applications médicales qui en disposent. Cet inventaire permettra de mettre en lumière les problèmes fréquemment rencontrés lors de l'implantation ou de la pose des dispositifs en PDMS, notamment les infections et la formation de biofilm en surface. Une partie est destinée aux problématiques liées aux implants mammaires en silicone, fondement de la réflexion menant à ces travaux. Les mécanismes physico-chimiques et biologiques à l'interface entre le matériau et l'environnement biologique sont globalement dépeints.

Une seconde partie présente les travaux mis en place dans le domaine de la recherche pour fonctionnaliser les surfaces de PDMS, afin de pallier les problèmes infectieux. Elle se concentre particulièrement sur les méthodes de fonctionnalisation par voie covalente, assurant une durabilité une fois le matériau implanté. Aussi, l'action de certains groupements chimiques ainsi que l'influence de l'architecture de surface sur l'environnement biologique sont parcourues et analysées.

Le chapitre s'achève sur l'étude de la fonctionnalisation des surfaces de PDMS par des polymères bioactifs porteurs de groupements sulfonate et carboxylate. Ce dernier point soulève des questionnements sur la dualité entre intégration de l'implant et prévention de la formation d'un biofilm. Ces précisions se feront grâce à l'analyse des travaux antérieurs réalisés au laboratoire et des résultats expérimentaux issus de la littérature sur le greffage de ces polymères, vis-à-vis d'applications biomédicales spécifiques.

1. Le PDMS dans les implants et dispositifs médicaux

1.1. Le PDMS, un matériau d'intérêt

1.1.1. Structure et propriétés

Le PDMS est un polymère faisant partie d'une classe plus large d'élastomères : les silicones. C'est le plus avantageux d'entre eux par son faible coût et ses nombreuses propriétés [1]. Le PDMS appartient à la famille des siloxanes, il est composé d'un squelette d'unités répétitives de liaisons Si-O et est porteur de groupements organiques méthyles sur sa chaîne latérale (Figure 1) [2,3]. La première synthèse de ce silicone a été réalisée dans les années 50 par l'industrie Waker Chemiecompany [4]. Dans la littérature, le PDMS le plus utilisé expérimentalement est le Sylgard 184[®] (Dow Corning), notamment pour des applications de dispositifs sur puce « lab-on-a-chip » [5,6]. Le Tableau 1 énumère les données liées aux propriétés caractéristiques d'un PDMS Sylgard 184[®] [5].

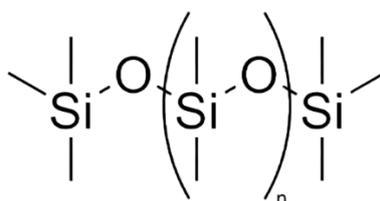


Figure 1: Formule chimique du poly(diméthylsiloxane)

Propriétés	Données
Transparence optique	240-1100 nm
Tension de surface	21-22 mN/m
Température de transition vitreuse	≈ -125 °C
Conductivité électrique	2,9 E+ 14 Ω*cm
Conductivité thermique	0,27 W/m*K
Module d'Young	≈ 1-3 MPa
Coefficient de vapeur de diffusion	≈ 100-6000 μm ² .s ⁻¹
Coefficient de diffusion d'oxygène	≈ 2000-4000 μm ² .s ⁻¹
Coefficient de diffusion de CO ₂	≈ 100 μm ² .s ⁻¹

Tableau 1 : Principales propriétés d'un PDMS Sylgard 184[®] [5]

En fonction de la longueur de ses chaînes et de leur degré de réticulation, le PDMS peut être formulé et utilisé comme gel, adhésif ou matériau élastomère pouvant arborer différentes formes [1,3]. Cette dernière caractéristique lui permet d'être adapté à de nombreuses applications biomédicales qui seront décrites plus loin. D'un point de vue mécanique, le PDMS est considéré comme un matériau hyperélastique, c'est-à-dire qui peut supporter une large déformation avant rupture [1,7]. Ceci est dû à une meilleure flexibilité de la liaison Si-O par rapport à un polymère plus conventionnel présentant une structure principale composée de liaisons C-C. Cette flexibilité est liée à la longueur plus importante de la liaison ($d_{\text{Si-O}} = 1,63 \text{ \AA}$), à son angle de rotation de 130° et sa chaîne latérale peu encombrante. Son élasticité est déterminée par son taux de réticulation. Plus il sera faible, plus le matériau sera élastique, les régions pouvant glisser les unes sur les autres [1].

Le matériau peut être lisse, mais on peut également lui conférer différentes rugosités [1]. Par exemple, des implants mammaires ont été synthétisés avec une texturation de surface afin d'assurer un meilleur maintien dans le corps après implantation (Figure 2) [8,9].

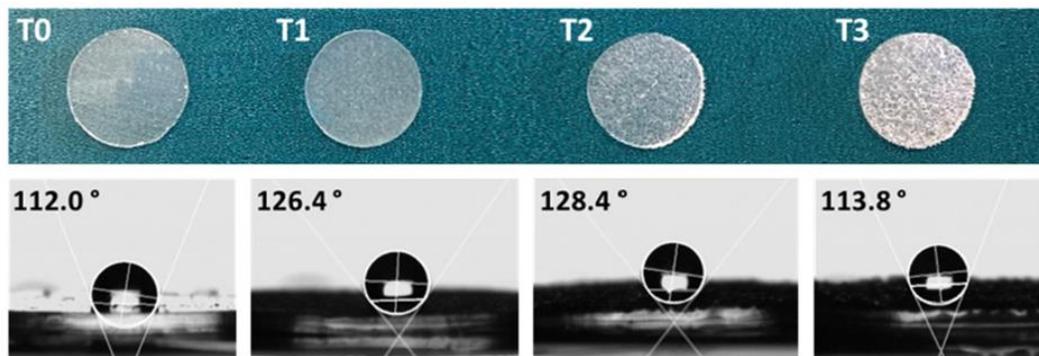


Figure 2 : Photographies d'échantillons de PDMS de différentes texturations issues d'enveloppes d'implants mammaires et mesures de leur angle de contact apparent [8]

Outre son aspect et ses propriétés mécaniques, les auteurs s'accordent pour attribuer au PDMS les avantages et propriétés suivantes, recherchées pour des applications biomédicales [1–3] :

- Une bonne biocompatibilité,
- Une résistance thermique,
- Une résistance/isolation électrique (faible conductivité),
- Une perméabilité aux gaz,
- Une facilité de fabrication,
- Un faible coût,
- Une transparence,

- Des propriétés hydrophobes,
- Une stabilité (le PDMS est inerte chimiquement),
- Une résistance au vieillissement.

C'est sa faible température de transition vitreuse, qui confère à ce matériau une haute résistance aux changements de température. Ce paramètre est avantageux pour la conservation, ses propriétés mécaniques sont stables entre -40 °C et 185 °C [3].

Ces propriétés permettent également au PDMS de faire face aux protocoles de stérilisation. En effet, le matériau présente une bonne résistance aux rayonnements ultraviolets (UV), aux vapeurs de stérilisation (oxyde de méthylène), ou aux irradiations gamma [2,3].

La biocompatibilité d'un matériau fait référence aux réactions chimiques, physiques et biologiques entre le matériau et l'organisme [10]. Elle est définie de manière large comme sa capacité, une fois implanté, à apporter une réponse adaptée à l'environnement biologique. En effet, lorsqu'il entre en contact avec le corps humain, le matériau fait face à la réponse inflammatoire à un corps étranger (FBR). Le système immunitaire réagit alors de manière à former une barrière entre le matériau et l'environnement biologique [11]. Les matériaux biocompatibles, dont fait partie le PDMS, possèdent cette bonne capacité d'intégration. C'est cette propriété qui en fait un matériau de choix pour des dispositifs médicaux et implants. La biocompatibilité est parfois subdivisée en trois catégories, permettant de préciser les comportements entre le matériau et l'environnement biologique : l'hémocompatibilité, l'histocompatibilité, et la cytocompatibilité. Ces catégories font respectivement référence à la compatibilité du matériau avec le sang, les tissus, et les cellules [10]. La Figure 3, inspirée de la revue de Zare *et al.*, illustre de manière brève l'évolution autour du développement du matériau silicone jusqu'à son utilisation en tant que biomatériau et les perspectives courantes [3].

Toutes ces propriétés rendent également le PDMS adaptable à des applications plus complexes que les dispositifs médicaux connus. La microfabrication de ce dernier est possible via des techniques comme le « spin coating », des procédés de photolithographie ou de « soft-lithography ». Ce sont sa stabilité thermique, sa transparence, son homogénéité, son isotropie ainsi que sa capacité à ne pas gonfler dans des conditions humides, qui le rendent adapté à ces procédés de fabrication [7]. La microfabrication connaît une évolution importante en raison de l'approche avantageuse qu'est le traitement de problèmes biomédicaux à l'échelle cellulaire et même subcellulaire [6]. Plus récemment, grâce à sa viscosité, sa flexibilité et sa monodispersité, le PDMS a même été développé en microparticules pour des applications en tant que liquide analogue au sang [12].

Par sa biocompatibilité initiale, le PDMS est également utilisé comme revêtement sur d'autres matériaux. Étant majoritairement lisse et hydrophobe, il aide par exemple les surfaces

qui en sont couvertes, comme le titane, à améliorer leur ostéointégration [13]. Le PDMS peut par ailleurs être combiné à d'autres matériaux. Dans les applications de microfluidique, le PDMS est souvent combiné au verre [14], des liaisons chimiques entre les deux matériaux pouvant être générées de manière irréversible.

Ces exemples montrent que le PDMS est déjà un matériau hautement avantageux. Indépendamment des inconvénients qui seront décrits dans un second temps, les progrès actuels visent également à conférer au matériau des propriétés spécifiques et exigeantes, afin de le rendre d'autant plus précieux. En plus de la biocompatibilité, l'intérêt réside désormais dans l'élaboration de surfaces bioactives.

Bref historique du développement du SILICONE

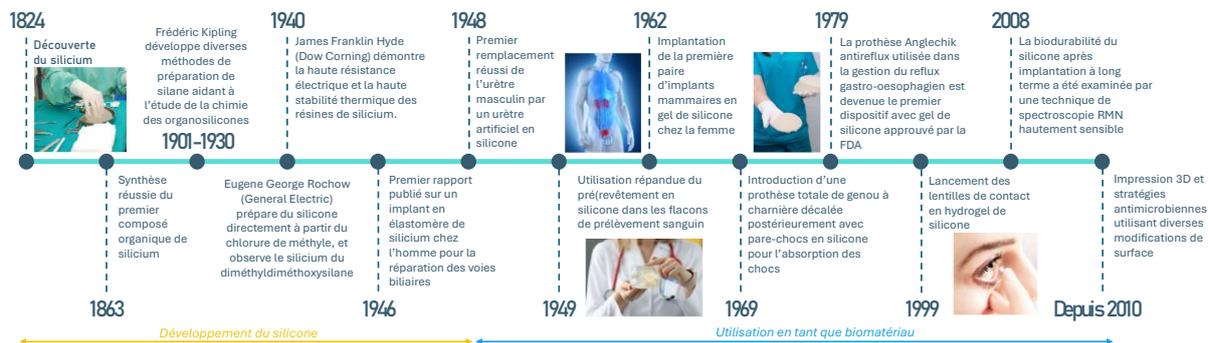


Figure 3 : Étapes clés autour du développement du silicone [3]

1.1.2. Le PDMS et ses applications biomédicales

Les applications biomédicales utilisant le PDMS touchent les micro- et les macro-systèmes, mais également les dispositifs extracorporels. On peut diviser les catégories d'applications comme suit [1,3,6,15] :

- (i) Les revêtements et traitements de surfaces ou assemblage avec d'autres dispositifs médicaux ;

Le PDMS est utilisé comme isolant d'implants électroniques comme les pacemakers. On le retrouve de manière plus générale comme revêtement d'implants et adhésif médical. Il est par exemple utilisé comme revêtement sur les seringues. Il a en effet été montré qu'une fois traitées par le silicone, la force d'insertion des seringues dans la peau se trouvait diminuée, offrant un moyen de pénétrer plus facilement et de réduire les douleurs du patient [3].

- (ii) Les inserts et implants remplaçant des parties du corps humain ;

Le PDMS peut être utilisé comme valve et micro-valve, en tant que pompe et micro-pompe. On le retrouve également dans la peau artificielle, pour la reconstruction maxillofaciale (nez, joue, menton, implant cochléaire), ou encore le remplacement d'œsophage. Son caractère inerte, thermiquement stable et biocompatible, ainsi que ses propriétés mécaniques, en font un bon candidat pour des applications de longue durée.

(iii) Les cathéters, drains, sondes et autres traitements médicaux nécessitant une implantation partielle ou non, et à court terme ;

Ces systèmes nécessitent d'être transparents, inertes et lubrifiants. On peut également y intégrer des systèmes optiques comme les lentilles de contact ou intraoculaires, qui sont parfois sous la forme d'hydrogel.

(iv) Les implants esthétiques

Les implants mammaires et fessiers, les implants faciaux, les mollets artificiels.

(v) Les autres dispositifs extracorporels

Le PDMS peut être utilisé dans les membranes pour dialyse et les oxygénateurs à membrane grâce à sa perméabilité. Il est retrouvé dans certains pansements pour son caractère biocompatible, confortable, atraumatique et grâce à sa perméabilité à l'air. Sous forme de gel on le retrouve également dans le traitement de brûlures cicatricielles.

Désormais, le silicone sous la forme d'encre de faible viscosité, est également adapté à des applications d'impression 3D, permettant l'élaboration de structures complexes [3].

Ces nombreuses applications sont permises grâce à la facilité de fabrication du PDMS et son faible coût. Elles sont par ailleurs précisément étudiées et développées car elles sont commercialisables [7]. En dehors des implants et des dispositifs médicaux, le PDMS est dorénavant de plus en plus utilisé pour des applications de délivrance de médicament, d'analyses biologiques et de diagnostiques, dans les biocapteurs et en microfluidique [16–18]. Il est donc adapté à des applications cardiovasculaires et à leur analyse, par exemple pour aider à comprendre des maladies comme l'anévrisme [1] où la compréhension de l'écoulement et du comportement de cellules sanguines dans les vaisseaux est majeure [1,7].

Le PDMS peut également se retrouver combiné à d'autres matériaux. Ce mélange permet de regrouper les propriétés avantageuses de chacun d'eux. C'est souvent le cas pour les sondes. La sonde est un tube flexible utilisé pour divers traitements médicaux, les plus utilisés sont les sondes urinaires et péritonéales. Elles sont généralement insérées dans un canal ou un vaisseau sanguin pour permettre l'administration de fluide, leur transport ou le drainage. Les avantages reliés par ces combinaisons de matériaux pour sondes sont regroupés dans le Tableau 2, reproduit depuis les travaux de Zare *et al.* [3,19].

Matériaux de la sonde	Temps maximum in situ	Caractéristiques
Polytetrafluoroéthylène (PTFE), recouvert de latex	28 jours	-
Latex enduit d'hydrogel	12 jours	Hydrogel, lisse, compatible avec les tissus
Silicone enduit d'hydrogel	12 jours	
Latex enduit de silicone- élastomère	28 jours	Silicone plus rigide
Alliage argent/hydrogel avec cœur en latex	28 jours	Propriétés antibactériennes
Silicone induit d'hydrogel avec ions argent	12 jours de propriétés antimicrobiennes	Propriétés antibactériennes
100 % Silicone	12 semaines	Parois minces, plus rigide qu'un revêtement silicone

Tableau 2 : Matériaux constitutifs des sondes et leurs caractéristiques [3]

Finalement, tous ces exemples montrent que le PDMS convient à une large gamme de dispositifs médicaux et implants et qu'il est d'intérêt que la recherche soit davantage poursuivie pour toutes ces propriétés. Pallier les inconvénients et les comprendre sont également des priorités. Les traitements de surface et fonctionnalisations en sont des voies d'optimisation et d'amélioration.

1.1.3. Inconvénients persistants pour une utilisation dans le domaine biomédical : les défis

(i) Hydrophobie et « biofouling »

En raison de la présence de groupements méthyles $-CH_3$ sur sa chaîne latérale, le PDMS possède la propriété d'être hautement hydrophobe. Son angle de contact en surface est généralement compris entre 105° et 115° [3]. Cette propriété représente un inconvénient dans la majorité des applications impliquant le PDMS. En effet, le caractère hydrophobe rend la surface propice à des phénomènes de « biofouling », correspondant à l'accumulation de matériel organique : cellules, bactéries, protéines, biomolécules et autres analytes [3,20]. Cette accumulation peut impacter la performance du matériau et mener à des infections, parfois sévères. En conséquence, le retrait ou le remplacement du biomatériau est indispensable [2,3].

Ce phénomène est d'autant plus marqué dans les systèmes de transport de liquide nécessitant un flux et les dispositifs microfluidiques [7]. Par exemple, lors du transport de sang, les plaquettes peuvent adhérer et s'agglomérer en surface du biomatériau. Ce processus est régi par l'adsorption non spécifique préalable de protéines. Ces dispositifs peuvent donc faire face à de nombreux problèmes cliniques tels que les thromboses ou encore une réponse inflammatoire excessive [10,19]. Dans les systèmes microfluidiques, des applications

nécessitent la croissance de cellules endothéliales sur les parois des microcanaux afin de créer un environnement similaire à celui retrouvé dans les systèmes de microcirculation. Ces systèmes peuvent permettre de réaliser des diagnostics chimiques et des dépistages. Le caractère hydrophobe du matériau y représente alors un obstacle considérable [7].

(ii) Hydrophobie et infection bactérienne

L'accumulation de matériel biologique en surface comprend l'adhésion des bactéries et, en conséquence, le développement d'un biofilm. Certaines applications doivent à tout prix l'en empêcher. C'est le cas par exemple des lentilles de contact en silicone, où l'adsorption de cellules ou de protéines provenant des larmes doit être évitée pour limiter les risques d'infections, en plus d'une sensation d'inconfort pour le patient [3,21,22]. L'opacification des lentilles intraoculaires est également un phénomène observé. Il est appelé « cataracte secondaire » et survient généralement 2 ans après opération. Ce phénomène est provoqué par la migration et la prolifération de cellules épithéliales, différenciées en fibroblastes, sur toute la capsule [23,24].

Les infections peuvent varier en fonction de si le dispositif est complètement implanté ou s'il l'est partiellement. La sonde urinaire est par exemple en contact avec la peau et les muqueuses, mais également avec l'environnement extérieur [15]. Les bactéries peuvent directement entrer en contact du périnée qui, une fois au contact de la sonde, va provoquer une réponse inflammatoire en raison des frictions du matériau contre la muqueuse de la vessie. La pose de la sonde laisse par ailleurs place au dépôt de composés urinaires propices à un développement bactérien : électrolytes, composés organiques et protéines, en surface du matériau. Anjum *et al.* expliquent que l'accumulation de bactéries peut se produire en un jour ou deux. Utiliser le PDMS comme composant de sonde est déjà un facteur limitant son incrustation en comparaison à d'autres matériaux [19,25]. Braem *et al.* font état des taux d'infections associés au matériel médical et aux biomatériaux, des pathologies résultantes, des traitements et du coût engendré. Par exemple, 4/1000 sondes veineuses sont contaminées par jour aux États-Unis pour un coût d'environ 46 000 \$ par infection. La contamination peut se produire pendant la chirurgie par contact avec l'environnement, ou encore ultérieurement par propagation hématogène. Leur récurrence peut être dévastatrice, entraînant la mort dans certains cas [26].

Concernant les dispositifs complètement implantés, on peut citer les problèmes liés à la pose d'implant mammaire en PDMS. Les complications résultent généralement de contaminations bactériennes, notamment par *Staphylococcus Epidermis* (*S. Epidermidis*). La colonisation bactérienne en surface de l'implant va provoquer des réactions inflammatoires à répétition et mener à la contracture capsulaire autour de l'implant [3,27,28]. L'exemple des infections générées à la surface de ces implants sera détaillé dans la partie 1.2.2 de ce chapitre.

En conséquence, beaucoup de travaux se sont concentrés sur l'amélioration de la mouillabilité de la surface, ils seront décrits en seconde partie.

(iii) Gonflement en présence de certains réactifs

La perméabilité du PDMS à certains solvants organiques peut limiter son utilisation en raison d'un gonflement induit par la pénétration du solvant dans la matrice. Sa perméabilité à la vapeur d'eau peut potentiellement mener à des changements de concentration en électrolytes dans le milieu de culture cellulaire. Cela peut provoquer des perturbations de croissance cellulaire et même leur mort. Le PDMS est aussi perméable à certaines petites molécules lipophiles, qui peuvent perturber les signaux à petite échelle lors de culture cellulaire dans des systèmes microfluidiques [5].

(iv) Topographie de surface

La topographie de surface peut grandement influencer l'adhésion de matériel biologique en surface de matériau. La texturation des implants mammaires rugueux crée des cavités en surface. Celles-ci représentent l'un des facteurs de développement du lymphome anaplasique à grandes cellules (LAGC), cancer lié à la pose de ces implants [29,30]. De ce fait, ces implants ont été retirés du marché [11]. Contrôler la topographie de surface représente un paramètre important et modulable pouvant conférer des propriétés au PDMS [19,31].

Ces différents constats poussent à comprendre d'autant plus les mécanismes de surface menant à l'adhésion de matériel biologique et à la colonisation bactérienne. De cette manière, des stratégies d'élaboration ou de fonctionnalisation adaptées pourront être proposées.

1.2. Mécanismes à l'interface biomatériau/milieu biologique

1.2.1. Généralités

Lorsqu'un matériau est implanté et entre en contact avec l'environnement biologique, une cascade de réactions correspondant à la réaction à un corps étranger (FBR) se produit naturellement [32]. L'environnement biologique va agir de manière à créer une barrière avec le corps étranger [11,33]. Bien que les grandes étapes de la FBR soient connues, les mécanismes intervenant dans la réponse au corps étranger sont complexes et dépendants de paramètres tels que l'environnement biologique, le matériau, la température et la condition du patient [10]. En conséquence, de nombreuses études s'y consacrent de manière à approcher au mieux la compréhension de ces phénomènes.

(i) Adhésion des protéines en surface

L'adsorption de protéines est considérée comme la première étape du mécanisme intervenant à l'interface d'un matériau lors de son introduction dans le corps humain [20,34]. Même si d'autres matériels biologiques viendront également s'adsorber, ce sont les protéines qui portent le rôle de support aux autres composés [33].

Les protéines sont constituées de chaînes polypeptidiques de différentes séquences d'acides aminés représentant leur structure primaire. Ces acides aminés sont capables d'interagir et de se lier entre eux par des liaisons hydrogène, formant ainsi des structures secondaires. Les structures secondaires les plus courantes observées sont les hélices α , les feuillets β , les spires β ou les structures aléatoires. Aussi, des liaisons hydrogène, la formation de ponts disulfure ou encore des interactions électrostatiques entre les chaînes polypeptidiques interviennent dans la conformation de la protéine, constituant sa structure tertiaire. Ainsi, chaque protéine est représentée par une structure 3D complexe, porteuse de groupements à caractère ionique, hydrophiles ou non, répartis de manière plus ou moins exposée à l'environnement biologique [35–37].

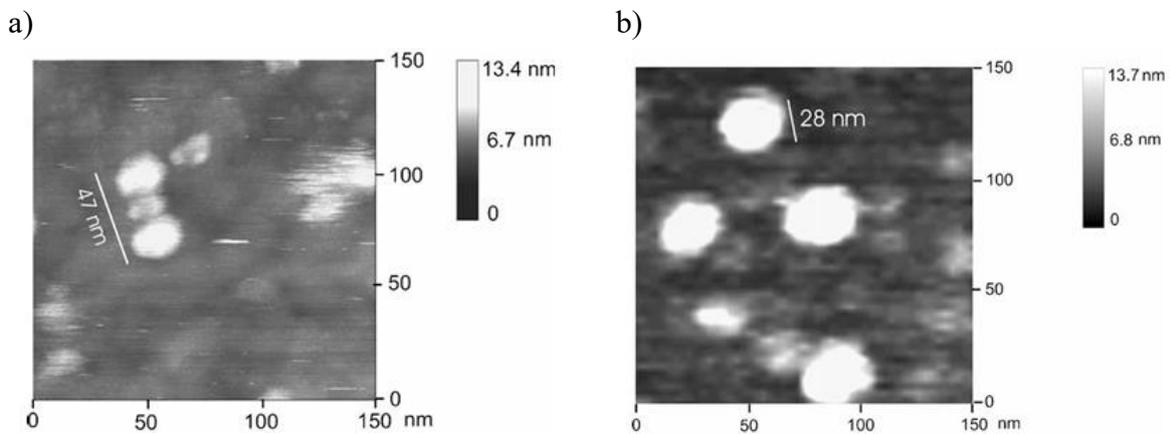
Cette conformation protéique peut être influencée par les facteurs environnementaux [20]. L'adsorption des protéines est donc dépendante des propriétés de surface du matériau sur lequel elle s'adsorbe. Parmi les interactions possibles on peut citer [36] :

- Les forces de Van der Waals,
- La capacité à former des liaisons hydrogène,
- Les réactions acide/base de Lewis,
- Des interactions électrostatiques,
- Des charges de surfaces,
- Des interactions hydrophiles ou hydrophobes.

Peuvent s'ajouter des propriétés liées à l'environnement biologique, telles que le pH ou la température, pouvant influencer sur le comportement des protéines et leur attachement [38].

Les interactions hydrophiles/hydrophobes et électrostatiques apparaissent comme les plus communes dans la littérature. D'après Zhang *et al.*, les interactions hydrophobes constituent la force motrice de l'adsorption des protéines en surface. Celles-ci peuvent provoquer leur changement conformationnel menant à leur dénaturation ou à leur perte d'activité, ou au contraire améliorer leur stabilité et leur activité [20,34]. Par exemple, Tunc *et al.* mettent en évidence par microscopie électronique à force atomique (AFM) la forme trinodulaire du fibrinogène une fois adsorbé sur des surfaces hydrophiles (Figure 4a). Cette même protéine est présente en moindre quantité sur des surfaces hydrophobes où elle arbore cette fois une forme globulaire (Figure 4b) [35]. Concernant les interactions électrostatiques, il est clair que l'adsorption de protéines est augmentée lorsque la surface et la protéine partagent des charges opposées. Mais le pH du milieu peut influencer la répartition des charges. À pH

élevé, la protéine sera majoritairement chargée négativement, tandis qu'à plus bas pH elle sera chargée positivement. La protéine trouve un équilibre lorsque le pH égale son point isoélectrique, la laissant dans son état neutre et limitant les perturbations. Finalement, une combinaison des propriétés électrostatiques et hydrophiles peut favoriser un contrôle de l'adsorption en surface [33].



Par leur nature riche et complexe et les interactions possibles en surface, les protéines sont donc capables de perturber entièrement le système, impactant la réponse de l'hôte. Pour remplir leurs fonctions elles adoptent la conformation spatiale adéquate, dépendante des interactions précédemment citées. Ce sont ces interactions qui déterminent alors la structure chimique exposée à l'environnement biologique. Cependant, la prédiction et même la détermination de cette structure est complexe. On peut tout de même considérer deux orientations principales récurrentes : « side-on » où la protéine s'adsorbe de manière perpendiculaire à la surface et « end-on », où la protéine s'étend plus sur la surface [38–40]. Aussi, la protéine est souvent plus simplement considérée pour ses 4 domaines principaux : hydrophile, hydrophobe, anionique et cationique (Figure 5) [20].

En plus de l'affinité relative aux propriétés de la surface, l'adsorption peut finalement aussi dépendre du type et de la concentration en protéine. La taille de la protéine peut jouer un rôle dans son adhésion, offrant plus de sites de liaisons. La concentration en protéines dans le système influe également sur leur taux d'adsorption ainsi que sur leur orientation. Dans un environnement peu concentré en protéines, leur temps de diffusion et leur temps d'étalement sur la surface est favorisé : la protéine peut se trouver dans un état plus stable et gagner en énergie. Les solutions hautement concentrées en protéines vont, quant à elles, favoriser les interactions intermoléculaires, induisant un changement conformationnel. La quantité de protéines à adsorber en surface étant plus importante, l'étalement est limité et un réarrangement

peut s'imposer [33,39]. L'étude particulière de chaque protéine interagissant avec des substrats peut permettre d'approcher encore plus l'orientation la plus probable adoptée.

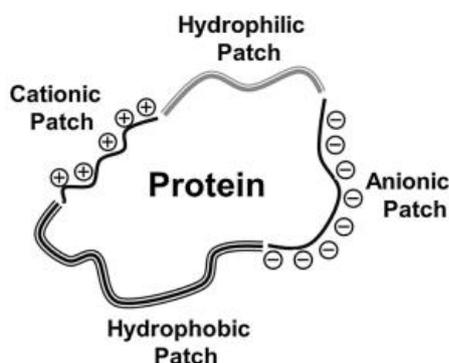


Figure 5 : Schéma simplifié d'une protéine et de ses interactions principales [20]

Une protéine attachée en surface peut être délogée par une autre si celle-ci a une affinité plus grande avec la surface, c'est l'effet Vroman (Figure 6) [33,41]. La protéine remplaçante est généralement plus grande et plus flexible au niveau de la conformation que la première. À noter que cet effet est lui-même dépendant du temps de contact des protéines en surface pour réaliser leur adsorption, ainsi que de leur concentration.

Des techniques poussées permettent le suivi en temps réel de l'adsorption de protéines, comme la résonance plasmonique de surface, la spectroscopie « lightmode » par guide d'onde optique ou l'utilisation de microbalances en cristal de quartz (QCM). Mais ces techniques font encore face à des difficultés comme le suivi des premiers instants des composés. Le matériau étudié peut également constituer un obstacle [42]. Le PDMS n'est pas adapté à l'utilisation de QCM en raison de son caractère mou, élastique et propice au gonflement, incompatible avec la rigidité du quartz. Le PDMS est également propice à la dissipation d'énergie lors des oscillations du cristal, perturbant les mesures.

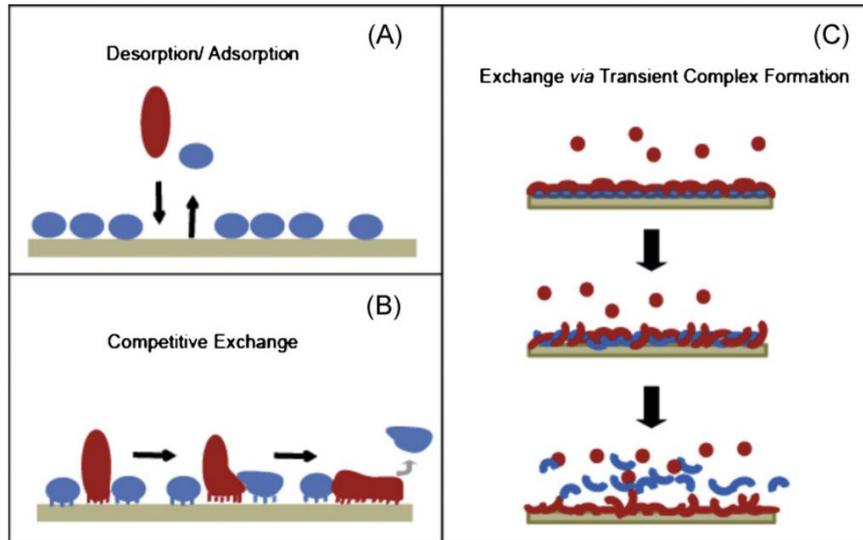


Figure 6 : Illustration schématique du potentiel mécanisme représentatif de l'effet Vroman [41]

(ii) Adhésion des cellules

Malgré la complexité des mécanismes de surface, il est admis que les propriétés de surface d'un matériau vont influencer le comportement des cellules par l'intermédiaire des protéines adsorbées. Arima *et al.* ont mis en évidence par résonance plasmonique de surface les temps d'adsorption de protéines et de cellules sur des surfaces monocouches auto-assemblées (SAMs). Les expériences ont été réalisées sur des SAMs porteurs de différents groupements chimiques à leur surface. Chaque résultat montre que l'adsorption des protéines s'effectue beaucoup plus rapidement que celle des cellules, confirmant l'approche mécanistique. La Figure 7 montre le temps d'absorption de cellules contre celui des protéines dans un milieu tampon phosphate salin (PBS). L'expérience est réalisée sur des surfaces SAMs porteuses de groupements NH_2 . L'adsorption rapide de protéines est clairement mise en évidence [42].

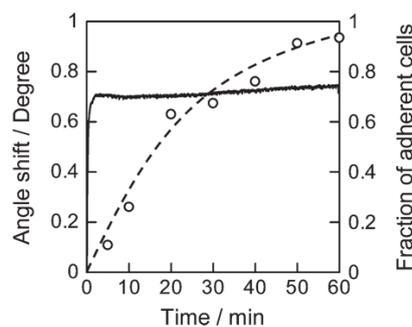


Figure 7 : Évolution temporelle de l'adhésion de protéines du sérum lors de l'exposition à un milieu de culture supplémenté par 2 % de PBS (ligne continue), et fraction de cellules adhérentes sur les SAMs- NH_2 (pointillés). [42]

C'est grâce à leurs ligands-récepteurs que les cellules reconnaissent les points d'attache disponibles des protéines, appelés intégrines pour les protéines de la matrice extracellulaire [34]. Ces intégrines peuvent se lier à un même ligand porté par la cellule. Elles possèdent un domaine de reconnaissance RGD correspondant à une séquence peptidique arginine-glycine-aspartate. Celui-ci est mis en évidence pour la fibronectine sur la Figure 8 [43]. Ce sont les intégrines qui traitent les signaux envoyés aux cellules, par exemple leur adhésion et leur prolifération [33]. Après adsorption d'une couche de protéines en surface, les cellules procèdent donc à un rapprochement, un attachement et à un étalement [42]. Ce sont les forces électrostatiques, de van der Waals et les interactions stériques qui contrôlent l'approche initiale. Les interactions entre la matrice extracellulaire et les intégrines constituent donc les interactions pilotant l'adhésion spécifique des cellules [42].

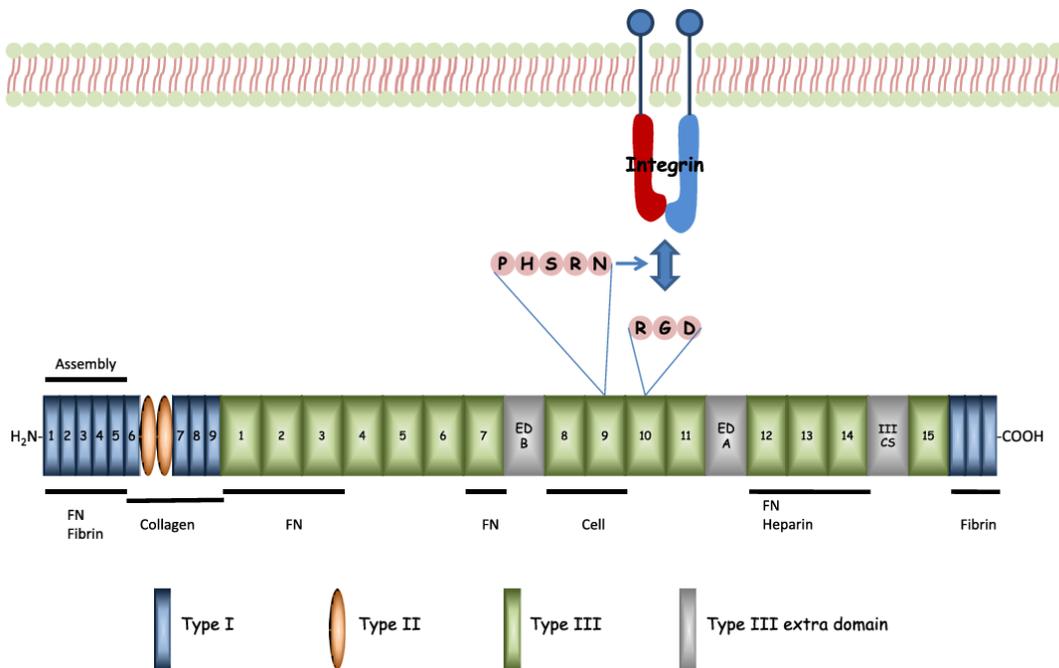


Figure 8 : Schéma représentant la structure de la fibronectine et l'interaction de son domaine RGD avec les intégrines des cellules [43]

Parmi les nombreuses protéines intervenant dans l'adhésion des cellules, on retrouve principalement la vitronectine (Vn) et la fibronectine (Fn), présentes en abondance dans la matrice extracellulaire et le collagène de type I, l'une des protéines majoritaires du corps humain [11,33,44]. La quantité de ces protéines adsorbées en surface, ainsi que la présentation de leurs intégrines et la conformation adoptée vont influencer sur la réponse cellulaire.

Pour les applications biomédicales liées au PDMS, il est également important de s'intéresser au comportement des protéines plasmatiques : l'albumine présente en grande quantité dans le sang et le fibrinogène. Le fibrinogène pouvant former des liaisons et interagir avec les récepteurs GP IIb/IIIa des plaquettes, peut favoriser leur adsorption au matériau [10]. Kwak *et al.* décrivent que du fibrinogène adsorbé à 10 ng.cm^{-2} peut déjà amorcer l'adhésion de plaquettes sanguines en surface [45]. L'adsorption de fibronectine, d'albumine et de fibrinogène est étudiée au cours de ces travaux de thèse.

(iii) Adhésion des bactéries

La formation d'une couche protéique sur la surface d'implants médicaux peut favoriser l'adhésion bactérienne et par conséquent la formation d'un biofilm [20]. L'adhésion des bactéries en surface est fonction des mêmes interactions d'une protéine, c'est-à-dire la polarité de surface, la densité de charge, et les interactions faibles : liaisons hydrogène et forces de Van der Waals [25]. Elle peut également être dépendante de paramètres tels que :

- La prédisposition génétique (l'âge, l'état de santé du patient, l'état du système immunitaire),
- La nature de la souche bactérienne,
- Les propriétés physicochimiques de l'implant ou du dispositif médical [11,32,46].

La formation du biofilm est un phénomène pouvant se produire rapidement et tôt. Sur les dispositifs implantables et le matériel médical, la persistance du biofilm bactérien peut mener à des infections nosocomiales. Chaque implant est susceptible d'être colonisé par des bactéries. La principale source de contamination provient de la flore bactérienne de la peau, constituée majoritairement de *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) et *Staphylococcus epidermidis* [26,32,47].

L'adhésion des bactéries est favorisée par la présence des protéines d'adhésion telles que la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et le collagène, mais également d'autres polypeptides. Les bactéries de type *staphylococci* possèdent par ailleurs des adhésines pouvant reconnaître spécifiquement les récepteurs de la fibronectine et du fibrinogène [19]. Il a été démontré que l'adhésion de fibronectine jouait un rôle important dans l'adhésion de *S. aureus* [48]. François *et al.* ont étudié l'affinité de la bactérie *Staphylococcus epidermidis* vis-à-vis de 7 protéines : albumine, fibronectine, vitronectine, collagène, fibrinogène, le facteur von Willebrand et la thrombospondine. Les résultats montrent une adhérence de *S. epidermidis* sur les surfaces adsorbées de fibronectine et fibrinogène [47]. C'est pourquoi il sera essentiel dans ces travaux de se pencher sur les interactions de surface avec ces protéines et investiguer les mécanismes biologiques résultants.

1.2.2. Infections et biofilms : l'exemple de l'implant mammaire

Après colonisation d'un implant par les protéines, celles-ci forment une fine couche autour de l'implant. Cette réaction est normale et constitue l'une des étapes de la FBR. Cependant, si un stimulus inflammatoire apparaît causé par exemple par la lixiviation de substances provenant de l'implant, ou la présence de bactéries, la capsule va alors se microvasculariser, s'épaissir, et se calcifier. La présence de bactéries va mener à la formation d'un biofilm. Dans le cas des implants mammaires, ce stimulus bactérien peut souvent avoir lieu pendant l'opération, menant donc à des complications sévères, exacerbées dans le temps [49].

L'étude des problématiques liées à la pose d'implants mammaires en PDMS a fait l'objet de deux thèses au laboratoire CB3S, effectuées par le Dr. Lam [50] et le Dr. Moris [51]. Celles-ci nous poussent à porter une attention particulière à ce sujet. Les travaux réalisés au cours de ce projet de thèse prennent donc d'abord appui sur ces problématiques, avant d'étendre l'étude aux matériaux PDMS dans le domaine biomédical en général. En effet, comme chaque fonctionnalisation de surface peut être spécifique à une réponse biologique, il devient nécessaire de comparer et discuter de leur pertinence par rapport à différentes applications biomédicales.

L'implant mammaire est utilisé pour réparer le corps après mastectomie, mais également pour des raisons purement esthétiques. Cela en fait l'un des dispositifs les plus implantés [11]. Cependant, la pose de ces implants a fait l'objet de plusieurs complications remettant en cause leur fiabilité. En 2010, le scandale « PIP implants » révèle l'utilisation de prothèses non conformes, menant à leur rupture et à la libération du gel les constituants. En 2019, l'affaire « implant files » dénonce les manquements en termes de réglementation des implants mammaires et fait retirer du marché les implants texturés. Ceux-ci seraient à l'origine du développement d'un cancer : le lymphome anaplasique à grandes cellules (LAGC), (« Breast Implant-Associated – Anaplastic Large Cell Lymphoma » (BIA-ALCL)) [11,29,30]. Ce lymphome se développe progressivement et peut se révéler 10 ans après implantation. L'origine du développement de ce cancer n'est pas clairement établie, mais l'explantation révèle que la contamination des surfaces par des bactéries telles que *S. Epidermidis*, *Ralstonia Pickettii* (*R. Pickettii*) et *Pseudomonas Aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), pourrait en être un facteur de développement [11].

De manière générale, des problèmes font irruption à l'interface entre l'implant et l'environnement biologique. Après implantation, une capsule postopératoire se forme autour de l'implant. Elle suit la FBR, dont le but est de créer une barrière biologique entre le corps étranger et l'environnement biologique. Cette capsule est généralement formée par l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire et de cellules : fibroblastes, lymphocytes, macrophages, et de bactéries. Dans le temps, cette capsule peut dégénérer en raison d'un développement bactérien important en surface, on parle alors de contracture

capsulaire (CC) (Figure 9). Elle correspond à la contraction du tissu cicatriciel fibrotique autour de l'implant [11,31,32,49,52]. C'est la cause la plus fréquente des complications générées par la pose d'implants mammaires. En raison de la colonisation bactérienne, des réactions inflammatoires chroniques ont lieu au niveau de la capsule. Ce phénomène peut être à l'origine de la production de lymphocytes responsables du BIA-ALCL. La CC conduit à des complications telles que des douleurs, un durcissement et une déformation de la poitrine. L'échelle de Baker permet de classer la sévérité de la CC en fonction des symptômes :

- Grade I : Pas de contraction de la capsule, le sein a une taille et une forme naturelle.
- Grade II : Le sein apparaît normal mais ferme au touché.
- Grade III : À la fermeté, s'ajoute une déformation du sein.
- Grade IV : Forme la plus sévère de la contracture, le sein est difforme, dur et douloureux. Ajdic *et al.* ont montré qu'à ce stade, correspond la plus haute concentration en bactéries dans la capsule périprothétique [53,54].

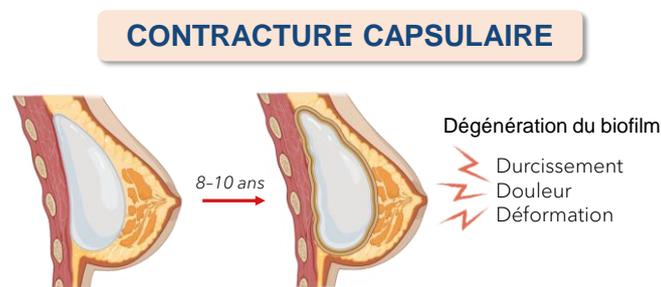


Figure 9 : Schéma de la contracture capsulaire et ses effets

Intervenir à la surface du matériau afin de limiter les complications observées est alors devenu une nécessité. Améliorer l'intégration de l'implant et prévenir ou limiter l'infection bactérienne sont deux points clés sur lesquels il est possible d'agir. L'hydrophobie de surface du PDMS, mentionné précédemment, peut constituer l'un des facteurs favorisant le développement d'un biofilm bactérien. Afin d'agir plus spécifiquement, il est judicieux de se pencher sur la compréhension des différents mécanismes intervenant à l'interface entre le matériau et le milieu biologique. Bien que ces différents mécanismes biologiques et chimiques soient complexes et encore étudiés, les grandes étapes intervenant dans la formation du biofilm en surface du PDMS sont connues (Figure 10) :

1. Adsorption non spécifique de protéines

L'adsorption non spécifique d'une couche de protéines en surface est la première étape provoquée lors de la FBR. Même si des molécules d'eau, des ions, des acides aminés ou encore de petites molécules solubles peuvent se déposer sur le matériau, l'adhésion de protéines sur

cette couche constitue le support de la première étape de la réaction à l'interface. Les protéines adsorbées adoptent en surface une conformation permettant une connexion avec d'autres composés. Plusieurs protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées, en particulier la fibronectine, la vitronectine et le collagène de type I. La structure biologique de ces protéines a le pouvoir d'induire et impacter le mécanisme suivant [33].

2. Adhésion réversible de bactéries

Cette étape peut se produire en parallèle de la première. Quelques bactéries planctoniques sont capables de s'attacher directement en surface, de manière réversible.

3. Adhésion irréversible de bactéries

Un attachement irréversible entre les protéines non spécifiques et des bactéries se produit en surface, amorçant la création du biofilm.

4. Maturation et croissance du biofilm

Accumulation de matériel biologique : cellules, protéines, bactéries, molécules solubles et liquides forment un mucus polysaccharidique. Les bactéries, pour favoriser leur survie, vont par ailleurs sécréter une couche de substances polymériques extracellulaire, agissant comme barrière protectrice pour elles-mêmes [25,26,32]. Le réseau résultant, sous forme de gel, promeut l'accumulation de matière et leur adhésion en surface.

5. Biofilm

Le biofilm atteint une structure tridimensionnelle, protégeant les bactéries des agressions extérieures (UV, antibiotiques, contraintes physiques et mécaniques...), les rendant plus résistantes que sous leur forme planctonique [26,32,55]. Le biofilm est ensuite capable de se répandre, de toucher l'environnement biologique, ainsi que d'autres endroits du corps [11].

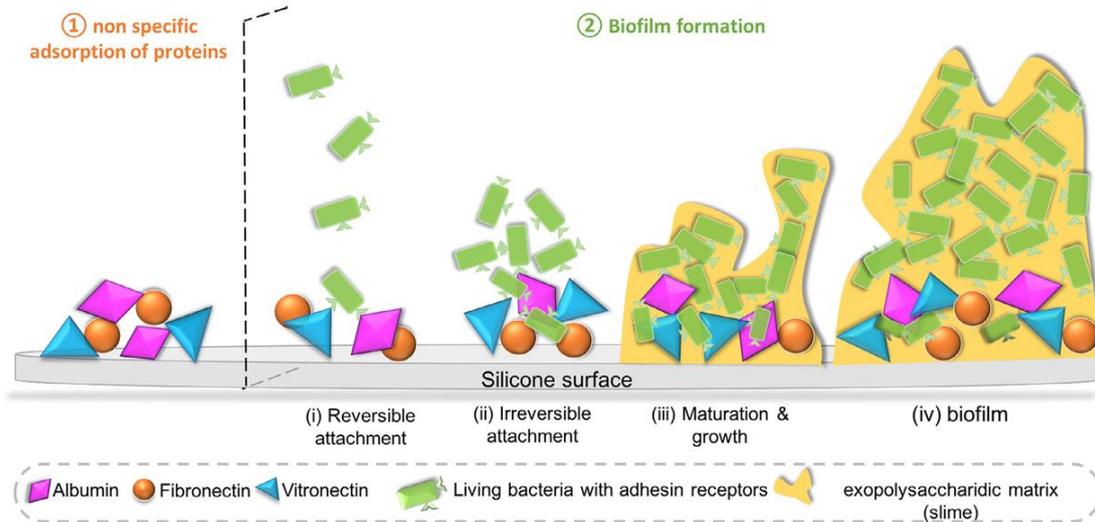


Figure 10 : Mécanisme de formation du biofilm bactérien en surface d'implant en silicone [11]

Finalement, les réactions chimiques et biologiques en chaîne se produisant en surface contribuent grandement à la contamination. Orienter ces interactions apparaît alors comme une solution. Contrôler le mécanisme de surface pourrait permettre de limiter, voire annihiler, l'adhésion de bactéries par action directe ou via l'influence de l'adhésion des protéines non spécifiques. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre et étudiées, dont la fonctionnalisation de surface et sont décrites plus loin dans ce chapitre.

2. La fonctionnalisation de surface comme solution

Les complications autour des dispositifs médicaux et implants, induits par la colonisation bactérienne et le développement de biofilms constituent un problème bien établi. Pour les comprendre, le mécanisme initiant la réponse biologique, mené par l'adsorption non spécifique des protéines doit être disséqué. Les travaux autour de l'élaboration et de la fonctionnalisation de biomatériaux adaptés palliant ces problèmes continuent alors de représenter un défi.

2.1. Conférer des propriétés de surface et prévenir des infections

Afin de limiter autant que possible les complications et les infections bactériennes et microbiennes en surface de PDMS, plusieurs stratégies ont été développées par les chercheurs. Sur le principe, elles consistent à prévenir en tuant les bactéries ou en les repoussant. On parle d'effet bactéricide et d'effet bactériostatique. Figure 11, Anjum *et al.* ont illustré cet aspect sur l'exemple de sondes médicales [25].

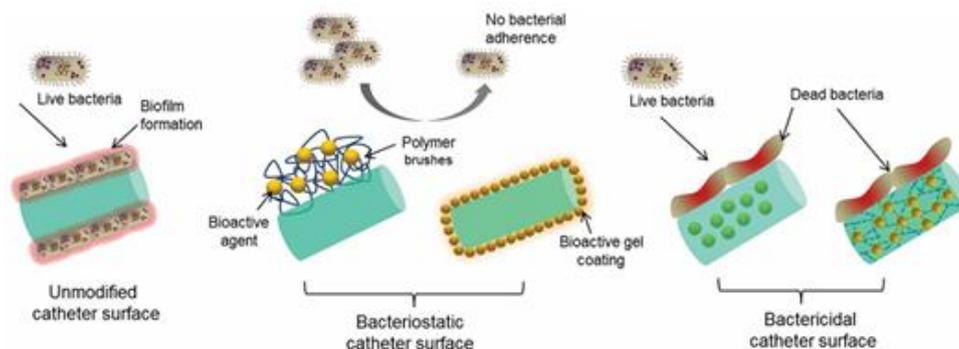


Figure 11 : Représentation schématique des effets bactériostatiques et bactéricides induits par la modification de matériau pour sonde [25]

Pour permettre ces effets en surface, les principales stratégies mises en place sont basées sur : la modification chimique de surface, les revêtements de surface ou la modification de la rugosité du matériau (Figure 12) [11,26,56,57]. Elles prennent effet grâce à des revêtements polymères, des nanoparticules, des tensioactifs, l'incorporation de rugosités, des traitements par encapsulation d'antibiotiques ou d'enzymes [25,32,55]. Ces modifications génèrent en surface des interactions perturbant les mécanismes portés par l'adhésion de protéines, mentionné précédemment. Ainsi, cette partie se concentrera sur les principales stratégies mises en place dans la littérature.

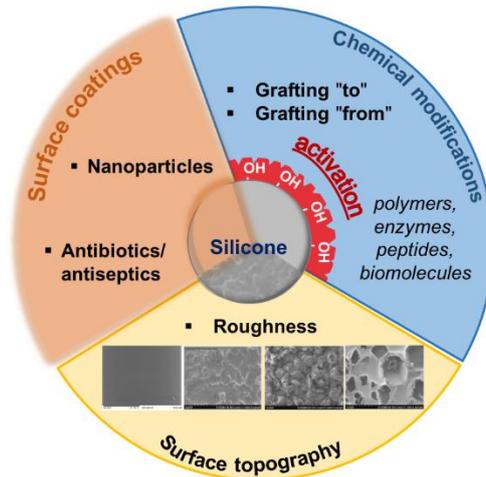


Figure 12 : Schéma regroupant les principales stratégies de fonctionnalisation de surface d'implants [11]

Les phénomènes de « biofouling », mentionnés dans la partie précédente peuvent être évités par la mise en place de ces stratégies [19]. Générer un revêtement « antifouling » signifie alors minimiser les interactions entre la surface du matériau et un composé adhérent. C'est un procédé qui peut rapidement s'avérer complexe lorsque la surface est confrontée à l'adhésion de molécules variées [20]. L'adsorption de protéines est au cœur des problématiques d'antifouling, car il est difficile de limiter leur adsorption [36]. Rendre la surface hydrophile représente une première étape dans cette démarche. Les composés hydrophiles possèdent en effet une importante tension de surface au contact de l'eau. Ainsi, ils pourront fortement attirer les molécules d'eau et former une couche hydratée protectrice en surface, pouvant prévenir l'adhésion de certains micro-organismes [57].

De nombreuses méthodes de modification chimique de surface ont été employées dans la littérature pour changer l'état de mouillabilité du PDMS. Parmi elles, on peut distinguer les modifications physiques et chimiques.

Parmi les méthodes physiques, la physisorption représente une approche simple, rapide, basée sur des interactions hydrophobes, hydrophiles ou électrostatiques [7,20]. La méthode passe par des techniques comme : le dépôt dit « layer-by-layer » (LbL), l'utilisation de tensioactifs non-ioniques et l'utilisation de polymères chargés [7,19]. Mais un désavantage majeur réside dans le manque de liaisons covalentes entre le matériau et les composés physisorbés, engendrant leur désorption progressive [7]. Ces fonctionnalisations sont rapidement dissipées sous l'influence des facteurs biologiques environnementaux, comme la solvataion, ou la température [20].

L'utilisation de traitements énergétiques en surface : la combinaison plasma/oxygène, les rayonnements UV couplés à l'ozone, l'application d'une décharge corona, représentent

également des méthodes physiques performantes. Ils permettent d'oxyder la surface, générant des groupements polaires augmentant la mouillabilité [7,58,59]. Ces méthodes ont l'avantage d'être généralement courtes et faciles à mettre en place. Pour les dispositifs microfluidiques, c'est souvent lors de la mise en forme du matériau que ces modifications physiques sont directement apportées afin de favoriser la mouillabilité des microcanaux [7]. Ces méthodes sont cependant temporaires, le PDMS sait retrouver son caractère hydrophobe dans le temps au contact de l'air [7]. Chang *et al.* montrent par analyse FTIR, l'apparition de groupements réactifs -OH sur des surfaces de silicone après traitement plasma. Cependant, les auteurs mentionnent qu'après seulement 24 heures, ces nouvelles liaisons disparaissent [60]. Miranda *et al.* rapportent que le traitement par oxygène/plasma est le plus utilisé pour rendre la surface du matériau hydrophile, mais insistent sur la perte rapide de l'hydrophilie de surface au contact avec l'air [7]. Par ailleurs, certains auteurs expliquent que ce traitement peut endommager la surface de PDMS [59].

La modification chimique de surface intervient pour pallier les désavantages des méthodes physiques. Elle peut assurer une stabilité dans le temps. Les techniques les plus souvent employées sont le dépôt chimique en phase gazeuse (CVD), la réalisation de SAMs et le greffage de polymères [7] ou de peptides bioactifs [55,61]. Les SAMs sont généralement composés de molécules organiques capables de s'ancrer sur des surfaces réactives. Elles sont constituées d'une tête principale se liant à la surface réactive et d'une seconde partie fonctionnelle conférant les propriétés à la surface [20]. La chimie du polymère offre de nombreuses possibilités de fonctionnalisation. Le polymère est lui-même porteur de groupements capables d'agir pour par exemple conférer des propriétés antimicrobiennes, mais peut aussi servir de support à la liaison d'autres composés. Cela offre l'opportunité d'octroyer de nouvelles propriétés à la surface, mais également de combiner et améliorer ses fonctions. En revanche, pour appliquer ces méthodes, les surfaces nécessitent parfois d'être au préalable activées afin de les rendre réactives. Combiner les traitements physiques avec les méthodes chimiques peut permettre de pallier cet obstacle. Cette combinaison de stratégies permet alors de générer un matériau fonctionnel plus stable dans le temps. Elle sera au cœur de la partie suivante [7].

Les traitements par incorporation ou relargage d'antibiotiques peuvent représenter des stratégies efficaces pour éradiquer les bactéries. Anjum *et al.* décrivent l'imprégnation de médicaments par immersion d'une sonde dans une solution médicamenteuse. Par gonflage puis séchage, le matériau incorpore des agents bactéricides [25]. Cependant, les biofilms bactériens formés en surface ont développé une résistance à de nombreux antibiotiques [25,55,56]. Des nano-antibiotiques composés généralement d'argent, oxyde de zinc, oxyde d'aluminium, oxyde de titane, nanoparticules d'or, de cuivre ou les nanotubes de carbone ont alors été développés et se sont montrés efficaces en comparaison à des antibiotiques traditionnels. Ils ont la capacité d'être plus perméables et sont retenus plus longtemps dans l'organisme. Ils sont également

résistants à des conditions de hautes températures et aux protocoles de stérilisation [25,62]. Néanmoins, le risque persiste qu'une fraction de bactéries résiste et reproduise le biofilm après arrêt du traitement [26]. Agir en amont pour prévenir l'infection paraît donc plus attrayant, limitant les infections et réinfections futures.

La modification du matériau en lui-même représente une solution pour conférer des propriétés à la surface. Généralement, les techniques utilisées sont le « blending » (fonte et mélange de polymères), la copolymérisation ou la réalisation de réseaux de polymères interpénétrés [15,19,63]. L'objectif de la modification du « bulk » est clairement d'élaborer une nouvelle surface avec une composition différente [15,64] ou de jouer sur les rugosités comme mode d'action [55,65]. Seldon *et al.* ont mis en place un composite silicone/acide poly(acrylique) pour des implants cochléaires. Le mélange réalisé a la capacité de gonfler en présence des fluides biologiques pour atteindre sa forme et sa taille finale après implantation dans la cochlée [66]. Gökaltun *et al.* ont synthétisé un copolymère poly(éthylène glycol) (PEG) et PDMS, augmentant considérablement l'hydrophilie de surface et réduisant l'adhésion non spécifique de molécules actives comme l'albumine, les lysozymes et l'immunoglobuline G [63]. Dans les systèmes de transports de flux, la combinaison de matériaux a permis d'améliorer les propriétés antibactériennes du matériau ou d'améliorer certaines de ses propriétés. C'est le cas pour la formulation de sondes, évoquée dans la partie précédente (Tableau 2) [3]. Néanmoins, la modification du matériau n'est pas retenue dans ces travaux de thèse. En effet, la modification du PDMS représente un risque accru d'altération des propriétés mécaniques initiales du matériau, en particulier son élasticité, ou encore une perte de sa transparence [5,7]. Köllnberger *et al.* ont incorporé des groupements acides carboxyliques dans le matériau silicone lors de son élaboration afin d'induire des propriétés antimicrobiennes. Mais les propriétés mécaniques du matériau, notamment la dureté, sont impactées par ce changement [64]. Cette stratégie reste applicable à des systèmes microfluidiques où l'écoulement du flux est l'unique opération voulue, la modification des propriétés mécaniques de ces matériaux n'induisant pas de risque [7]. La formation d'hydrogels de PDMS est également une stratégie émergente pour réaliser des dispositifs médicaux et combattre les infections. Elle a permis d'incorporer de nombreux composés comme les ammoniums quaternaires, capables d'action biocide contre un large spectre de bactéries [57].

La vaste quantité de recherches autour de l'élaboration ou de la fonctionnalisation de nouveaux dispositifs médicaux en PDMS montre l'intérêt constant pour ce matériau. Chacune d'entre elles peut se concentrer sur des modifications physico-chimiques diverses consacrées à des applications spécifiques. Mais elles soulignent que des obstacles restent à surmonter. Il est par ailleurs important d'approfondir davantage la compréhension des mécanismes de surface afin de viser une efficacité, durabilité et reproductibilité optimales. Finalement, l'attrait vers les matériaux multifonctionnels est également mis en lumière.

2.2. Greffage de polymères bioactifs : une méthode de fonctionnalisation par voie covalente

Cette partie se concentre sur la stratégie de greffage de polymères bioactifs en surface. Cette méthode par voie chimique en comparaison à la méthode par voie physique peut assurer une stabilité à long terme, grâce à la présence de liaisons covalentes en surface. Les points clés et les avancées concernant cette méthode dans la littérature sont passés en revue.

2.2.1. Activation des surfaces

Le greffage en surface permet la création de groupements réactifs. Elle nécessite généralement une étape de pré-irradiation afin de générer des hydroxydes, des peroxydes ou des radicaux en surface qui seront des sites pour le greffage et la polymérisation [15]. Les étapes de pré-irradiation généralement utilisées sont (Figure 13) :

- L'utilisation de plasma,
- Le rayonnement gamma,
- La décharge corona,
- Les rayonnements UV ou UV/O₂.

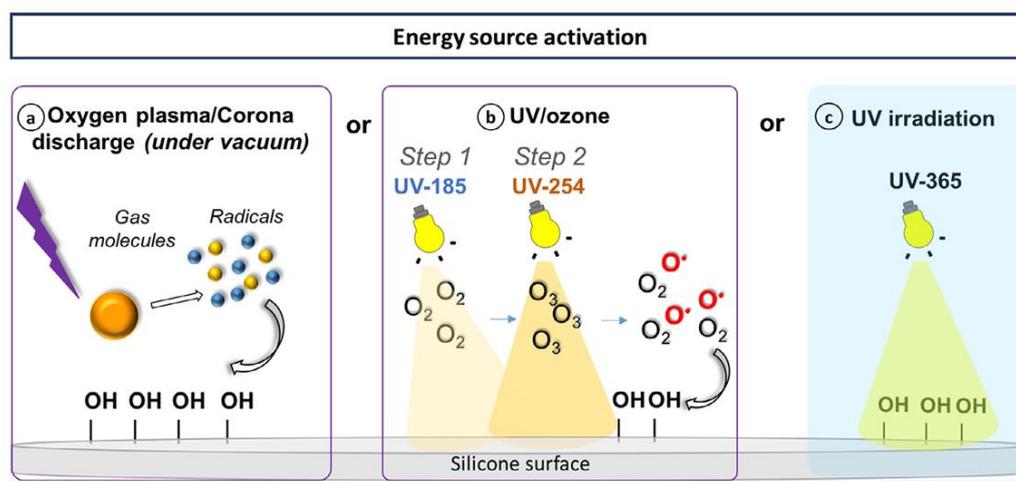


Figure 13 : Représentation schématique des stratégies d'activation de surface de PDMS utilisant des sources d'énergie [11]

Le choix des irradiations peut dépendre de leur disponibilité, de leur impact envers la modification visée et de la profondeur de pénétration du matériau [15]. Ces méthodes sont avantageuses car elles permettent l'immobilisation d'une large gamme de polymères et ne

nécessitent pas forcément l'utilisation d'initiateurs de polymérisation, pouvant rester dans l'environnement en tant qu'impureté [25].

Le traitement plasma est très souvent rencontré dans la littérature. Il implique une excitation d'électron, une ionisation et une dissociation. Les électrons accélérés par le plasma ont assez d'énergie pour induire la rupture de liaisons chimiques et former les radicaux initiateurs de polymérisation [67]. Cependant, Lu *et al.* décrivent que bien que souvent utilisé pour activer les surfaces, le plasma à oxygène possède de fortes propriétés d'oxydation et peut facilement endommager la structure du PDMS en formant, notamment, des fissures. En alternative, les auteurs utilisent le plasma de CO₂ [68]. Pour limiter les dommages, Zhang *et al.* et Ding *et al.* ont dans leurs travaux couplé deux techniques : une activation par plasma d'argon et d'oxygène respectivement, puis le greffage de polymère sous irradiations UV [57,69].

Alves *et al.* mettent en évidence que la technique d'irradiation employée peut aussi impacter la topographie de surface. Les auteurs ont greffé de l'acide poly(méthacrylique) sur des surfaces de polyuréthane par irradiations plasma et ultraviolets. Le greffage réalisé sous UV a engendré une efficacité antiadhésive des cellules plus importantes qu'avec le plasma (Figure 14). Ce résultat peut être corrélé à une densité de groupement -COOH plus élevée en surface via cette voie de fonctionnalisation. Aussi, les images par AFM montrent qu'après greffage au plasma, la surface est beaucoup plus lisse qu'avec les UV qui induisent plus de rugosités (Figure 15, Tableau 3) [70]. Le choix de la méthode de fonctionnalisation est alors également déterminant vis-à-vis des fonctionnalités futures à conférer à une surface.

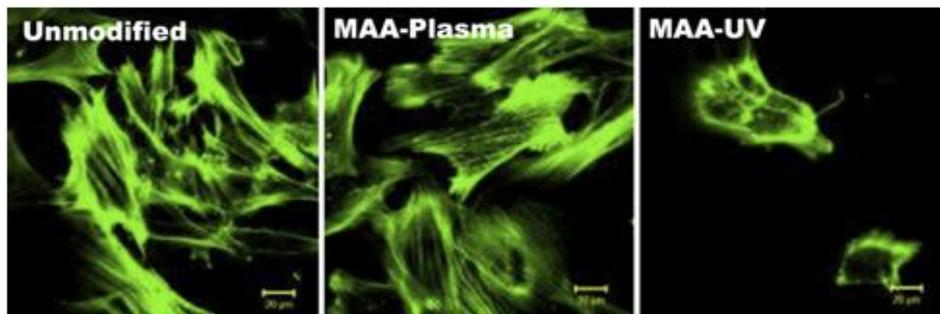


Figure 14 : Observations en microscopie à fluorescence de l'adhésion de cellules de moelle osseuse humaine sur des surfaces de polyuréthane greffées par de l'acide méthacrylique par plasma ou irradiations UV [70]

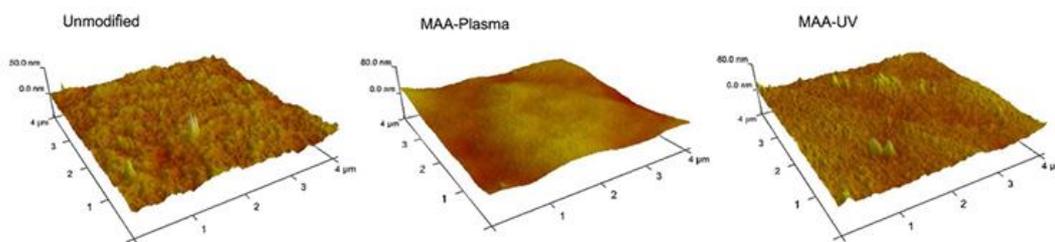


Figure 15 : Images par AFM des surfaces de polyuréthane non modifiées et modifiées [70]

Surface de polyuréthane	R _a (nm)
Non modifiée	2,57 ± 0,31
MAA-plasma	1,44 ± 0,35
MAA-UV	2,37 ± 0,31

Tableau 3 : Rugosités de surface R_a (nm) de polyuréthane non modifié et modifié [70]

2.2.2. Greffage de polymères bioactifs

Le greffage en surface est une méthode avantageuse dans le sens où elle permet, lorsque les conditions idéales de greffage sont trouvées, d'utiliser plusieurs types de polymères.

Les stratégies de greffage covalent des polymères par voie chimique peuvent être opérées par des réactions en surface catégorisées par trois méthodes : « grafting to », « grafting from » et « grafting through » (Figure 16) [10,71]. La méthode « grafting to » (Figure 16A) est satisfaite par ancrage préalable d'une molécule réactive en surface du substrat. Cette molécule va ensuite réagir avec les groupes terminaux de chaînes polymères fonctionnelles préalablement préparées. Celles-ci sont généralement synthétisées avec des tailles ou masses moléculaires contrôlées. Par l'approche « grafting from » (Figure 16B), les chaînes de polymères sont créées directement à partir de radicaux générés en surface. La propagation est ensuite assurée par les monomères environnants [10,16,19]. Enfin, la méthode « grafting through » (Figure 16C) repose sur la propagation de chaînes de polymères à partir de doubles liaisons formées ou attachées en surface du substrat [10].

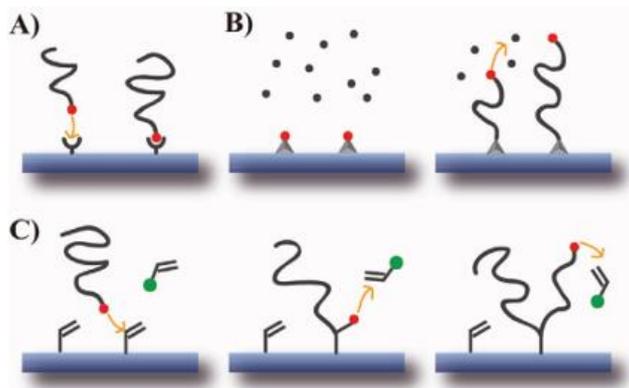


Figure 16 : Représentation schématique des stratégies de greffage : A) « grafting to », B) « grafting from » et C) « grafting through » [10]

L'inconvénient principal de la méthode « grafting to » peut résider dans la gêne stérique occasionnée entre les chaînes de polymères à greffer. De ce fait, il peut être difficile d'obtenir un revêtement dense sous forme de couche en surface et les taux de greffage obtenus sont souvent bas. Néanmoins, cette méthode offre la possibilité de fonctionnaliser la surface de manière plus contrôlée ou homogène. En effet, le polymère attaché peut être préalablement synthétisé et caractérisé [10].

Le choix du polymère à greffer par la méthode « grafting from » offre l'avantage de générer des conformations spécifiques en surface. La polymérisation peut, par exemple, générer de longues chaînes en forme de brosses ou de courtes chaînes repliées sur la surface formant un « pancake » (Figure 17A) [10]. Ces différences peuvent par ailleurs impacter la densité de greffage en surface (Figure 17B). Aussi, on peut imaginer une hétérogénéité du greffage et de longueurs de chaînes. Alors, en plus des groupements fonctionnels portés par les polymères, la topographie de surface est impactée. Cela peut générer de nouvelles propriétés et, par conséquent, une possible multifonctionnalité de surface.

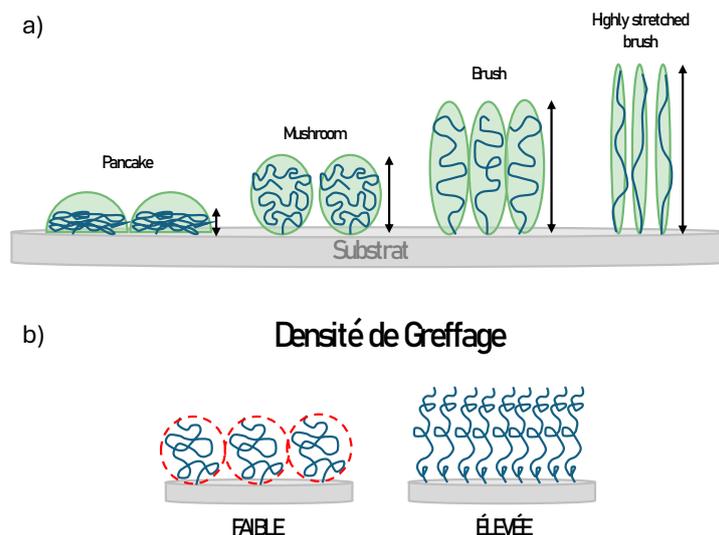


Figure 17 : Représentation schématique a) des configurations possibles adoptées par les chaînes de polymère greffées en surface, b) de la densité de chaînes pouvant être greffées en fonction de leur configuration [10]

Par la méthode « grafting through », les chaînes de polymères se développent en surface du matériau, mais des monomères liés à la surface peuvent également s’insérer dans les chaînes en croissance. Cette technique permet généralement la formation d’une couche polymérique épaisse en surface. En effet, les chaînes formées sont généralement plus courtes mais présentes en plus grande quantité en surface par la concentration plus importante en monomères impliqués [10].

Dans le Tableau 4 sont regroupées, en fonction de leur méthode d’oxydation, quelques techniques de greffage employées sur PDMS issues de la littérature, ayant permis la réalisation de cet état de l’art. Évidemment, bien d’autres articles littéraires mettent en lumière ces stratégies de greffage. Le tableau permet d’avoir une idée globale des modes d’action variés mis en place et de souligner les techniques de pré-irradiation les plus utilisées.

Méthode d'oxydation de surface	Stratégie de greffage	Composé greffé	Principaux résultats	Ref
Plasma chaud : Production d'arcs gazeux à haute température ou Plasma froid : Production de décharges luminescentes	Immersion dans une solution d'AAc et polymérisation par plasma, 60 W, 30 min	Acide acrylique, Puis immobilisation de chitosane et gélatine	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration de la croissance cellulaire. Utilisation comme matériau mimant le derme. 	[72]
	Greffage d'AAc en solvant organique. Dépôt LbL de chitosane et d'héparine	Acide acrylique. Immobilisation de chitosane et héparine	<ul style="list-style-type: none"> Elaboration d'un film multicouche. Action antibactérienne contre <i>E. Coli</i> et <i>S. Aureus</i>. 	[60]
	Utilisation de plasma CO ₂ , 30 W, 10 min			
	Polymérisation par introduction du substrat dans une solution tampon 18h	Dopamine	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. 	[68]
	-	Oxydation seule	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. 	[58]
	Immersion dans APTES, 50 °C, 30 min ; Immersion dans une solution tampon de rhamnolipide, 60 min	Rhamnolipides	<ul style="list-style-type: none"> Activité antibactérienne contre <i>S. Aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>. Réduction de la taille du biofilm. Applications sur sondes. 	[55]
	Monomères dissouts en solvants organiques. Greffage UV, 1000 W, 30 °C	Acrylamide (AAm) N,N-diaméthylaminoethyl méthacrylate, 2,2,2-trifluoroethyl acrylate	<ul style="list-style-type: none"> Mise en évidence de différentes morphologies de surface après greffage de chacun des composés. Modifications de mouillabilité. 	[69]
Immersion dans une solution organique contenant le monomère	Amonium quaternaire, composé zwitterionique	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. Inhibition de l'activité bactérienne d'<i>E. coli</i>. 	[57]	
Rayonnement gamma		N-vinyl pyrrolidone, 2-hydroxyethyl méthacrylate, Acrylamide, acide acrylique, glycidyle méthacrylate, éthylène glycol diméthacrylate, méthacrylate d'éthyle	<ul style="list-style-type: none"> Réduction de l'adhésion de plaquettes. Propriétés hémocompatibles. 	[15]
	Solution de monomère exposée au rayonnement gamma ; source ⁶⁰ Co.	Acide acrylique, nanoparticules d'or.	<ul style="list-style-type: none"> Immobilisation de nanoparticules en surface. Inhibition de l'adhésion de <i>S. aureus</i>. 	[73]
		Acide acrylique, éthylène glycol diméthacrylate	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. Evaluation quantitative et mécanique du greffage en surface et optimisations. 	[74]
		Acide acrylique	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. Changements de conductivité thermique. Augmentation de la conductivité électrique. 	[75]
Rayonnement UV ou UV/O₂	Immobilisation de photo-initiateur (benzophénone), puis polymérisation	Acide Acrylique	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité de surface. Intérêt pour la topographie de surface. Inhibition de l'adhésion de cellules. Inhibition de la croissance d'un biofilm. 	[31,76]
	Immersion dans une solution de monomère et polymérisation sous UV	Styrène sulfonate de sodium	<ul style="list-style-type: none"> Amélioration de l'intégration d'implant mammaire en silicone. 	[77]
	-	Oxydation seule	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. 	[58]
	Click Chemistry	Composé dérivé de claramine	<ul style="list-style-type: none"> Activité antibactérienne contre <i>E. Coli</i> et <i>S. epidermidis</i>. 	[56]
	Une seule étape aux UV, mais utilisation de solvant organique : NaIO ₄ (enlève l'oxygène), benzyle alcool (agent de transfert de chaîne) facilite les terminaisons	Acide acrylique, acrylamide, diméthylacrylamide, 2-hydroxyethyl acrylate, poly(éthylène glycol) monométhoxyle acrylate	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation de la mouillabilité. Diminution de l'adsorption de peptides. Propriétés convenables à des applications en microfluidique. 	[78]
Traitement Corona : Champ électromagnétique intense permettant l'ionisation de la surface	Immersion dans une solution de monomère et polymérisation sous UV	Acrylamides	<ul style="list-style-type: none"> Confirmation du greffage pour immobilisation d'autres composés en surface. 	[15]
Traitement laser, pulsé ou non : Utilisation d'une source photon pouvant atteindre de hautes intensités	Immersion dans une solution de monomère	Acrylamides	<ul style="list-style-type: none"> Utilisation de longueur d'onde précise et étroite pendant l'activation, permettant la création d'un nombre important de groupement réactifs localisés 	[15]

Tableau 4 : Résumé des stratégies de greffage du PDMS utilisées dans la littérature, classées en fonction de la méthode d'oxydation utilisée

Généralement, ces greffages en surface de PDMS sont ensuite caractérisés par mesure d'angle de contact, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, spectroscopie photoélectronique à rayons X, microscopie à force atomique et microscopie électronique à balayage [55,58,69,70,72].

La mesure d'angle de contact est une information cruciale de la modification de surface, le PDMS étant hautement hydrophobe. Sur une surface plane (Figure 18a), l'angle de contact est lié à l'énergie libre de surface des interfaces solide-gaz, liquide-gaz et solide-liquide selon l'équation de Young. Lorsque la surface apparaît plus rugueuse, la mouillabilité peut être régie par l'état de Wenzel (Figure 18b) lorsque la surface est complètement mouillable. L'état de Cassie-Baxter régit la mouillabilité de surfaces rugueuses lorsqu'elles sont partiellement mouillables (Figure 18c). Dans ce dernier état, la goutte repose en partie sur la surface, mais également sur des poches d'air emprisonnées dans les rugosités. La zone de contact avec la surface elle-même est limitée et l'angle de contact peut augmenter, la goutte pouvant devenir glissante [19].

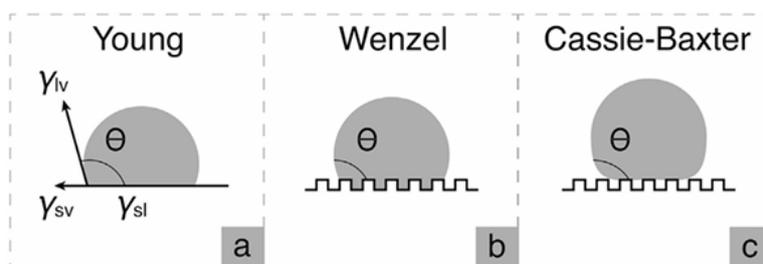


Figure 18 : Comportement de la goutte de liquide a) sur une surface plane selon le modèle d'Young ; sur une surface rugueuse selon b) l'état de Wenzel et c) l'état de Cassie-Baxter [19]

2.3. Influence des groupements chimiques portés par les polymères et rôle de leur architecture sur l'environnement biologique

Dorénavant, l'approche fonctionnalisante de dispositifs médicaux doit non seulement être adaptée à l'application, mais également pouvoir agir sur plusieurs fronts : procurer par exemple une action contre un large spectre de bactéries couplée à un intérêt fonctionnel propre. Cette partie se consacre à explorer l'influence de différents groupements chimiques en surface.

2.3.1. Influence des groupements chimiques d'hydrophilie croissante sur les protéines et les cellules

Faustino *et al.* décrivent que les polymères hydrophiles et/ou chargés peuvent interagir avec les molécules d'eau par liaisons hydrogène et solvatation ionique. L'approche des bactéries

et d'autres composants va provoquer la libération de molécules d'eau et la compression des chaînes de molécules, résultant en une pression osmotique qui va générer des répulsions stériques. En conséquence, la compression des chaînes va générer une diminution de l'entropie et leur déshydratation va augmenter l'enthalpie, favorables à l'apparition de propriétés « antifouling ». Les composés amphiphiles, possédant sur leur chaîne à la fois des composés hydrophiles et hydrophobes, peuvent alors combiner des propriétés adhérentes et antiadhérentes. L'hétérogénéité de ces structures complexes peut provoquer des réarrangements et créer une surface ambiguë, pouvant tromper les microorganismes [19]. Ainsi, l'hydrophilie conférée par les polymères peut jouer un rôle essentiel dans la modification des interactions avec les composés biologiques.

Les travaux d'Arima *et al.* ont permis d'étudier l'impact de plusieurs groupements chimiques : méthyle $-CH_3$, hydroxyle $-OH$, acide carboxylique $-COOH$ et amine $-NH_2$, portés par des surfaces modèles grâce à l'utilisation de SAMs. Au cours de cette étude, la réponse obtenue après incubation de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine a été traquée, avec et sans adsorption préalable de BSA (albumine de sérum bovin). La microscopie à fluorescence à réflexion totale interne a permis par marquage fluorescent de suivre l'adhésion des cellules après 10, 30, 60 et 180 minutes d'incubation. Les résultats ont montré une adhésion des cellules endothéliales sur les SAMs porteurs de groupements $-COOH$ et $-NH_2$, tandis que peu de cellules adhèrent aux surfaces portant les $-OH$ et très peu de cellules ont adhéré aux surfaces avec $-CH_3$. La même expérience a été réalisée avec une préadsorption des surfaces par de la BSA. Cette fois uniquement les surfaces porteuses de $-COOH$ et $-NH_2$ sont analysées. Dans les deux cas, l'adhésion des cellules est ralentie en comparaison aux surfaces nues, avec une légère préférence pour les surfaces $-NH_2$. Mais le nombre de cellules finit par atteindre celui des surfaces sans BSA [42]. Les groupements chimiques portés par les molécules montrent donc une influence claire sur l'adhésion des cellules. La fonctionnalisation particulière par des groupements chimiques peut alors constituer une stratégie pour moduler l'adhésion des cellules.

Sivaraman *et al.* réalisent un travail similaire. Ils étudient l'influence de SAMs porteurs de groupements $-CH_3$, $-OCH_2-CF_3$, $-NH_2$, $-COOH$ et $-OH$ sur l'adsorption de fibrinogène et d'albumine. La spectropolarimétrie à dichroïsme circulaire leur a permis de montrer que l'augmentation de l'hydrophobie de surface avait tendance à augmenter la quantité de protéines adsorbées et à engendrer leur changement de conformation. Ce changement de comportement serait engendré par la séparation de leurs structures secondaires hydrophobes les unes des autres. Ce phénomène est causé par une force motrice thermodynamique provoquée par la diminution de l'énergie libre du système. Les structures secondaires hydrophobes de la protéine iraient former des interactions hydrophobes avec les groupes non polaires des surfaces. La structure initiale de la protéine est déstabilisée et son changement conformationnel et orientationnel est provoqué [79].

Les résultats montrent également que le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface n'est pas le seul à régir la conformation de la protéine adsorbée. Bien que les surfaces porteuses des groupements -COOH et -OH aient une mouillabilité proche (Tableau 5), la BSA adsorbée sur les SAMs-OH montre une conformation plus proche de sa structure native ; ce qui n'est pas le cas pour les SAMs-COOH (Figure 19). Les auteurs expliquent que les interactions hydrophobes internes aux protéines pourraient dominer sur leur tendance à se déployer en interagissant avec les SAMs-OH. Dans l'environnement biologique, les SAMs-COOH sont chargés négativement. Ils peuvent donc interagir préférentiellement avec les protéines et potentiellement générer de nouvelles forces. Ceci induisant une nouvelle fois des changements d'orientation et de conformation [79].

Par ailleurs, un changement conformationnel plus important est observé pour les SAMs-NH₂ en comparaison aux SAMs-COOH. Cela correspondrait aux interactions électrostatiques plus importantes et plus nombreuses entre les SAMs-NH₂ chargés positivement et les protéines. L'angle de contact plus élevé combiné à ces interactions électrostatiques offre également une surface plus favorable aux changements conformationnels des protéines [79].

Paramètre	CH ₂	OCH ₂ CF ₃	COOH	NH ₂	OH
Angle de contact (°)	100,9 ± 1,9	90,2 ± 0,8	17,9 ± 1,3	47,6 ± 1,8	17,6 ± 1,9

Tableau 5 : Angle de contact des SAMs porteurs de différents groupements (n = 7) [79]

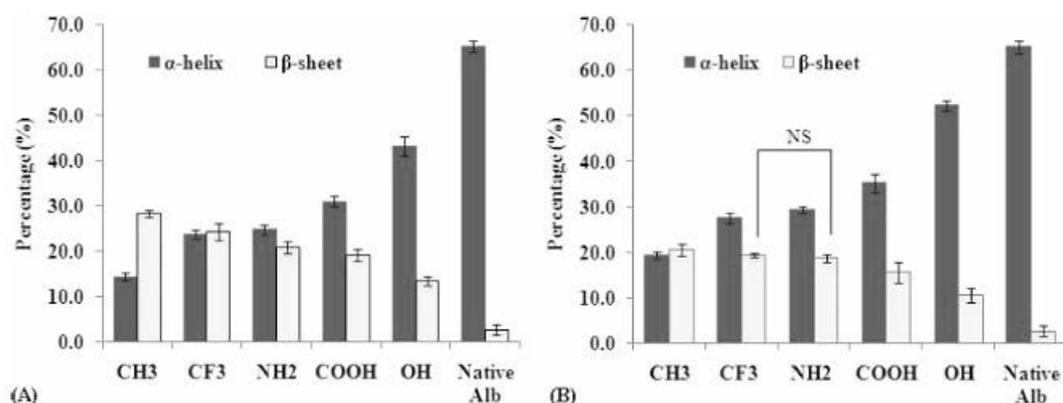


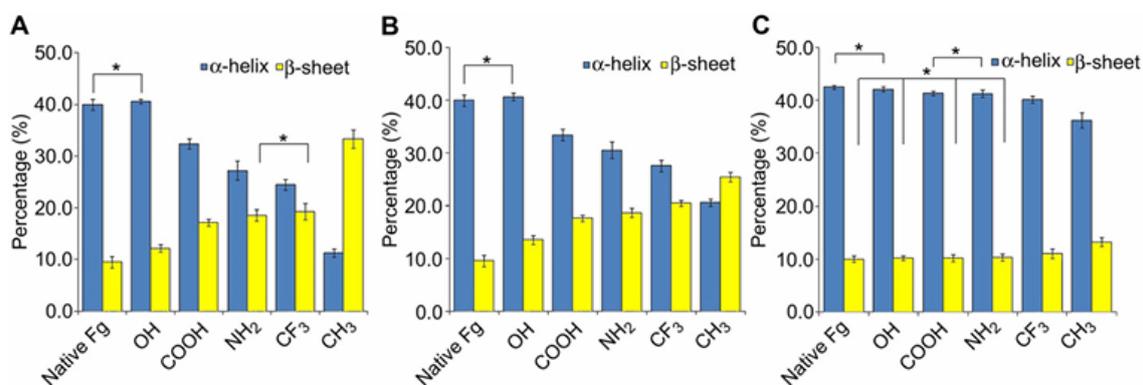
Figure 19 : Changement des structures secondaires du BSA adsorbé à (A) 0,1 mg.mL⁻¹ et (B) 1,0 mg.mL⁻¹ sur les SAMs en comparaison à la conformation native de la protéine (n = 6 ; NS = non significatif ; p < 0,05) [79]

Dans une seconde étude, ces mêmes auteurs travaillent sur l'adsorption de fibrinogène sur ces mêmes SAMs. Les résultats montrent clairement l'influence de la concentration de Fg

en solution et de la chimie de surface du matériau sur la conformation adoptée par la protéine. Précédemment, nous avons pu voir que plus la surface était hydrophile, moins la quantité de protéines adsorbées était élevée. Au niveau conformationnel, on remarque qu'avec l'hydrophobie de surface (Tableau 6), une perte de structure en hélice α est observée contre un gain en feuillets β (Figure 20). Ce changement est visible pour une adsorption réalisée aux concentrations plus faibles : 0,1 et 1,0 mg.mL⁻¹. À une concentration de 10 mg.mL⁻¹, la protéine n'a pas le temps d'adopter une conformation préférentielle. Dans ce cas les changements conformationnels sont moindres, peu importe la chimie de surface [39].

Paramètre	OH	COOH	NH ₂	CF ₃	CH ₃
Angle de contact (°)	17,6 ± 1,9	17,9 ± 1,3	47,6 ± 1,8	90,2 ± 0,8	100,9 ± 1,9

Tableau 6 : Angle de contact des SAMs porteurs de différents groupements (n = 7)

Figure 20 : Changements en structures secondaires du Fg adsorbé à (A) 0,1 mg.mL⁻¹, (B) 1,0 mg.mL⁻¹ et (C) 10,0 mg.mL⁻¹ sur les SAMs en comparaison à sa conformation native (n = 6 ; * = non significatif; p < 0,05) [39]

L'adhésion de plaquettes sur ces surfaces constituait la seconde étape de l'étude. Les résultats montrent que le nombre de plaquettes adhérees augmente avec l'hydrophobie de surface, mais décroît avec l'augmentation de la concentration en Fg en solution. En reliant ces résultats à la Figure 20, on peut faire l'hypothèse que l'adhésion des plaquettes est liée à la diminution de conformation en hélices α du Fg. Cette diminution est engendrée soit par une importante concentration de Fg en solution, soit par le changement d'hydrophilie de surface [39]. Ces résultats permettent de guider les choix de fonctionnalisation permettant de moduler les propriétés de surface.

Finalement, ces résultats mettent en avant le rôle déterminant des groupements fonctionnels et de leur densité en surface sur l'adsorption des protéines. Le caractère

hydrophobe n'est pas un paramètre à prendre en compte seul. Aussi, la concentration en protéines dans un milieu influence leur cinétique d'adsorption et par conséquent leurs arrangements conformationnels.

2.3.2. Groupements mimes de composés biologiques : l'exemple de l'héparine

L'héparine est un polyanion biocompatible constitué d'unités saccharides (Figure 21). Elle est produite naturellement dans le corps humain. Cette molécule est d'intérêt grâce à la présence de groupements sulfonate et carboxylate qui, ensemble, ont montré leur capacité à se lier à de nombreux composés biologiques et aux surfaces polymères [2,46,60].

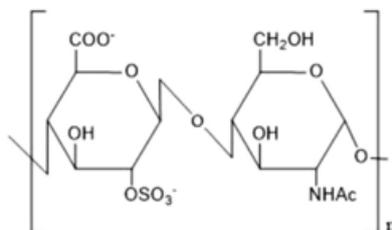


Figure 21 : Formule chimique de la molécule d'héparine

Zdanowski *et al.* ont adsorbé de l'héparine sur du poly(chlorure de vinyle) (PVC). Leurs analyses ont montré une diminution de l'adhérence de *S. aureus* et *S. epidermidis* sur ces surfaces en comparaison à une surface nue [80]. Arciola *et al.* ont mis en évidence la diminution de l'adhésion de *S. epidermidis* sur des surfaces de lentille intra-oculaires modifiées par l'héparine. Ils postulent que lors de leur adhésion, les bactéries subissent une modification chimique du peptidoglycane [21]. Cependant, des inconvénients dans son utilisation seule résident dans le fait que sa composition moléculaire peut varier d'une espèce à l'autre mais également parmi les lots d'échantillons. Aussi, sa disponibilité depuis les sources animales est limitée [60]. Ainsi, de nombreux auteurs s'inspirent de sa composition et forment des composés dits « heparin-like » pour fonctionnaliser les surfaces [47].

Dufay *et al.* ont choisi de travailler avec l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique car il contenait des segments similaires à l'héparine capables d'agir comme anticoagulant. L'étude réalisée consistait à greffer des fibres de PCL (poly(caprolactone)) élaborées par électrospinning [81]. Par la synthèse d'un copolymère, Crémieux *et al.* ont mis en évidence l'efficacité du mélange sulfonate et carboxylate sur l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus*. Le travail a été réalisé sur des surfaces de silicone, *in vivo* et *in vitro* [48]. Degoutin *et al.* ont utilisé l'héparine pour ses propriétés anticoagulantes, couplé à la gentamycine, un

antibiotique aminoglycosilé, pour fonctionnaliser du polypropylène. Lorsque les 2 molécules sont présentes, le taux de prolifération cellulaire augmente, suggérant un effet synergique. Les effets antibactériens contre *S. aureus* sont supérieurs à 99,99 % lorsque les deux molécules sont immobilisées. L'effet anticoagulant a été évalué : il est important pour des surfaces fonctionnalisées d'héparine et satisfaisant pour les surfaces contenant les deux molécules, bien que moins important que pour l'héparine seule. Finalement, l'étude montre que l'effet antibactérien contre *S. aureus* et l'effet anticoagulant peuvent être combinés par fixation des deux molécules actives en surface [82]. François *et al.* ont montré une inhibition de plus de 90 % de *S. epidermidis* lorsque du PMMA était revêtu de 1 mg.mL^{-1} de composé « heparin-like ». À cette même concentration, l'héparine seule inhibe de 30 % les *S. epidermidis*. Ces surfaces étaient préalablement adhérentes de Fn. Cependant, ces résultats d'inhibition n'ont pas été observés pour des surfaces pré-adsorbées de Fg [47]. Ce dernier résultat suggère alors la dépendance de bactéries vis-à-vis de certaines protéines. Un seul groupement réactif n'est alors pas nécessairement suffisant pour lutter contre l'influence de l'ensemble de l'environnement biologique.

Skhiri *et al.* ont travaillé sur l'influence d'un copolymère carboxylate/sulfonate, tous deux présents dans la molécule d'héparine, sur la prolifération et la différenciation de cellules tumorales mammaires humaines (MCF-7). L'étude a été réalisée pour différentes proportions en monomères acide méthacrylique (MAc)/styrène sulfonate de sodium (NaSS) au sein du copolymère : 20/80, 30/70, 40/60 et 50/50. Une importante inhibition des cellules est observée, atteignant 80 %, pour les proportions 30/70 et 40/60, contre 40 % pour du poly(styrène sulfonate) de sodium (poly(NaSS)) seul. La présence des deux monomères semble essentielle pour empêcher l'adhésion de ces cellules cancéreuses [83]. Ces résultats mettent en évidence le rôle important de la composition d'un polymère bioactif. Michiardi *et al.* ont greffé le poly(NaSS) ainsi que le copolymère MAc/NaSS sur des implants en titane de manière à y moduler l'attachement des cellules. Les résultats montrent, en comparaison à une surface non fonctionnalisée, que le poly(NaSS) a tendance à favoriser l'adhésion de cellules ostéoblastiques. La fonctionnalisation par le copolymère permet, à l'inverse, un détachement plus important des cellules en comparaison à une surface non fonctionnalisée. Par ailleurs, la minéralisation de l'implant en présence de poly(NaSS) n'évolue pas en comparaison au titane seul. Le copolymère, lui, a tendance à ralentir la minéralisation de l'implant [84].

Ces résultats montrent le potentiel de l'utilisation de composés chimiques mimant les composés biologiques. Les composés « heparin-like » étudiés ici sont de bons candidats pour moduler les propriétés biologiques de surface et conférer des propriétés antibactériennes. Les recherches nécessitent d'être poursuivies pour trouver les conditions idéales adaptées à un biomatériau donné. Mais ce sont sur ces principes que s'inspirent les travaux réalisés au laboratoire concernant le greffage de polymères bioactifs.

2.3.3. Les polymères stimuli-répondants

Les polymères bioactifs « stimuli-répondants », c'est-à-dire sensibles à un stimulus extérieur (pression, température, lumière, pH), attirent également l'attention. En effet, en raison des nombreuses interactions impactant l'adhésion de matériel biologique, des polymères thermosensibles, photosensibles, mécaniquement réactifs et pH-sensibles sont étudiés à des fins antibactériennes [10,85,86]. Ces polymères, par leur composition, leur longueur de chaînes et leur architecture, sont conçus de manière à être ajustables en réponse aux stimuli extérieurs. Geissler *et al.* ont par exemple fonctionnalisé du PDMS par un substrat stimuli-sensible par contrainte mécanique. Un dépôt LbL de polyanions et polycations en surface par plasma pulsé a permis l'immobilisation d'acide maléique. Des essais d'élongation du matériau ont montré des changements d'hydrophilie de la surface [85]. Ce résultat met en évidence la disponibilité changée des groupements réactifs lorsque le matériau est sous contrainte. Il témoigne également d'un nouvel exemple de possibilités de modulation des propriétés de surface d'un biomatériau.

2.3.4. Architecture et topographie de surface

L'architecture du matériau et sa topographie sont des paramètres à prendre en compte lors de la fonctionnalisation de surfaces. Ils peuvent en effet influencer la réponse biologique. Arciola *et al.* dans leur étude, postulent qu'en fonction du matériau, le mécanisme d'adhésion peut différer. Des auteurs ont en effet montré qu'il était possible de détacher la bactérie *Pseudomonas* de surfaces de polystyrène par traitement enzymatique, mais que cette méthode était inefficace sur des surfaces de verre [21]. Ce résultat suggère que le mécanisme d'adhérence diffère d'un matériau à l'autre.

Askari *et al.* ont travaillé avec le PEG diacrylate (PEGDA) incorporé dans la formulation de lentilles de contact afin de réduire l'adhésion de matériel biologique. Deux formulations de PEGDA de masses molaires différentes ont été comparées : 200 g.mol⁻¹ et 600 g.mol⁻¹. Les résultats ont montré que la rugosité de surface était augmentée avec une plus faible concentration en PEGDA. C'est sur ces surfaces qu'une adhésion plus importante des protéines a été constatée [65]. Faustino *et al.* rapportent les travaux de Park *et al.*, dans lesquels des PEG de différentes tailles de chaînes ont fonctionnalisé des surfaces de polyuréthane. Les résultats montrent une amélioration de l'inhibition d'*Escherichia coli* (*E. coli*) pour les longueurs de chaînes plus importantes [19]. La composition de surface couplée à la structure chimique de la fonctionnalisation peut donc impacter l'efficacité bioactive du matériau.

2.4. Influence du solvant

Sun *et al.* notent qu'il est important de rester vigilant vis-à-vis de l'utilisation de certains solvants lors de la fonctionnalisation de surface. Ceux-ci peuvent en effet impacter le matériau lors de sa modification et son utilisation une fois implanté. Avoir le contrôle sur les procédés d'élaboration est important pour qu'ils soient les plus « verts » possibles et qu'ils n'impactent pas l'état du matériau [10]. Hu *et al.* greffent différents polymères en surface de PDMS (AAc, PEG, diméthylacrylamide, 2-hydroxyethyl acrylate), en une seule étape et en utilisant les irradiations UV. Néanmoins, dans ces conditions, la présence de solvant organique, le benzyl alcool en tant qu'agent de transfert de chaîne, a été indispensable pour assurer le greffage [78]. Dans ces travaux de thèse, limiter l'utilisation de solvant organique sera alors une condition cruciale dans la mise en place des fonctionnalisations de surface.

Finalement, les caractérisations présentées dans cette partie sont révélatrices de l'influence de nombreux paramètres chimiques, topographiques et environnementaux sur les mécanismes en surface de biomatériaux. L'ensemble des interactions et dépendances existantes entre un polymère fonctionnel et la surface, et entre cette surface fonctionnalisée et l'environnement biologique, montrent l'importance du choix de la fonctionnalisation vis-à-vis d'une application.

3. Proposition de stratégies

La partie précédente a permis de comprendre quelques relations et interactions existantes entre les greffages fonctionnels et l'environnement. Les stratégies mises au point par les auteurs sont autant de clés pour approcher une fonctionnalisation optimale du PDMS. Grâce également aux travaux antérieurs du laboratoire, ce projet de thèse s'inscrit dans cette continuité d'investigations autour d'une fonctionnalisation durable du PDMS et de prévention de la contamination bactérienne.

3.1. Antériorité du laboratoire : utilisation de polymères bioactifs porteurs de groupements carboxylate et sulfonate

Dans la partie précédente, l'influence des composés « heparin-like » sur la réponse biologique a été mise en évidence. Le laboratoire CB3S s'est longtemps intéressé aux polymères bioactifs porteurs de groupements chimiques sulfonate (SO_3^-) et carboxylate (COO^-) présents sur l'héparine [87,88]. De nombreux matériaux comme les polymères (PVC [80], polyméthylméthacrylate [24,89], silicones [77], polycaprolactone [90,91]) ou le titane [92–94] peuvent être fonctionnalisés par des polymères porteurs de ces groupements. Ils ont, de plus, montré une activité changée vis-à-vis de cellules et de bactéries.

Crémieux *et al.* se sont intéressés à la réponse bactérienne *in vitro* et *in vivo* d'échantillons en silicone, revêtus d'un copolymère sulfonate et carboxylate. Une copolymérisation radicalaire a été réalisée avec différents ratios $R = \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COO}^- + \text{SO}_3^-]}$ en groupements. Ce sont des concentrations proches en chacun des groupements, menant à $R = 0,64$, qui montrent la meilleure inhibition bactérienne. Le revêtement sur le silicone a été réalisé par « spray-coating » et a été réticulé sur les surfaces en appliquant 1 minute d'irradiations UV. Les résultats *in vitro* montrent un taux d'inhibition de l'adhérence de *S. aureus* 47 % supérieur pour les surfaces fonctionnalisées en comparaison aux surfaces contrôles. Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur des lapins et ont montré une inhibition 35 % supérieure pour les surfaces fonctionnalisées. L'hypothèse mise en avant expliquant ce comportement est l'indisponibilité des régions de fibronectine associées à l'adhésion des adhésines bactériennes. La composition de surface aurait généré une orientation particulière de la fibronectine non favorable à l'adhésion de *S. aureus* [48]. Khadali *et al.* et Yammine *et al.* se sont intéressés au phénomène de « cataracte secondaire » se produisant sur les lentilles intraoculaires [23,24]. Ici, une inhibition de l'adhérence de cellules est recherchée en surface. La fonctionnalisation du matériau par les groupements sulfonate et carboxylate représentait alors une solution. Yammine *et al.* ont utilisé le même ratio $R = 0,64$, mais cette fois directement incorporé dans la formulation du matériau. Les résultats ont montré que le copolymère inhibait de 40 % l'adhésion de fibroblastes [23]. Khadali *et al.* ont synthétisé différents terpolymères de

méthacrylate de méthyle (MMA), MAc et NaSS, et étudié leur influence sur l'environnement biologique. La tendance montre une inhibition de la prolifération cellulaire en comparaison à une surface de PMMA seule, ou un puits contrôle (noté CW, Figure 22). Les auteurs insistent sur l'importance de la composition chimique des polymères et de la distribution de leurs groupements en surface, plutôt que leur taux. Leur étude a finalement montré que peu importe le taux en groupements ioniques présents au sein du terpolymère (essais réalisés pour des taux compris entre 5 et 25 %), l'effet inhibiteur reste le même tant que le ratio $R = 0,59$ est respecté [24].

Table 1. Chemical Characterization of the Terpolymers

polym	initial feed	experimental compositions			M_i (g/mol)
	MMA/MA/NaSS (mol %)	by NMR (mol %)	by AT (mol %)	R^a	
Ter1	92.5/0/7.5	92/0/8		0	60 300
Ter2	85/3/12	87.2/3.2/9.6	85.7/4.8/9.5	0.26	70 080
Ter3	85/3/12	83.8/4.8/11.4	84.4/4.2/11.4	0.28	88 100
Ter4	85/5/10	87.3/3.6/9.1	87.1/3.7/9.2	0.29	74 200
Ter5	85/6/9	87.9/4.2/7.9	86.5/5.6/7.9	0.38	80 100
Ter6	85/7.5/7.5	85.5/8.4/6.1	86.4/7.4/6.2	0.56	68 600
Ter7	85/7.5/7.5	86.6/7.8/5.6	86.0/8.5/5.5	0.59	75 200
Ter8	85/8/7	84.1/9.6/6.3	83.1/10.7/6.2	0.62	70 600
Ter9	85/10/5	85.3/10.6/4.1	85.5/10.2/4.3	0.71	73 300
Ter10	85/12/3	84.2/12.8/3	84/13.1/2.9	0.82	62 700
Ter11	85/15/0	84.2/15.8/0	82.3/17.7/0	1	73 800

^a $R = \text{COO}^- / (\text{COO}^- + \text{SO}_3^-)$.

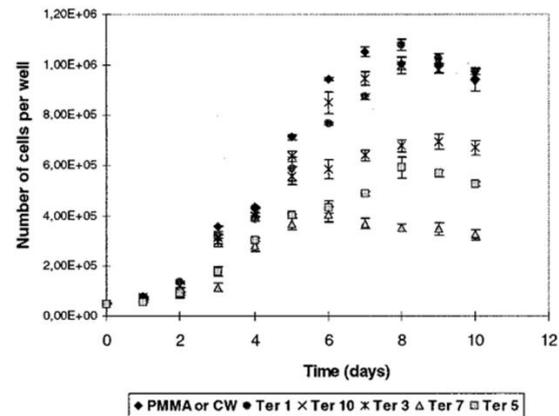


Figure 22 : Étude de la prolifération des cellules de McCoy sur des surfaces de PMMA fonctionnalisées par des terpolymères MMA/MA/NaSS de différentes compositions [24]

Par la suite, c'est le groupement sulfonate seul qui a largement été exploité. Sa fonctionnalisation en surface d'implant s'est montrée efficace pour améliorer l'adhésion des cellules et ainsi favoriser leur intégration dans les premiers jours suivant l'implantation.

Alcheikh *et al.* ont fonctionnalisé des surfaces de titane avec du poly(NaSS) par polymérisation thermique. Les analyses biologiques et microbiologiques ont permis de mettre en évidence le rôle du polymère bioactif dans l'intégration osseuse de l'implant. Le greffage du poly(NaSS) n'interfère pas dans l'adhésion et la prolifération de cellules ostéoblastiques. L'activité de la phosphatase alcaline, ayant pour rôle d'accélérer les liaisons avec les phosphates dans le but de former le phosphate de calcium, a été mesurée en présence des surfaces. Après 12 et 18 jours de culture, les surfaces fonctionnalisées montrent une activité augmentée. Ce résultat encourage l'action potentielle du poly(NaSS) dans l'amélioration de la minéralisation osseuse [93]. Chourifa *et al.* obtiennent des résultats similaires en greffant du poly(NaSS) par la méthode « grafting from » sous irradiations UV, et de taille contrôlée par la méthode « grafting to » sur des surfaces de titane. Des tests microbiologiques ont montré une inhibition significative de l'adhérence de *S. aureus* [94]. Ces études mettent en évidence le rôle des

groupements sulfonates dans l'intégration d'implants en titane pour des applications osseuses, ainsi que leur impact dans la prévention d'infections bactériennes. Pour les matériaux impliqués dans l'intégration tissulaire, les fibroblastes au contact du poly(NaSS) montrent généralement une activité améliorée. Après 24 heures d'incubation, Benabdderrahmane *et al.* obtiennent un pourcentage de viabilité de fibroblastes augmenté sur des surfaces PCL fonctionnalisées au poly(NaSS) [91].

Au laboratoire, les travaux réalisés sur le PDMS se concentraient généralement au niveau du « bulk ». Mais il est préférable de conserver les propriétés initiales du PDMS, notamment mécaniques. Alors, c'est un travail plutôt en surface du matériau qui est à privilégier. Lam *et al.* ont montré l'amélioration de l'intégration d'implants mammaires par leur fonctionnalisation en surface par le poly(NaSS) [95]. Néanmoins, pour pallier les problèmes infectieux et les complications généralement rencontrées, il faudra désormais davantage fonctionnaliser et discuter de la réponse biologique adaptée. Enfin, il est souhaitable d'éviter la présence de solvants organiques, utilisés par exemple lors de la terpolymérisation réalisée dans le DMSO par Khadali *et al.* [24].

3.2. Greffage du poly(NaSS) sur des implants mammaires en PDMS

Le matériau PDMS était au cœur de deux thèses récemment réalisées au laboratoire CB3S. Elles se sont directement concentrées sur les problématiques liées aux implants mammaires (partie 1.2.2). Les travaux du Dr. Lam ont permis de fonctionnaliser le PDMS avec le poly(NaSS) par pré-irradiation et greffage UV. Le greffage chimique et covalent sur les surfaces a été caractérisé [77] et la réponse cellulaire a montré une amélioration de la prolifération des fibroblastes en surface après 24 heures d'incubation. La viabilité de ces cellules était par ailleurs augmentée, présentant des taux de survie supérieurs à 100 % en comparaison à des surfaces non fonctionnalisées [95]. Des observations à l'AFM ont permis de montrer des orientations différentes de la fibronectine entre son adhésion sur une surface non greffée et greffée. Sur la première, la protéine arbore une orientation fibrillaire (Figure 23a), tandis qu'une forme plutôt nodulaire de la fibronectine apparaît en surface de PDMS greffé (Figure 23b) [96]. L'ensemble de ces résultats dénotent l'action prometteuse de ce greffage pour mieux intégrer l'implant et lutter contre ses problèmes infectieux [50].

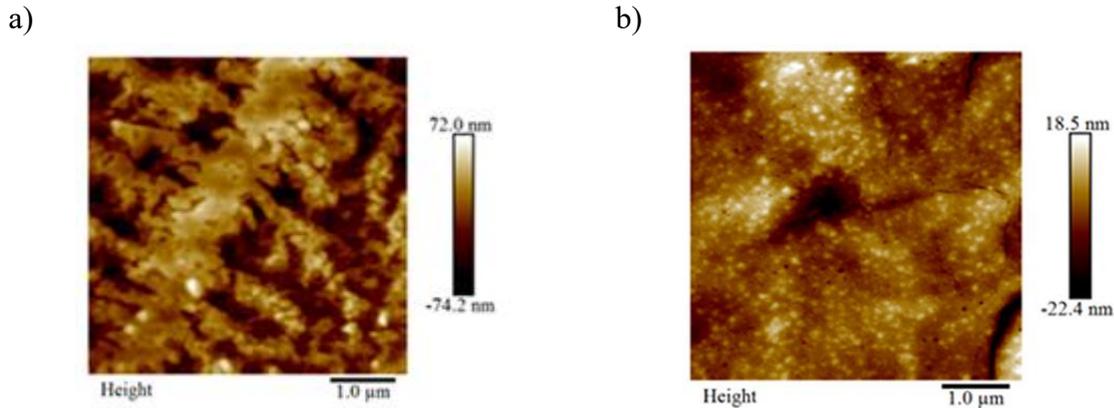


Figure 23 : Images AFM de surfaces de PDMS a) non greffé, b) greffé poly(NaSS), sur lesquelles la fibronectine a été adsorbée 60 minutes [96]

La thèse du Dr. Moris s'est concentrée sur l'étude du biofilm bactérien formé autour de l'implant mammaire et des techniques de décollement optimales de ce biofilm [32]. Ses travaux ont intégré l'évaluation de l'impact de la fonctionnalisation des surfaces par le poly(NaSS) dans l'évolution de la formation du biofilm. L'étude *in vitro* montre par sa technique de décollement aux ultrasons une diminution de 61 % de la quantité de *S. epidermidis* sur des surfaces greffées en comparaison au témoin. Cependant, l'étude *in vivo* n'a pas été aussi satisfaisante. L'explantation d'implants posés 2 mois dans des lapins a montré une épaisseur identique de la membrane formée autour des implants greffés et non greffés. L'analyse des différents marqueurs de l'inflammation issus d'implants contaminés par *S. epidermidis* a été effectuée : aucune différence significative n'a été observée en moyenne entre les deux conditions et les importants écart-types observés ne permettent pas de faire l'hypothèse d'une tendance et de conclure [51].

Le poly(NaSS) bien que prometteur, ne serait pas suffisant à lui seul pour avoir une action antibactérienne optimale et toucher un plus large spectre de bactéries. Par ailleurs, l'amélioration de l'intégration de l'implant est discutable. Si la formation de la capsule est favorisée par les cellules et que l'adhésion de bactéries persiste, la contamination n'est pas évitée et la contracture capsulaire pourrait intervenir rapidement. C'est pourquoi ces travaux de thèse s'orientent désormais sur un aspect plus antiadhésif de ces surfaces, pour ainsi limiter la formation de la CC. Shin *et al.* expliquent que les myofibroblastes, représentant 26,9 % de l'épaisseur de la contracture capsulaire, joueraient un rôle clé dans son développement. Le mécanisme met en jeu le facteur de croissance (TGF)- β 1, une cytokine fibrogénique capable d'activer la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, stimulant la formation de la matrice extracellulaire. Ainsi, il a été montré que si la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est interrompue, la contracture capsulaire autour des implants mammaires est réduite [52]. Finalement, une dualité peut se mettre en place entre amélioration de l'intégration et du maintien de l'implant et limitation de la formation de la capsule. Le tout, avec une action

antibactérienne de la surface. Une dernière option consisterait à étudier simultanément les deux voies pour en exploiter les avantages, d'où l'intérêt vers la multifonctionnalisation des implants. Aussi, des travaux sur un revêtement « antifouling » du PDMS pourraient convenir à d'autres applications impliquant le matériau.

3.3. Greffage de polymères porteurs de groupements carboxylate

Les travaux de recherche autour des biomatériaux montrent un intérêt accru envers des systèmes toujours plus optimaux et à visées multiples. Le greffage de poly(NaSS) seul n'étant pour le moment pas concluant pour prévenir la contracture capsulaire des implants mammaires [51], l'attention s'est redirigée vers le copolymère mettant en jeu les groupements SO_3^- et COO^- . Plus spécifiquement, les polymères porteurs de groupements carboxylates COO^- , généralement antiadhésifs, qui gagnent toujours de l'attention de nos jours [97]. Possédant déjà une capacité bioactive lorsqu'utilisés seuls, les groupements carboxylates réactifs ont également la capacité d'allouer une fonctionnalisation multiple des surfaces. Cet aspect sera illustré par des exemples au sein de cette partie.

3.3.1. Conférer des propriétés antiadhésives

Parmi les techniques principales de revêtements d'antiadhésion et « antifouling » de protéines, on retrouve énormément de revêtements à base d'oxydes de poly(éthylène) (PEO) et de PEG, et l'utilisation de composés polyzwitterioniques [10,19,20,98,99]. D'autres applications proposent également l'utilisation de molécules bioactives : des saccharides comme l'acide hyaluronique (capables de séparer des biomolécules, d'antifouling de protéines), des peptides, on retrouve également l'héparine ; l'utilisation de poly-hydroxy-polymères (abondance de liaisons hydrogène possible, augmentant toujours plus l'hydrophilie de surface), l'utilisation de polymères hydrophiles porteurs de groupements amides (hautement hydrophiles et capables d'accélérer la séparation électrophorétique des protéines) et les revêtements à base de fluor (minimisent l'énergie de surface du matériau et diminuent donc leur tension de surface, engendrant une résistance à l'encrassement) [19,20].

Les zwitterions, contenant cations et anions, sont capables de provoquer des interactions avec l'eau et potentiellement d'autres composés, via de fortes interactions électrostatiques combinées aux liaisons hydrogène. Ils peuvent ainsi présenter une haute résistance à l'adsorption non spécifique de protéines et conférer des propriétés d'« antifouling » [19,20,57,99].

Les chaînes de PEO peuvent diminuer l'adsorption de Fg et d'albumine [100] et ont montré leur efficacité en inhibant 94 % de la bactérie *P. aeruginosa* en surface de silicone [101]. Le PEG, lui, est connu pour sa non-toxicité et sa capacité à réduire l'adhésion de protéines par

sa grande mobilité en conditions hydratées et par les gênes stériques provoquées. Ces propriétés sont attrayantes pour prévenir la formation de matrice extracellulaire par prévention de l'adhésion de cellules, conséquence de l'antiadhésion de protéines [10,16]. Incorporé dans le réseau de PDMS [65] ou greffé sur sa surface, le PEG a montré son efficacité pour inhiber l'adhésion de fibroblastes et des bactéries *S. aureus*, *E. coli* et *S. epidermidis* [19,102]. Cependant, le PEG a pour défaut d'être peu stable dans le temps dans un environnement biologique, en raison de sa possible oxydation lorsqu'il est en contact de nombreuses solutions biologiques [19,20]. L'utilisation de certains dérivés de PEG est également peu avantageuse lorsqu'utilisés pour immobiliser d'autres biomolécules [16]. De plus, le PEG est sujet à des problèmes d'hémocompatibilité [10].

L'ensemble des composés présentés font état des stratégies pouvant être adoptées pour conférer des propriétés antiadhésives. Parmi elles, les polymères bioactifs porteurs de groupements acides carboxyliques ont attiré l'attention. Par leurs propriétés, leur simplicité et leur utilisation préalable dans les copolymères « heparin-like », ils seront au cœur des travaux réalisés.

3.3.2. Propriétés des polymères porteurs de groupements carboxylates

Parmi les polymères porteurs de groupements carboxylates, on retrouve généralement l'acide poly(méthacrylique) (PMAc) et l'acide poly(acrylique) (PAAc). Ces polymères ne sont pas toxiques et sont biocompatibles [97]. Le PAAc ou le PMAc peuvent être considérés comme des polymères sensibles aux stimuli environnants, et notamment sensibles au pH [25,85,86,103,104]. Ces polymères sont hydrophiles et hygroscopiques. Ils sont capables d'être réticulés pour former des réseaux hydrogels avec par exemple du chitosane [105]. Ils sont parfois utilisés pour créer des copolymères en bloc avec, par exemple le polyacrylamide, l'oxyde de poly(éthylène), ou encore la cellulose [97,106]. Hu *et al.* comparent le greffage par irradiations UV du PAAc et du PEG sur des surfaces de PDMS. Ils mettent en évidence l'augmentation plus importante de l'hydrophilie de surfaces fonctionnalisées avec le PAAc. Même après 3,5 heures de greffage, le PEG augmente moins fortement la mouillabilité de surface et se greffe en plus faible quantité [78].

L'antiadhésion est une propriété intéressante pour de nombreuses applications impliquant le PDMS. Outre les discussions autour de l'implant mammaire [31,52,99], on retrouve des applications telles que les sondes, tubes, les lentilles de contact [19,23,65], ou encore les dispositifs microfluidiques qui ne doivent pas accumuler de matériel biologique [17,18]. Les dispositifs à court maintien dans le corps doivent pouvoir être retirés sans provoquer de désordre biologique. Le PAAc est un polymère bioactif capable d'agir en ce sens. L'hydrophilie importante conférée par ce polymère et la densité importante de charges négatives présentes à pH physiologique, peuvent prévenir l'adhésion de composés biologiques [18,31,74,107].

Le PAAc est capable de conférer des propriétés antibactériennes au milieu. Arkaban *et al.* expliquent que la forme déprotonée de l'acide permet une capacité d'échange d'ions acides accrue. Cette propriété est pH-dépendante et offre une capacité d'échange optimale pour $4,5 < \text{pH} < 6$. Une quantité importante d'ions COO^- apporte à la surface une densité de charge négative élevée, propice à une affinité importante pour les cations. Plus ces taux en surface sont élevés, plus ils induiront de nombreux échanges, et plus l'action antibactérienne pourra être déterminante [97]. Gratzl *et al.* mettent en évidence cet aspect : la présence du PAAc dans leur copolymère génère une activité antibactérienne par échange d'ions, et cette activité augmente avec la quantité d'acide acrylique. Néanmoins, la présence de contre-ions dans le milieu peut parfois perturber cette action [108].

Yang *et al.* mettent également en évidence que le greffage de PAAc en surface de films de silicone peut augmenter la conductivité électrique du matériau. Les électrons π des groupements carboxyles greffés permettent d'induire cette propriété, tandis que l'acide poly(acrylique) seul est plus résistant électriquement en raison des liaisons hydrogène fortes au sein de sa structure [75].

Coindre *et al.* expliquent que du silicone revêtu d'acide poly(méthacrylique) a permis l'augmentation de la vascularisation via un facteur de croissance de l'insuline. Ils ont de ce fait fonctionnalisé du polypropylène poreux avec 40 % d'acide méthacrylique co-isodecyl acrylate. Les surfaces, une fois fonctionnalisées, ont montré un degré d'inflammation plus bas et les résultats dévoilent qu'après trois semaines d'implantation, la densité de vaisseaux autour de l'implant double en comparaison au polypropylène seul (Figure 24) [109]. Cette étude met à nouveau en lumière une fonctionnalité induite par les groupements carboxylate en surface.

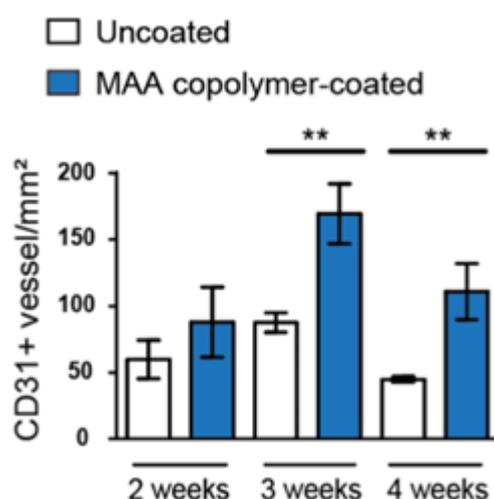


Figure 24 : Densité de vaisseaux sanguins autour d'implants en polypropylène non modifiés et modifiés après 2, 3 et 4 semaines [109]

Ainsi, le PAAc et le PMAc représentent des polymères de choix pour conférer une bioactivité en surface. Ils agissent notamment contre l'adhésion de bactéries et autres matériels biologiques, et pour l'amélioration d'autres propriétés telles que la conductivité électrique ou encore la vascularisation. Il est ainsi pertinent de poursuivre les investigations autour de la fonctionnalisation du PDMS par ces polymères.

3.3.3. Combinaison du groupement carboxylate avec d'autres groupements et techniques structurales

Les différents travaux exposés dans cette partie ont pour objectif de mettre en évidence l'efficacité de la combinaison du groupement carboxylate avec d'autres composés. Ces exemples montrent l'intérêt de la multifonctionnalisation pour formuler des revêtements toujours plus optimaux pour des applications médicales.

Velazco-Medel *et al.* ont travaillé sur le greffage grâce aux irradiations gamma, d'un copolymère acide acrylique et éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) en surface de PDMS. Le greffage a été mis en place dans une solution contenant du toluène avec différents ratios de AAC/EGDMA. Des études de gonflement au contact de l'eau ont été mises en place pour analyser la capacité d'adsorption de la surface. Cette capacité est amplement augmentée lorsque la proportion en AAC dans le copolymère est élevée (ratio 5:1). Néanmoins une rétention d'eau accrue augmente l'instabilité du système avec des gains et pertes de masse importants. Ce paramètre n'étant pas souhaitable dans cette étude, l'incorporation d'EGDMA a donc constitué un compromis permettant le maintien d'un système stable [74].

El-Tahlawy *et al.* ont travaillé sur l'élaboration d'un copolymère chitosane/acide poly(méthacrylique) [110], et Abbasian *et al.* ont formulé un système de relargage de médicaments grâce à la conjugaison de chitosane greffé par l'acide poly(méthacrylique), immobilisant de l'oxyde de graphène. Le système de ces derniers s'est révélé biocompatible et arbore une bonne capacité d'encapsulation. La présence de l'acide poly(méthacrylique) permet le relargage par sensibilité au pH [111]. Chang *et al.* ont élaboré un film multicouche via la méthode LbL, à base d'acide poly(acrylique), de chitosane et d'héparine qu'ils ont immobilisé sur un substrat de silicone. Des essais microbiologiques ont montré l'inhibition croissante de *S. aureus* et *E. coli* avec la présence de ces multicouches. Les auteurs postulent que l'adhésion d'héparine sur la multicouche est favorisée par les interactions ioniques et impacte sa conformation. Cette hypothèse est émise sur le fait que l'héparine se lie habituellement à la fibronectine, alors que l'adhésion des cellules est diminuée dans cette étude [60]. Finalement, l'utilisation de plusieurs molécules et leur assemblage génèrent des réactions interdépendantes, impactant les propriétés de surface du biomatériau sur l'environnement biologique.

Un dépôt contrôlé d'une multicouche de composés a permis la multifonctionnalisation de sondes en silicone. De la polydopamine a été déposée sur des surfaces de silicone, sur

lesquelles des nanoparticules d'argent ont été immobilisées. Plusieurs couches de ces composés ont été successivement formées et une couche de poly(sulfobetaine méthacrylate-co-acrylamide) a enfin été greffée (Figure 25). Cette dernière couche a permis de conférer une propriété d'antifouling à la surface. Les nanoparticules d'argent permettent, par leur diffusion, de limiter l'incrustation des sondes de silicone pendant 12 à 45 jours, limitant ainsi la formation d'un biofilm sur ce matériau à courte durée d'implantation. La multiplication de couches a permis de fonctionnaliser la sonde sur ses parties intérieure et extérieure [112].

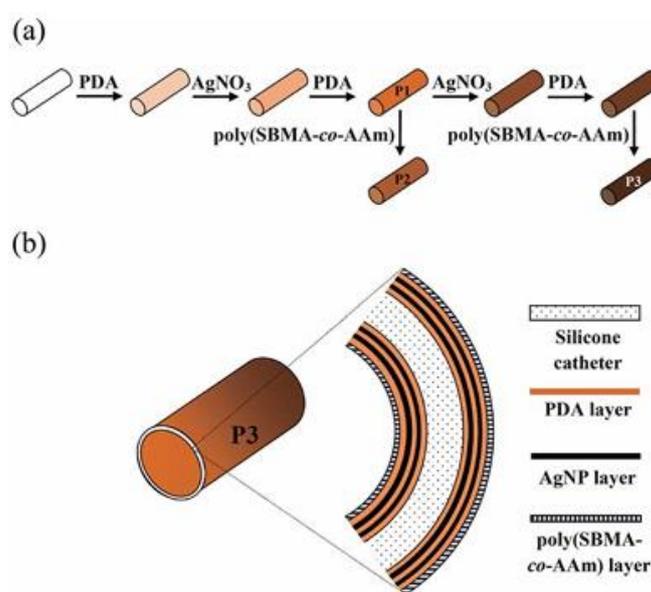


Figure 25 : Schéma descriptif des étapes (a) et de la structure (b) de la multifonctionnalisation de sondes en silicone [112]

Lee *et al.* ont greffé du PAAc sur le PDMS en réalisant différents micromotifs par la technique de photolithographie et l'utilisation d'irradiations UV. De cette manière, l'impact sur l'environnement biologique de la composition chimique de la surface couplée à la topographie sont étudiés. Des motifs de PAAc en couche, en rayures et troué ont été créés sur les surfaces. Les résultats *in vitro* et *in vivo* ont montré l'efficacité du PAAc dans la réduction de l'adhésion cellulaire en surface et dans le développement de la capsule autour de l'implant au cours du temps. Le revêtement de PAAc sous forme de rayures montre les résultats les plus encourageants, soulignant le rôle complémentaire de la microstructure sur l'activité en surface [31]. Faustino *et al.* soulignent le rôle influent de la topographie de surface, notamment via l'utilisation pertinente de la technique par lithographie, sur l'adhésion de cellules et de bactéries et même sur l'inhibition de la formation de biofilm en surface [19].

3.3.4. Les groupements carboxylates support d'une fonctionnalisation additionnelle

Le nombre important de groupements -COOH pouvant être formés en surface grâce au greffage du PAAc peut permettre la fixation de nouvelles molécules bioactives [82,86,113]. Alors, une application de délivrance d'agents actifs peut être couplée à une volonté d'inhiber l'accumulation de matériel biologique sur des dispositifs [25,106].

Zuñiga-Zamorano *et al.* ont utilisé l'acide méthacrylique pour son aspect pH-sensible afin de fonctionnaliser du PVC. Des mesures par gonflement ont permis de déterminer un point critique à $\text{pH} = 8,5$. Ainsi, le matériau fonctionnalisé a permis d'améliorer sa capacité à immobiliser un antibiotique, la ciprofloxacine, et de la relarguer par changement de pH du milieu (Figure 26). L'inhibition d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* par cette voie de fonctionnalisation a été mise en évidence (Figure 27) [114].

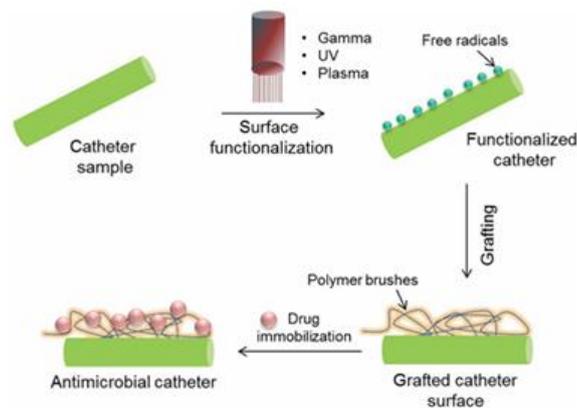


Figure 26 : Schéma de la stratégie de fonctionnalisation de sondes avec immobilisation d'antibiotiques [114]

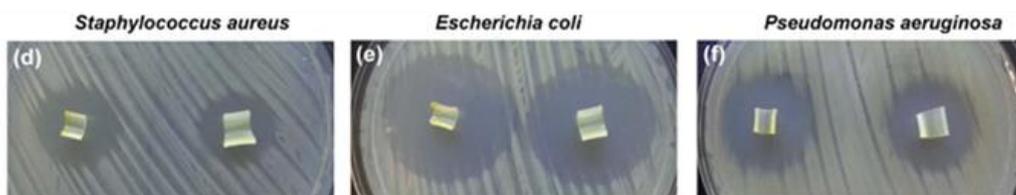


Figure 27 : Inhibition de l'adhésion de (d) *S. aureus*, (e) *E. coli* et (f) *P. aeruginosa* sur des surfaces de sondes en PVC greffées par du MAc avec immobilisation de ciprofloxacine [114]

García-Vargas *et al.* ont immobilisé de la vancomycine sur des surfaces de polypropylène greffées avec du PAAc par pré-irradiation aux rayonnements gamma γ . Cette fonctionnalisation a permis de diminuer la température de décomposition du matériau et de

conférer un gonflement pH-dépendant du matériau. L'immobilisation de vancomycine a été évaluée à plus de 109,9 mg/g, considérée comme remarquablement élevée. Cette immobilisation a permis de réduire l'adhésion de *S. aureus* sur les surfaces [115]. Cabana *et al.* se servent du rayonnement gamma ^{60}Co afin de greffer des chaînes de PAAc en surface de films de silicone pour immobiliser des particules d'or. La technique mise en place par immersion dans une solution ionique d'or a permis de répartir uniformément les particules en surface. L'action de ces surfaces contre l'adhésion de *S. aureus* a été efficace puisqu'une diminution significative de la viabilité de ces bactéries est observée pour une surface greffée à 14 % par la combinaison AAc et or. À noter que les particules d'or seules adhérentes à la surface n'ont pas d'effet antiadhésif contre *S. aureus* [73].

Enfin, il est intéressant d'ajouter qu'en plus de son utilisation comme revêtement de dispositifs médicaux, le PAAc a aussi prouvé son efficacité en tant que composant d'hydrogels et nanogels, nanoparticules et nanosphères, pour des applications de bio-détection, bio-imagerie et thérapies cancéreuses ; ou encore sous forme de nanofibres pour des applications en ingénierie tissulaire [97,116].

4. Conclusion

Cet état de l'art a d'abord permis de mettre en lumière les avantages quant à l'utilisation du PDMS dans le domaine des biomatériaux. Cependant, son caractère hydrophobe peut représenter un inconvénient : cette propriété favorise l'accumulation de matériel biologique en surface de l'implant, dont les bactéries, qui peuvent engendrer des complications, notamment des infections. Elles peuvent toucher diverses applications, allant des sondes qui peuvent par exemple être touchées par des thromboses sur leur face interne, et une réaction inflammatoire sur leur surface externe, à des implants pouvant rester plusieurs années dans le corps comme les implants mammaires qui voient leur capsule postopératoire dégénérer.

La compréhension du mécanisme à l'interface du matériau avec l'environnement biologique est complexe. Il est néanmoins acquis que les protéines sont les premiers composés qui adhèrent au biomatériau et que ce sont elles qui guident principalement l'adhésion des autres composés. Les mécanismes d'adhésion des protéines en surface mettent en jeu de nombreuses interactions physico-chimiques : les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, les réactions acide/base, les interactions électrostatiques, ou encore les interactions hydrophile ou hydrophobe. C'est de la même manière que les bactéries vont interagir avec les protéines. Ainsi, on comprend que moduler ces interactions constitue un élément clé pour éviter les problèmes.

La modification de la chimie de surface représente alors une solution prometteuse pour prévenir les complications. L'analyse des données de la littérature présente de nombreuses stratégies pour y parvenir. Chacune constitue une avancée afin d'approcher la solution optimale. Par ailleurs, les recherches s'orientent désormais vers la modification multiple des surfaces, leur conférant davantage de fonctionnalités.

En prenant appui sur l'expertise du laboratoire, le projet s'inscrira dans cette optique. Il se concentrera sur l'utilisation de composés porteurs de groupements carboxylates, prometteurs pour conférer des propriétés antiadhésives, antibactériennes et pouvant remplir la fonction de support de l'attachement d'autres composés. Pour cela, il s'agira dans un premier temps de mettre en place une stratégie optimale de greffage de ces composés sur le PDMS, et de la caractériser. Des analyses topographiques et mécaniques seront également menées afin d'évaluer l'impact du greffage sur le matériau. Ces aspects constitueront le Chapitre 3. Les surfaces fonctionnalisées seront ensuite confrontées à des premières analyses biologiques et microbiologiques. Elles feront l'objet du Chapitre 4. Ces expériences sont menées de manière à comprendre les mécanismes à l'interface entre le matériau et l'environnement biologique. Enfin, des travaux supplémentaires ont été conduits afin d'optimiser le procédé et comprendre l'impact de la structure moléculaire des polymères sur l'environnement biologique. Pour aller plus loin, des essais de synthèse de copolymères ont également été menés. Ces perspectives de travail sont au cœur du Chapitre 5.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes

Ce chapitre a pour objectif d'exposer l'ensemble du matériel ainsi que les méthodes et protocoles expérimentaux utilisés au cours de ces travaux de thèse.

Il regroupe les différents monomères et polymères exploités et les stratégies mises en place pour les greffer en surface du PDMS. S'ensuit la présentation des méthodes de caractérisation chimique de surfaces et des produits. Les méthodes d'analyses topographiques de surface sont ensuite décrites ainsi que les essais mécaniques réalisés.

Enfin, les méthodes et protocoles employés pour réaliser les essais biologiques et microbiologiques sont présentés.

1. Matériels

1.1. Surfaces de PDMS

Les surfaces de PDMS utilisées pour ce projet proviennent d'enveloppes de prothèses mammaires médicales vides obtenues par l'entreprise SEBBIN, ou d'implants entiers ALLERGAN. Ces derniers ont été fournis par le Dr. Vivien Moris, chirurgien esthétique, lors de sa thèse au sein du laboratoire CB3S (Figure 28). Dans le cadre des expériences, ces implants sont préalablement vidés et lavés. Pour cela, ils sont coupés en deux à l'aide d'un scalpel, et vidés au maximum de leur gel de silicone. Les enveloppes sont ensuite redécoupées puis introduites dans un bain de tétrahydrofurane (THF) placé aux ultrasons pendant deux fois 10 minutes. De cette manière, les échantillons vont gonfler et pourront ainsi être nettoyés des dernières traces de gel résiduelles. Les morceaux d'enveloppe sont ensuite lavés à l'eau distillée deux fois 5 minutes, puis séchés. Les enveloppes fournies seules (SEBBIN) sont uniquement découpées et lavées une nuit dans de l'eau distillée.

Des échantillons carrés de 10 x 10 mm sont découpés pour réaliser la plupart des caractérisations chimiques. Pour les essais biologiques, des échantillons ronds de 10 mm de diamètre ont été découpés. Avant chaque utilisation, les échantillons sont lavés une nuit dans de l'eau distillée.



Figure 28 : Implant mammaire en PDMS (ALLERGAN)

1.2. Monomères et solvants

Au cours de ce projet, plusieurs monomères ont été utilisés pour fonctionnaliser les surfaces de PDMS. Leur nom, leur concentration, les solvants associés ainsi que les polymères résultants sont regroupés dans le Tableau 7.

Dans une première partie, l'étude s'est concentrée sur le greffage en surface d'acide poly(acrylique) (PAAc) et d'acide poly(méthacrylique) (PMAc). Ces polymères sont porteurs de groupements acide carboxylique. À titre de comparaison avec les travaux précédents réalisés

au laboratoire, le poly(styrène sulfonate) de sodium (PNaSS), porteur du groupement sulfonate, a également été greffé. Dans une seconde partie, l'étude s'est concentrée sur le greffage de polymères proches structurellement des premiers cités : l'acide poly(vinylbenzoïque) (PVAc), et l'acide 4-(4-poly(Acryloyloxy)butoxy)benzoïque (PAbAc).

1.2.1. Le styrène sulfonate de sodium (NaSS)

Une étape de purification est nécessaire avant l'utilisation des différents monomères. Le styrène sulfonate de sodium (Sigma Aldrich) a été purifié par recristallisation. 90 g de monomère ont été dissouts dans un mélange constitué de 180 mL d'eau distillée et 1600 mL d'éthanol (Carlo Erba Reagents) (10:90 v/v) à 70 °C pendant une nuit sous agitation. Le mélange a ensuite été filtré à chaud sur Büchner, de manière à récupérer le filtrat qui sera conservé 48 heures à 4 °C. Une fois le temps écoulé, des cristaux de NaSS sont formés. Le milieu est alors à nouveau filtré sur Büchner, les cristaux sont récupérés et séchés à l'étuve 50 °C pendant une nuit [117]. Le NaSS est conservé à -20 °C avant utilisation.

Au cours de l'étude, le NaSS est utilisé à une concentration de 0,35 M en solution aqueuse. Cette concentration a été déterminée sur la base des travaux antérieurs réalisés au laboratoire [77].

1.2.2. L'acide acrylique (AAc), et l'acide méthacrylique (MAc)

Avant utilisation, l'acide acrylique (Sigma Aldrich) et l'acide méthacrylique (ThermoFisher) sous forme liquide sont purifiés sur colonne préparée d'un dissolvant d'inhibiteur hydroquinone et éther monométhyle d'hydroquinone. Les solutions récupérées sont ensuite conservées à température ambiante (TA).

Les monomères sont utilisés à une concentration de 0,35 M en solution aqueuse ainsi qu'en solution aqueuse à pH ajusté par introduction de NaOH (0,32 M). La concentration a été choisie en référence aux travaux de greffage antérieurs réalisés avec le PNaSS.

1.2.3. L'acide vinylbenzoïque (AcV)

Pour être utilisé, l'acide vinylbenzoïque (BLDpharm) est purifié par chauffage à reflux. 2 grammes de produit sont introduits dans 50 mL d'eau et le mélange est chauffé à 110 °C. Après ébullition, 15 mL d'éthanol sont ajoutés millilitre par millilitre dans le mélange jusqu'à solubilisation complète. Le tout est porté à reflux pendant 15 minutes. Après arrêt du chauffage, le mélange une fois refroidi est placé une nuit au frigo. Le lendemain, le mélange obtenu est filtré et la poudre récupérée est séchée 2 heures à l'étuve 50 °C.

Pour les étapes de fonctionnalisation, l'AcV est utilisé à une concentration de 7.10^{-3} M en solution aqueuse. La concentration a été déterminée par la limite de solubilité du produit dans l'eau.

1.2.4. L'acide 4-(4-(Acryloyloxy)butoxy)benzoïque (AbAc)

L'AbAc commercial de pureté 99,95% (BLDpharm) a été utilisé directement sans étape de purification préalable.

La concentration utilisée au cours des étapes de fonctionnalisation est de 0,05 M dans du méthanol (ThermoFisher Scientific). Celle-ci a été déterminée expérimentalement après plusieurs tentatives de solubilisation, greffages et cinétiques de greffages.

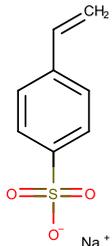
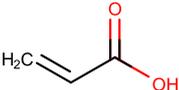
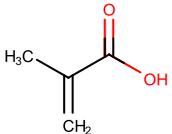
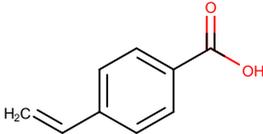
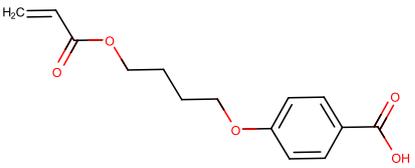
Monomère	Concentration (M)	Solvant	Polymère
Styrene sulfonate de Sodium, NaSS 	0,35	Eau distillée	Poly(Styrene Sulfonate) de Sodium PNaSS
Acide Acrylique, AAc 	0,35	Eau distillée ou NaOH(aq)	Acide Poly(Acrylique) PAAc
Acide Méthacrylique, MAc 	0,35	Eau distillée ou NaOH(aq)	Acide Poly(Méthacrylique) PMAc
Acide Vinylbenzoïque, AcV 	$7 \cdot 10^{-3}$	Eau distillée	Acide Poly(Vinylbenzoïque) PVAc
Acide 4-(4-(Acryloyloxy)butoxy)benzoïque, AbAc 	0,05	Methanol	Acide 4-(4-poly(Acryloyloxy)butoxy)benzoïque PAbAc

Tableau 7 : Monomères et polymères utilisés pour fonctionnaliser les surfaces de PDMS

2. Stratégie de greffage

2.1. Méthode directe « grafting from »

Afin de réaliser les différents greffages de polymères bioactifs en surface, le PDMS est d'abord soumis aux irradiations ultraviolettes (UV) constituant l'étape d'activation. La polymérisation de surface est ensuite amorcée par la méthode dite « grafting from » [77] (Figure 29).

L'échantillon de silicone préalablement découpé et lavé est placé dans un ballon de 100 mL avec 60 mL d'eau distillée. L'échantillon est suspendu à une tige en téflon et pressé contre un disque de téflon de manière à le maintenir directement face au faisceau UV (Figure 29). Il est nécessaire de procéder ainsi en raison de la transparence du matériau et de son caractère flottant. Avant de procéder à l'exposition aux UV, le milieu est dégazé pendant 30 minutes sous argon. La source d'irradiations UV utilisée provient d'une lampe à mercure basse pression de source LOT Oriel (365 nm) (Figure 30a). La superficie couverte par les irradiations en pleine puissance est d'environ 1,2 cm². Dans le cas de quelques greffages réalisés avec les monomères acide acrylique et méthacrylique, la source UV d'une lampe LED Omnicure (365 nm) à plus large faisceau de diffusion a été utilisée (Figure 30b).

1^{ère} étape, activation de la surface :

La surface de PDMS étant inerte chimiquement, la première étape consiste à la rendre réactive. Après dégazage, l'échantillon introduit dans l'eau est placé face aux rayonnements UV pendant 1 heure à 160 mW.cm⁻². De cette manière, des groupements hydroxyles sont formés en surface, la rendant active.

2^e étape, polymérisation en surface : méthode « grafting from » :

Après activation, l'échantillon est rapidement transféré dans un ballon contenant la solution de monomère à concentration, préalablement dégazée 30 minutes sous argon. Le tout est placé de nouveau face aux irradiations UV pendant 1 heure à 220 mW.cm⁻². A cette étape, à partir des groupements hydroxyles, des radicaux O[•] sont formés et vont réagir avec les monomères en solution. De nouveaux radicaux sont ensuite formés, la polymérisation radicalaire est amorcée.

À la suite de l'étape de greffage, les échantillons sont lavés pendant 48 heures dans de l'eau distillée afin de retirer les résidus de polymères non greffés. Ils sont ensuite séchés pendant une nuit à l'étuve à 37 °C.

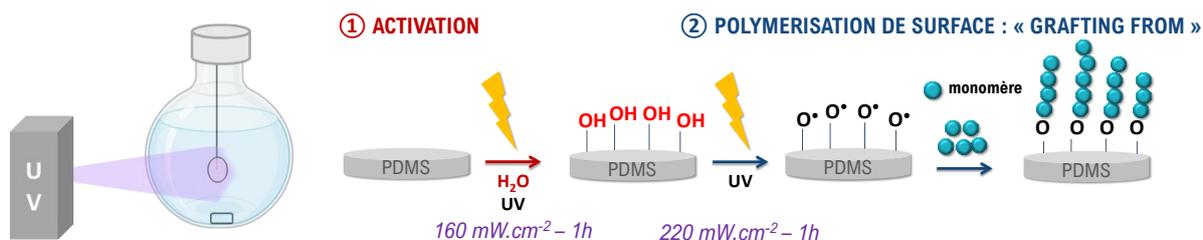


Figure 29 : Schéma de greffage et méthode de polymérisation "grafting from"

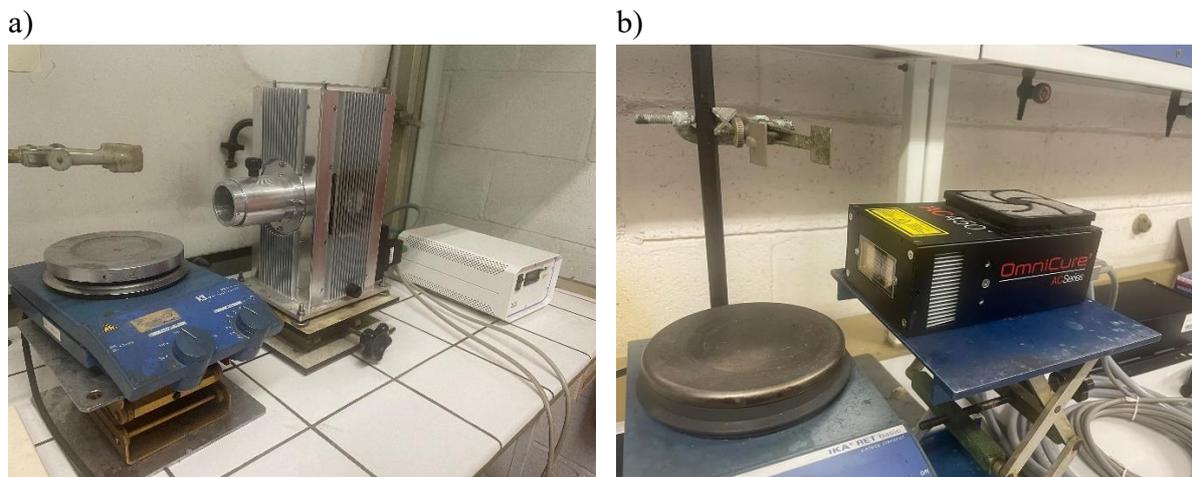


Figure 30 : Photographies des dispositifs de source de rayonnements UV : a) lampe à mercure Lot Oriel (LO), b) pavé LED Omnicure

2.2. Méthode indirecte « grafting to »

2.2.1. La méthode

Dans le dernier chapitre de ce manuscrit, une autre méthode est employée afin de greffer les polymères bioactifs en surface de manière plus contrôlée. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de la méthode de greffage indirecte dite « grafting to » [118]. Elle consiste à utiliser une molécule adhésive capable de s'immobiliser sur la surface du matériau et sur laquelle va ensuite venir s'attacher un polymère bioactif de taille contrôlée. Ici, l'Acrylamide de Dopamine (ADOPA), grâce à son groupement catéchol ayant de fortes propriétés adhésives, a été synthétisée pour jouer ce rôle fonctionnel d'ancre [119] (Figure 31). Sur le même principe, de l'acide caféique (Sigma-Aldrich, Figure 31) a également été utilisé comme ancre dans ces travaux [120]. Le développement d'un protocole optimal d'adhésion de ces molécules d'ancrage en surface ayant fait l'objet d'une partie de ces travaux de recherche, plusieurs concentrations en solution ont été expérimentées. Ces expériences ainsi que les caractérisations sont décrites dans le Chapitre 5 de ce manuscrit. Après adhésion, du polyNaSS de taille

contrôlée (10 kDa) porteur d'un groupement thiol terminal (polyNaSS-SH) est attaché à la molécule ancrée par une réaction thiol-ène click (Figure 32, Voie n°1).

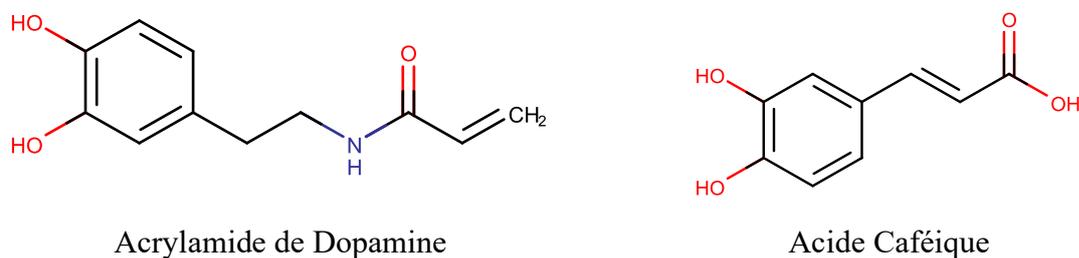


Figure 31 : Formules chimiques des molécules d'ancrage : Acrylamide de Dopamine et Acide Caféique

Une autre stratégie consiste à d'abord former le produit de la réaction thiol-ène click entre le polyNaSS-SH et l'ADOPA, puis à accrocher le tout aux surfaces de PDMS (Figure 32, Voie n°2). Les différents essais expérimentaux réalisés seront également discutés dans le Chapitre 5 de ce manuscrit.

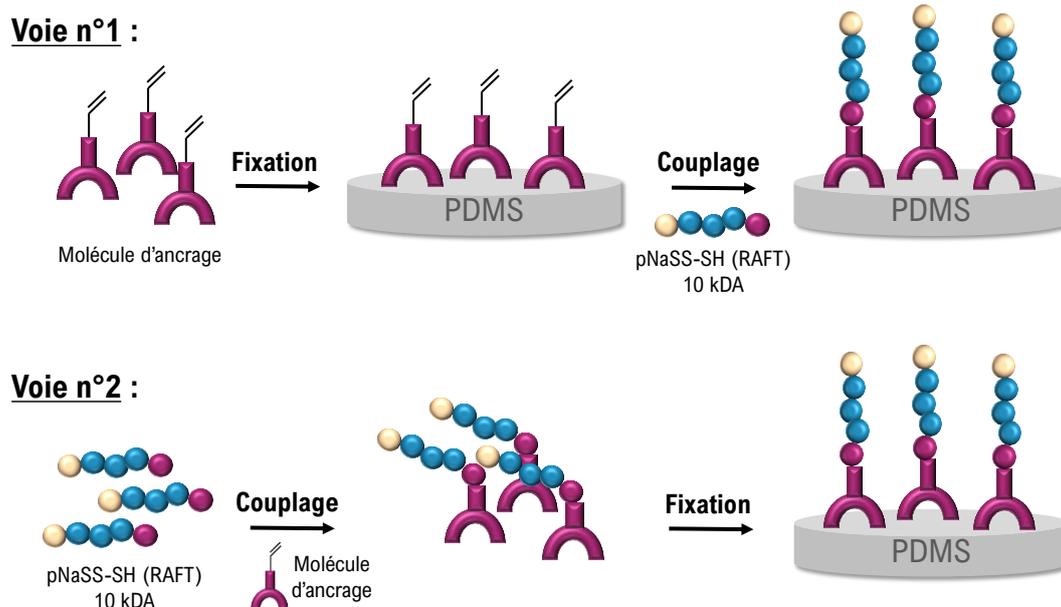


Figure 32 : Stratégies d'adhésion des polymères par la méthode "grafting to"

2.2.2. Synthèse des réactifs

Synthèse de l'Acrylamide de Dopamine (Figure 33) :

Les réactifs utilisés pour la synthèse de l'ADOPA et leurs quantités respectives sont résumés dans le Tableau 8.

Dans un ballon, 14,43 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) ont été dissouts dans 402 mL d'eau distillée et le mélange a été dégazé 30 minutes sous argon. La solution est ensuite transférée dans un ballon contenant 3 g de chlorhydrate de dopamine (Sigma-Aldrich) dégazé et le tout est agité et dégazé sous argon pendant 15 minutes. Le ballon est ensuite refroidi à 0 °C puis sont ajoutés 8,55 g de Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) et 8,1 mL de chlorure d'acryloyle (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific) goutte à goutte. Le milieu est maintenu sous agitation pendant une nuit à TA. Après cette étape, la solution est acidifiée à $\text{pH} = 2$ avec HCl concentré. L'extraction de ce mélange est ensuite effectuée 3 fois avec de l'acétate d'éthyle (Sigma-Aldrich), puis le mélange est lavé avec HCl (0,1 M) et séché avec MgSO_4 (Thermo Fisher Scientific). Le produit obtenu est transféré dans un ballon et concentré à l'évaporateur rotatif. Un liquide orangé visqueux est obtenu. Enfin, l'acrylamide de dopamine est purifiée sur colonne de gel de silice avec un mélange dichlorométhane/méthanol (9:1) puis révélé par chromatographie sur couches minces. Le produit est passé une dernière fois à l'évaporateur rotatif pour éliminer le dichlorométhane restant. Le produit obtenu est placé au congélateur puis séché sous vide. Le rendement obtenu est de 33 %.

Borate $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$		Chlorhydrate de Dopamine		Na_2CO_3		Chlorure d'acryloyle	
(g)	(mmol)	(g)	(mmol)	(g)	(mmol)	(mL)	(mmol)
14,43	37,20	3,00	16,75	8,55	80,25	8,10	78,90

Tableau 8 : Réactifs et leur quantité pour la synthèse de l'acrylamide de dopamine

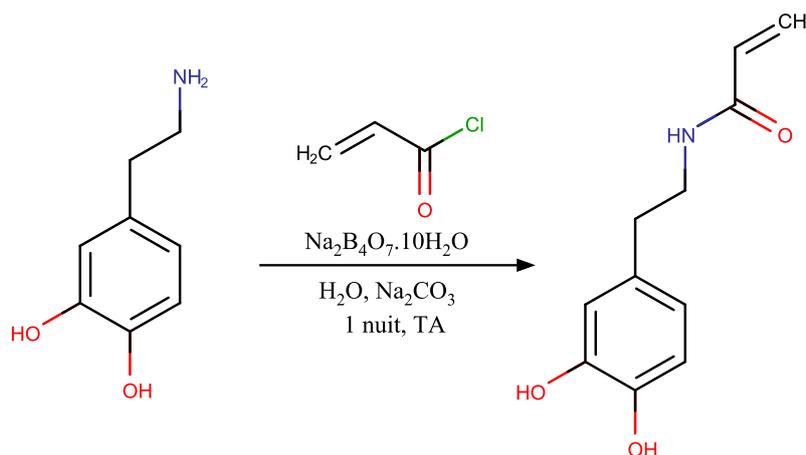


Figure 33 : Schéma de synthèse de l'acrylamide de dopamine

Préparation du polyNaSS-SH (10 kDa) par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) (Figure 34) :

Les réactifs utilisés et leur quantités respectives sont résumés dans le Tableau 9.

- Préparation du polyNaSS (10 kDa)

Dans un ballon de 50 mL sont introduits l'acide 4,4'-azobis(4-cyanovalérique) (ACVA, Sigma-Aldrich) comme initiateur de polymérisation, l'acide 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoïque (CTA, Sigma-Aldrich) comme agent de transfert de chaîne et le NaSS. 15 mL d'eau distillée sont ajoutés et le mélange est dégazé sous argon pendant 30 minutes. Le mélange obtenu est chauffé à 70 °C pendant 5 heures sous agitation. Le ballon est ensuite transféré dans un bain de glace pour une durée de 20 minutes. Le produit obtenu est précipité dans 350 mL d'acétone froid (Carlo Erba Reagents). Un précipité rose est obtenu. Ce précipité est alors filtré, puis placé à l'étuve à 50 °C pendant une nuit.

- Formation du polyNaSS-SH

Dans un ballon, sont dissouts 4 g (0,76 mol) de polyNaSS (10 kDa) dans 10 mL d'eau distillée. Le ballon est placé dans un bain de glace sous agitation et la solution est dégazée sous argon pendant 15 minutes. En parallèle, une solution de NaBH₄ (1 M, Sigma-Aldrich) est préparée et dégazée sous argon pendant 15 minutes. A l'aide d'une seringue, les 10 mL de la solution de NaBH₄ préparée sont introduits dans le mélange polymère. 2 mL de tributylphosphine (PBU₃, ACROS ORGANICS) sont tout de suite ajoutés à l'aide d'une seringue en verre. La solution est dégazée pendant 15 min, puis laissée sous agitation pendant 48 heures. Le mélange est ensuite précipité dans du méthanol froid (environ 500 mL). Un précipité blanc est obtenu. Il est alors filtré et lavé avec un peu de méthanol froid afin d'enlever

le NaBH_4 résiduel. La poudre de polyNaSS thiolaté obtenue est enfin séchée à l'étuve $50\text{ }^\circ\text{C}$, puis conservée à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pour une utilisation ultérieure.

NaSS		ACVA		CTA		[NaSS] : [ACVA] :
(g)	(mol)	(g)	(mol)	(g)	(mol)	[CTA]
5	$2,43 \cdot 10^{-2}$	$3,29 \cdot 10^{-2}$	$3,91 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \cdot 10^{-1}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	[62] : [0,3] : [1]

Tableau 9 : Réactifs et leur quantité pour la formation du pNaSS-SH

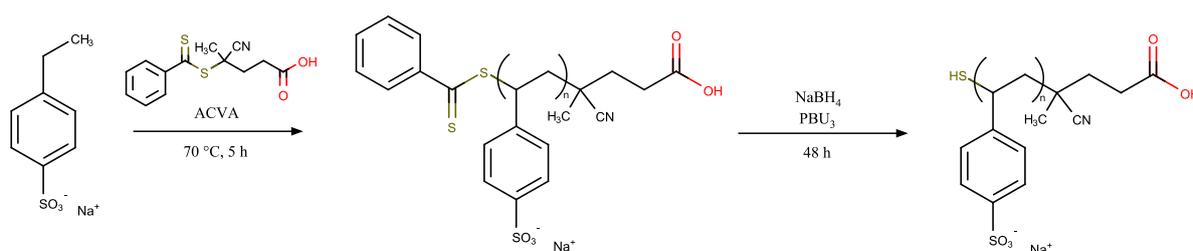


Figure 34 : Schéma de synthèse du pNaSS-SH

Formation du produit de la réaction thiol-ène click (pNaSS-SH/ADOPA) :

Dans un ballon, le pNaSS-SH (1 g , $1,0 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$) et du photoamorceur 2,2'-Azobis(2-méthylpropionamide) Dihydrochloride (ADC, Sigma-Aldrich) ($1,30 \cdot 10^{-2}\text{ g}$, $4,79 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$) sont solubilisés dans 3 mL d'eau. Dans un vial, l'ADOPA est solubilisée dans 3 mL de méthanol puis ajoutée au ballon. Le tout est agité et dégazé 30 minutes à l'abri de la lumière. Le ballon est ensuite placé aux irradiations UV pendant 45 minutes à $190\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ sous agitation. La solution obtenue est concentrée à l'évaporateur rotatif puis précipitée dans 10 mL de méthanol froid sous agitation. La solution contenant le précipité est alors centrifugée pendant deux fois 15 minutes à 4400 rpm en retirant le surnageant à chaque fois. Le précipité obtenu est dissout dans l'eau puis lyophilisé et conservé à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pour une utilisation ultérieure.

3. Caractérisations physico-chimiques du greffage

3.1. Mesure de l'angle de contact apparent

Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'un matériau est une propriété déterminante des interactions entre une surface et son environnement. Il peut rentrer en compte dans l'interprétation de nombreux phénomènes de surface. La mouillabilité des surfaces de PDMS avant et après fonctionnalisation est déterminée grâce au système de mesure KRUSS GmbH DAS10. Pour chaque surface, une goutte d'eau distillée de 2 μL est déposée et l'angle de contact apparent est capturé 15 secondes après le dépôt. La mesure est réalisée trois fois sur chaque échantillon. À partir de l'équation de Young-Dupré (1) et de la détermination de la ligne de base de contact (Figure 35), le logiciel DSA drop shape analysis associé à l'appareil fournit les valeurs θ d'angle de contact apparent.

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{LS}}{\gamma_{LG}} \quad (1)$$

Dans cette équation, γ_{SG} , γ_{LS} et γ_{LG} , désignent respectivement les tensions superficielles à l'interface solide/gaz, liquide/solide et liquide/gaz. Généralement, la surface est considérée comme plutôt hydrophobe lorsque $\theta \geq 90^\circ$ et hydrophile quand $\theta < 90^\circ$.



Figure 35 : Schéma de principe de mesure d'angle de contact apparent

3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier et Réflectance Totale Atténuée (ATR-FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet de mettre en évidence par l'exploitation de bandes spectrales, la présence de liaisons ou groupements caractéristiques des molécules ou surfaces analysées. La technique est basée sur la détection des vibrations et élongations de liaisons atomiques. Un rayonnement infrarouge parcourt l'échantillon, pour lequel certaines longueurs d'ondes seront absorbées par les liaisons chimiques présentes à des fréquences énergétiques associées. Celles-ci seront associées à des bandes spectrales présentes à des positions (nombre d'onde) et des intensités précises sur le spectre.

Lors de ce projet, les analyses ont été réalisées à l'aide du spectromètre Perkin Elmer Spectrum Two. La résolution a été fixée à 4 cm^{-1} avec une gamme spectrale allant de 600 à 4000 cm^{-1} (16 scans). Les surfaces de PDMS analysées sont déposées et pressées avec une force équivalente contre un diamant par lequel traverse le rayonnement. Les spectres obtenus sont ensuite ajustés et directement analysés.

3.3. Spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS)

Les expériences XPS consistent à bombarder les échantillons solides de photons par des rayons X à certaines longueurs d'onde. Ces échantillons émettront en conséquence des photoélectrons d'énergie propre à chaque élément constitutif de la surface et qui seront détectés. L'XPS est capable de détecter des éléments d'une profondeur allant de 2 à 10 nm , permettant la détermination de la composition de la surface par comparaison avec des spectres connus. De cette manière, les changements de composition de nos surfaces fonctionnalisées pourront être mis en évidence. Les expériences ont été réalisées avec le spectromètre Omicron Argus XPS (Taurusstein, Allemagne), équipé d'une source radiative monochromatique $\text{AlK}\alpha$ ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$). Les surfaces de silicone sont exposées à de l'ultra-vide ($\leq 10^{-10} \text{ Torr}$) et à un faisceau d'électrons de 300 W . L'émission de photoélectrons a été analysée sous un angle de 90° . Les spectres sont obtenus en paramétrant l'énergie by-pass à 100 eV pour le spectre survey et 20 eV pour les régions de haute résolution. Les énergies de liaison ont été calibrées sur l'énergie de liaison $\text{C}1\text{s}$, à $284,8 \text{ eV}$, d'un atome de carbone aliphatique. Les intensités des pics obtenus sont corrigées par les facteurs de Scofield [121]. Le logiciel Casa XPS v.2.3.15 (Casa Software Ltd., UK) est utilisé pour ajuster et traiter les spectres et un ratio Gaussien/Lorentzien (ratio G/L = 70/30) est appliqué.

3.4. Dosage colorimétrique au bleu de toluidine (BT)

Les taux de greffage en surface de nos matériaux ont pu être déterminés grâce à un dosage colorimétrique au bleu de toluidine (Figure 36). En effet, les groupements cationiques $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ du BT mis en contact avec nos surfaces vont pouvoir complexer avec chaque groupement anionique carboxylate COO^- ou sulfonate SO_3^- présent sur nos polymères (Figure 36). Pour cela, une solution de BT à $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ est préparée en dissolvant $75,6 \text{ mg}$ de poudre de BT (Carl Roth) dans 500 mL d'eau distillée. La solution est agitée pendant une nuit à l'abri de la lumière. Le lendemain, la solution est ajustée à $\text{pH} = 10$ avec du NaOH (1 M) de manière à assurer la complexation des groupements sous leur forme ionique. Chaque échantillon est ensuite immergé dans 5 mL de solution de BT pendant 6 heures à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sous agitation. Une fois complexées, les surfaces sont lavées 3 fois 5 minutes dans une solution de NaOH à $1 \cdot 10^{-3}$

M de manière à retirer l'excès de BT non complexé. Les échantillons sont finalement placés dans 5 ou 10 mL de solution d'acide acétique (50/50 %v/v, Sigma-Aldrich) pendant 24 heures à l'abri de la lumière pour permettre leur décomplexation. À la fin de l'expérience, l'absorbance des solutions de décomplexation est mesurée au spectromètre UV-visible à 633 nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption de la molécule de BT.

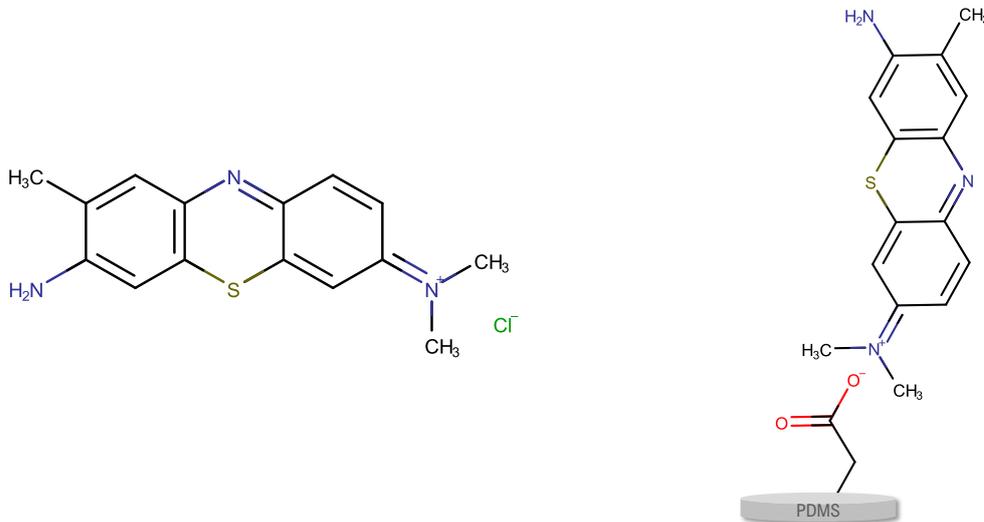


Figure 36 : Formule chimique de la molécule de bleu de toluidine et schéma de complexation de la molécule de BT en surface de PDMS

En utilisant la loi de Beer-Lambert (2), où A correspond à l'absorbance mesurée, ε le coefficient d'extinction molaire en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, l à la longueur de la cuve et C à la concentration en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de la solution, il sera possible d'accéder à la concentration en BT. Ensuite, grâce à l'hypothèse avancée par Ikada *et al.* [122] selon laquelle une mole de BT se complexe avec une mole de groupement carboxylate, la concentration en groupements anioniques en surface pourra être déterminée.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2)$$

$$TG = \frac{n(BT)}{S} \quad (3)$$

$$n(BT) = n(\text{COO}^-) = \frac{C}{V} \quad (4)$$

Le coefficient d'extinction molaire ϵ est déterminé par la pente d'une courbe d'étalonnage (Figure 37), réalisée grâce à la mesure des absorbances de solutions de BT de concentrations connues dans de l'acide acétique.

Le taux de greffage TG, en mol.cm^{-2} , est déterminé par les équations (3) et (4), avec V , le volume d'acide acétique en L.

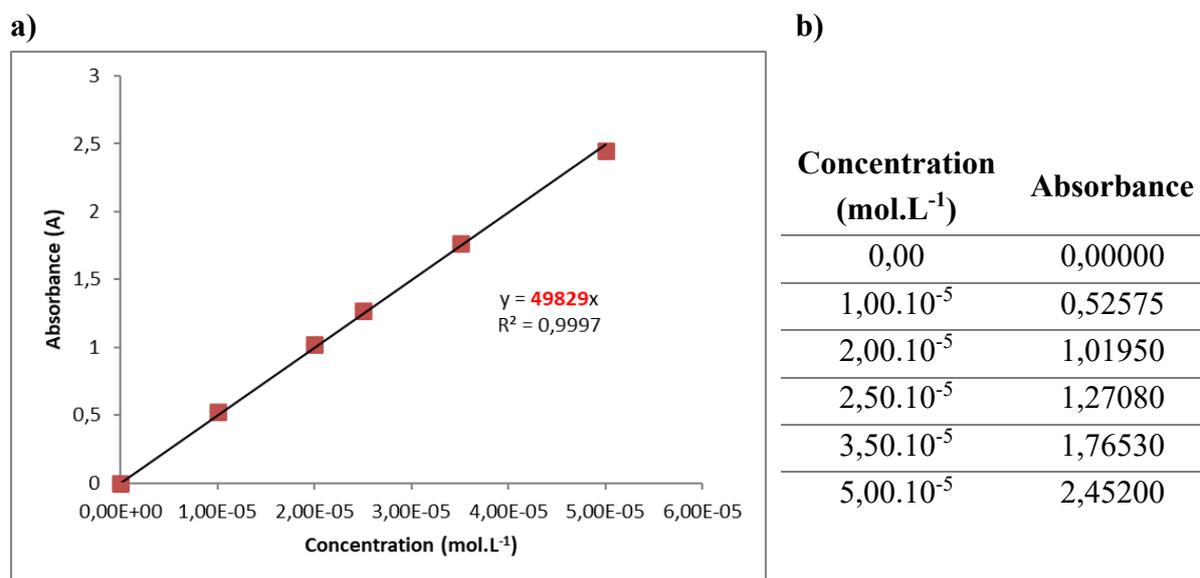


Figure 37 : a) Courbe d'étalonnage des solutions de BT, b) Concentrations correspondantes

3.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton

La spectroscopie RMN a été utilisée ici afin de caractériser et de s'assurer de la bonne composition des divers composés synthétisés lors de cette étude. L'expérience repose sur la détection des fréquences de résonance des spins des noyaux atomiques, excités par l'application d'un champ magnétique extérieur. La fréquence de résonance détectée est dépendante de l'environnement chimique des noyaux. Elle va donc permettre d'accéder à des informations telles que la nature et le nombre d'atomes voisins, les liaisons chimiques ou les distances interatomiques. Le spectre obtenu est composé de pics de fréquence d'intensités précises et positionnés à des valeurs de déplacement chimique δ (ppm) spécifiques.

La spectroscopie RMN de composés polymériques permet également d'accéder au taux de conversion du monomère impliqué.

Les expériences ont été menées à l'aide d'un spectromètre Brüker AVANCE-III-400 (1H : 400 MHz). Les échantillons sont préalablement préparés par solubilisation d'environ 12

mg du produit étudié dans 0,7 mL de solvant adéquat : diméthylsulfoxyde (DMSO), ou oxyde de deutérium (D₂O). Le mélange est agité 15 minutes puis versé dans un tube d'analyse RMN.

4. Analyses topographiques des surfaces et essais mécaniques

4.1. Essais de Traction

Dans cette étude, la réalisation d'essais de traction consiste à vérifier que la fonctionnalisation de surface n'impacte pas de manière significative les propriétés mécaniques initiales du PDMS. Lors de l'essai, une force de traction uni-axiale est appliquée sur le matériau. Le PDMS, classé dans la catégorie des élastomères, subit dans un premier temps une déformation élastique réversible. Dans cette zone, lorsque la contrainte appliquée est relâchée, le matériau retrouve sa longueur initiale L_0 . Au-delà de cette zone, l'échantillon va subir une déformation plastique, cette fois irréversible, atteignant une longueur $L > L_0$. La zone de déformation s'étend jusqu'à atteindre un point de rupture du matériau (Figure 38).

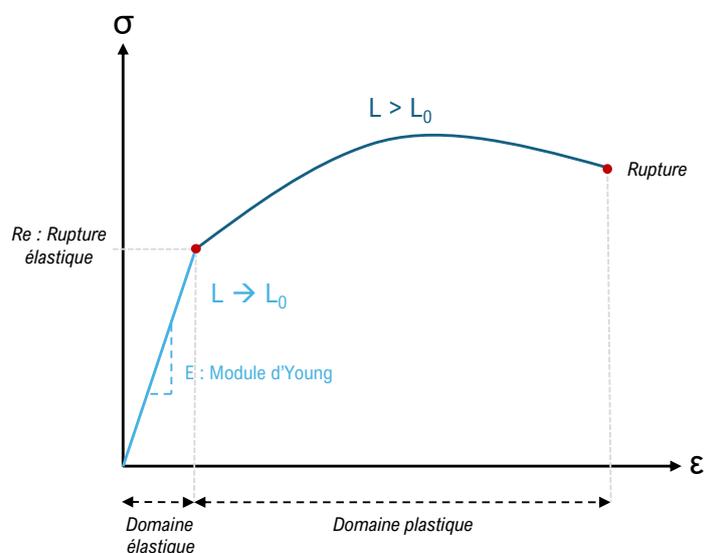


Figure 38 : Exemple de courbe représentative du comportement en contrainte-déformation d'un élastomère

Les tests de traction ont été réalisés sur des éprouvettes de taille normée (NF EN ISO 527-2), découpées dans les enveloppes de silicone. Pour chaque condition étudiée, 4 éprouvettes sont analysées. Dans le cas des échantillons fonctionnalisés, les greffages ont été effectués sur la zone d'intérêt centrale des éprouvettes mesurant 2 cm (Figure 39). Pour réaliser les essais, les éprouvettes sont d'abord placées dans la capsule de travail et maintenues par des pinces à leurs extrémités pour éviter une contrainte et une déformation initiale. La capsule fermée est programmée à 37 °C afin de se placer à une température similaire à celle du corps humain. L'expérience est réalisée par l'appareil ElectroPuls E3000 electro-magnetic (Instron, USA) (Figure 39). Les paramètres de traction ont été fixés à 50 mm/min et 2 images/s. De la

peinture noire et blanche a été préalablement déposée en spray sur la zone d'intérêt pour permettre le suivi et le traitement par caméra. Le traitement des images est ensuite effectué sur le logiciel Matlab (Mathworks, USA).

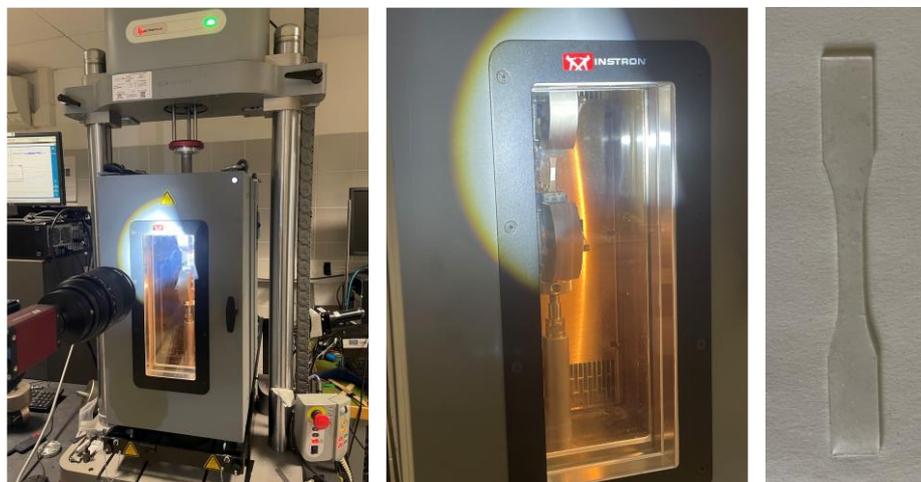


Figure 39 : Capsule et appareil de traction utilisés, et éprouvette en PDMS

4.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) – Module d'analyses dispersives en énergie (EDX)

Afin d'analyser l'aspect de surface de nos matériaux lors des différentes étapes de fonctionnalisation, des images de la surface ont été capturées au microscope électronique à balayage HITACHI TM3000. Le principe du MEB repose sur l'interaction d'électrons projetés sur la surface avec la surface de l'échantillon. Cette interaction va générer des électrons secondaires correspondants à un signal électrique. L'intensité de ce signal dépendant de la topographie de la surface, permettra de rendre compte de l'état de celle-ci. Le MEB utilisé détecte les électrons secondaires à une tension accélératrice comprise entre 5 et 15 kV. Les échantillons introduits dans la cellule du MEB doivent être propres et secs. Les images ont été acquises à des grossissements généralement compris entre 150x et 3000x.

Par ailleurs, le MEB est également couplé à un module de spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) permettant d'établir l'analyse élémentaire en surface d'échantillon.

4.3. Rugosité de surface au profilomètre optique

De manière à approfondir les analyses de l'état de la surface une fois fonctionnalisée, des analyses topographiques au profilomètre optique ont été réalisées. Celles-ci permettent par ailleurs d'accéder à de nombreux paramètres de rugosité. Des cartographies de surface ont été obtenues à l'aide du profilomètre optique RD ContourGT-K (Bruker) (Figure 40). Les données topographiques ont été mesurées par un interféromètre optique 3D à lumière verte (Contour GT-K1, Bruker). Les mesures ont été effectuées par interférométrie à balayage vertical sans contact (paramètre de mesure VSI) avec un objectif 50x associé à un grossissement numérique 2x. Avec cette technique, la résolution verticale était d'environ 10 nm. Le mode de caractérisation sans contact a été choisi en raison du caractère relativement mou de la surface de l'échantillon. Pour chaque échantillon, 10 mesures topographiques de 20 μm x 20 μm ont été réalisées. Les analyses ont été effectuées à sec. Les paramètres de rugosité sont calculés à l'aide du logiciel Mountains® 9.3.10494 (DigitalSurf).

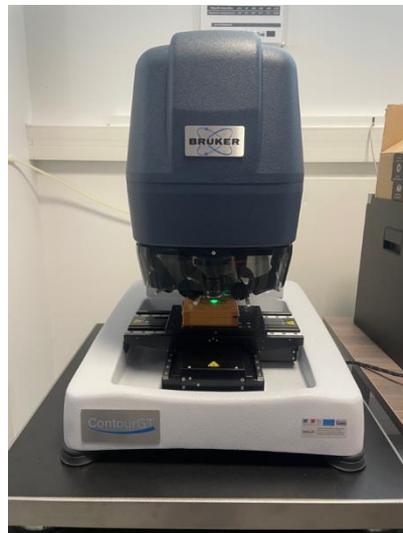


Figure 40 : Profilomètre optique RD ContourGT-K (Bruker)

4.4. Microscopie électronique à force atomique (AFM)

Le microscope électronique à force atomique a été utilisé pour sa capacité de haute résolution, en complément des analyses d'adsorption de protéines. Le principe repose sur la visualisation de la topographie de surface, grâce à l'interaction d'une pointe nanométrique avec les atomes constitutifs de la surface d'un échantillon. La mesure des forces d'interactions (Van-der-Waals, électrostatiques, etc.) entre les atomes de la surface et la pointe fixée sur un micro-levier permet le suivi des rugosités. Un faisceau laser, orienté à l'arrière du micro-levier et

réfléchi vers un cadran constitué de photodiodes, permet la réception de l'information pour la restitution d'images tridimensionnelles (Figure 41).

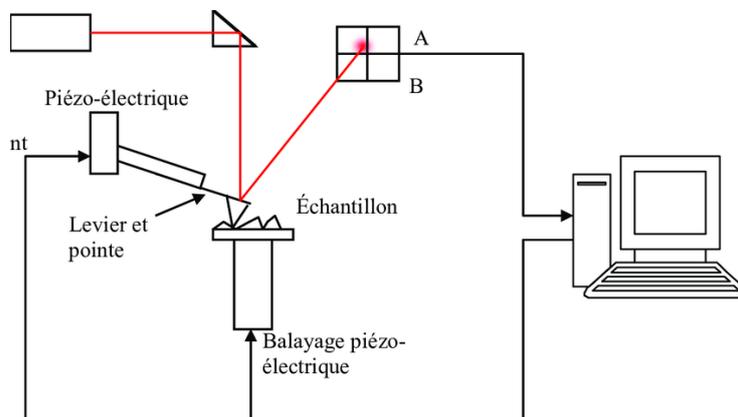


Figure 41 : Principe de fonctionnement du microscope à force atomique [123]

L'AFM utilisé au laboratoire est le Multimode 8, couplé à un contrôleur Nanoscope V (Bruker). La surface de PDMS est déposée sur un palet magnétique et est adhérente avec un ruban adhésif de carbone. Ce dispositif permet de fixer solidement l'échantillon et de limiter les interactions électrostatiques avec la pointe. Il faut veiller à ce que la surface soit sèche et propre. Les acquisitions sont réalisées en mode « Scanasyt Air ». La pointe utilisée est en nitrure de silicium, la fréquence de résonance f_0 appliquée est de 70 kHz et la constante de ressort $k = 0,4$ N/m. La calibration de l'appareil est réalisée manuellement.

Pour balayer la surface le mode sans contact a été utilisé, c'est-à-dire que la pointe balaye la surface à distance constante de l'échantillon sans le toucher. La déviation du laser est induite par les forces attractives entre l'échantillon et la pointe. Dans le cas de l'analyse d'adsorption de protéines, les zones de PDMS balayées étaient généralement des surfaces carrées comprises entre 500 nm et 10 μm de côté. La fréquence de balayage appliquée est comprise entre 0,1 et 1 Hz. Le logiciel Nanoscope analysis 2.0 a permis de traiter et analyser les images.

5. Etude de la réponse biologique

5.1. Culture cellulaire

5.1.1. Mise en culture des cellules

Tous les tests de culture cellulaire ont été réalisés avec des fibroblastes de souris de lignée L929 (ATCC), en conformité avec les normes ISO impliquant les biomatériaux. Les expériences sont réalisées dans des flasques de culture tissulaire en polystyrène (TCP) et des plaques multi-puits en polystyrène. Les échantillons de PDMS sont toujours fixés au fond des puits, face d'intérêt vers le haut, à l'aide d'inserts stériles en polypropylène.

Avant de démarrer les essais biologiques, les fibroblastes doivent préalablement être mis en culture dans des flasques contenant du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) complété (Sérum Bovin Fœtal 10 %, Streptomycine 1 %, L-glutamine 1 %) à 37 °C et 5 % de CO₂. Pour cela, des cryotubes contenant les cellules sont d'abord décongelés au bain marie, puis 9 mL de DMEM sont ajoutés. Le milieu est centrifugé à 700 rpm pendant 5 minutes afin de retirer le diméthylsulfoxyde (DMSO) présent dans la solution de congélation. Le surnageant est retiré et le culot de cellules est solubilisé dans 10 mL de DMEM qui sont ensuite versés dans un flasque qui sera incubé. Le milieu est changé tous les 3 jours jusqu'à ce que les cellules aient atteint l'état de confluence. L'observation de l'affluence des cellules a été réalisée avec un microscope optique (OLYMPUS CKX53SF).

5.1.2. Préparation des échantillons – conditionnement

Avant chaque essai biologique, les échantillons subissent une étape de stérilisation et de conditionnement.

Les surfaces sont lavées pendant 3 heures dans du tampon phosphate salin (PBS), puis rincées 10 minutes dans de l'eau ultrapure. Une fois rincées, chaque face est exposée 15 minutes aux UV (30 W) de la hotte à flux laminaire du poste de sécurité microbiologique (PSM). Les surfaces sont ensuite placées dans les puits de culture, puis recouvertes de 1 mL de DMEM. La plaque de puits est placée une nuit dans l'incubateur à 37 °C, 5 % CO₂ de manière à conditionner les surfaces pour les expériences futures.

5.1.3. Dépôt des cellules sur les surfaces

Une fois que les cellules ont atteint l'état de confluence, elles peuvent être utilisées pour les expériences. Pour cela, le milieu DMEM est retiré du flasque de culture et le flasque est rincé avec 2 fois 3 mL de PBS. Sont ensuite ajoutés 2 mL de trypsine pour « détacher » les cellules du fond du flasque. Le flasque est laissé 5 minutes en présence de trypsine dans l'incubateur, retiré, et 8 mL de milieu DMEM sont ajoutés. Le flasque est agité doucement puis

son contenu est récupéré dans un tube de 15 mL. 1 mL de ce milieu est récupéré pour réaliser le comptage des cellules. Les 9 mL restants sont placés dans la centrifugeuse à 700 rpm pendant 5 minutes à la suite desquelles le tube sera vidé du surnageant. Le comptage des cellules est réalisé à l'aide d'un compteur (Millipore Corporation). Un calcul est effectué de manière à ajouter la quantité de milieu DMEM complétement nécessaire au dépôt d'une suspension de 5.10^5 cellules par millilitre sur chaque puits de travail : les puits contenant les surfaces, ainsi que sur des puits « contrôles » sans surface.

5.2. Mise en évidence de la morphologie des cellules et de leur prolifération en surface

Afin d'évaluer les interactions entre les surfaces fonctionnalisées et le milieu biologique cellulaire, la morphologie et la prolifération des fibroblastes en surface ont été étudiées. Pour cela, les surfaces de PDMS ont été incubées avec les cellules pendant 24 heures, 3 jours et 7 jours, à la suite desquels elles ont été fixées puis colorées pour observation au microscope. Pour ce faire, après chaque temps d'incubation, le milieu DMEM est retiré et les surfaces sont lavées délicatement avec 600 μ L de PBS. Pour fixer les cellules, 500 μ L de formaldéhyde (4 %) ont été déposés sur chaque puits et la plaque placée à 4 °C pendant 30 minutes. Après ce temps, le formaldéhyde est retiré et les surfaces sont lavées une première fois avec 500 μ L de PBS stérile, puis 500 μ L d'eau ultrapure. Les plaques peuvent être conservées à 4 °C avant observations.

Les surfaces de PDMS ayant la particularité d'être transparentes, les cellules une fois fixées peuvent être observées au microscope optique (Motic SFC-18) après coloration. Pour réaliser la coloration, 500 μ L (quantité suffisante pour couvrir l'échantillon dans le puits) d'hématoxyline (Sigma-Aldrich) sont déposés 5 minutes sur chaque échantillon. L'hématoxyline basique va colorer les composants acides du tissu : noyau, ribosome, et réticulum endoplasmique. La solution d'hématoxyline est ensuite retirée et l'échantillon est rincé avec de l'eau distillée. Ensuite, 500 μ L de bluing reagent (Epredia) sont déposés 15 secondes sur les surfaces, retirés, et les surfaces sont rincées avec de l'eau distillée puis de l'éthanol absolu. 500 μ L d'éosine (Sigma-Aldrich) sont ensuite déposés 5 minutes sur les surfaces. La solution est ensuite retirée, puis on rince de nouveau la surface avec de l'eau distillée puis de l'éthanol absolu. L'éosine est un colorant acide permettant la coloration du cytoplasme des fibroblastes. Les surfaces une fois sèches, sont déposées entre lames et lamelles pour réaliser les observations. Les images au microscope optique sont choisies de manière à représenter le mieux possible l'ensemble du comportement en surface. Les grossissements appliqués pour la prise d'images sont généralement 4x et 10x.

5.3. Tests de viabilité cellulaire

Les tests de viabilité cellulaire permettent d'évaluer le taux de cellules viables après 24 heures d'incubation sur les surfaces. Pour cela, un test MTT (3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide, Thermo Fisher Scientific) (Figure 42) est réalisé.

Après 24 heures d'incubation, le milieu cellulaire est délicatement retiré et chaque puits est délicatement rincé avec 400 μL de PBS stérile. 500 μL de solution de MTT à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont déposés sur chaque puits et la plaque, recouverte d'aluminium, est replacée 4 heures dans l'incubateur. La solution de MTT a été préparée en dissolvant une quantité de poudre de MTT relative au nombre d'échantillons étudiés, dans un volume correspondant de DMEM sans rouge de phénol. La solution a été agitée et filtrée avec un filtre de 0,22 μm afin d'enlever l'excès de solide non dissout. Les déshydrogénases mitochondriales des cellules, au contact des sels de trétrazolium jaunes de la solution de MTT, vont les réduire en cristaux de formazan violets. À la suite des 4 heures, le milieu de MTT est retiré et les puits sont lavés le plus délicatement possible avec 400 μL de PBS. 350 μL de DMSO sont ensuite ajoutés et mélangés sur la surface, permettant la dissolution des cristaux formés. Les solutions deviennent violettes. Les plaques sont ensuite agitées 30 minutes sur un agitateur orbitalaire pour assurer la dissolution de tous les cristaux. Enfin, 3 x 100 μL contenus dans chacun des puits est transvasé dans une plaque de 96 puits à l'aide d'une pipette. L'absorbance de chacun des puits est mesurée grâce à un lecteur UV-visible de plaque multi-puits (ELx800, Biotek), paramétré à 540 nm.

Le pourcentage de viabilité cellulaire (VC) est ensuite évalué par l'équation (5) :

$$VC = \frac{(DO_s - DO_{DMSO}) \cdot S_c}{(DO_c - DO_{DMSO}) \cdot S_s} \cdot 100 \quad (5)$$

Avec :

- DO_s la densité optique de l'échantillon de PDMS,
- DO_{DMSO} la densité optique du DMSO,
- S_c la surface du puits contrôle,
- DO_c la densité optique du contrôle,
- S_s la surface de l'échantillon.

Les expériences sont réalisées avec 3 surfaces par condition, la valeur des densités optiques DO représente donc la moyenne des DO obtenues par condition.

La réalisation de ce test MTT est un outil permettant de mesurer le taux de cellules viables. Ainsi, la mise en place du protocole et le traitement des résultats peut être adaptée en fonction des propriétés à mettre en évidence lors de cette étude. En particulier, pour réaliser les tests de cytotoxicité et de prolifération décrits ci-après.

5.3.1. Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité a été évaluée de manière à vérifier que le greffage ne soit pas toxique pour les cellules. Le test MTT est réalisé après 24 heures d'incubation des cellules et la détermination du taux de viabilité cellulaire est adapté en fonction du comportement du polymère greffé vis-à-vis des cellules.

Lorsque le polymère bioactif greffé en surface est réceptif à l'adhésion des cellules et à leur prolifération, l'équation (5) est utilisée pour déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire après 24 heures d'incubation. Seules sont prises en compte les cellules ayant adhérees à la surface. Avant solubilisation des cristaux avec le DMSO, les surfaces sont donc déplacées dans un autre puits de manière à éviter la solubilisation de cellules ayant potentiellement adhérees au fond du puits. La comparaison des conditions non greffée et greffée est réalisée par rapport à des puits contrôles sans surface.

Si le polymère bioactif greffé a tendance à provoquer l'antiadhésion des cellules, le test est mené de manière à vérifier si le greffage provoque la mort des cellules ou s'il les repousse. En effet, le test va cette fois prendre en compte les cellules adhérentes au fond des puits des plaques TCP, les surfaces ne sont pas déplacées de puits. Ainsi, si le greffage en surface n'a pas engendré la mort des cellules, celles-ci iront adhérer au fond de la plaque (Figure 42). Le taux de cellules viables peut de cette manière être comparé au contrôle, car la totalité des cellules peuvent adhérer au fond du puits sans être présentes sur la surface. Sinon, le greffage, toxique pour les cellules, provoquera leur mort. Le milieu cellulaire sera alors retiré avant réaction avec la solution de MTT. Le taux total de cellules viables représente alors les cellules ayant adhéré au fond de la plaque et sur les surfaces. Les surfaces étudiées à prendre en compte dans l'équation (5) sont donc identiques pour les échantillons et les puits contrôles.

5.3.2. Tests de prolifération

Des tests de prolifération en surface ont été menés en utilisant le test MTT. Ils sont réalisés 24 heures, 3 jours et 7 jours après incubation des surfaces en présence des fibroblastes. Ils permettent de quantifier et appuyer les résultats observés au microscope lors de la coloration des cellules. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'évolution de la prolifération cellulaire entre nos surfaces et les puits contrôles, et ainsi souligner l'effet des interactions de surface entre le polymère bioactif greffé et le milieu biologique. Sont donc uniquement prises en compte les cellules viables adhérentes en surface des échantillons, qui sont comparées à un puits contrôle sans surface.

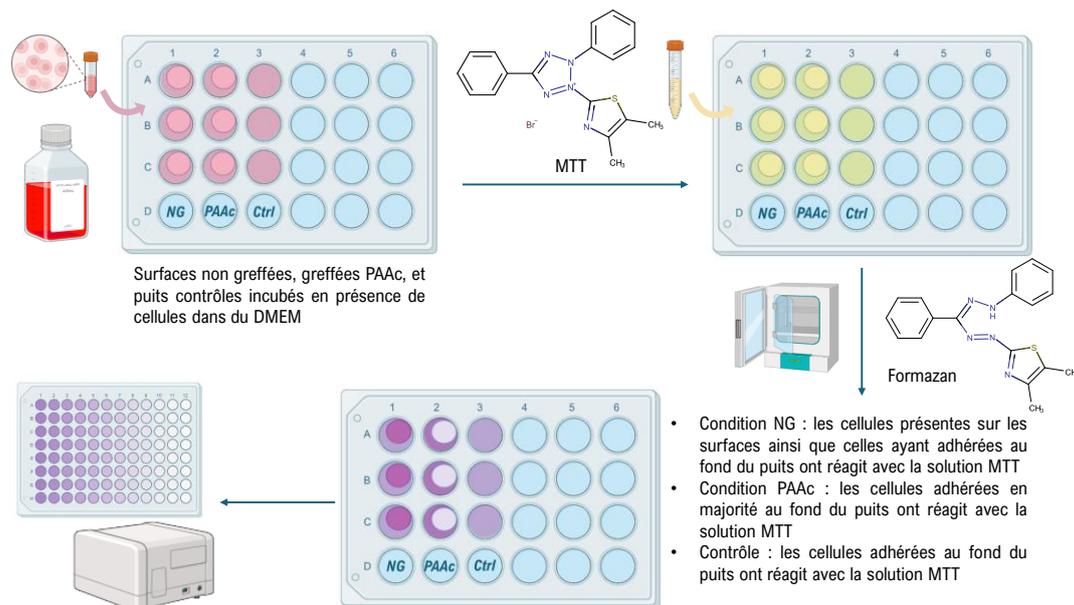


Figure 42 : Schéma de principe du test MTT

5.4. Adsorption de protéines

Les protéines interviennent dans de nombreux mécanismes biologiques. Elles participent pour certaines à l'adhésion des cellules et des bactéries. C'est pourquoi, il a été choisi dans cette étude de se concentrer sur les interactions de certaines protéines avec les surfaces fonctionnalisées.

5.4.1. Choix des protéines

L'albumine de sérum bovin (BSA, Thermo Fisher Scientific), la fibronectine (Fn, Sigma-Aldrich), le fibrinogène (Fg, Sigma-Aldrich) et le collagène (collagen from calf skin, Sigma-Aldrich) sont les protéines étudiées lors de ces travaux. La BSA est une protéine retrouvée en grande quantité dans le corps humain, notamment dans le sang et sert de modèle pour de nombreuses études [124]. La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire, connue pour jouer un rôle dans l'adhésion des cellules aux surfaces [36]. Le fibrinogène est une protéine plasmatique, intervenant dans le mécanisme de coagulation sanguine [35]. Il a par ailleurs été montré que ces deux dernières protéines peuvent jouer un rôle dans l'adhésion des bactéries [92]. Enfin, le collagène a été étudié en perspective de ce projet. C'est la protéine majoritaire de la matrice extracellulaire, constitutive de la charpente des tissus [34]. Ces différentes protéines ont été choisies pour leur importance dans différents mécanismes biologiques, dont les réactions à un corps étranger (FBR). Elles interviennent par ailleurs dans les processus d'intégration d'implants et de dispositifs médicaux.

5.4.2. Protocole d'adsorption

Avant adhésion des protéines, les surfaces d'étude subissent le protocole de stérilisation décrit dans la partie 5.1.

Pour adsorber l'albumine, une solution à $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est préparée en dissolvant de la poudre de BSA dans du PBS. La solution préparée est agitée et 1 mL est déposé sur chaque surface pour 1 heure d'incubation à 37°C , 5 % CO_2 . La solution de fibronectine est préparée à une concentration de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du PBS. La solution est agitée manuellement pendant 15 minutes afin d'éviter l'agrégation de la protéine en solution. De la même manière, 1 mL de la solution préparée est déposé sur chaque puits d'intérêt pour une heure d'incubation. Les concentrations en solution de ces protéines sont choisies sur la base des travaux du Dr. Felgueiras [33], réalisés au laboratoire. Elles sont représentatives des proportions retrouvées dans les fluides biologiques. La solution de fibrinogène dans du PBS est préparée à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Elle a été déterminée en adéquation avec les travaux de Sivaraman *et al.* [39], de manière à couvrir la surface par les protéines sans la saturer et y former des multicouches. 1 mL de solution est déposé sur chaque surface pour 2 heures d'incubation. Après adsorption, les solutions sont retirées et la surface délicatement rincée avec 500 μL de PBS, puis 500 μL d'eau ultrapure. Les surfaces sont séchées sous la hotte PSM puis conservées à 4°C .

Pour certaines expériences, dans le cas de l'adsorption de la fibronectine, les surfaces subissent au préalable une étape dite de passivation. Avant adsorption de ces protéines, les surfaces ont été mises 30 minutes au contact de BSA, de manière à bloquer les sites d'adsorption non spécifiques. Les solutions sont ensuite retirées et lavées au PBS. L'adsorption des protéines est ensuite réalisée comme décrit précédemment.

5.4.3. Adsorption du collagène

Les expériences menées en présence de collagène ont eu pour but d'étudier ses interactions avec la surface, fonctionnalisée ou non. Cette étude constitue une étape préliminaire à une étude plus complète, qui devra être menée sur le rôle de la fonctionnalisation vis-à-vis de l'action du collagène. Elle a également été pensée dans une perspective d'immobilisation de molécules biologiques sur les surfaces fonctionnalisées [125].

Le collagène a été adsorbé sur les surfaces de silicone à une concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans du PBS pendant 2 heures ou 24 heures, dans l'incubateur à 37°C , 5 % CO_2 . Comme précédemment, les surfaces ont ensuite été lavées avec 500 μL de PBS, puis 500 μL d'eau ultrapure. Aussi, deux expériences ont été menées avec le collagène en présence de fibroblastes. Ces expériences sont résumées dans le Tableau 10. La première consiste à incuber les surfaces pendant 24 heures en présence de fibroblastes, puis de retirer le milieu et adsorber la solution de collagène pendant 2 heures. La deuxième expérience consiste à mélanger du collagène avec le milieu DMEM contenant les fibroblastes et incuber les surfaces avec cette solution pendant

24 heures. Des analyses morphologiques au microscope optique (OLYMPUS CKX53SF) sont ensuite conduites par coloration des cellules suivant le protocole décrit précédemment, complété par une coloration au trichrome de Masson. Pour ce dernier, les surfaces sont colorées par 500 μL d'une solution d'écarlate de Biebrich-fuchsine acide pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau ultrapure. Pendant 5 minutes, les surfaces sont cette fois recouvertes par une solution de travail d'acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique dans de l'eau, puis 5 minutes par une solution de bleu d'aniline. Enfin, les surfaces sont exposées à une solution d'acide acétique 1 % pendant 2 minutes et lavées à l'éthanol absolu. Les surfaces peuvent ensuite être séchées et observées. Le résultat de la coloration du collagène par cette voie est bleu.

	Expérience 1	Expérience 2
Etape 1	Stérilisation + Conditionnement	Stérilisation + Conditionnement
Etape 2	Incubation des fibroblastes, 24 h	Incubation mélange fibroblastes + collagène, 24 h
Etape 3	Adsorption collagène, 2 h	Arrêt et fixation avec formaldéhyde (4 %)
Etape 4	Arrêt et fixation avec formaldéhyde (4 %)	Coloration et observation
Etape 5	Coloration et observation	-

Tableau 10 : Résumé des expériences réalisées en présence de collagène

5.5. Caractérisations et quantification des protéines en surface

5.5.1. Caractérisations

L'adsorption des protéines a été caractérisée par deux techniques préalablement décrites dans la partie 3 : la mesure d'angle de contact apparent et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a d'autant plus été exploitée grâce à l'analyse de la bande amide I caractéristique des protéines. La région spectrale de la bande amide I : 1700-1600 cm^{-1} , correspond presque entièrement aux vibrations et étirements des liaisons $\text{C}=\text{O}$ des liaisons peptidiques. En raison de la géométrie moléculaire unique de chaque protéine, chaque type de structure secondaire va donner lieu à une fréquence de vibration ou d'étirement de liaison $\text{C}=\text{O}$ différente. Ainsi, par des méthodes mathématiques il est possible d'approcher et d'estimer les structures secondaires des protéines adsorbées. Pour cela, on peut dans un premier temps appliquer la méthode de la dérivée seconde sur la gamme spectrale

correspondant à la bande amide I, de manière à déterminer les positions des bandes associées aux structures secondaires. Cependant, le logiciel mis à disposition au laboratoire n'était pas adapté à l'application de cette méthode. La position des bandes et leurs limites a donc été fixée par des valeurs relevées dans la littérature, notamment grâce aux travaux de Kong *et al.* [126] et Bunaciu *et al.* [127]. Les positions spectrales, associées aux structures secondaires principales : feuillet β , structures aléatoires, hélices α et spires β , sont regroupées dans le tableau en Annexe 1. Ensuite, la déconvolution de la bande spectrale amide I a été réalisée grâce à l'élaboration d'un code en langage Python, dont un exemple est disponible en Annexe 2. L'hypothèse principale émise ici est que la bande spectrale amide I peut être approximée par une fonction gaussienne (équation (6)), représentant la somme des aires de fonctions gaussiennes associées aux structures secondaires de la protéine (Figure 43) [35,128]. De cette manière, par la détermination des aires sous chaque bande structurale, il sera possible d'accéder à la distribution de ces structures secondaires dans chaque protéine.

$$f(x) = a \cdot \exp\left(-\frac{(x - b)^2}{2c^2}\right) \quad (6)$$

Avec :

a : l'amplitude de la bande,

b : la valeur centrale du pic,

c : l'écart-type ou largeur à mi-hauteur de la bande.

Les étapes principales de l'approche par déconvolution sont les suivantes :

- Définition de la fonction gaussienne principale,
- Définition des fonctions gaussiennes correspondant aux structures secondaires,
- Définition des paramètres de départ (amplitude a , valeur centrale b , et largeur à mi-hauteur c) et des valeurs aux limites grâce aux données de la littérature,
- Utilisation d'une fonction d'ajustement et optimisation des paramètres définis,
- Détermination des aires sous les courbes des bandes spectrales.

La détection de protéines sur les surfaces par AFM pourra compléter et corrélérer les hypothèses émises lors de l'estimation des structures secondaires.

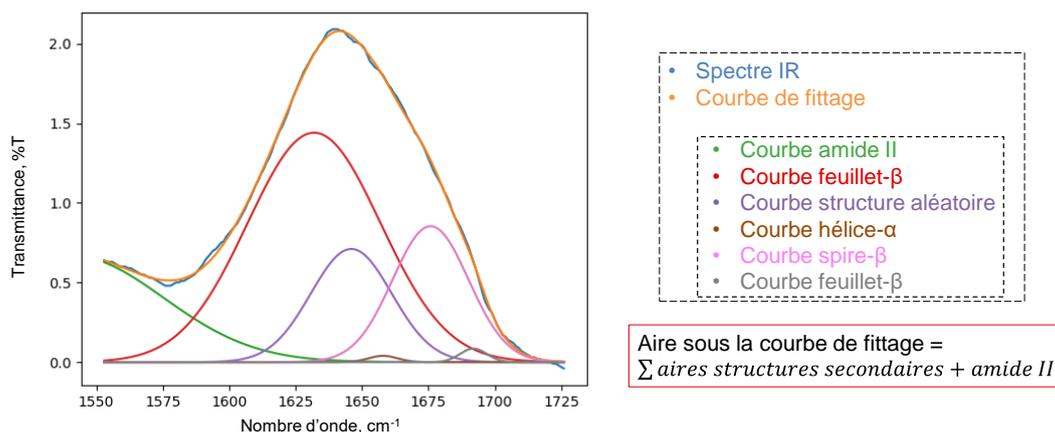


Figure 43 : Exemple de séparation de la bande amide I de fibronectine adsorbée sur une surface de PDMS greffée par le PNaSS. La somme des aires des bandes structurales correspond à l'aire sous la courbe d'ajustement (fittage) en orange

5.5.2. Quantification des protéines en surface : Dosage colorimétrique par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique permettant d'accéder à la concentration de protéines en solution. Le principe est basé sur un changement de couleur observé en raison de la complexation des acides aminés basiques présents dans la protéine avec le bleu de Coomassie G-250 (Figure 44) présent dans la solution de Bradford (Thermo Fisher Scientific). La solution passe généralement du marron au bleu. Pour mesurer la concentration surfacique des protéines sur le PDMS avec la solution de Bradford, le protocole généralement utilisé en solution a été adapté. Un dosage indirect de la solution de protéines déposée est réalisé. De cette manière, on cherche à accéder à la concentration en protéines restantes en solution, pour en déduire la concentration adsorbée en surface.

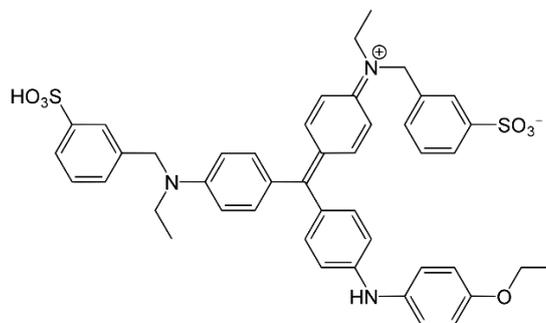


Figure 44 : Structure moléculaire du bleu de Coomassie G-250 (méthode de Bradford)

Une courbe d'étalonnage est d'abord élaborée à partir de solutions de BSA commerciales (Thermo Fisher Scientific) de différentes concentrations dans la solution de Bradford (Figure 45a). Elle permet d'accéder au coefficient d'extinction ϵ exprimé ici en $\text{mL}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Figure 45b), répondant à la loi de Beer-Lambert (équation (2)). Les absorbances sont mesurées grâce au lecteur de plaque UV-visible (ELx800, Biotek) à une longueur d'onde λ de 600 nm.

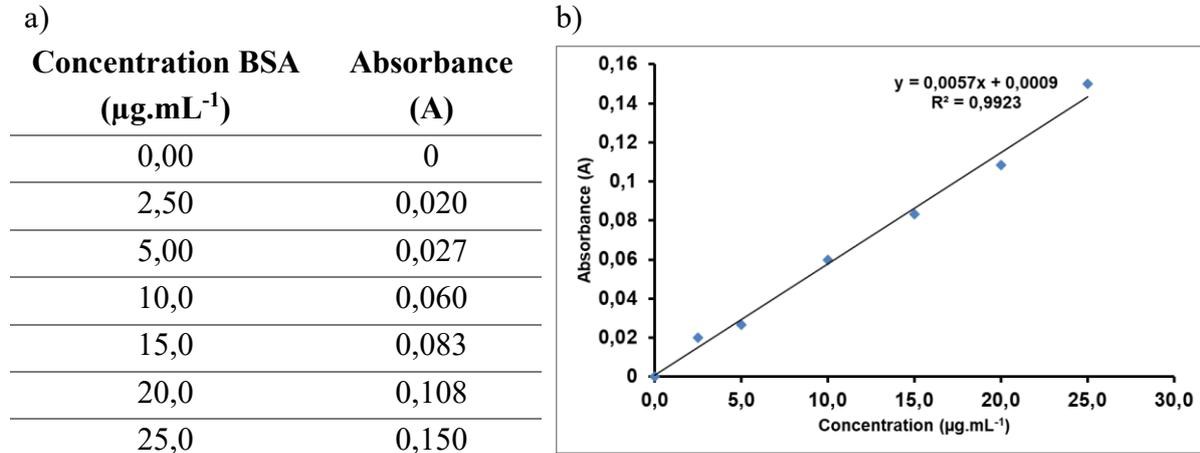


Figure 45 : a) Concentration et absorbance des solutions de BSA utilisées pour réaliser la courbe d'étalonnage de la méthode de Bradford; b) Courbe d'étalonnage correspondante

Ensuite, lors de l'expérience, 1 mL de solution de protéines aux concentrations fixées précédemment (partie 5.4.2) est déposé sur les surfaces. Afin de réaliser le dosage indirect, les 1 mL de solution de protéine restante à la fin du temps d'adsorption sont transférés vers autre plaque. À partir de ces 1 mL, 300 μL sont prélevés et mélangés à 300 μL de solution de Bradford. Les solutions se colorent en bleu de plus en plus intense avec la concentration en protéine (Figure 46). Les solutions sont ensuite transférées dans une plaque 96 puits et les valeurs d'absorbance sont lues au lecteur de plaque UV-visible à $\lambda = 600$ nm.



Figure 46 : Exemple du changement de couleur des solutions de protéines en présence de solution de Bradford

La concentration surfacique en protéines notée $C_{S_{prot}}$ exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ est calculée selon l'équation (7) :

$$C_{S_{prot}} = \frac{C_i \cdot V_i - \frac{V_i}{V_{prelev}} \cdot \frac{(DO_p - DO_s)}{\epsilon} \cdot (V_{prelev} + V_{Bradford})}{S_{PDMS}} \quad (7)$$

Avec :

- C_i , la concentration initiale de protéines en solution en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,
- V_i , le volume de solution protéique déposé sur l'échantillon en mL,
- V_{prelev} , le volume de solution de protéines prélevé dans le puits après adsorption en mL,
- DO_p , la densité optique de la solution de protéines complexées,
- DO_s , la densité optique du solvant,
- ϵ , le coefficient d'extinction en $\text{mL}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- $V_{Bradford}$, le volume de solution de Bradford ajouté en mL,
- S_{PDMS} , la surface de l'échantillon en cm^2 .

6. Évaluation de la réponse microbiologique

L'adhésion des bactéries au contact de surfaces fonctionnalisées a été évaluée. Ces expériences ont permis d'obtenir une première réponse quant à l'action du greffage à l'égard d'une catégorie de bactéries.

6.1. Matériels

Les conditions de surface étudiées au contact de la solution bactérienne sont regroupées dans le Tableau 11. Des surfaces seules, non-greffées et greffées ont été étudiées directement au contact de ces solutions. Mais aussi, une autre condition a consisté à d'abord adsorber des protéines avant de mettre les échantillons au contact des bactéries. Les adhésions de fibronectine et fibrinogène ont été précédées d'une étape de passivation par de la BSA.

Les analyses autour d'une seule catégorie de bactéries : *Staphylococcus Epidermidis*, ont pu être réalisées dans cette étude. Elles ont été précisément choisies car elles sont mises en cause dans le LAGC, cancer développé lors de la pose d'implants mammaires [30]. Aussi, au laboratoire, les études réalisées avec des *Staphylococcus Aureus* au contact de surface en titane greffées de polyNaSS ont déjà été largement étudiées [46,93,94]. Elles démontrent l'efficacité notable du greffage de ces groupements sulfonate vis-à-vis de l'inhibition de l'adhésion de *S. aureus*, notamment en présence de Fn.

Fonctionnalisation	Surface seule	Adhésion fibronectine	Adhésion fibrinogène
Non greffé	3	3	3
Greffage PAAc	3	3	3
Greffage PNaSS	3	3	3

Tableau 11 : Conditions étudiées en microbiologie

6.2. Culture bactérienne et dépôt sur les surfaces

Afin de réaliser les expériences, les solutions de *S. epidermidis* doivent dans un premier temps être préparées. Dans un flacon de 50 mL, 10 mL de bouillon Mueller Hinton sans agar-agar sont versés. À partir de boîtes de culture, 1 à 2 colonies bactériennes sont prélevées et mélangées manuellement à la solution à l'aide d'une spatule. Le flacon est conservé dans une étuve à 37 °C pendant une nuit sous agitation. Le lendemain, les solutions placées à l'étuve sont dosées par spectroscopie UV-Visible de manière à vérifier la bonne poussée des bactéries. Pour considérer cela, la DO obtenue doit être comprise entre 0,5 et 1. 1 mL de la solution bactérienne est ensuite prélevé et placé dans un Eppendorf pour centrifugation. Le surnageant est retiré et

le culot de bactéries obtenu est solubilisé dans du PBS et centrifugé à nouveau. Le surnageant est une nouvelle fois retiré et le culot de bactéries est solubilisé dans 1 mL de PBS. À partir de ce millilitre, une quantité adaptée est prélevée de manière à réaliser une solution à 1.10^7 CFU.mL⁻¹ dans du PBS. La concentration est choisie de manière à se placer au milieu de la courbe de croissance des bactéries (Figure 47), pendant la phase exponentielle.

Le dépôt sur les surfaces d'étude est réalisé avec 1 mL de la solution préparée. Celles-ci sont ensuite incubées pendant 3 heures à 37 °C. Une fois le temps écoulé, les surfaces au contact de la solution bactérienne sont retirées, légèrement égouttées et placées dans des pots contenant 2 mL de PBS. Ces pots subissent alors une étape de sonication, qui consiste à les placer 3 minutes dans un bain à ultrasons de manière à décoller les bactéries adhérentes aux surfaces.

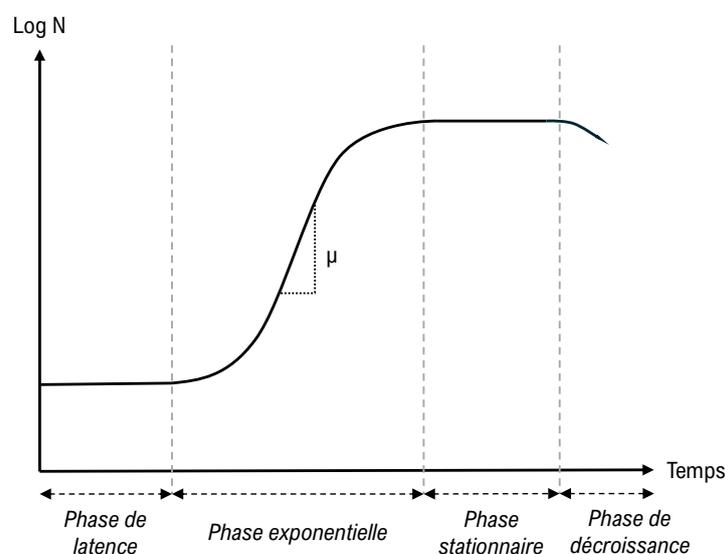


Figure 47 : Exemple de structure d'une courbe de croissance bactérienne, représentant le nombre de bactérie N par unité de volume en fonction du temps, avec un taux d'accroissement μ

6.3. Analyses du développement bactérien en surface

6.3.1. Préparation des boîtes de gélose

Des boîtes de gélose sont préalablement préparées pour réaliser l'ensemencement des bactéries cultivées sur les surfaces. Pour cela, du bouillon composé de poudre d'Agar (15 g.L^{-1}) et de bouillon de Mueller Hinton (21 g.L^{-1}) dans de l'eau distillée est préparé et stérilisé à l'autoclave. Une fois chaud, le mélange est coulé dans des boîtes de pétri à 2/3 de hauteur et laissé gélifier et refroidi quelques instants. Les boîtes sont conservées retournées pour éviter les défauts liés à la condensation.

6.3.2. Ensemencement

A partir des solutions de sonication, 2 solutions d'ensemencement sont préparées. Une à la concentration C : 1 mL de la solution est prélevé et versé dans un Eppendorf, une autre à la concentration $C/10$: 100 μL de cette même solution sont prélevés et dilués dans 900 μL de PBS.

Pour réaliser l'ensemencement, un ensemenceur automatique (easySpiral, Interscience) est utilisé (Figure 48a). Les boîtes de pétri sont disposées une à une sur le système et un coulage (50 μL) en spirale et exponentiel est programmé. Par condition, 3 boîtes sont coulées à partir du premier Eppendorf à la concentration C et 3 autres boîtes à la concentration $C/10$. Une fois le dépôt effectué, les boîtes sont placées à l'étuve 37 °C pendant une nuit.

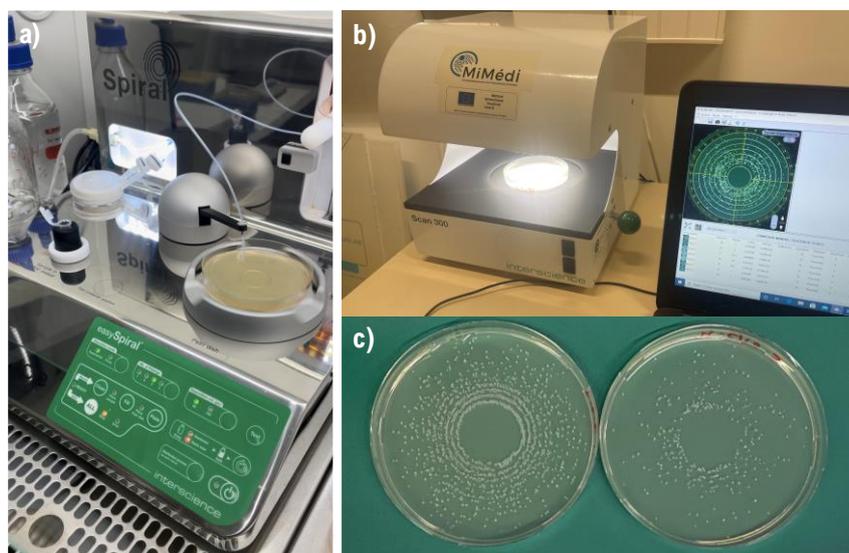


Figure 48 : a) Ensemenceur automatique, b) Appareil de comptage de colonies bactériennes et logiciel, c) Exemple de boîtes de géloses obtenues après croissance bactérienne

6.3.3. Comptage

Le lendemain, les boîtes obtenues (Figure 48c) sont analysées grâce à l'appareil SCAN 3000 (MiMédi, Interscience) et au logiciel associé (Figure 48b). Sur le logiciel, la boîte de pétri est divisée en 4 quarts dans lesquels on observe 6 secteurs correspondants aux rangées de spirales (Figure 49). Un premier comptage automatique est effectué par le logiciel, basé sur le contraste entre les colonies bactériennes et la gélose. Le comptage est réalisé à partir du premier secteur (extérieur), où la totalité des points par secteur est prise en compte jusqu'à détecter entre 20 et 200 colonies. Chaque image est retraitée de manière à retirer les points défauts et ajouter les colonies non prises en compte. La valeur obtenue est exprimée en CFU.mL^{-1} .



Figure 49 : Extrait du logiciel de comptage de colonies bactériennes

Chapitre 3 – Fonctionnalisation chimique de surfaces de PDMS par des groupements carboxylates et caractérisations

Ce chapitre se concentre sur le développement d'une méthode de fonctionnalisation du PDMS par voie covalente adaptée au greffage de groupements carboxylates sur les surfaces. La démarche expérimentale est décrite et le greffage effectif est mis en évidence par diverses méthodes de caractérisation telles que : la mesure d'angle de contact apparent, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la détermination de taux de greffage par dosage colorimétrique et la spectroscopie photoélectronique à rayons X. Des analyses topographiques des surfaces au MEB et au profilomètre optique ont également été effectuées. Elles ont permis d'obtenir plus d'informations sur l'allure de la surface une fois greffée et sur le comportement du polymère. Des essais de tractions ont été menés afin de vérifier que le PDMS conservait ses propriétés élastiques une fois greffé. Enfin, une étude cinétique de l'étape de polymérisation du greffage a été effectuée à des fins d'optimisation de la méthode.

L'ensemble des résultats a permis de déterminer la meilleure approche pour fonctionnaliser le PDMS avec des chaînes de polymère porteuses de groupements COO⁻.

1. Greffage covalent par irradiations UV des surfaces de PDMS

1.1. Mise en œuvre de la méthode de greffage

1.1.1. Surfaces de PDMS issues d'enveloppes d'implants mammaires

Les échantillons de PDMS utilisés proviennent d'enveloppes d'implants mammaires médicales. Ils ont un aspect lisse, mais l'on peut distinguer une face externe et une face interne (Figure 50). Seule la face externe sera considérée dans cette étude, étant la partie de l'implant qui entre en contact avec l'environnement biologique. À l'œil nu, la face externe est plus brillante et transparente que la face interne. Au MEB (Figure 50a et b), la surface du PDMS apparaît en effet lisse et peu d'imperfections sont présentes. La composition de l'échantillon a été déterminée au MEB couplé à l'EDX et est présentée dans le Tableau 12.

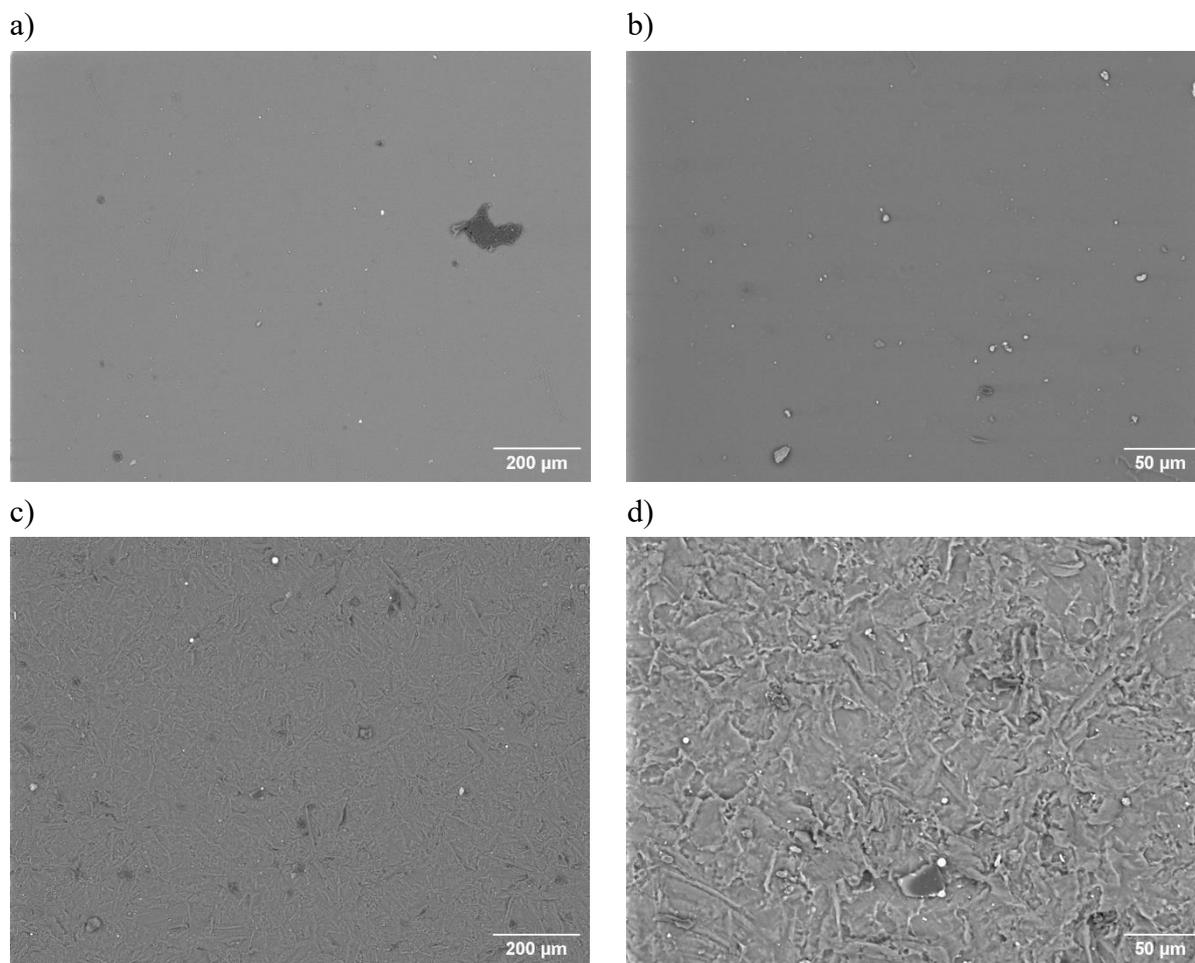


Figure 50 : Images acquises au MEB des faces externes, a) grossissement 150x, b) grossissement 500x et internes c) grossissement 150x, d) grossissement 500x d'enveloppes de PDMS d'implants mammaires

1. Greffage covalent par irradiations UV des surfaces de PDMS

	Carbone (%at.)	Oxygène (%at.)	Silicium (%at.)
Face externe	46,8 ± 0,72	31,6 ± 1,03	21,5 ± 0,51
Face interne	51,9 ± 0,85	31,1 ± 0,70	17,0 ± 0,37

Tableau 12 : Détermination par EDX de la composition de l'enveloppe d'implant mammaire en PDMS

Les enveloppes ont une épaisseur comprise entre 700 et 750 μm , où une couche supplémentaire composée de poly(diphénysiloxane) est insérée permettant d'imperméabiliser l'implant. Celle-ci est mise en évidence par une double flèche sur la Figure 51. En effet, dans le cas des implants mammaires, elle permet d'éviter la perspiration du gel de silicone à travers l'implant. Sa composition déterminée par EDX est présentée dans le Tableau 13. La chaîne latérale étant composée de groupements phényle, le pourcentage en atome de carbone est logiquement plus élevé que pour le PDMS.

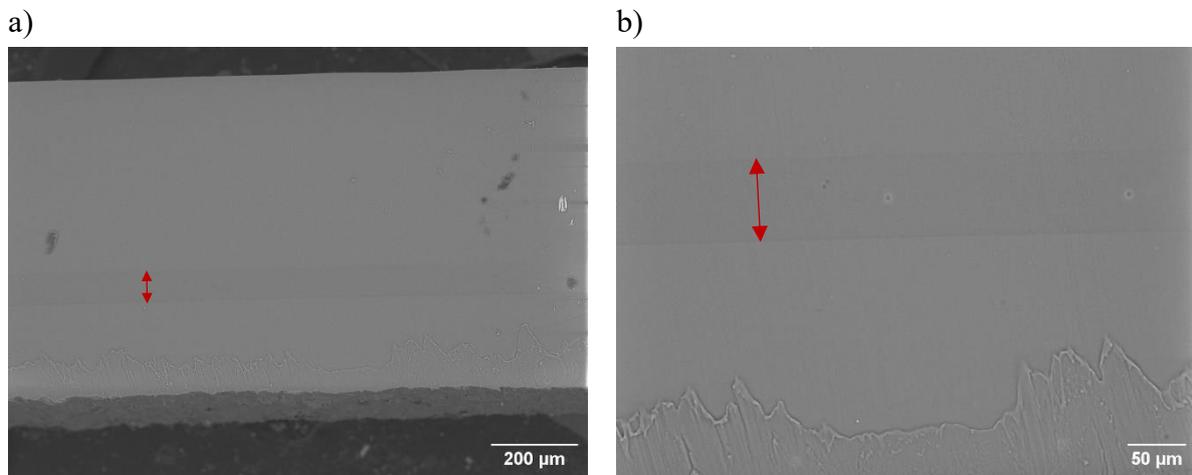


Figure 51 : Images MEB de la tranche d'un échantillon de PDMS, a) grossissement 150x, b) grossissement 400x

Carbone (%at.)	Oxygène (%at.)	Silicium (%at.)
56,2 ± 0,42	16,4 ± 0,85	27,4 ± 0,84

Tableau 13 : Détermination par EDX de la composition du poly(diphénysiloxane) inséré dans l'épaisseur de l'échantillon en PDMS

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet de mettre en évidence les bandes caractéristiques du matériau PDMS utilisé (Figure 52). Le spectre fait apparaître deux bandes courtes à 2960 cm^{-1} et 2903 cm^{-1} caractéristiques des elongations asymétriques $-\text{CH}_3$, à 1258 cm^{-1} apparaît la bande caractéristique des déformations symétriques $\text{Si}-\text{CH}_3$, les

élongations asymétriques Si-O-Si apparaissent sous la forme d'une bande large à 1010-1080 cm^{-1} et la bande à 787 cm^{-1} est représentative de la liaison Si-CH₃.

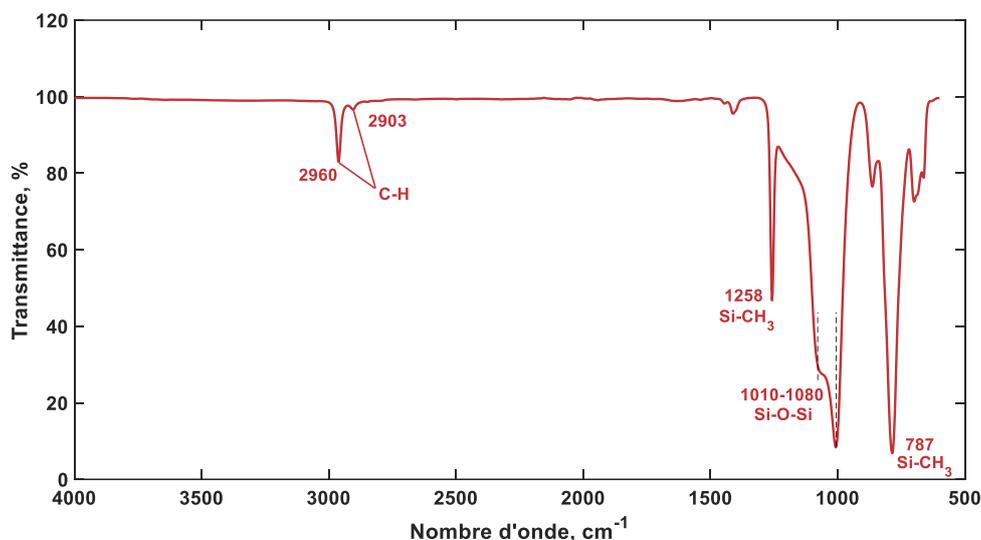


Figure 52 : Spectre FTIR de surface de PDMS étudiée

La mesure d'angle de contact apparent par dépôt d'une goutte d'eau de 2 μL sur la surface met en évidence le caractère hydrophobe du PDMS. La valeur moyenne obtenue est égale à $112,8^\circ \pm 3,00^\circ$ (Figure 53). Ce sont les groupements méthyles sur la chaîne latérale du PDMS qui confèrent au matériau son caractère hydrophobe. Cette propriété est particulièrement limitante pour de nombreuses applications médicales. Elle favorise l'accumulation de matériel biologique, notamment les bactéries, engendrant de sévères complications. C'est la raison principale pour laquelle il a été décidé de modifier chimiquement la surface.

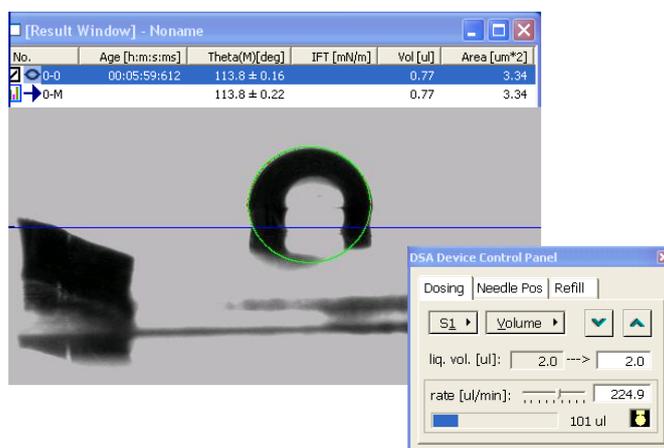


Figure 53 : Exemple de mesure d'angle de contact apparent sur une surface de PDMS déterminé grâce au système de mesure KRUSS GmbH DAS10

1.1.2. Fonctionnalisation : intérêt du motif « acide carboxylique » dans le MAc et l'AAc

L'acide acrylique (AAc) est le plus petit monomère vinylique contenant un groupement acide carboxylique. La formation de l'acide poly(acrylique) génère alors un polymère dense en groupements [129]. Au contact d'un milieu biologique, ce sont les groupements carboxylate COO^- qui sont majoritairement présents. La surface est ainsi rendue hautement hydrophile et propice à des interactions ioniques avec l'environnement biologique. Yoo *et al.* insistent sur le fait que la densité de charge en surface contribue largement à induire une importante mouillabilité [130]. Aussi, ces groupements peuvent agir comme support pour l'immobilisation d'autres molécules biologiques [97,114,115]. L'acide poly(méthacrylique) est capable de générer des interactions similaires lorsqu'il est greffé en surface. Par ailleurs, la réactivité radicalaire du monomère rend sa copolymérisation favorable avec d'autres monomères d'intérêts tels que le NaSS [24,48]. Alors, comme discuté précédemment dans le Chapitre 1, ces propriétés font de l'acide poly(méthacrylique) et de l'acide poly(acrylique) de bons candidats pour conférer des propriétés antiadhésives aux surfaces de PDMS ainsi qu'un support de multifonctionnalisation de la surface.

L'intégration des implants médicaux est souvent mise en avant par leur interaction favorable avec les cellules [95,131]. La propriété d'antiadhésion peut alors dans certains cas questionner la réelle biocompatibilité des dispositifs médicaux. Néanmoins, les auteurs s'accordent dorénavant pour définir la biocompatibilité comme « la capacité d'un matériau à remplir les fonctions souhaitées dans le cadre d'une thérapie médicale, à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique et à interagir avec les systèmes vivants sans risque de blessure, de toxicité ou de rejet par le système immunitaire et d'effets locaux ou systémiques indésirables ou inappropriés » [132]. En d'autres termes, la biocompatibilité est dépendante de l'application à laquelle le biomatériau est destiné et ne doit dans ce cas, pas causer de perturbation menant à des effets indésirables et préjudiciables pour l'homme. Le projet s'est ainsi orienté dans ce sens : étudier la perturbation du mécanisme initial d'intégration du PDMS par sa fonctionnalisation de surface, tout en veillant à ne pas engendrer d'effet importun. Par ailleurs, de nombreuses applications biomédicales impliquant le PDMS, par exemple les sondes et les lentilles optiques, nécessitent de limiter l'accumulation de matériel biologique en leur surface [3,24,25].

Tout au long de ces travaux, la concentration en monomère dans la solution est fixée au départ à 0,35 M. Elle est choisie sur la base des travaux réalisés précédemment au laboratoire avec le NaSS, où à cette concentration relativement faible, un greffage suffisant est établi [77]. Dans cette première partie, la stratégie de greffage la plus adaptée de groupements carboxylates en surface du matériau PDMS est développée.

1.2. Stratégie de greffage

1.2.1. Activation et greffage par rayonnements UV

Anciennement, au laboratoire, les travaux ont mis en évidence l'efficacité du greffage via la technique dite « grafting from » sous irradiations UV sur divers matériaux : titane [89,118], PCL [90,91] et notamment les surfaces de silicone [77]. En raison du caractère inerte des surfaces de PDMS, il est important de rendre la surface réactive avant d'amorcer l'étape de polymérisation en présence du monomère. Lors de sa thèse, le Dr. Lam a mis en évidence que l'activation via les irradiations UV représentait une méthode optimale pour activer les surfaces de PDMS [77]. D'autres voies avaient d'abord été testées pour tenter d'activer la surface : (1) l'oxydation par la méthode piranha, qui utilise un mélange acide servant en général à oxyder les surfaces métalliques telles que le titane [50,131]. Cependant, celle-ci a dégradé la surface de silicone ; (2) l'ozonation, utilisée pour oxyder les surfaces de PCL [50,91,133], n'a pas su se montrer suffisamment efficace pour générer des groupements polaires en surface. Aussi, dans le Chapitre 1, le recours au plasma pour activer les surfaces et même les greffer est la méthode la plus répandue (Tableau 4). Elle offre en particulier l'avantage d'être rapide : de quelques secondes [58,72], à une dizaine de minutes d'exposition [134]. Néanmoins, Alves *et al.* ont montré que le greffage de l'acide méthacrylique aux UV menait à de meilleurs résultats que l'activation par plasma pour réduire l'adhésion des cellules sur des surfaces de polyuréthane [70]. L'expertise du laboratoire a alors incité les recherches à s'orienter vers les irradiations UV. Lam *et al.* ont finalement utilisé cette technique pour activer la surface de silicone. Les essais se sont montrés concluants. L'activation de la surface a été mise en évidence par spectroscopie FTIR (Figure 54). La bande caractéristique des groupements -OH générés après l'étape d'oxydation apparaît à environ 3668 cm^{-1} [77]. Par la suite, c'est cette condition d'activation qui a donc été retenue pour toutes les étapes de greffage réalisées au cours de ces travaux.

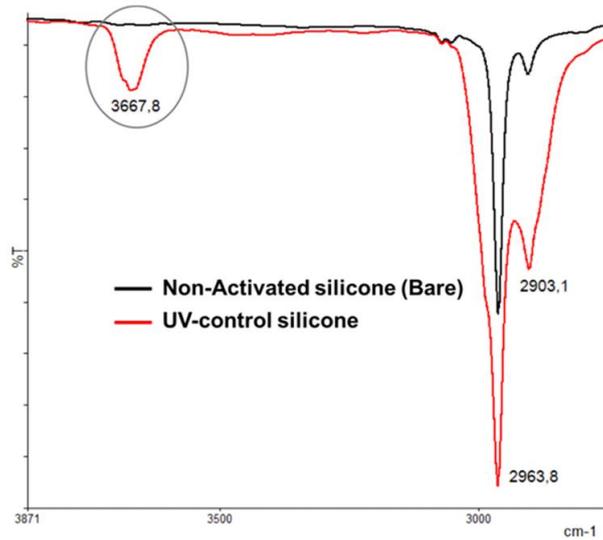


Figure 54 : Mise en évidence par spectroscopie FTIR de la présence de groupements réactifs hydroxyles sur des surfaces de PDMS activées sous irradiations UV [77]

Expérimentalement dans cette étude, le silicone est suspendu et plaqué contre un disque de téflon face aux rayonnements UV (365 nm) et exposé à une puissance de 160 mW.cm^{-2} pendant une heure. Ce dispositif expérimental permet d'immerger complètement la surface initialement hydrophobe. Par ailleurs, la transparence de ce matériau le rend d'autant moins propice à l'absorbance du rayonnement. Placer directement l'échantillon face au faisceau permet alors d'imposer la réaction en surface (Figure 55).

L'action des rayonnements UV seuls sur les surfaces de silicone a été étudié par Lam et *al.* Il a été montré que ceux-ci n'endommageaient pas de manière significative les propriétés élastiques de la surface. Cependant, une surface uniquement activée aux UV avait tendance à diminuer la viabilité des cellules. Les auteurs expliquent que les rayonnements UV induisent un lissage de la surface. Cet effet a été observé par AFM. Or, les cellules ont tendance à mieux adhérer lorsque la surface est plus rugueuse. Néanmoins, cet effet défavorable sur la prolifération des cellules n'est plus observé une fois la surface greffée via l'action des rayonnements UV [95]. Leur utilisation est donc considérée comme vérifiée et validée pour la suite de cette étude.

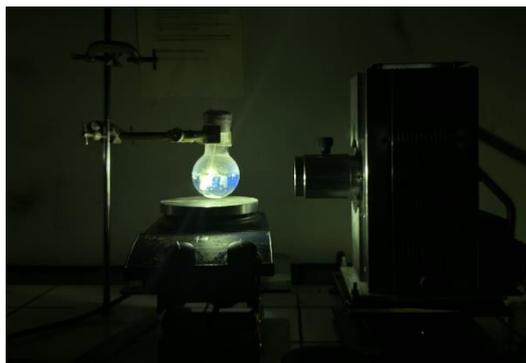
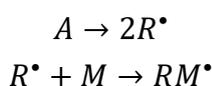


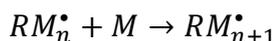
Figure 55 : Dispositif de greffage des échantillons de silicone sous irradiations UV

Après l'étape d'activation, des groupements hydroxyles -OH sont formés en surface à partir desquels, s'ensuit l'étape de polymérisation (Figure 29). Au laboratoire, le développement de ce greffage a initialement été mené en présence du NaSS comme monomère. L'étape de polymérisation par la méthode directe « grafting from » peut être décrite par un mécanisme de polymérisation radicalaire à partir de la surface de la manière suivante (Figure 56) :

- i. L'amorçage : sous l'action des UV, les groupements de surface du PDMS activé, considérés comme amorceurs (A), sont décomposés en radicaux (R^\bullet). Ces radicaux vont ensuite réagir avec un monomère (M) présent en solution pour former un centre actif RM^\bullet ; la polymérisation est amorcée.



- ii. La propagation : Toujours sous l'action des UV, un radical est formé sur le monomère ayant réagi. Celui-ci va attaquer une autre molécule de monomère, qui va elle-même être décomposée en radical et attaquer la molécule de monomère suivante, et ainsi de suite, jusqu'à former une chaîne de n motifs monomères en surface.



- iii. Terminaison : C'est la dernière étape de la réaction de polymérisation. Elle est réalisée par recombinaison : le radical en bout de chaîne générée en surface, va réagir avec un autre radical en bout de chaîne présente en solution ;



ou par dismutation : un transfert de proton se produit à partir d'une chaîne polymérique formée en solution, vers le radical en bout de chaîne polymère formée en surface.

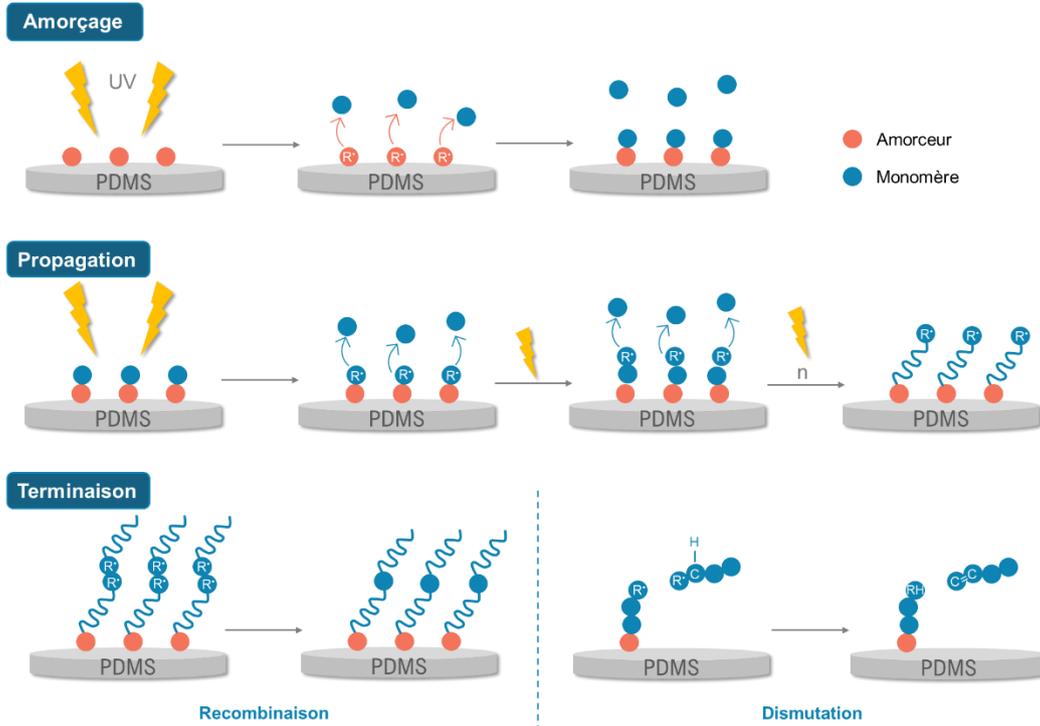
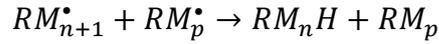


Figure 56 : Schéma du mécanisme de polymérisation radicalaire par la méthode « grafting from » sur une surface de PDMS

Ce même protocole a été mis en place en présence des monomères MAc et AAc. Après une étape de lavage de 48 heures, les échantillons sont ensuite séchés et caractérisés.

1.2.2. Caractérisations du greffage direct

Utilisation des rayonnements UV de la lampe à mercure Lot Oriel :

Dans un premier temps, les greffages sont réalisés face aux rayonnements UV de la lampe à mercure Lot Oriel, dont le faisceau est concentré sur une surface d'un diamètre environ égal à 1,2 cm (Figure 30a). Lors de l'étape de polymérisation, l'échantillon est exposé à une puissance de 220 mW.cm^{-2} (365 nm) pendant une heure. Cependant, dans ces conditions, le greffage du monomère MAc est sans appel : l'échantillon est complètement durci, cassant, difforme, le rendant impraticable (Figure 57 et Figure 58a). La surface greffée à partir du

monomère AAc est moins altérée, mais elle est tout de même devenue opaque et plus rigide à l'œil nu (Figure 58b). La première hypothèse émise est que la concentration du monomère en solution est trop élevée, impactant la réactivité de surface. Le pH mesuré particulièrement bas, égal à $\sim 2,4$, rend compte également du caractère acide de la solution. Par ailleurs, une différence de réactivité entre le monomère MAc et AAc vis-à-vis de la surface est constatée.

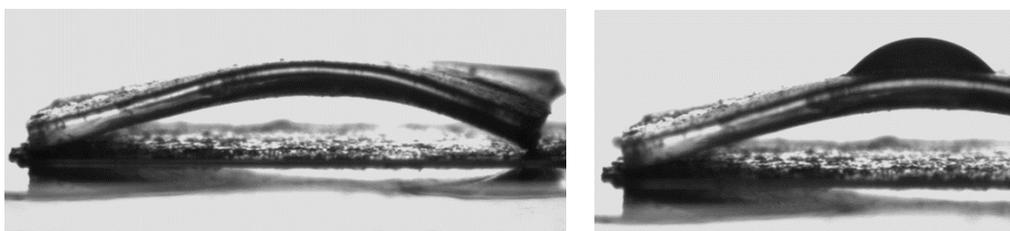


Figure 57 : État de surface d'un échantillon de PDMS greffé par le PMAc (0,35 M) sous irradiations UV (LO)

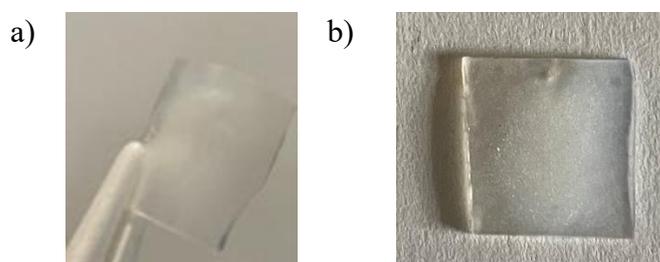


Figure 58 : État de surface d'un échantillon de PDMS greffé sous irradiation UV LO (0,35 m) par a) PMAc, b) PAAc

En raison du durcissement des surfaces greffées par le PMAc, de leurs difformités et des irrégularités obtenues, les mesures d'angle de contact n'ont pas été retenues car biaisées. Cependant la forme de goutte observable sur la Figure 57 rend tout de même compte d'une mouillabilité augmentée. Pour les greffages du PAAc, les angles de contact apparents obtenus atteignent en moyenne $70,5^\circ$, augmentant ainsi considérablement la mouillabilité des surfaces.

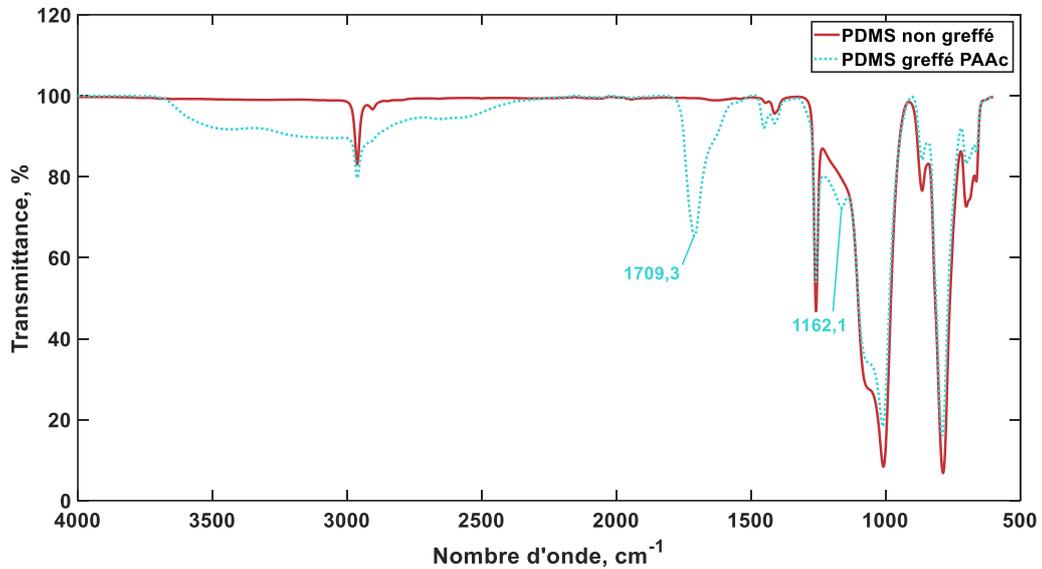
Les spectres FTIR réalisés à partir de ces surfaces mettent en évidence les bandes caractéristiques présentes sur le PDMS une fois greffé (Figure 59). De nouvelles bandes sont observées, avec de fortes intensités. La bande intense à 1709 cm^{-1} est attribuée à la liaison $\text{C}=\text{O}$ de l'acide carboxylique. La bande large observable entre 2500 et 3500 cm^{-1} correspond quant à elle aux groupements $-\text{OH}$ des acides carboxyliques. Cette méthode d'analyse permet de mettre en évidence le greffage effectif de ces monomères sur les surfaces de PDMS.

L'apparition d'une bande à 1162 cm^{-1} observable sur les deux spectres peut être attribuée à la liaison éther $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. La création de cette liaison peut correspondre à la rupture homolytique de la liaison CH_2-H lors de l'étape d'activation, formant alors une liaison $\text{C}-\text{OH}$, puis de l'étape

1. Greffage covalent par irradiations UV des surfaces de PDMS

de polymérisation suivante entre le groupement réactif -OH formé et le monomère. Cette bande spectrale met alors en évidence le caractère covalent du greffage en surface par irradiations UV.

a)



b)

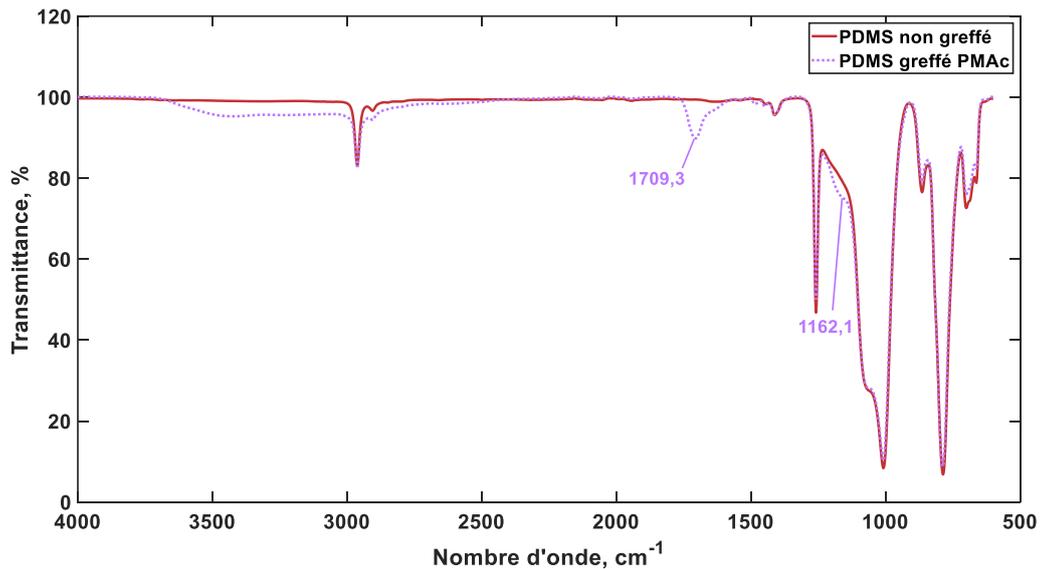


Figure 59 : Spectres FTIR de surfaces de PDMS non greffée et a) greffée PAAc, b) greffée PMAc

Le taux de greffage obtenu par dosage colorimétrique au BT rejoint cette interprétation. Le taux atteint $7,22 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻² en moyenne pour le greffage du PAAc et $1,92 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻²

en moyenne dans le cas du PMAc. Le taux de greffage mesuré pour le PDMS témoin atteint en comparaison $1,85 \cdot 10^{-9}$ mol.cm⁻² (Figure 60). Les valeurs moyennes obtenues pour les surfaces greffées sont supérieures de deux puissances de dix en comparaison aux surfaces non-greffées. Ce résultat rend compte d'un taux très élevé de motifs carboxylate présents. Cette affirmation est donnée par appui sur les résultats antérieurs du laboratoire, associés aux taux de motifs sulfonates greffés en surface de matériaux. Le taux obtenu était suffisant pour constater par la suite une réponse biologique changée [95]. Sur les surfaces de PDMS greffées par le polyNaSS, le taux obtenu était supérieur d'une puissance de dix en comparaison à des surfaces non greffées [77].

On constate néanmoins sur les résultats obtenus ici que les valeurs de taux de greffage sont variables. Les incertitudes sont considérables, reflétant l'altération du matériau.

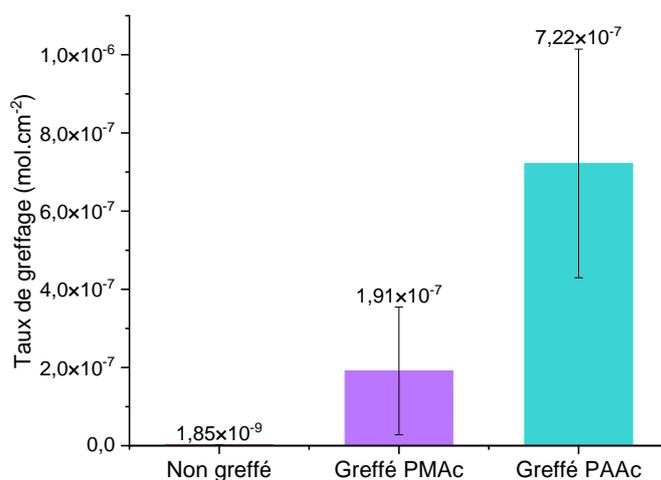


Figure 60 : Taux de greffage moyens du PDMS non greffé, greffé PMAc et greffé PAAc

A cette étape, les premières caractérisations montrent que le polymère se greffe en quantité importante sur les surfaces malgré les défauts. Il a donc été envisagé de modifier les paramètres de greffage, les conditions expérimentales et les conditions en solution, afin d'atteindre un greffage suffisant et significatif sans endommager le matériau.

Dans la suite des démarches de greffage de ces polymères, l'utilisation d'une autre lampe source de rayonnements UV s'est présentée comme une alternative.

Utilisation du rayonnement UV d'une source LED :

La lampe LED (Omniculture A475, 365 nm) est utilisée pour ces expériences (Figure 30b). La fenêtre optique plus grande offerte par ce dispositif : 5 cm de longueur et 2,3 cm de largeur, offre l'avantage d'élargir le champ d'action du faisceau. Un contrôleur extérieur permet par ailleurs de moduler la puissance de sortie des rayonnements à la distance de travail. D'après les travaux d'optimisation réalisés au laboratoire, un greffage optimal est obtenu pour une activation réalisée également à 160 mW.cm^{-2} et 220 mW.cm^{-2} pour l'étape de polymérisation [50].

Des surfaces de PDMS ont dans un premier temps de nouveau été greffées à une concentration de 0,35 M. Les surfaces récupérées après greffage étaient bien moins altérées que lors du greffage utilisant la lampe à mercure LO. Cependant, elles ont de nouveau montré un aspect blanchâtre et sont toujours rigides même si plus manipulables. Ces surfaces ont alors pu être caractérisées par mesure d'angle de contact apparent et leur taux de greffage a été évalué par dosage colorimétrique au BT.

Les résultats obtenus par mesures d'aWCA ont été regroupés sur la Figure 61a. Ils mettent en évidence la présence du polymère en surface grâce au changement de mouillabilité. Une surface non greffée initialement à $112,8^\circ$ passe à $85,3^\circ$ et 81° en moyenne respectivement pour une surface greffée au PMAc et PAAc. Toutefois, ces valeurs restent relativement élevées pour considérer la surface suffisamment hydrophile. En ce qui concerne les taux de greffage, la présence du polymère est de nouveau mise en évidence avec un taux en surface élevé : $4,34 \cdot 10^{-7} \text{ mol.cm}^{-2}$ et $2,92 \cdot 10^{-7} \text{ mol.cm}^{-2}$ en moyenne pour PMAc et PAAc respectivement (Figure 61b). Cependant, pour les deux méthodes de caractérisation, la répétabilité du greffage en surface est vaine. Les écarts de mesures obtenus entre chaque greffage sont élevés, comme le mettent en évidence les écarts-types conséquents. Par ailleurs, lors des mesures d'échantillons greffés par le PMAc, la diminution d'angle de contact apparent ne concorde pas toujours avec un taux de greffage élevé sur ce même échantillon et inversement. Une hypothèse pour expliquer ce constat pourrait être attribuée à la différence de longueur de chaîne générée en surface. En effet, la méthode « grafting from » ne permet pas d'avoir le contrôle sur la longueur des chaînes polymériques créées [10]. Ainsi, l'importante réactivité du monomère MAc pourrait générer de longues chaînes en surface formant une couche de polymère. De cette manière, une fois séchés, les échantillons pourraient présenter plus d'irrégularités en surface. Par ailleurs, l'action des UV générée par les deux lampes pourrait également impacter la réactivité en ce sens. On peut faire l'hypothèse qu'un rayonnement plus diffus peut agir plus amplement en solution qu'au niveau de la surface et favoriser plus d'homopolymérisation en solution.

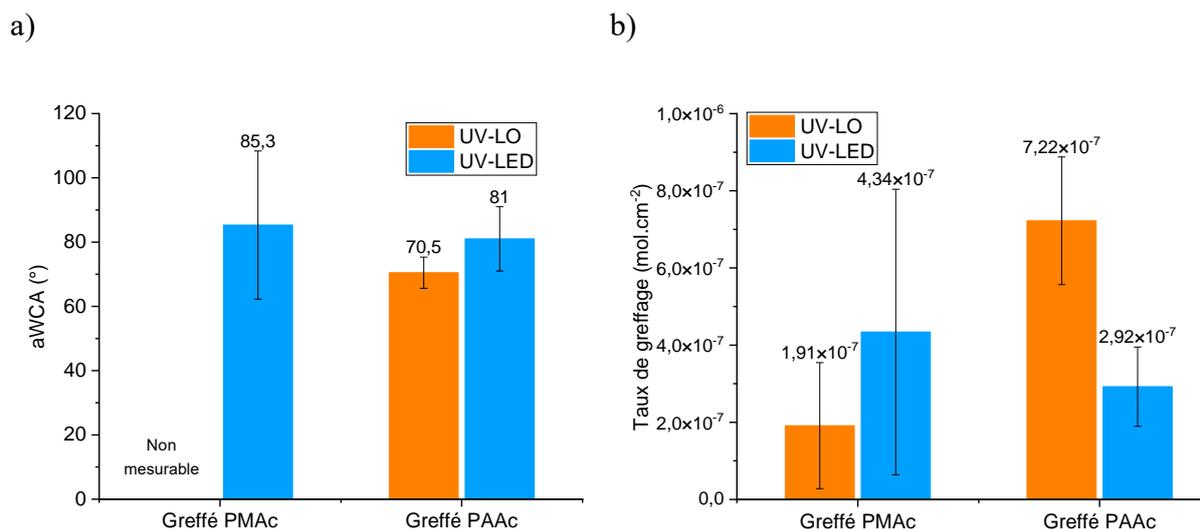


Figure 61 : a) aWCA et b) taux de greffage des surfaces de PDMS greffées par le PMAc et le PAAc sous irradiations UV-LO et UV-LED (0,35 M)

En raison de l'altération persistante du PDMS greffé dans ces conditions, il a été décidé de faire varier la concentration de manière à limiter l'impact du monomère sur le matériau. Initialement fixée à 0,35 M, la concentration a été diminuée à 0,2 M. Les essais de greffage ont été réalisés uniquement avec le monomère MAC et face aux 2 lampes UV.

Pour un greffage à la lampe LO, les surfaces ont cette fois pu être caractérisées par mesure d'aWCA car elles ont été obtenues moins durcies. Toutefois, les surfaces restent une nouvelle fois plus rigides et blanchâtres qu'un silicone nu. Les résultats (Figure 62a) montrent tout de même une diminution accrue de l'angle de contact apparent en surface avec cette lampe, passant en moyenne à 66°, rendant la surface hydrophile. Diminuer la concentration en solution en utilisant le rayonnement de la lampe UV LED réduit l'endommagement des surfaces. Elles sont macroscopiquement peu rigides en comparaison à l'expérience réalisée à 0,35 M. Néanmoins, les angles de contact apparents obtenus restent élevés, avec un angle de 93,4° en moyenne, bien que révélateurs de la présence d'un greffage en surface.

La mesure des taux de greffage met en évidence un taux élevé de PMAc en surface de PDMS ayant subi les rayonnements UV de la LO (Figure 62b). Les surfaces exposées au rayonnement du pavé LED sont quant à elles moins greffées, mais gardent tout de même en moyenne un résultat présentant une puissance de dix de différence avec un PDMS témoin. L'écart-type est par ailleurs réduit, ce qui pourrait être représentatif d'un greffage plus régulier et homogène, le matériau étant moins abîmé.

Finalement la diminution de la concentration à 0,2 M reste une condition trop aléatoire où le matériau reste endommagé macroscopiquement. Les résultats de caractérisation n'offrent

pas de résultats probants, puisque la condition de greffage pour laquelle le matériau est le moins abîmé fait faiblement diminuer la valeur de l'aWCA. Cette condition de diminution de concentration en solution n'est donc pas retenue. De plus, une diminution plus importante encore de la concentration n'a pas été envisagée en raison de l'altération toujours importante du matériau dans le cas étudié. Une concentration plus faible risquerait également de diminuer toujours plus le taux de polymère greffé en surface, limitant la performance de la fonctionnalisation et des analyses biologiques à suivre.

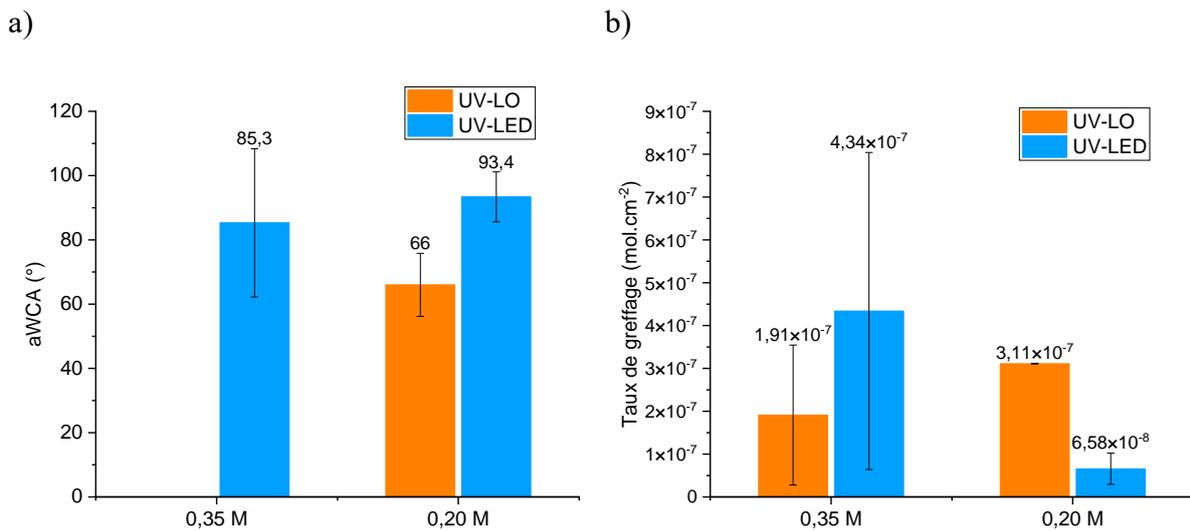


Figure 62 : a) aWCA et b) Taux de greffage, des surfaces de PDMS greffées par le PMAc à 0,35 M et 0,2 M sous UV-LO et UV-LED

Ces résultats relèvent également l'incertitude quant à l'utilisation de la lampe UV LED pour greffer ces monomères en surface de PDMS. Le faisceau, plus diffus, agit différemment sur la réactivité en solution. Ce résultat est observé macroscopiquement et mis en évidence par les résultats de caractérisation.

Ces derniers résultats mettent tout de même en évidence le possible greffage du polymère sur les surfaces de PDMS. En revanche, il reste à pallier le problème d'altération du matériau. Velazco *et al.*, expliquent dans leurs travaux que le monomère AAc est susceptible de pénétrer dans la matrice polymérique du PDMS et de polymériser à l'intérieur, induisant une contrainte. Cette hypothèse pourrait expliquer l'effet opaque et durci de l'échantillon obtenu [74,76]. Dans le second point abordé dans cette partie, le protocole a alors été adapté en conséquence.

2. Adaptation du protocole de greffage et caractérisations du greffage covalent

2.1. Modification du protocole : contrôle du pH de la solution de monomère

À cette étape des investigations expérimentales, la méthode « grafting from » est maintenue avec une étape de pré-irradiations sous UV. Mais, les conditions en solution lors de l'étape de polymérisation sont changées. En effet, le pH de la solution est ajusté : le monomère est solubilisé dans une solution aqueuse de NaOH, de manière à atteindre un pH environ égal à $pK_a(\text{monomère}) + 1$ (Figure 63). Cela correspond à $pH = 5,5$ pour le MAc, et $pH = 5,25$ pour l'AAc. Ainsi, les groupements portés par le monomère en solution seront présents en majorité sous la forme carboxylate COO^- . Cette forme anionique adoptée par les monomères va générer des répulsions entre les chaînes de polymère créées et des répulsions en surface dues à des interactions électrostatiques [74]. Ainsi, la pénétration du monomère et sa polymérisation au sein de la matrice de silicone se voit limitée, favorisant un greffage en surface.

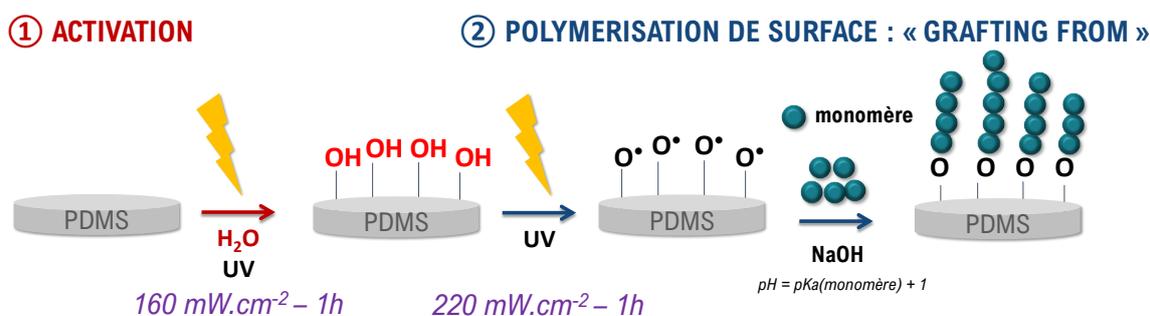


Figure 63 : Schéma de la stratégie de greffage "grafting from" en surface du PDMS avec ajustement du pH de la solution de polymérisation

D'un point de vue expérimental, la condition adéquate d'ajustement du pH en solution a été déterminée par réalisation de greffages en augmentant progressivement la concentration en NaOH en solution. Le pH est mesuré à chaque étape, de manière à suivre l'évolution de l'acidité de la solution. En-dessous de $pK_a(\text{monomère})$, les échantillons restent rigides et opaques, bien que la rigidité semble s'affaiblir lorsque pH approche pK_a . Au-delà, lorsque $pH \gg pK_a(\text{monomère})$, l'échantillon garde le même aspect qu'une surface non greffée. Cependant, les caractérisations du matériau ne reflétaient pas, ou peu, la présence d'un greffage en surface. C'est donc pour la condition intermédiaire, où le pH en solution avant greffage est fixé à environ

$pK_a(\text{monomère}) + 1$, que le greffage est optimal. Les caractérisations de surface décrites dans la partie 2.2 de ce chapitre mettent en évidence ce résultat.

Une attention particulière sera d'abord portée pour le monomère MAc. En effet, les conditions de changement de pH du milieu mis en œuvre avec ce monomère n'ont pas permis d'obtenir les résultats escomptés. La différence de réactivité du monomère et son architecture pourraient agir en ce sens. En conséquence, d'autres stratégies ont été mises en œuvre, couplées à l'ajustement du pH, pour tenter de greffer le polymère en surface. Elles sont décrites ci-après.

2.1.1. Greffage du PMAc à pH

Pour le monomère MAc, le changement de pH en solution limite son greffage en surface. Les conditions en pH inférieur mais proche du $pK_a(\text{MAc})$ ont peu d'impact sur la mouillabilité de surface du PDMS. Ce constat est observé peu importe les irradiations utilisées (Figure 64a). De plus, la surface arbore une légère rigidité. Sur la même figure, apparaissent également les résultats en condition $pH = pK_a + 1$ sur les deux dispositifs. Celle-ci n'affecte pas du tout l'hydrophilie de surface. La Figure 64b rend compte des taux de greffage sur ces surfaces. Ils atteignent $1,43 \cdot 10^{-8}$ et $1,66 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ en moyenne pour les greffages aux UV-LO et UV-LED respectivement. Bien qu'augmentés, ces taux restent trop faibles pour considérer les surfaces suffisamment greffées. Le spectre FTIR du PMAc greffé avec modification du pH du milieu montre tout de même la présence des bandes caractéristiques du MAc (Figure 65). Les intensités de bandes sont cependant plus faibles que lors du greffage sans modification du pH.

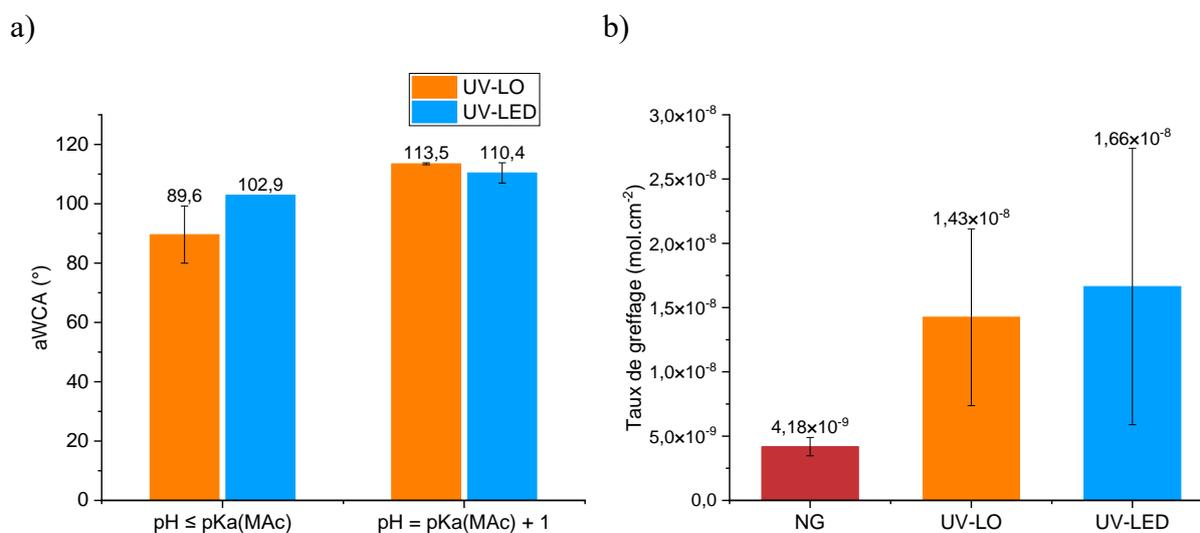


Figure 64 : a) aWCA des surfaces de PDMS greffées PMAc sous différentes conditions de pH du milieu, b) Taux de greffage du PMAc en surface du PDMS à $pH \approx pK_a(\text{MAc}) + 1$

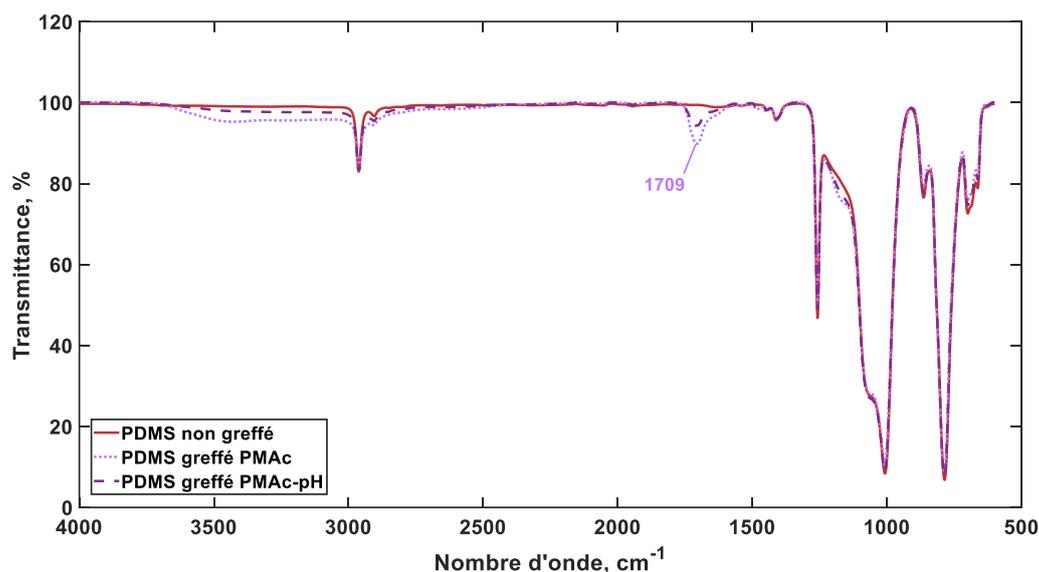


Figure 65 : Spectres FTIR du PDMS non greffé et greffé avec le PMAc et PMAc avec ajustement du pH du milieu à $pK_a(\text{MAc}) + 1$

Le greffage du PMAc avec modification du pH en solution ne peut donc pas être retenu. Cependant, en raison de l'altération importante du matériau après l'étape de greffage sans modification du pH du milieu, celle-ci ne peut pas non plus être conservée. Alors, comme les caractérisations avec modification du pH sont tout de même révélatrices de la présence du polymère, des alternatives expérimentales en solution ont été testées. Elles ont eu pour but de tenter d'améliorer le greffage. Pour chacun des nouveaux essais, la surface est de nouveau caractérisée par mesure d'angle de contact apparent et par détermination du taux de greffage par dosage colorimétrique au BT. Les expériences sont réalisées en utilisant les rayonnements UV de la lampe LO, plus performante.

i. Changement du pH et allongement du temps d'étape de polymérisation

Un allongement du temps de greffage a été envisagé comme solution pour pallier le faible taux obtenu précédemment. Uniquement deux essais ont été réalisés en raison de la contrainte expérimentale de temps et des choix préférentiels effectués dans la suite des travaux de thèse. Les résultats montrent qu'un allongement de l'étape de polymérisation aux UV à 2h30 permettait d'augmenter le taux de polymère greffé de plus d'une puissance de dix, atteignant $2,97 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Figure 66b). Le matériau greffé n'est pas rigide, mais un peu blanchi en son centre. L'angle de contact apparent obtenu de $97,7^\circ$ est cependant à nouveau élevé, la surface reste hydrophobe, même si l'angle est légèrement diminué (Figure 66a). On constate une nouvelle fois ici, qu'à un taux de greffage élevé est associé un angle de contact apparent élevé. Une surface couverte du polymère mais avec de courtes chaînes en surface, ou peu de chaînes de polymère mais de taille longue pourraient expliquer ce résultat (Figure 17) [10]. En résumé,

cette condition pourrait à l'avenir être approfondie mais reste trop contraignante dans le cas présent. En effet, la totalité du greffage serait réalisée en 3 heures 30.

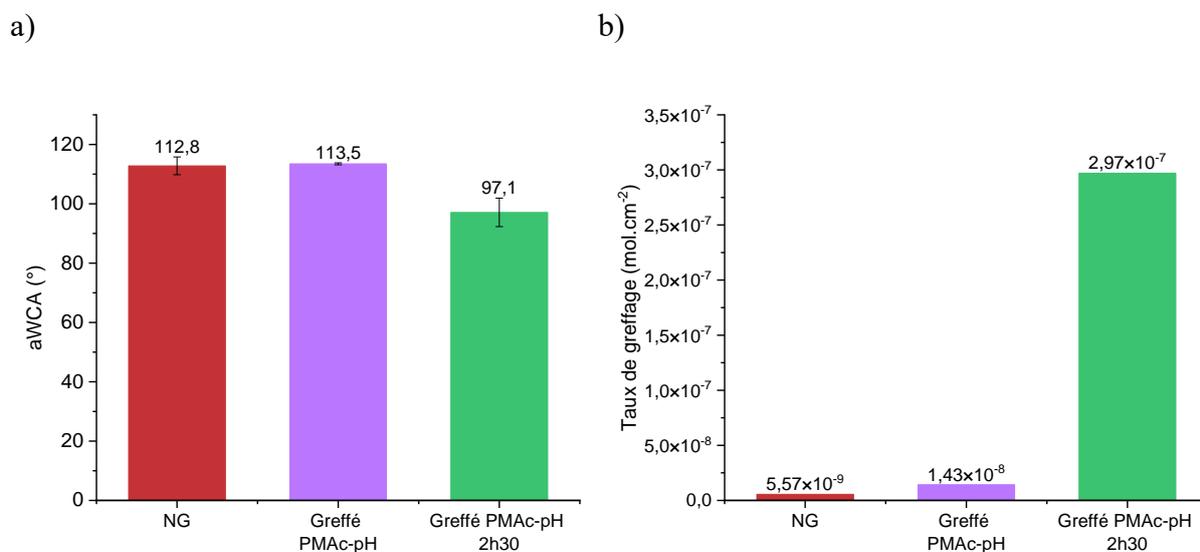


Figure 66 : a) WCA et b) taux de greffage du PMAc en surface du PDMS pour différents temps de polymérisation.

ii. Mise à pH et ajout d'amorceur de polymérisation

Pour ces essais, un amorceur de polymérisation : l'ACVA (4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid)) à 1 % en concentration a été ajouté en solution. L'amorceur a pour rôle de lancer la réaction de polymérisation grâce à la formation de radicaux libres par décomposition. Il est parfois ajouté pour améliorer le taux de polymérisation. En utilisant la même technique « grafting from » Pereira *et al.* ont par exemple du ajouter l'AIBN en tant qu'amorceur dans leur solution organique de greffage afin de lancer la polymérisation d'acide poly(vinylbenzylphosphonique) sur leur surface de titane [131]. Néanmoins, nos résultats sont dans ces conditions restés insuffisants. La mouillabilité de surface n'est pas affectée comme le montre la Figure 67a. Le taux de greffage est cependant élevé en comparaison à un PDMS non greffé, mais l'expérience est peu répétable comme le signifie l'important écart-type (Figure 67b). La mouillabilité trop faiblement diminuée et la non-répétabilité des greffages constituent des incertitudes trop importantes pour conserver l'ajout d'amorceur de polymérisation comme solution.

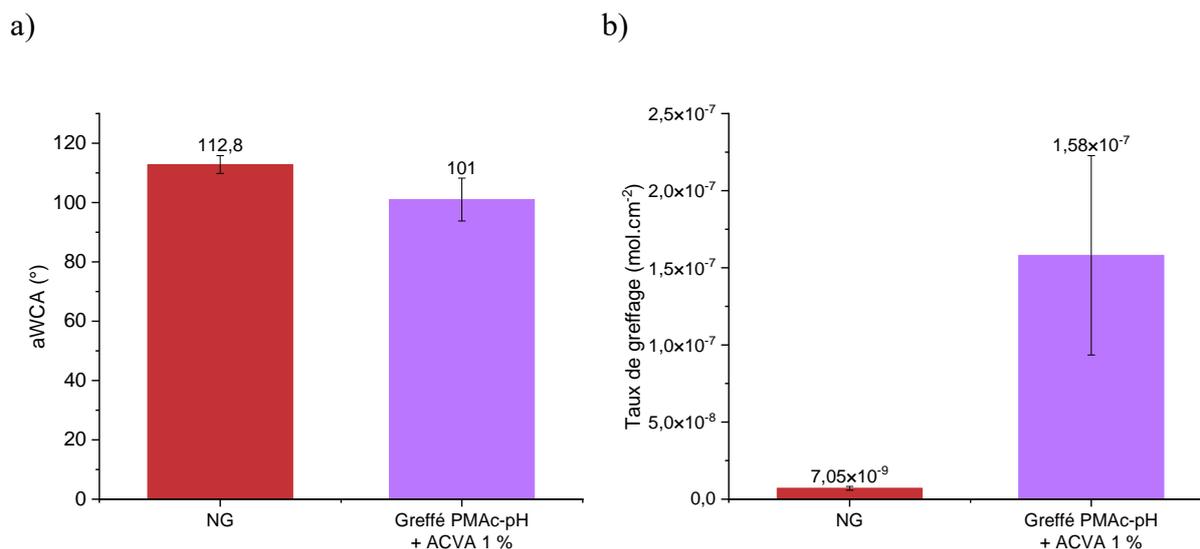


Figure 67 : a) aWCA et b) Taux de greffage du PMAc-pH en surface de PDMS en présence d'amorceur de polymérisation

iii. Changement de solvant

Zuniga *et al.* tentent dans leurs travaux de greffer l'acide méthacrylique sur des sondes en PVC. L'étude montre qu'en solution aqueuse, le rendement de greffage du monomère est faible et qu'en contrepartie une forte homopolymérisation est observée. Leur stratégie fut donc d'utiliser un autre solvant, en l'occurrence du toluène, pour faire gonfler le matériau PVC et favoriser l'accès du MAc aux sites radicalaires [114].

Trois greffages ont alors été testés dans 3 solvants différents où le MAc est soluble : le toluène, le méthanol et le dioxane [114,135]. Ces expériences permettent d'observer si l'utilisation d'un solvant organique peut générer d'autres interactions et freiner l'homopolymérisation en solution. Elles ont cette fois été réalisées sans modification du pH de la solution, mais toujours à une concentration en monomère de 0,35 M.

La mesure d'angle de contact apparent et la mesure du taux de greffage montrent peu de changement concernant le greffage du PMAc dans le méthanol et le dioxane (Figure 68). Un léger épaulement est visible sur le spectre FTIR vers 1645 cm⁻¹ (Figure 69), couramment attribué à la liaison C=C. Elle pourrait être attribuée à des traces de monomère en solution, mais ne peut donc pas démontrer la présence d'un greffage en surface. Ces conditions sont donc exclues. En revanche, un taux de greffage significatif de 9,42.10⁻⁸ mol.cm⁻² est constaté lorsque l'étape de polymérisation est effectuée dans le toluène (Figure 68b). Mais l'aWCA correspondant reste élevé (Figure 68a), la surface du PDMS garde sa propriété hydrophobe. Ces résultats montrent que la modification du solvant peut avoir un impact sur le greffage. Le toluène fait gonfler les surfaces de silicone, rendant accessible les sites radicalaires permettant

la polymérisation. Néanmoins, la mouillabilité de surface reste faible. Par ailleurs, en fin de greffage l'échantillon obtenu est blanchi (Figure 70), bien que non rigide. L'analyse du spectre FTIR montre un très léger épaulement vers 1709 cm^{-1} (Figure 69). Il est caractéristique de la liaison C=O du polymère, mais montre par sa faible intensité qu'il est faiblement détecté. Même si le taux de greffage en présence du toluène est élevé, la faible intensité des bandes spectrales révèle la non-fiabilité du greffage dans cette condition. En effet, en raison du gonflement du PDMS, le greffage a probablement été effectué dans le matériau et non en surface. Ceci expliquerait ce constat.

L'inconvénient de cette condition expérimentale est qu'une nouvelle fois, la polymérisation a possiblement été développée au sein du matériau et non en surface. Ce phénomène augmente le risque d'altération des propriétés mécaniques du matériau. Par ailleurs, l'utilisation de solvant organique n'est pas une condition « verte » de greffage et freine donc l'objectif d'optimisation du procédé pour des applications biomédicales. On peut enfin supposer que le gonflement du matériau et la pénétration du solvant dans la matrice peut favoriser le relargage de substances chimiques une fois le matériau au contact d'un environnement biologique, et ce, même après des étapes de lavage successives. Finalement, ces résultats sont considérés insuffisants ici pour être conservés en vue de futures caractérisations biologiques à visées applicatives.

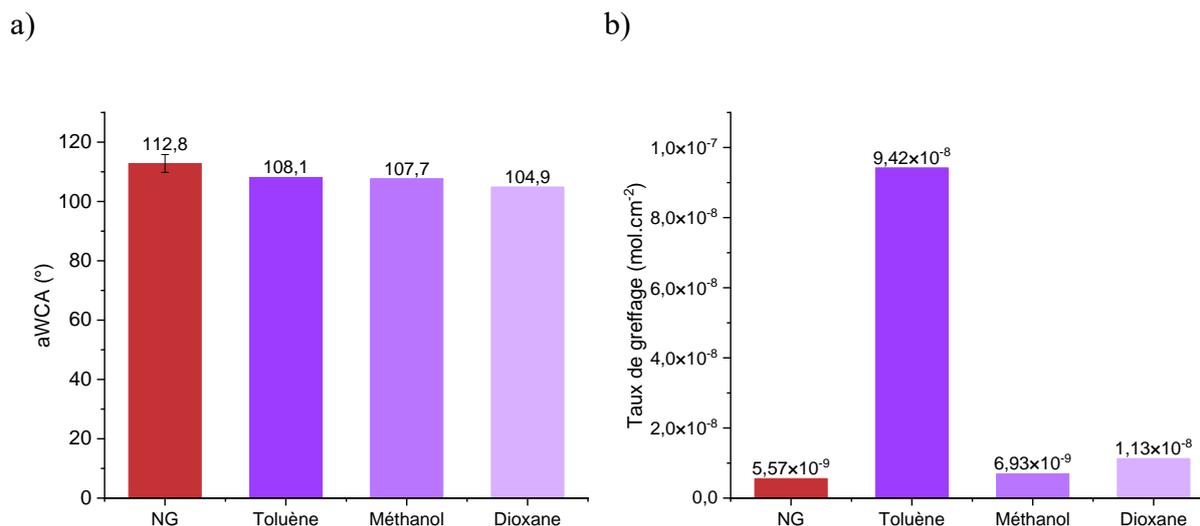


Figure 68 : a) aWCA et b) taux de greffage du PMAc en surface du PDMS dans différents solvants organiques

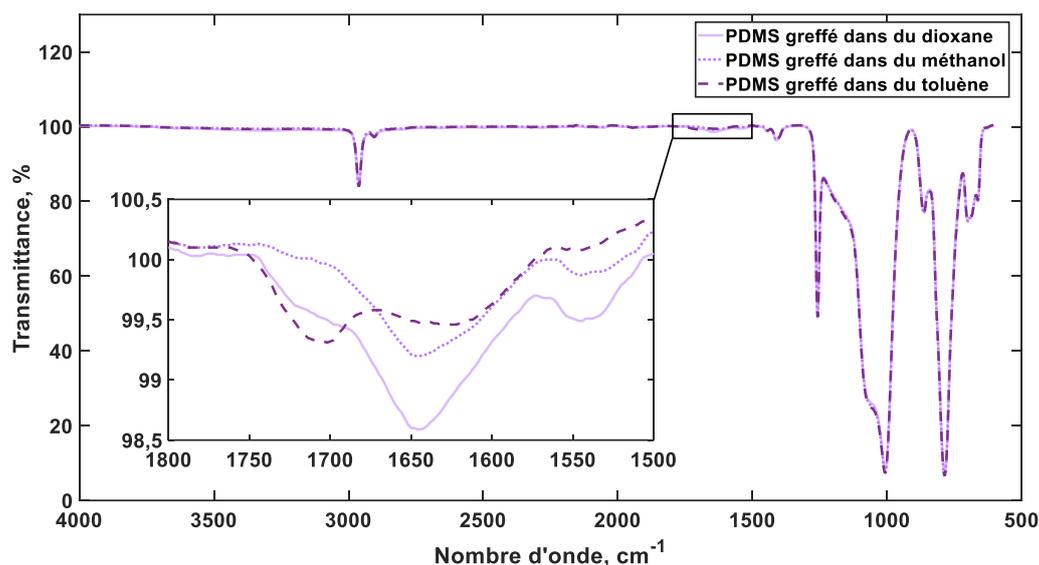


Figure 69 : Spectres FTIR des surfaces de PDMS greffées dans différents solvants organiques

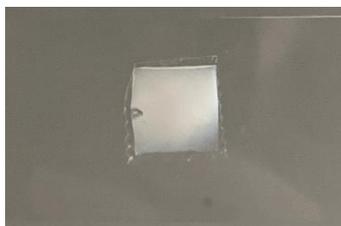


Figure 70 : Etat de surface d'un échantillon de PDMS greffé par le PMAc dans du toluène

Finalement, la difficulté à obtenir un greffage de surface par le PMAc pourrait reposer sur sa différence de réactivité et de comportement en solution. L'homopolymérisation ainsi que les effets limitants imposés par les interactions électrostatiques et stériques entre chaînes de polymères peuvent être plus importants dans le cas du MAC. La présence de la liaison méthyle, en comparaison au monomère AAC, peut induire une potentielle gêne stérique supplémentaire.

En conclusion, les constats observés lors du greffage du PMAc dans différentes conditions sont les suivants :

- La mouillabilité de surface reste faible dans la majeure partie du temps,
- Des taux de greffages élevés peuvent être obtenus, mais ne concordent pas avec la mouillabilité de surface,
- Les greffages sont peu répétables,
- Le contrôle du polymère en solution est aléatoire,
- La modification du pH du milieu n'a pas d'impact sur le greffage,

- La surface du matériau reste endommagée.

Dans la suite des travaux, c'est donc le greffage du PAAc qui sera privilégié. Toutefois, à titre de comparaison pour la suite des caractérisations, une condition de greffage du PMAc a été sélectionnée. Il s'agit du greffage du polymère sous irradiations UV-LED à une concentration de 0,35 M. Grâce à l'utilisation de ces irradiations la surface était moins altérée et un taux de greffage important était obtenu. Les spectres FTIR montrent pour chaque greffage effectué la présence des groupements caractéristiques du MAc. Les résultats de mesure d'angle de contact restent cependant variables. Une mouillabilité importante de la surface comme une faible mouillabilité peut être obtenue pour des taux de greffages équivalents.

2.1.2. Greffage du PAAc à pH

Lorsque $\text{pH} = \text{pKa}(\text{AAc})+1$, au niveau macroscopique, l'aspect de surface des échantillons greffés par le PAAc reste inchangé en comparaison à une surface nue (Figure 71). Le greffage de l'AAc aux UV avec ajustement du pH lors de l'étape de polymérisation est efficace et constitue donc la condition retenue. La partie suivante se consacre alors à la caractérisation précise du greffage covalent. Pour chaque caractérisation, une condition de greffage à pH modifié est comparée avec la condition de greffage directe. Dans un souci de lisibilité, la condition à pH modifié sera notée PAAc-pH, contre PAAc pour la condition sans modification du pH.

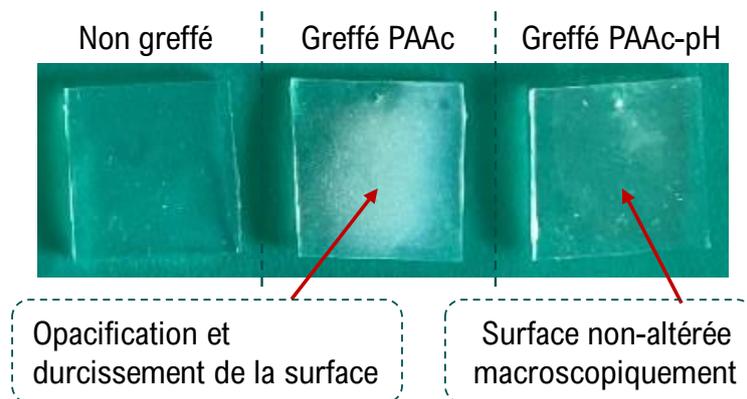


Figure 71 : Comparaison des états de surface du PDMS non greffé, greffé par le PAAc et par le PAAc-pH

2.2. Caractérisations du greffage des surfaces de PDMS par le PAAc dans des conditions de pH modifié en solution

2.2.1. Mesure d'angle de contact apparent

Sur la Figure 72, la mesure des aWCA montre que la mouillabilité des surfaces est augmentée après greffage dans les conditions à pH modifié. La valeur atteint environ 67° avec un écart-type faible, mettant en évidence la répétabilité de l'expérience. Cette valeur confirme par ailleurs la présence du polymère en surface. Les nouvelles conditions expérimentales n'impactent donc pas le changement de mouillabilité en surface du PDMS.

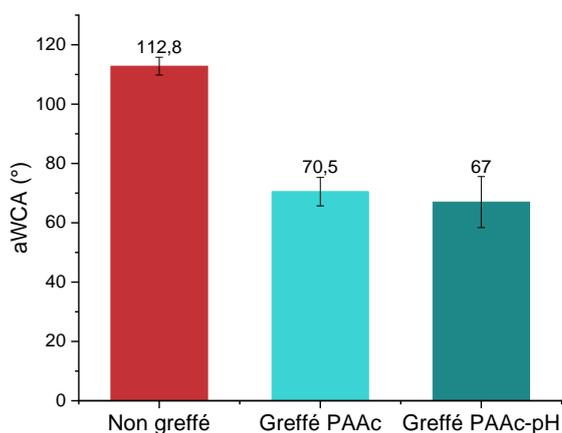


Figure 72 : Comparaison des aWCA des greffages du PAAc et du PAAc-pH en surface du PDMS

2.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres FTIR du PDMS greffé par la condition PAAc-pH montrent la présence des bandes caractéristiques du polymère en surface (Figure 72). Vers 1709 cm^{-1} apparaît la bande représentative de la liaison C=O et la bande large entre 2500 et 3500 cm^{-1} correspondant à la liaison OH de l'acide carboxylique. Le caractère covalent du greffage est de nouveau mis en évidence par la présence de la bande caractéristique de la liaison éther C-O-C vers 1162 cm^{-1} .

Néanmoins l'intensité des bandes caractéristiques du greffage pour la condition à pH modifié apparaît plus faible que pour le greffage direct. Ce résultat pourrait s'expliquer par un taux plus faible de polymère greffé, en raison de sa pénétration limitée au sein du PDMS. Cette hypothèse pourra être appuyée par les résultats de mesure de taux de greffage.

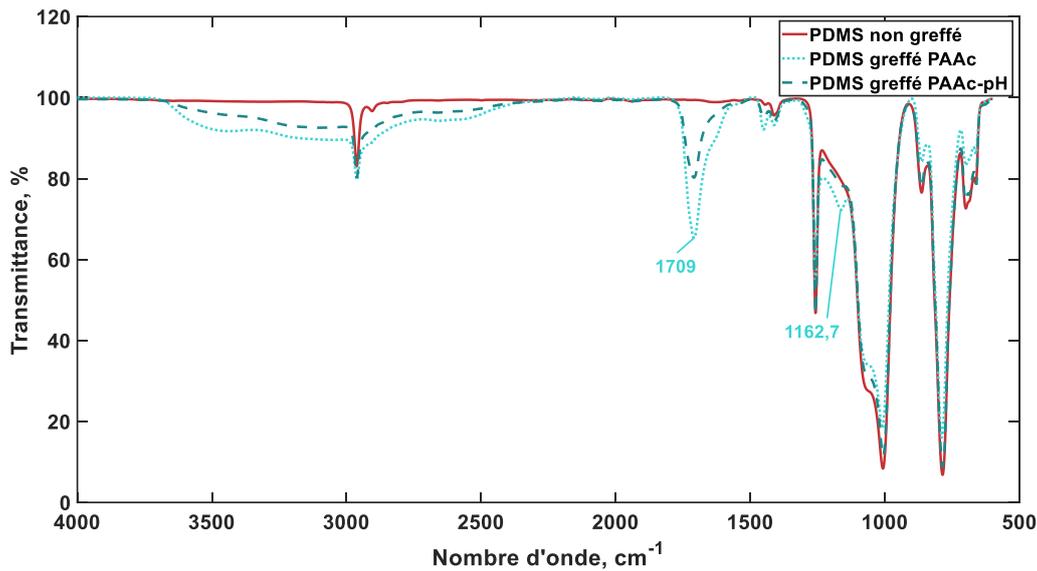


Figure 73 : Comparaison des spectres FTIR des surfaces de PDMS non greffée, greffée PAAc et greffée PAAc-pH

2.2.3. Evaluation des taux de greffage en surface

Les expériences de dosage colorimétrique au BT des PDMS greffés par le PAAc-pH révèlent le greffage abondant des surfaces par le polymère bioactif. Un taux de $1,59 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻² est obtenu contre $1,85 \cdot 10^{-9}$ mol.cm⁻² en moyenne pour une surface non greffée. Néanmoins, en comparaison au greffage du PAAc, le taux de greffage en surface est bien moins abondant (Figure 74). En raison de la capacité du monomère AAc à pouvoir pénétrer le réseau matriciel du PDMS [74,76], le taux obtenu pour le greffage du PAAc atteignant en moyenne $7,22 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻² est particulièrement élevé. Lorsque le pH de la solution contenant le monomère est ajusté, l'acide acrylique se trouve sous la forme COO⁻. Ainsi, des répulsions ioniques se produisent entre les groupements et des répulsions stériques ont lieu avec la surface électrostatique du PDMS. La pénétration du monomère dans le réseau de PDMS se voit ainsi limitée, favorisant un greffage sur la surface. De cette manière, même si le taux de greffage obtenu pour la condition PAAc-pH est moins élevé, il correspond majoritairement à des groupements présents en surface. En comparaison, le taux de greffage obtenu pour le PAAc correspondrait à des chaînes de polymère formées en surface, mais également aux monomères ayant pénétré le PDMS et polymérisé. Par ailleurs, la faible incertitude obtenue pour le greffage du PAAc-pH permet de confirmer la répétabilité du greffage. Moins d'incertitudes persistent quant au dosage du nombre de groupement en surface, ce qui révélerait et confirmerait une nouvelle fois un greffage opéré sur la surface et non dans la matrice du PDMS. Ainsi, le PAAc en condition d'ajustement du pH est considéré comme largement greffé en surface.

Lors des précédents travaux effectués pour le greffage du PNaSS, le taux en groupements sulfonates évalués en surface pour une concentration en solution de 0,35 M a été évalué à $8,45 \cdot 10^{-7} \text{ g.mol}^{-1}$ [77]. Ce taux était considéré comme suffisant pour influencer sur la réponse biologique. Dans la même unité, ce taux est évalué à $1,12 \cdot 10^{-5} \text{ g.mol}^{-1}$ et $2,48 \cdot 10^{-6} \text{ g.mol}^{-1}$ pour le PAAc et le PAAc-pH respectivement. En comparaison, l'échantillon serait donc suffisamment greffé pour potentiellement induire une action biologique. Ce résultat reste néanmoins hypothétique car le travail est réalisé avec un autre monomère, mais constitue une base pour poursuivre les caractérisations et investigations.

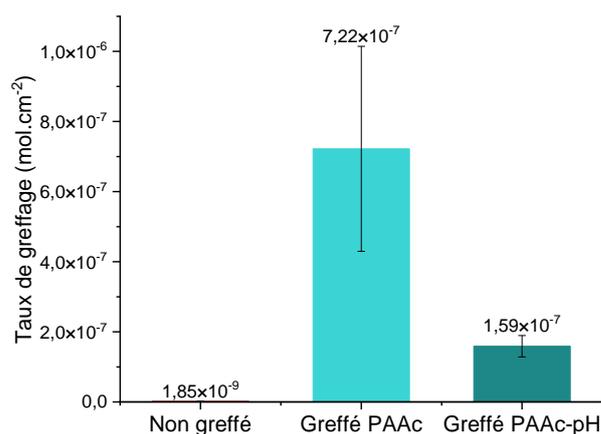


Figure 74 : Comparaison des taux de greffage entre une surface non greffée, greffée PAAc et greffée PAAc-pH

Enfin, en comparaison, le greffage du PMAc engendre en moyenne un taux de greffage en surface plus élevé que le greffage du PAAc-pH (Figure 75). Cependant, la très grande incertitude avait une nouvelle fois montré la non-répétabilité du greffage du PMAc. De façon similaire au greffage du PAAc, le résultat suggère également que sans ajustement du pH, le monomère pénètre systématiquement la matrice du matériau. Cependant, comme évoqué dans la partie précédente, ajuster le pH du milieu en présence de PMAc n'engendre pas un taux de greffage élevé en surface. L'hypothèse mise en avant pour expliquer ce phénomène est basée sur la gêne stérique occasionnée par le groupement méthyle du MAc.

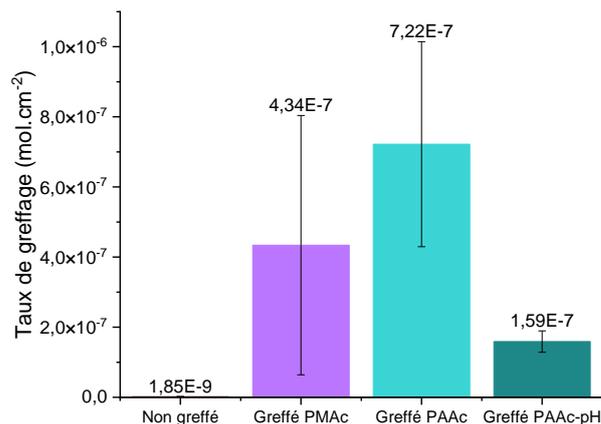


Figure 75 : Comparaison des taux de greffages en surface du PDMS dans les conditions expérimentales retenues : greffage PMAc, PAAc et PAAc-pH

2.2.4. Comparaison des pourcentages atomique en surface par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS)

Les expériences de spectroscopie photoélectronique à rayons X permettent d'accéder à la composition de surface des matériaux. Cette technique permet de mettre en évidence les changements atomiques en surface du PDMS associés au greffage.

Les polymères bioactifs utilisés sont essentiellement composés d'atomes de carbone (C1s) et d'oxygène (O1s). Ces atomes sont déjà présents dans le matériau PDMS. Néanmoins, une variation non négligeable de leur pourcentage atomique est observée une fois les surfaces greffées (Tableau 14). Le pourcentage atomique des atomes de carbone et d'oxygène augmente, ce qui suggère la présence de plus de matière carbonée au-dessus de l'échantillon de PDMS. En contrepartie, le pourcentage atomique de silicium en surface diminue. En effet, lors du passage du rayonnement, le signal Si2p est atténué à travers la couche organique formée. Ces résultats confirment la présence des polymères PMAc et PAAc en surface. La même conclusion peut être apportée pour le greffage du PAAc-pH. En comparaison au greffage du PAAc, une variation plus importante en moyenne des différents pourcentages atomique est même observée. Ainsi, le changement de condition de greffage en solution ne semble pas impacter la quantité de matière greffée en surface.

Atome	Position* (eV)	%at. non greffé	%at. greffé PMAc	%at. greffé PAAc	%at. greffé PAAc-pH
C1s	283	49,1 ± 2,2	54,0 ± 2,3	51,1 ± 2,5	52,3 ± 0,9
O1s	531	23,0 ± 0,3	23,8 ± 0,3	24,4 ± 1,2	28,5 ± 0,3
Si2p	101	27,9 ± 2,1	21,8 ± 2,0	24,5 ± 3,7	19,2 ± 1,3

Tableau 14 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surface de PDMS greffées dans différentes conditions. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné)

Le greffage du PMAc et du PAAc est également souligné grâce aux spectres XPS haute résolution (Figure 76). En effet, deux nouveaux signaux apparaissent dans la région C1s par rapport au PDMS non greffé. Les énergies de liaison observées à 284,4-284,8 eV en bleu et 288,3 eV en rouge, sont respectivement attribuées aux atomes dans l'environnement chimique C-O et C-Si, et dans C=O (Figure 76a). Ces signaux correspondent clairement à la couche pure de PAAc et PMAc en surface. Une tendance similaire est observée dans la région O1s. L'apparition du nouveau signal en rouge (Figure 76b) d'énergie de liaison plus élevée est attribué à l'oxygène dans une fraction acide C-O(C=O). Enfin, les pourcentages atomiques globaux des surfaces de PDMS greffées par le PMAc et le PAAc par rapport à la surface nue, présentés Tableau 15, montrent la grande correspondance entre les environnements chimiques C1s et O1s des fractions acides (en rouge) : 5,6 contre 5,1 pour le PAAc et 4,1 contre 3,9 pour le PMAc.

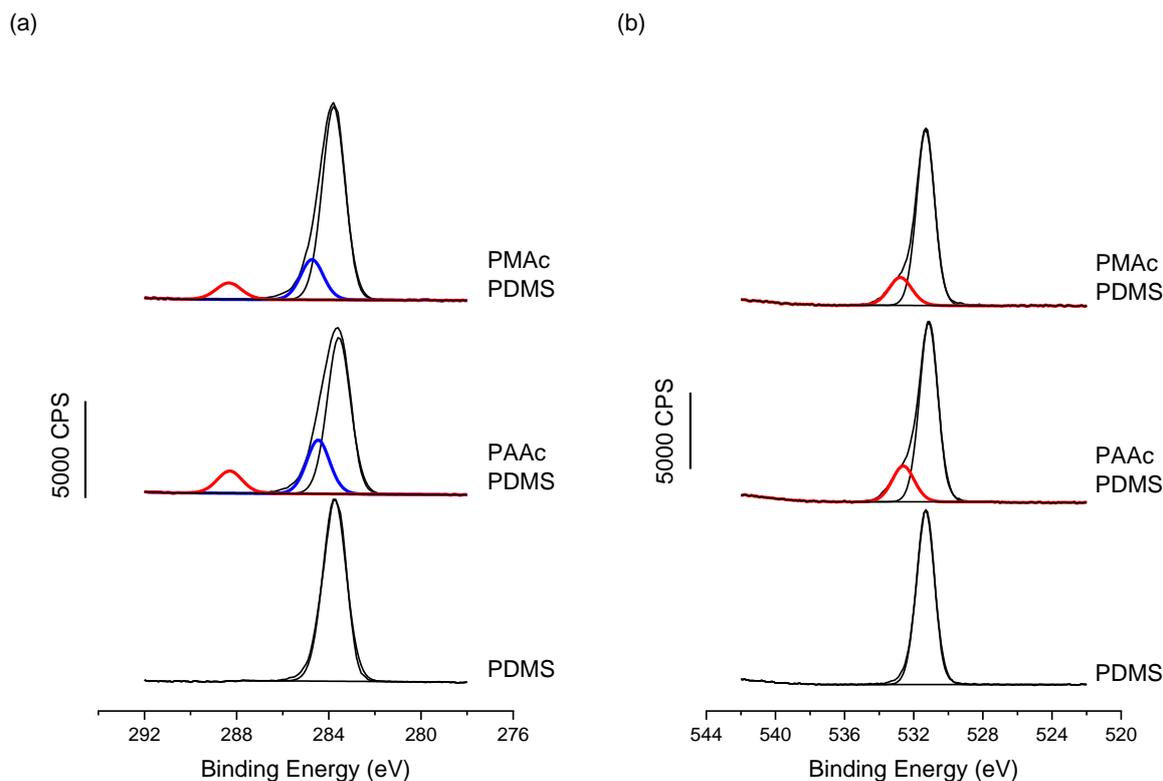


Figure 76 : Spectres XPS haute résolution pour (a) C1s et (b) O1s, montrant l'apparition des groupements caractéristiques liés au PMAc et au PAAc, en comparaison au PDMS témoin

Attribution	C1s			O1s		Si2p	C_{288}/C_{total}	O_{533}/O_{total}
Attribution	C-C, C-H	C-O, C α	C=O	C=O(OH) O-Si	C=O(OH)	Si-O		
PDMS	283,8			531,3		101,2		
	47,6			22,7		29,7		
PAAc	283,6	284,4	288,3	531,1	532,6	101,1		
	36,25	12,45	5,6	20,9	5,1	19,8	0,103	0,196
PMAc	283,8	284,8	288,3	531,3	532,8	101,3		
	43,0	9,0	4,1	19,5	3,9	20,4	0,073	0,166

Tableau 15 : Pourcentages atomiques des fractions chimiques de chaque élément, obtenus à partir de la décomposition des spectres XPS haute résolution pour C1s et O1s présentés Figure 76

2.2.5. Essais de physisorption

En parallèle de ces travaux, des tests de physisorption ont été réalisés pour confirmer l'efficacité de l'utilisation des rayonnements UV dans la formation de liaisons covalentes. Pour cela, l'étape d'activation sous irradiations UV est réalisée comme décrite en début de partie.

Ensuite, les surfaces activées sont placées une nuit dans une solution de MAc ou de AAC, à une concentration de 0,35 M et à TA. Enfin, les échantillons sont lavés 48 heures dans de l'eau distillée. Les expériences ont été réalisées avec une activation des surfaces via la lampe à mercure LO dans le cas de l'utilisation du AAC et la lampe LED pour le MAc, correspondant aux conditions les plus optimales retenues pour leur greffage. La mesure d'angle de contact révèle une très légère diminution (Figure 77a) de 106° et 103° en moyenne pour les surfaces physisorbées avec le MAc et l'AAC respectivement. Les surfaces restent hydrophobes, la diminution est minime en comparaison aux résultats obtenus après greffage sous rayonnements. Elle reflète probablement la présence de résidu de monomère, ou de l'action des rayonnements UV seuls sur les surfaces [77]. L'analyse des spectres FTIR ne montre pas de changement spécifique correspondant à un greffage (Figure 77b). Les spectres des surfaces physisorbées se superposent au spectre d'une surface de PDMS non fonctionnalisée. La bande caractéristique de la liaison C=O, généralement intense retrouvée à environ 1709 cm^{-1} lors du greffage de nos monomères n'apparaît pas. Ces caractérisations soulignent donc le caractère covalent du greffage via les rayonnements UV.

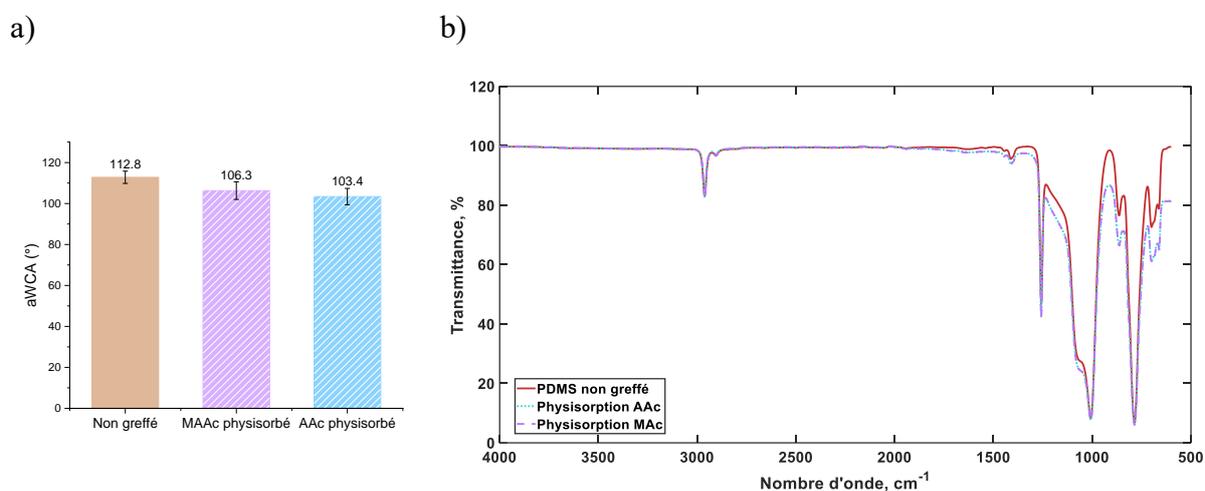


Figure 77 : a) aWCA et b) Spectres FTIR obtenus après physisorption du MAc et de l'AAC en surface de PDMS

2.3. Conclusion partielle

Les différentes caractérisations chimiques des surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH sont révélatrices de l'efficacité de l'adaptation du protocole. Le taux de greffage en surface est élevé, la mouillabilité est augmentée, la présence du polymère est mise en évidence sur les spectres FTIR et les analyses XPS montrent la présence d'une couche de polymère sur la surface. Enfin, à l'œil nu la surface n'apparaît pas endommagée. Des analyses microscopiques

2. Adaptation du protocole de greffage et caractérisations du greffage covalent

de l'état de surface du matériau ainsi que des essais mécaniques sont ensuite réalisés afin de valider totalement ce protocole.

A titre comparatif, les conditions de greffage directes du PMAc et du PAAc sont conservées pour la suite des caractérisations. Le Tableau 16 ci-dessous résume leurs propriétés de surface.

Condition	PMAc	PAAc	PAAc-pH
Monomère greffé	MAc	AAc	AAc
Lampe UV	LED	LO	LO
Concentration (M)	0,35	0,35	0,35
pH de la solution de greffage	≈ 2,40	≈ 2,25	5,25 = pKa(AAc) + 1
aWCA (°)	85,3	70,5	67,0
Bandes spectrales IR	<ul style="list-style-type: none"> • C=O : 1709 cm⁻¹ • -OH(C=O) : 2500-3500 cm⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> • C=O : 1709 cm⁻¹ • -OH(C=O) : 2500-3500 cm⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> • C=O : 1709 cm⁻¹ • -OH(C=O) : 2500-3500 cm⁻¹
Taux de greffage moyen (mol.cm⁻²)	4,34.10 ⁻⁷	7,22.10 ⁻⁷	1,59.10 ⁻⁷

Tableau 16 : Résumé des propriétés de surface du PDMS greffé dans les conditions retenues

3. Etat de surface du PDMS greffé

La modification de l'état de surface du PDMS après les différents essais de greffage et parfois son endommagement ont encouragé la réalisation d'analyses topographiques du matériau.

3.1. Aspect de surface au microscope électronique à balayage

Des images ont été capturées au MEB afin d'observer microscopiquement les changements ayant lieu sur les surfaces fonctionnalisées. Le PDMS greffé par le PMAc et le PAAc était déjà macroscopiquement endommagé (Figure 58). Les surfaces étaient devenues opaques et durcies. Au MEB, on peut voir qu'à faible grossissement (150x) (Figure 78-B1 et C1) des amas apparaissent en surface en comparaison à un silicone non greffé lisse (Figure 78-A1). Ils pourraient correspondre à la couche importante de polymère greffé en surface. La quantité d'amas présents est plus importante pour le greffage du PAAc (Figure 78-C1) que pour celui du PMAc (Figure 78-B1). Ce phénomène peut correspondre à la supposée réactivité plus importante du monomère AAc en solution placé devant le faisceau concentré de la lampe UV LO. Le faisceau plus diffus de la lampe LED utilisée pour greffer le MAc avait déjà montré une altération moins importante du matériau au niveau macroscopique.

À plus fort grossissement (3000x, Figure 78-B2), la surface est parsemée de crêtes et fissures. Yang *et al.* font la même observation : dans leur étude, les auteurs comparent le greffage du PAAc sous irradiations UV en solution aqueuse et en solution organique (acétone avec benzophénone en tant que photoinitiateur). Lorsque le polymère est greffé en solution aqueuse, la surface est constituée de blocs lisses séparés par des crêtes. En réalisant une analyse par AFM, ils remarquent que les zones hautes, donc les crêtes, correspondent à une surface plus rigide que les zones lisses. L'interprétation suggère que le PDMS étant un matériau élastomère, les crêtes sont essentiellement constituées de chaînes de polymère. Les auteurs expliquent que l'AAc est compatible avec l'eau et que le monomère peut donc facilement pénétrer le film de PDMS. La polymérisation a ainsi lieu dans la masse, entraînant une contrainte dans le film. Si cette contrainte dépasse l'élasticité du film, alors des fissures peuvent se former. Ces fissures constituent ensuite une nouvelle interface de greffage que les monomères peuvent facilement atteindre [76]. De ce fait, la densité de chaînes de polymères greffées à cet endroit peut être élevée, rendant le matériau rigide et cassant. Cette interprétation pourrait expliquer les irrégularités obtenues en ce qui concerne les mesures d'angles de contact apparents d'un greffage à l'autre et les écarts types importants des taux de greffage mesurés. Yang *et al.* ajoutent même que la densité de chaînes greffées dans les fissures peut devenir très élevée et que les monomères diffusant dans les fissures pouvaient probablement former des hydrogels avec les chaînes greffées, menant à l'effet Trommsdorff [76]. Cet effet apparaît dans les milieux très

concentrés où la polymérisation radicalaire s'effectue en masse, avec un polymère soluble dans son monomère. La conversion du monomère y augmente fortement.

La surface apparaît encore plus irrégulière et difforme à haut grossissement dans le cas du greffage du PAAc (Figure 78-C2). Celle-ci est envahie par des discontinuités constituées de crevasses et crêtes. Lorsque le pH du milieu est ajusté, on observe à un grossissement 150x que la surface est moins envahie par les amas (Figure 78-D1). À haut grossissement (3000x), la surface arbore une nanostructure ondulatoire (Figure 78-D2). Les défauts persistent avec quelques fissures plus marquées, mais la surface paraît globalement moins endommagée. Par ailleurs, les changements sont constatés sur l'ensemble de la surface et non par fissures marquées et éparses comme pour le greffage du PMAc (Figure 78-B2). Le greffage est probablement plus uniformément réparti sur la surface.

Ajuster le pH du milieu contribue considérablement à limiter la pénétration du monomère dans le réseau du PDMS, évitant l'endommagement du matériau. Yang *et al.* obtiennent cet effet de structure ondulatoire en surface lorsque l'AAC est greffé en milieu organique [76]. Ici, l'utilisation de solvant organique est évitée. Des caractérisations topographiques au profilomètre optique vont compléter les interprétations et hypothèses formulées. Des essais de traction permettront de vérifier si les modifications de surface observées au niveau microscopique ont une incidence sur les propriétés élastiques du PDMS.

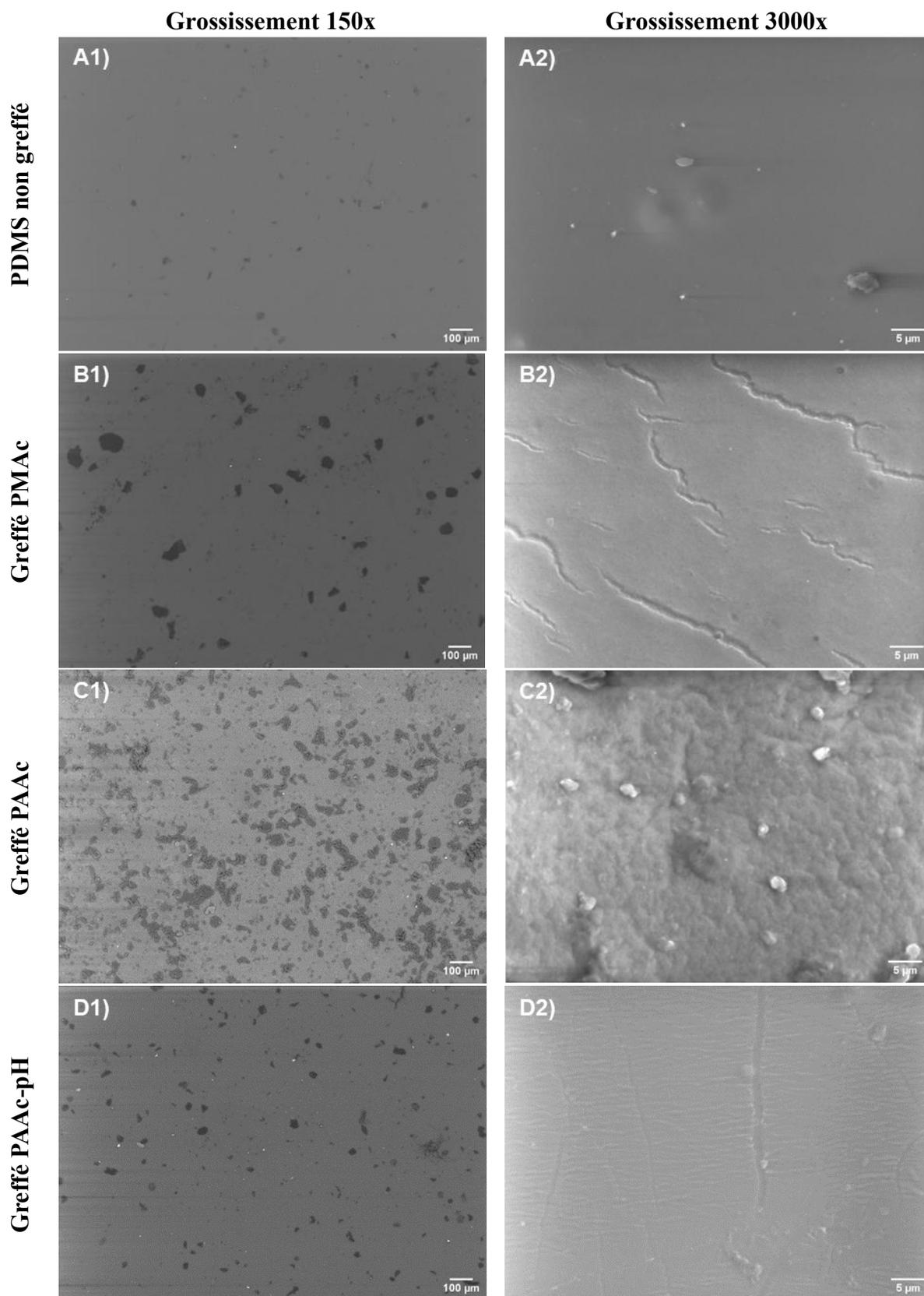


Figure 78 : Images MEB de PDMS non greffé : A1) 150x, A2) 3000x; PDMS greffé PMAc : B1) 150x, B2) 3000x; PDMS greffé PAAc : C1) 150x, C2) 3000x; PDMS greffé PAAc-pH : D1) 150x, D2) 3000x

3.2. Comportement de surface et rugosités

Des analyses topographiques complémentaires ont été réalisées au profilomètre optique. Ces acquisitions ont eu pour but d'obtenir plus d'informations sur l'état de surface et le comportement du polymère une fois greffé. Plusieurs scans ont été réalisés sur différentes zones d'une même surface et sur plusieurs surfaces pour une même condition. Les scans présentés Figure 79 ont été choisis de manière à représenter le mieux possible l'ensemble des résultats. Ils ont été colorés de manière à optimiser l'observation de l'aspect en surface.

La Figure 79b représentative du greffage du PMAc et la Figure 79c représentative du greffage du PAAc mettent en évidence la grande réactivité de ces monomères. En comparaison à une surface non greffée (Figure 79a), leurs surfaces sont recouvertes d'amas correspondant aux polymères. De manière générale, ces images soulignent le greffage effectif et homogène en surface. Pour ces deux conditions, les irrégularités sont retrouvées et avec des valeurs de rugosités qui atteignent environ $1,7 \mu\text{m}$ de hauteur contre $0,1 \mu\text{m}$ pour le PDMS non greffé. Une épaisse couche de polymère est donc formée sur la surface. Les principales différences observables entre le greffage du PAAc et du PMAc résident dans la forme des aspérités hautes obtenues. Si l'on considère qu'elles correspondent à des amas de polymères, celles-ci sont plus régulièrement étalées dans le cas du greffage du PAAc. Pour le greffage du PMAc, les amas arborent des formes plus arrondies, éparses et plus massives. Dans les parties précédentes, des hypothèses étaient formulées quant à la configuration du polymère : il pouvait être greffé sous la forme de chaînes courtes mais dispersées, ou sous la forme de longues chaînes rapprochées. Ces différentes configurations peuvent impacter les mesures d'angles de contact apparents. Les scans obtenus peuvent donc laisser penser que le PAAc formerait de longues chaînes qui s'étaleraient sur la surface une fois séchée. Pour le PMAc, de plus courtes chaînes seraient obtenues, formant des petits amas sphériques une fois la surface sèche. Cette différence peut être liée à la gêne stérique plus importante occasionnée par le groupement méthyle porté par le MAc.

La caractérisation des surfaces au profilomètre optique a donc permis de mieux visualiser l'allure du polymère une fois greffé. La méthode reste cependant qualitative et basée sur les observations, des caractérisations complémentaires sont nécessaires afin de confirmer les hypothèses.

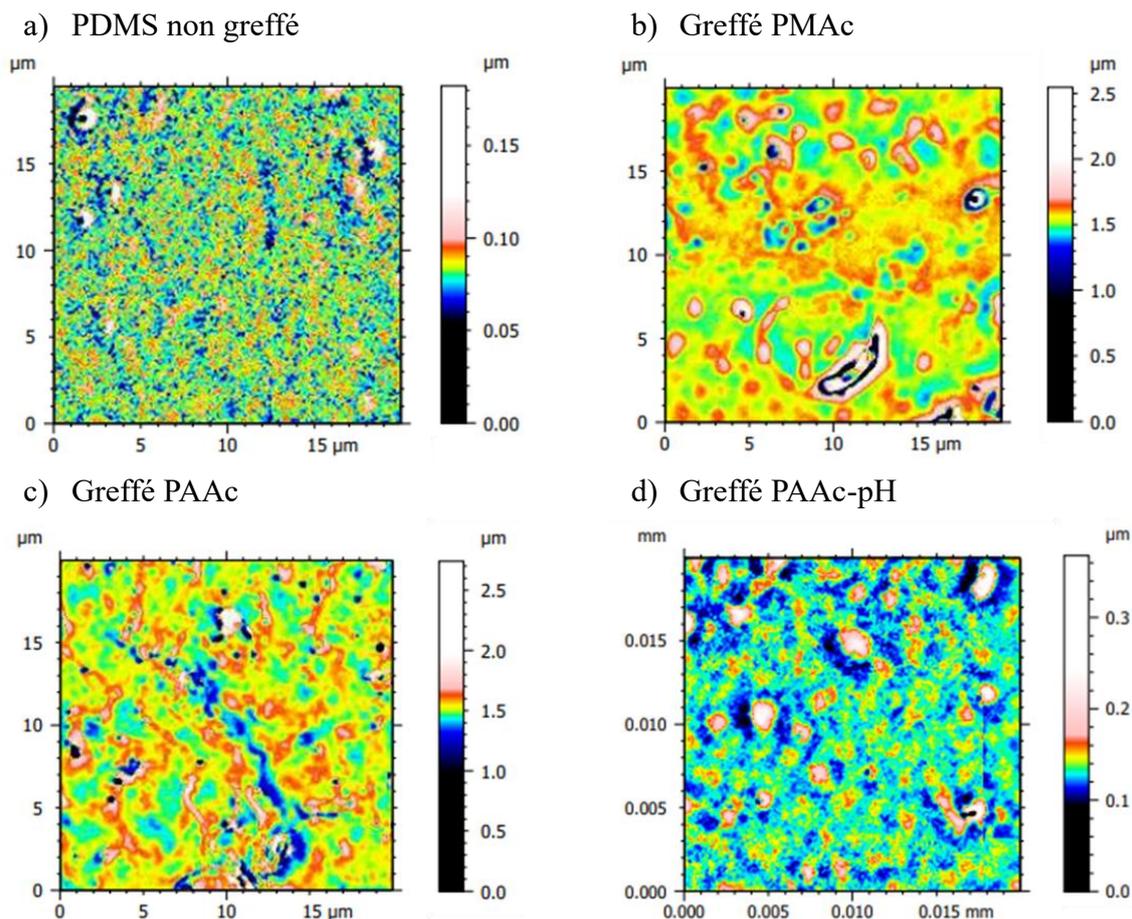


Figure 79 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b) greffé PMAc, c) greffé PAAc et d) greffé PAAc-pH

Le scan correspondant au greffage du PAAc-pH (Figure 79d) présente une surface plus proche du scan du PDMS non greffé (Figure 79a). La couche formée en surface est moins importante, avec une hauteur maximale de rugosités atteignant 0,20 µm. Des amas restent présents en surface, traduisant la présence du polymère. Ces résultats peuvent coïncider avec le taux de greffage moins important du PAAc-pH en comparaison aux autres greffages. Les hautes rugosités sont moins étalées sur la surface et la présence de crêtes et crevasses est moins manifeste. Le greffage s'établi principalement en surface, moins de polymère pénètre le réseau de PDMS. Ces différentes observations confirment la modification moins importante du matériau après greffage.

En comparaison, des surfaces de PDMS greffées au NaSS ont été analysées au profilomètre optique (Figure 80). Trois scans sont présentés car l'ensemble de la surface n'était pas homogène. Cette inhomogénéité peut être expliquée par la répétabilité moyenne du greffage du PNaSS. En effet, même si le greffage du polymère a lieu dans la grande majorité des cas, la caractérisation des surfaces montre des irrégularités. Une mouillabilité accrue est généralement

obtenue, mais d'une surface à l'autre, la mesure obtenue est variable. Par ailleurs, un taux de greffage important peut parfois être associé à une mouillabilité faible. Ces constats sont similaires à ceux obtenus pour le greffage du PMAc. De la même manière, l'une des hypothèses expliquant ce phénomène peut être attribuée à la structure moléculaire du monomère. Le cycle aromatique porté par le NaSS contribue à engendrer des gênes stériques en solution et entre les chaînes de polymère formées. Par ailleurs, une importante homopolymérisation en solution est générée, attestée par l'importante viscosité de la solution obtenue en fin de greffage. À titre indicatif et comparatif, les caractérisations des surfaces greffées par le PNaSS sont présentées en Annexe 3.

Le scan présenté Figure 80a a une allure assez proche de celle de la condition PAAc-pH. Les hautes rugosités atteignent 0,6 μm et sont réparties en amas sur la surface. Sur la Figure 80b, plus d'amas sont visibles sur une même zone. Enfin, la Figure 80c arbore plus d'irrégularités que les autres figures. En général, le PNaSS reste présent sur l'ensemble du matériau et de la même manière que pour le PAAc-pH, le greffage s'effectue principalement en surface du PDMS. Cependant, comme expliqué précédemment, plus d'irrégularités sont observées. Le polymère se greffe en surface, mais une alternance de chaînes longues et courtes plus ou moins espacées peut être obtenue. À noter que l'ensemble des scans obtenus correspondent à des surfaces sèches. Le polymère bioactif greffé peut alors apparaître replié et peut couvrir la surface par ses chaînes.

L'acquisition de ces différents scans ont permis d'accéder aux hauteurs moyennes arithmétiques (S_a) des surfaces (Figure 81). Les valeurs obtenues confirment les observations faites précédemment, à savoir que c'est le greffage du PAAc-pH qui génère le moins de rugosités en surface, avec une moyenne proche de celle obtenue pour une surface non greffée. C'est ensuite le greffage du NaSS qui crée le moins de rugosités et enfin les hauteurs moyennes arithmétiques obtenues pour les greffages du PMAc et PAAc sont beaucoup plus importantes, avec des écart-types élevés témoignant des irrégularités.

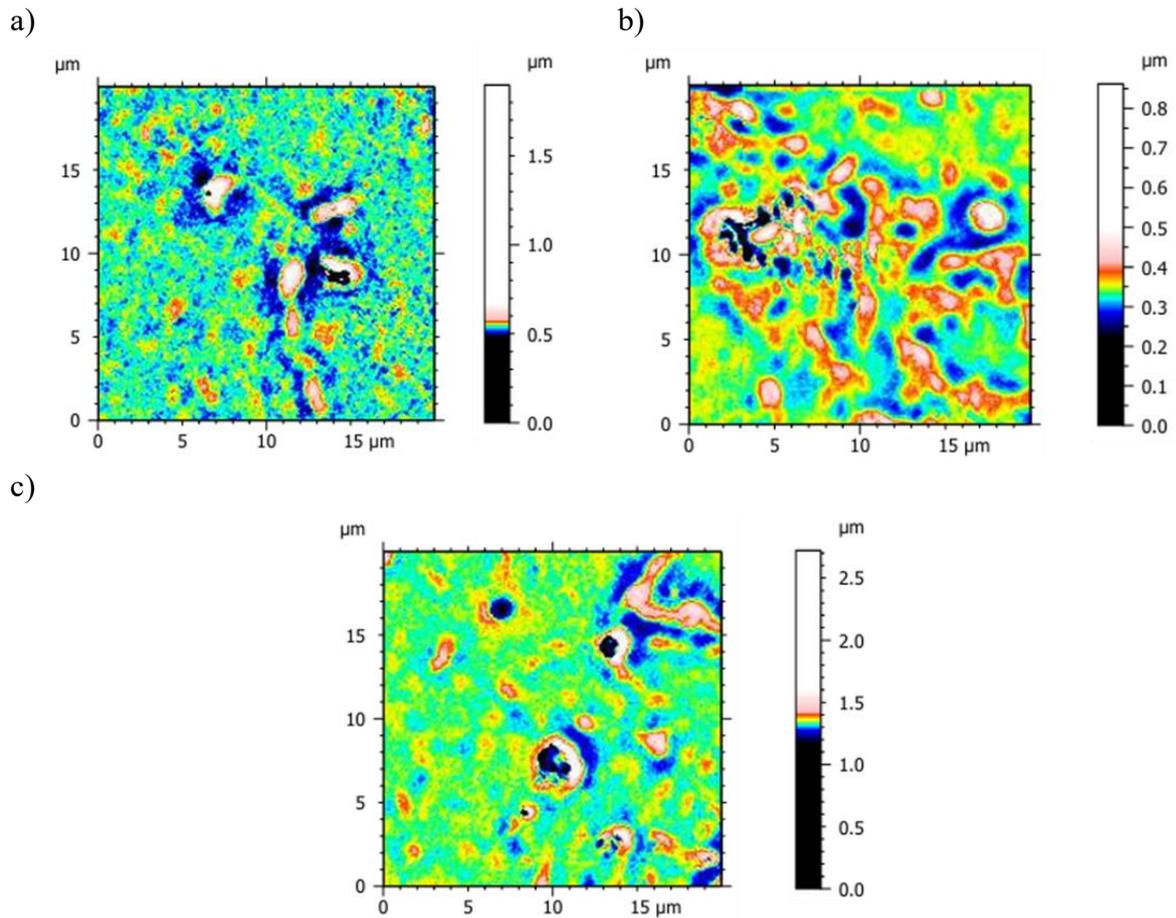


Figure 80 : Topographies de surfaces de PDMS greffées par le poly(NaSS)

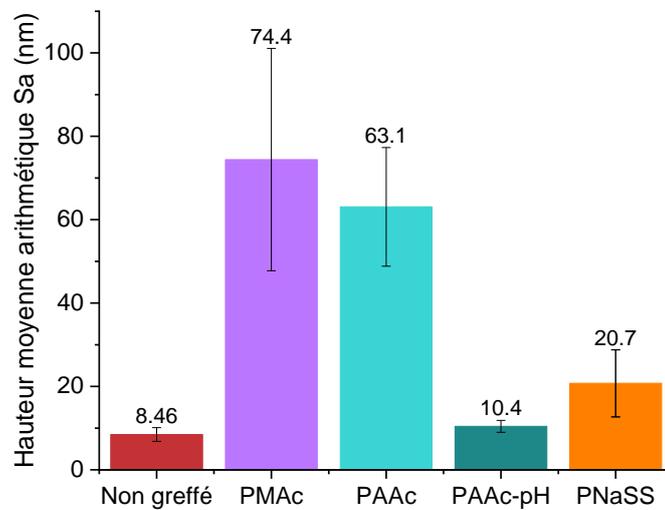


Figure 81 : Rugosités de surface / Hauteurs moyennes arithmétiques de PDMS non greffé et greffé

Finalement, l'analyse topographique de surface grâce au profilomètre optique représente un outil précieux pour mieux comprendre le comportement en surface une fois greffée. L'architecture du monomère est un paramètre influençant la qualité du greffage en surface par la méthode « grafting from ». Un monomère encombré peut générer plus d'interactions en solution et avec la surface. Cela limite sa pénétration dans le réseau PDMS, mais le greffage en surface peut être inhomogène. Les objectifs de fonctionnalisation de ce projet ambitionnent de limiter le plus possible la modification des propriétés mécaniques du matériau. Le PDMS doit conserver ses propriétés mécaniques initiales, avantageuses. Par ailleurs, la modification du matériau pourrait générer des effets indésirables lors de l'évaluation de la réponse biologique. Dans ce sens, la stratégie de greffage du PAAc avec ajustement du pH du milieu est donc la plus favorable. Les essais de traction suivants complètent l'étude.

4. Essais de traction

L'essai de traction est la dernière caractéristique évaluée avant de poursuivre avec l'étude de la réponse biologique. Il permet de juger si la fonctionnalisation du matériau engendre des modifications importantes des propriétés élastiques initiales du PDMS, non souhaitées ici. Les propriétés mécaniques sont des paramètres essentiels apparaissant dans les spécifications des dispositifs médicaux implantables. Elles incluent les propriétés intrinsèques du matériau et les contraintes mécaniques subies par l'action du milieu biologique environnant et les mouvements naturels de la vie. Le PDMS utilisé est un élastomère : il se caractérise par un faible module d'élasticité, signifiant qu'une faible contrainte conduit à une déformation importante. Les essais de traction réalisés ici permettent de comparer l'application d'une contrainte sur le PDMS greffé selon les 3 conditions retenues avec le PDMS non greffé.

Des essais de traction ont précédemment été réalisés sur des éprouvettes activées aux irradiations UV uniquement. Ils ont montré qu'elles n'induisaient pas de changement significatif des propriétés mécaniques en traction du matériau [95]. Ici, les essais sont réalisés sur des éprouvettes normées, où le greffage est effectué sur la zone centrale de travail (Figure 82). Les tests sont réalisés dans une cellule à 37 °C afin de se placer dans les conditions de températures du corps humain. Les essais de traction sont effectués suivant la norme ISO 37:2024 concernant les caoutchoucs vulcanisés et thermoplastiques. La Figure 82 met en évidence les courbes de contraintes/déformations obtenues pour les 3 conditions de greffage retenues et le silicone non greffé. La Figure 83 présente les modules d'Young correspondants. L'allure de la courbe contrainte déformation dans le cas du greffage PAAc-pH est similaire à la courbe de la condition non greffée, elles se superposent. Le module d'Young associé, égal à $1,71 \pm 0,54$ MPa contre $2,07 \pm 0,16$ MPa pour le PDMS non greffé confirme cette observation. Le comportement en contrainte du matériau greffé dans cette condition ne modifie pas de manière significative les propriétés mécaniques du matériau. Au contraire, les courbes correspondantes au greffage du PAAc et du PMAc s'éloignent de la condition contrôle. Dans le cas du greffage du PAAc, le module d'Young égal à $2,77 \pm 0,29$ MPa est supérieur au contrôle. Le module d'Young obtenu à partir des essais réalisés sur les éprouvettes greffées par le PMAc est égal à $2,13 \pm 0,82$ MPa. Il est en moyenne proche de la valeur contrôle, mais l'écart-type conséquent témoigne de la non-répétabilité de l'expérience.

Les essais mécaniques montrent une nouvelle fois ici que les propriétés du matériau sont considérablement endommagées lorsque le PAAc et le PMAc sont greffés de manière directe. Blanchemain *et al.* ont fonctionnalisé du PET par le PAAc en utilisant du plasma froid. Les essais mécaniques réalisés au cours de leur étude ont montré une augmentation de 10 % de la déformation et de la contrainte à la rupture. De manière analogue à cette étude, le polymère a amplement réagi avec la surface. Les auteurs ont observé que le PAAc avait recouvert le PET et comblé les interstices formés par les fibres, modifiant le matériau [107].

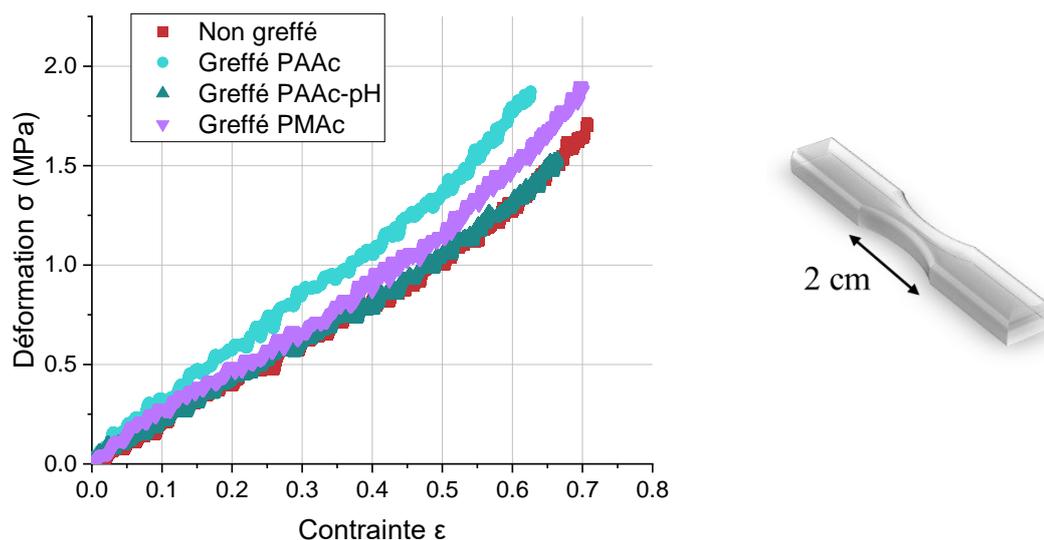


Figure 82 : Courbe contrainte/déformation correspondantes aux essais de tractions effectués sur des échantillons de PDMS greffés dans différentes conditions

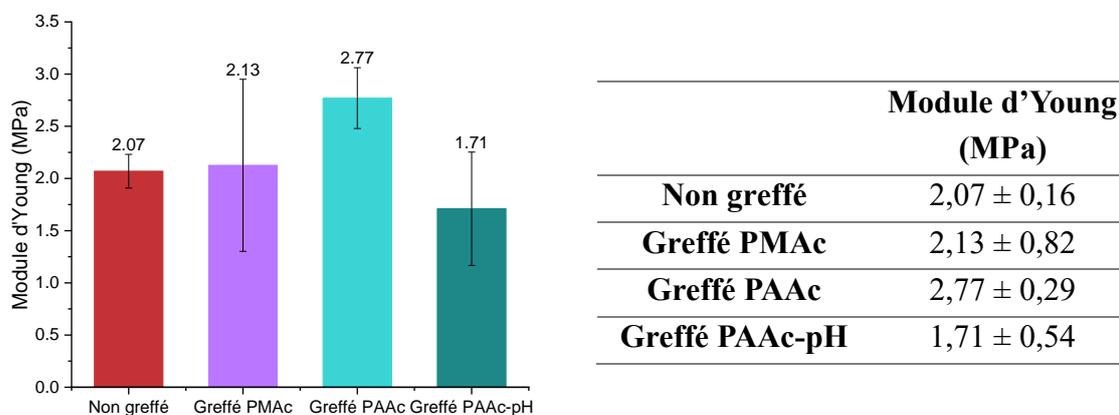


Figure 83 : Modules d'Young associés aux essais de traction du PDMS pour différents greffages de surface

Les résultats les plus satisfaisants sont donc obtenus dans le cas du greffage du PAAc-pH. Les caractérisations mécaniques ont complété les analyses topographiques réalisées et permettent de conclure qu'il n'y a pas de modification significative des propriétés du matériau lorsqu'il est soumis à une contrainte mécanique. Cette propriété était souhaitée, seule la surface est vouée à être modifiée afin de conserver les propriétés initiales du matériau et éviter des complications potentielles liées à sa modification intrinsèque.

5. Cinétique de greffage

Afin d'optimiser la méthode de greffage du PAAc-pH, une étude cinétique de l'étape de polymérisation a été effectuée. Ces travaux se sont inscrits dans le cadre du stage de M1 d'Elsa De Pinho. L'étape d'activation a été conservée et différents temps ont été testés pour l'étape de polymérisation : 15 min, 30 min, 45 min, 60 min et 90 min. Jusqu'à présent, cette étape était fixée à 60 min. L'étude permet d'examiner si des changements significatifs sont observés lorsque le temps de polymérisation est allongé.

Pour chacune des conditions, les méthodes de caractérisation appliquées mettent en évidence la présence du polymère en surface, néanmoins des différences sont observées. Les spectres FTIR obtenus pour chacune des conditions (Figure 84) mettent en évidence la présence des liaisons caractéristiques de l'acide acrylique : une bande large entre 2500 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} attribuée à la liaison -OH et la bande à 1709 cm^{-1} correspondant à la liaison C=O. Toutefois, plus le temps de greffage est long, plus l'intensité des bandes est forte. La densité de groupements présents peut augmenter avec le temps de polymérisation.

La mesure d'angle de contact (Figure 85) montre que la mouillabilité augmente avec le temps de polymérisation. 15 minutes de greffage ne suffisent pas à rendre la surface suffisamment hydrophile, une moyenne d'aWCA de $99,2^\circ$ est obtenue. Lorsque 30 min de greffage sont appliquées, la mouillabilité augmente avec un aWCA de $75,2^\circ$, mais l'incertitude importante révèle que la reproductibilité du greffage n'est pas satisfaisante. Les greffages de 45 min augmentent légèrement la mouillabilité en comparaison aux 30 min et l'écart-type est réduit. Un gain de 9° est obtenu lorsque le temps est encore augmenté à 60 min, mais après 90 min de greffage, peu de différence est observée.

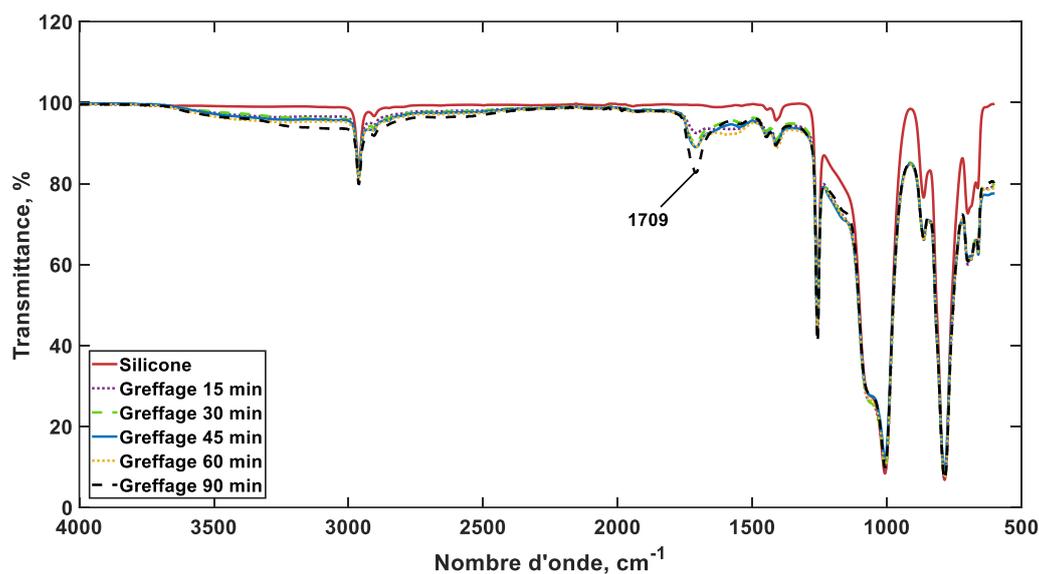


Figure 84 : Spectres FTIR du greffage du PAAc-pH en surface du PDMS après différents temps de polymérisation

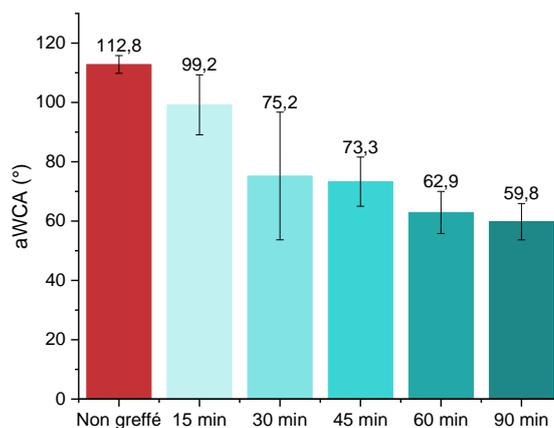


Figure 85 : aWCA en surface de PDMS greffée par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation

Les taux de greffage obtenus (Figure 86) confirment que 15 minutes d'expérience laissent peu de temps aux monomères en solution pour suffisamment polymériser en surface. 30 min de greffage permettent d'obtenir un taux plus important de $4,08 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ en moyenne. Mais une nouvelle fois, l'important écart-type témoigne de l'insuffisante répétabilité de l'expérience. A partir de 45 min de greffage, les taux obtenus sont importants et le greffage est donc considéré comme efficace pour poursuivre les caractérisations. Le taux obtenu pour

60 minutes de greffage est du même ordre que pour 45 minutes. 90 minutes de greffage permettent d'obtenir un taux de groupements en surface encore plus important égal à $1,90 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻². Cependant, comme le montre l'image acquise au MEB Figure 87F, l'état de surface du PDMS est impacté. Un nombre important de crêtes et fissures est observé. Un temps de polymérisation trop long laisse le temps aux molécules de pénétrer le PDMS. L'absence totale de fissures est constatée pour 15 minutes et 30 minutes de greffage (Figure 87B et C). Néanmoins, à partir de 30 minutes la surface apparaît déjà plus rugueuse. Les essais de traction ont précédemment montré qu'après 1h de greffage, la surface ne subissait pas de changement significatif du comportement élastique du matériau. Ainsi, les défauts observés pour 45 et 60 minutes sont acceptables pour poursuivre l'étude.

L'ensemble des caractérisations mettent en évidence qu'au moins 45 minutes de polymérisation en solution sous l'action des UV sont nécessaires pour greffer convenablement les surfaces de PDMS. Au-delà d'une heure de polymérisation, le matériau est de nouveau trop endommagé, le monomère a le temps de réagir au sein même du PDMS. Finalement, les 60 minutes d'étape de polymérisation sont maintenues dans le protocole pour la suite de l'étude.

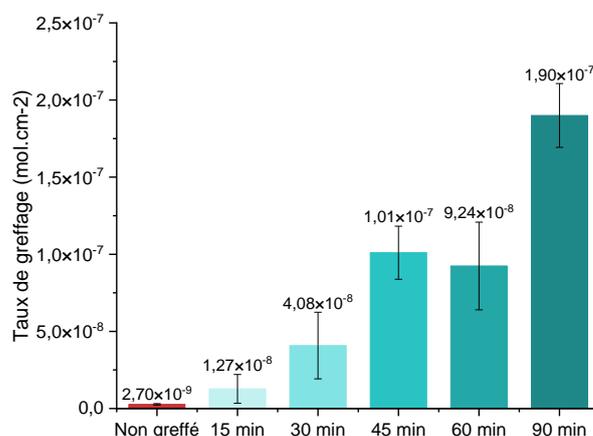


Figure 86 : Taux de greffages en surface de PDMS greffée par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation

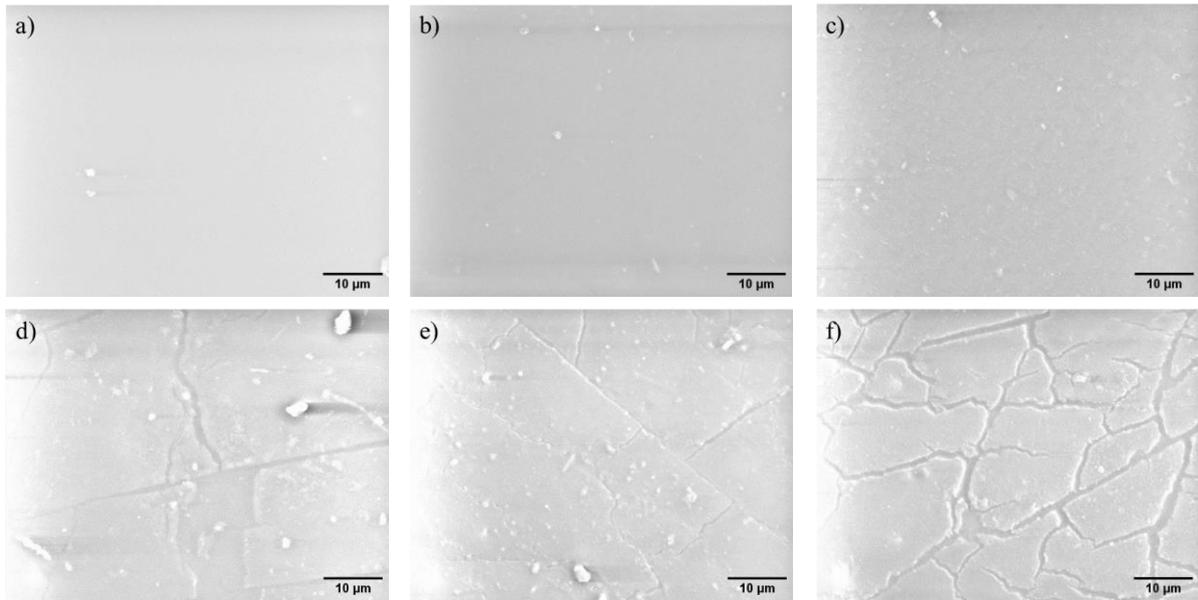


Figure 87 : Images MEB des surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH après différents temps de polymérisation : a) non greffée, b) 15 min, c) 30 min, d) 45 min, e) 60 min et f) 90 min

6. Conclusion partielle

La première partie de ce chapitre s'est consacrée à la mise en place d'une stratégie de greffage de composés porteurs de groupements carboxylate en surface du PDMS. Le greffage de l'AAc en solution sous irradiations UV en 2 étapes : activation et polymérisation de surface, s'est montrée prometteuse.

Lors de l'étape de polymérisation, la modification du pH de la solution à $\text{pH} = \text{pKa}(\text{AAc}) + 1$ a permis de limiter la pénétration du monomère dans le matériau. Avec ce protocole la mouillabilité de surface augmente, le taux de polymère greffé est important, l'AAc est présent de manière homogène sur la surface et la technique de greffage est répétable.

Les analyses topographiques ont permis d'interpréter le comportement du polymère en surface. Celui-ci modifie la surface du PDMS : des amas sont présents en surface et à fort grossissement au MEB, de légères fissures sont observables. Néanmoins, les essais de tractions ont validé l'utilisation de cette stratégie de greffage car elle ne modifie pas de manière significative les propriétés élastiques du PDMS. Ainsi, cette condition seule est retenue pour réaliser les essais biologiques.

À l'avenir, des essais mécaniques doivent être menés afin d'évaluer l'état de dégradation du matériau dans le temps après fonctionnalisation. Enfin, l'étude cinétique a montré qu'une réduction du temps de polymérisation à 30 minutes limitait la présence de défauts en surface. Néanmoins, le taux de polymère greffé était réduit. Des analyses biologiques complémentaires pourraient déterminer si à ce taux plus faible de polymère greffé, une réponse biologique suffisante est obtenue.

Chapitre 4 – Analyses biologiques et microbiologiques des surfaces de PDMS greffées par le PAAc

Ce quatrième chapitre se concentre sur les premières réponses biologiques obtenues après fonctionnalisation des surfaces de PDMS. Les surfaces ont, pour cela, été mises au contact de fibroblastes et de trois protéines majoritairement présentes dans l'organisme ou intervenant dans les mécanismes d'adhésion des cellules et des bactéries : l'albumine, la fibronectine et le fibrinogène. Des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés, la morphologie des cellules incubées avec les surfaces a été observée et leur prolifération a été mesurée. Des méthodes de caractérisation simples telles que la spectroscopie FTIR et la mesure d'angle de contact ont été employées afin d'effectuer de premières investigations sur les mécanismes intervenant en surface, notamment via l'adhésion des protéines. L'exploitation des bandes caractéristiques attribuées aux protéines adhérees en surface a permis d'accéder aux informations liées à leur organisation et de mettre en évidence le rôle de la fonctionnalisation sur les changements. Un dosage colorimétrique a été établi afin d'accéder à la quantité de protéines adsorbées. Les interactions entre le collagène et les surfaces fonctionnalisées en présence de cellules ont également été observées. Elles permettent d'établir de premières hypothèses sur l'influence du greffage vis-à-vis de la protéine dans le but d'établir des perspectives d'étude d'immobilisation de composés en surface. Enfin, des essais microbiologiques en présence de *S. epidermidis* ont permis d'analyser l'influence de la fonctionnalisation sur l'adsorption de bactéries.

L'ensemble de ces analyses permet d'établir un premier bilan concernant l'influence de la fonctionnalisation du PDMS par le PAAc-pH sur l'environnement biologique et d'approcher les mécanismes mis en jeu à l'interface entre le matériau et le milieu biologique. Ces analyses ont par ailleurs été comparées à la fonctionnalisation du PDMS par le PNaSS afin de souligner leurs propriétés et particularités.

1. Premières réponses biologiques en surface de PDMS greffé par le PAAc-pH

1.1. Viabilité cellulaire

Le premier axe de cette partie se concentre sur la non-toxicité du greffage. Les articles de la littérature font état du caractère biocompatible du PAAc [25,97] et de son utilisation répandue pour des applications biomédicales [18,31,74,107]. Néanmoins, cet aspect doit être vérifié avec nos conditions expérimentales, d'autant que le polymère bioactif peut conférer des propriétés antiadhésives vis-à-vis de composés biologiques [31]. Le test MTT est un bon indicateur de la viabilité des cellules et par conséquent de la cytotoxicité des surfaces. Les enveloppes d'implants mammaires utilisées comme échantillon dans cette étude sont déjà considérées comme biocompatibles. Les propriétés antiadhésives conférées par le PAAc ne doivent donc pas affecter la biocompatibilité initiale du matériau. Au laboratoire, les tests MTT sont généralement dédiés à la mise en évidence de l'amélioration de la biocompatibilité des implants. Ce phénomène est mis en évidence par l'augmentation du pourcentage de viabilité cellulaire sur les surfaces fonctionnalisées après 24 heures. Ce constat est généralement justifié par la présence du polyNaSS en surface, favorisant la prolifération des fibroblastes [95] ou des ostéoblastes [131]. Pour ce projet, le protocole a été adapté à une fonctionnalisation antiadhésive. La Figure 42 illustre schématiquement l'expérience. Des échantillons de PDMS non greffés et greffés par le PAAc-pH de diamètre $\varnothing = 10$ mm sont placés dans des puits de diamètre plus important ($\varnothing = 19$ mm). Ainsi, les cellules n'adhérant pas en surface peuvent adhérer à la partie du puits non couverte par l'échantillon, évitant leur anoïkose (mort cellulaire). Si la surface induit la mort des cellules, elles n'adhèrent pas au fond du puits et ne peuvent pas être complexées par la solution MTT.

Les résultats Figure 88a montrent qu'après application du protocole, le pourcentage de viabilité cellulaire après 24 heures est similaire entre une surface non greffée et greffée par le PAAc-pH. Ces taux équivalents montrent que les cellules n'ayant pas adhéré au PDMS greffé ont vraisemblablement adhéré au fond des plaques de culture. Ce phénomène est observable à l'œil nu comme le montre la Figure 88b. Les cellules déposées sur les surfaces de PDMS non greffées ont quant à elles adhéré sur la surface et au fond du puits. Ce test valide donc l'utilisation du protocole de greffage du PAAc-pH pour poursuivre les investigations associées aux réponses biologiques et microbiologiques.

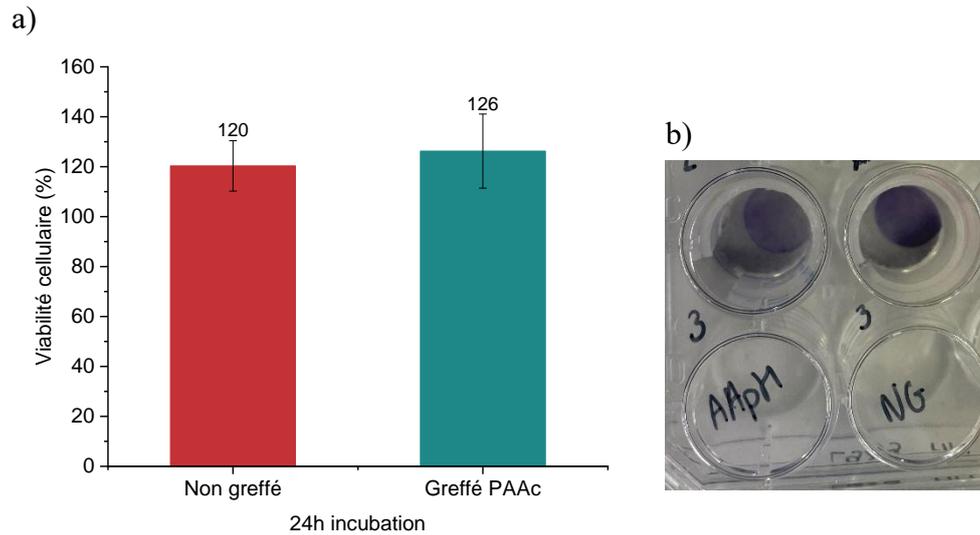


Figure 88 : a) Taux de viabilité cellulaire en surface de PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH. b) Photographie de l'expérience MTT réalisée sur la surface de PDMS fonctionnalisée à gauche et non greffé à droite

1.2. Morphologie et prolifération des cellules

Afin de mettre en évidence l'influence de la fonctionnalisation des surfaces de PDMS par le PAAc-pH sur les cellules, des tests de morphologie et de prolifération cellulaire ont été mis en place. Après 24 heures, 3 jours et 7 jours, la morphologie et le comportement des cellules ont été observés au microscope optique après coloration selon le protocole décrit dans le Chapitre 2. Sur la Figure 89 sont présentées les images des surfaces de PDMS fonctionnalisées, capturées après chaque temps à deux grossissements différents (10x et 40x).

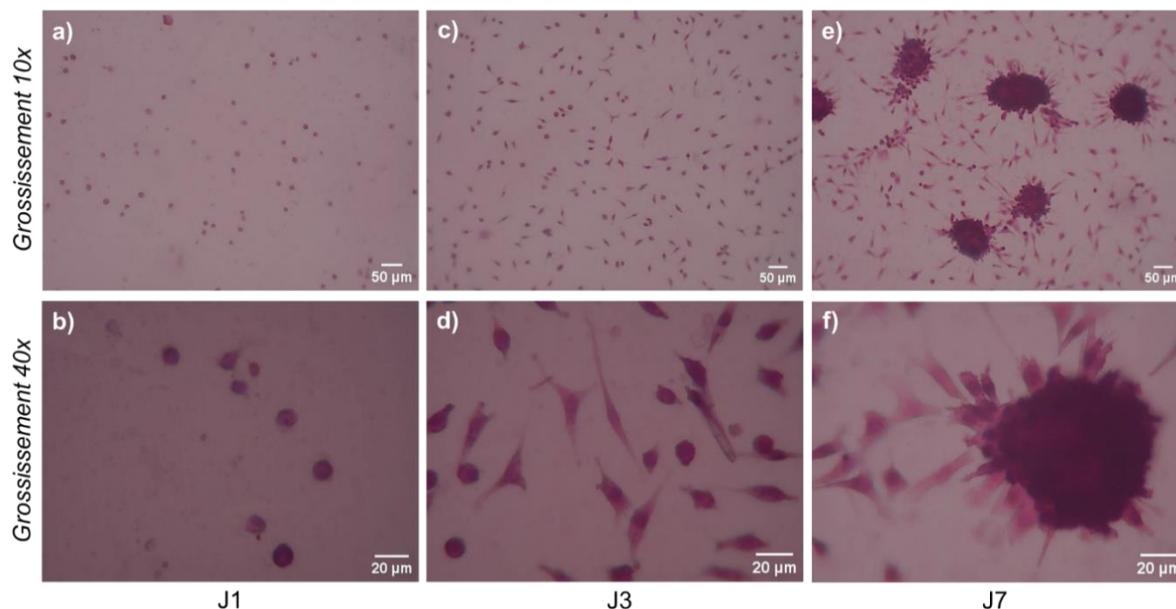


Figure 89 : Images au microscope optique de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH et incubées avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x

Après 24 heures, seule une petite quantité de cellules adhère au PDMS greffé (Figure 89a). Sur la Figure 90, les mêmes images ont été prises cette fois sur des surfaces non greffées pour réaliser la comparaison. Après 24 heures, plus de cellules ont adhéré à la surface en comparaison au PDMS greffé (Figure 90a). De plus, certaines cellules s'étalent (Figure 90b), ce qui est représentatif de leur forme active et compatible avec la surface [136]. Tandis que pour la surface greffée, le peu de cellules ayant adhéré exhibent une forme arrondie (Figure 89b). À partir du troisième jour, la surface de PDMS greffée (Figure 89c) a la même tendance qu'une surface non-greffée après 24 heures (Figure 90a). Les cellules occupent un peu plus la surface et commencent à prendre une forme étalée, mais d'autres ont toujours une forme arrondie (Figure 89d). Sur les surfaces non greffées, la prolifération des cellules est plus importante (Figure 90c et d). Les cellules couvrent beaucoup plus la surface et arborent toutes une forme allongée et beaucoup plus étirée qu'après 24 heures. Enfin, les images après 7 jours d'incubation montrent que pour le PDMS non greffé, les cellules ont entièrement recouvert la surface, formant un réseau (Figure 90e et f). Pour le PDMS greffé par le PAAc-pH, la surface n'est pas totalement couverte. Les cellules éparpillées semblent couvrir la surface de la même manière qu'une surface non greffée après 3 jours, et en plus, des agglomérats de cellules sont constatés sur certaines zones (Figure 89e et f). Les fibroblastes vont même jusqu'à se superposer, formant un amas.

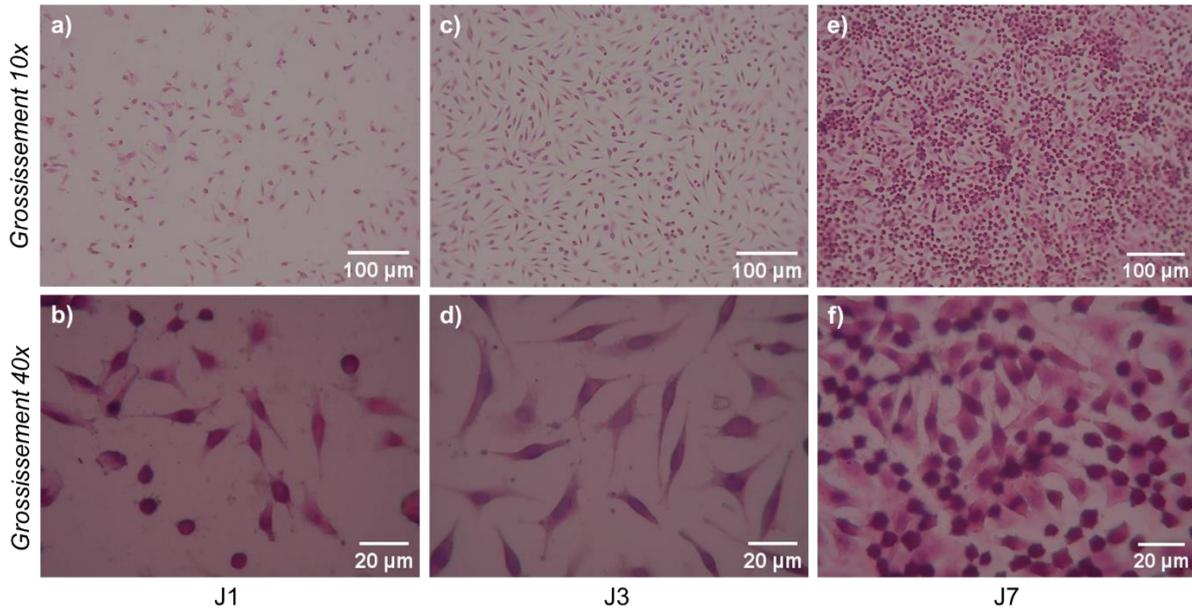


Figure 90 : Images au microscope optique de surfaces de PDMS non greffées et incubées avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x

Ainsi, le greffage du PAAc-pH sur les surfaces de PDMS a un effet significatif sur l'adhésion et la prolifération des fibroblastes. La colonisation de la surface par les cellules est considérablement ralentie. Les forces électrostatiques, stériques et les forces de Van der Waals constituent les interactions initiales entre les récepteurs des cellules et la surface [42]. Le contrôle de leur adhésion peut donc être perturbé si ces propriétés de surface sont modifiées.

L'allure de la surface après 3 jours d'incubation est similaire à l'évolution en surface du PDMS après 24 heures d'incubation. Aussi, après 7 jours d'incubation, des amas de cellules se forment sur certaines zones réparties aléatoirement sur la surface fonctionnalisée. Il est probable que les cellules ayant réussi à adhérer sur certaines régions de la surface continuent de proliférer de manière verticale. Ces régions pourraient correspondre à des zones plus « vides » en composés PAAc-pH greffés. Dans le chapitre précédent, les scans de topographie de surface réalisés au profilomètre optique ont révélé que le greffage du PAAc-pH sur les surfaces de PDMS apparaissait homogène (Figure 79). Cependant, les mesures ont été effectuées en conditions sèches. Les chaînes de polymère semblaient former des amas, laissant supposer que la surface pouvait être greffée de longues chaînes recroquevillées sur elles-mêmes. Les images au MEB du PDMS greffé sans ajustement du pH mettaient clairement en évidence la présence d'amas massifs de polymères regroupés (Figure 78). Toutefois, mêmes si certaines régions sont occupées par les cellules, la tendance générale montre que les surfaces greffées perturbent le mécanisme habituel d'adhésion et de prolifération des fibroblastes.

Afin de confirmer les observations et vérifier que le développement vertical des cellules après 7 jours d'incubation ne compense pas leur diffusion sur la surface, un test MTT dans le temps a été réalisé. Comme pour les observations au microscope, les tests MTT sont réalisés après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation. Cette fois, les essais ont été réalisés de manière à considérer la surface uniquement, sans les cellules ayant adhéré au puits TCP. Le taux est calculé en considérant un puits vide comme référence, où les cellules ont été déposées et incubées en même temps que les surfaces. La viabilité des cellules est ainsi exprimée selon l'équation (5). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 91. Pour les surfaces de PDMS non greffées, le pourcentage de viabilité cellulaire évolue faiblement mais toujours de manière croissante par rapport au puits contrôle. Pour le PDMS greffé, le pourcentage est faible après 24 heures en comparaison aux surfaces nues, atteignant 43,9 %. Le résultat reflète la faible quantité de cellules adhérentes, comme observé sur la Figure 89a et b. Après 3 jours, le taux est encore plus bas, dû à la faible prolifération en surface provoquée par le faible nombre de cellules adhérentes initialement en comparaison à la surface contrôle. Sur ces dernières, les cellules prolifèrent toujours plus. Un parallèle peut être fait avec la Figure 89d où l'évolution paraît similaire avec une surface non greffée après 24 heures (Figure 90b). Enfin, le pourcentage réaugmente après 7 jours d'incubation. Cet effet peut être expliqué par la prolifération réenclenchée par les cellules qui ont adhéré et qui croissent de manière verticale (Figure 89f).

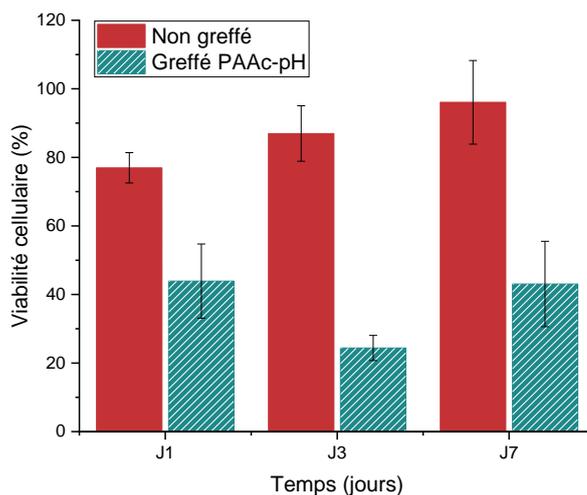


Figure 91 : Étude de la prolifération des fibroblastes en surface de PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation

Malgré la croissance persistante des cellules sur certaines régions de l'échantillon, la tendance montre une différence significative de leur nombre ayant adhéré. Les taux obtenus soulignent le ralentissement conséquent de la prolifération des fibroblastes dans le temps. Ce phénomène peut être induit par la quantité importante de groupements COO^- en surface

induisant une densité de charge importante. La surface de PDMS ainsi chargée peut générer plus d'interactions répulsives [81]. Dans la littérature, la présence de groupements acide carboxylique sur des surfaces a déjà montré le ralentissement de la prolifération de certaines cellules. L'étude réalisée par Blanchemain *et al.* a montré le ralentissement de la prolifération de cellules endothéliales microvasculaires et de cellules musculaires de l'artère pulmonaire humaine sur des surfaces de poly(éthylène téréphtalate) fonctionnalisées par le PAAc [107]. Une sélectivité vis-à-vis de ces cellules a même été mise en évidence. Ce résultat est intéressant car il montre qu'une fonctionnalisation particulière peut permettre la prolifération sélective de certaines cellules par rapport à d'autres, favorisant certains mécanismes biologiques. Dans l'étude de Blanchemain *et al.*, ce phénomène permet d'établir une première couche de cellules endothéliales sans que les cellules musculaires n'interfèrent [107]. Notre étude devrait alors être étendue à d'autres catégories de cellules. On peut en effet imaginer utiliser le silicone fonctionnalisé comme dispositif barrière permettant la croissance préférentielle d'une catégorie de cellules à défaut d'une autre.

En raison de la faible quantité de fibroblastes adhérents dans les premiers instants, la tendance au ralentissement de la prolifération des fibroblastes en surface du PDMS greffé par le PAAc-pH est vérifiée. Un dépôt contrôlé du polymère en surface pourrait donner davantage d'indices sur l'action optimale du polymère à l'égard des fibroblastes. Lee *et al.* ont travaillé sur ce point en créant différentes microstructures de PAAc en surface du PDMS : une couche pleine, une couche trouée et des rayures de polymères (Figure 92a). Ces microstructures de surface ont été élaborées grâce à une technique de photolithographie. Les résultats montrent que c'est le dépôt en rayures qui entraîne la meilleure action dans le temps contre la formation d'une capsule fibreuse autour de l'implant (Figure 92b). Cet effet est également mis en évidence par la réduction de la densité de collagène en surface (Figure 92c) [31]. Ainsi, intégrer des microstructures particulières peut davantage contribuer à comprendre les interactions de surface. Néanmoins, les autres configurations mettent également en évidence l'efficacité de la présence des groupements COO^- à l'égard de l'antiadhésion des fibroblastes. Après 5 jours, l'effet antiadhésif est équivalent peu importe la microstructure.

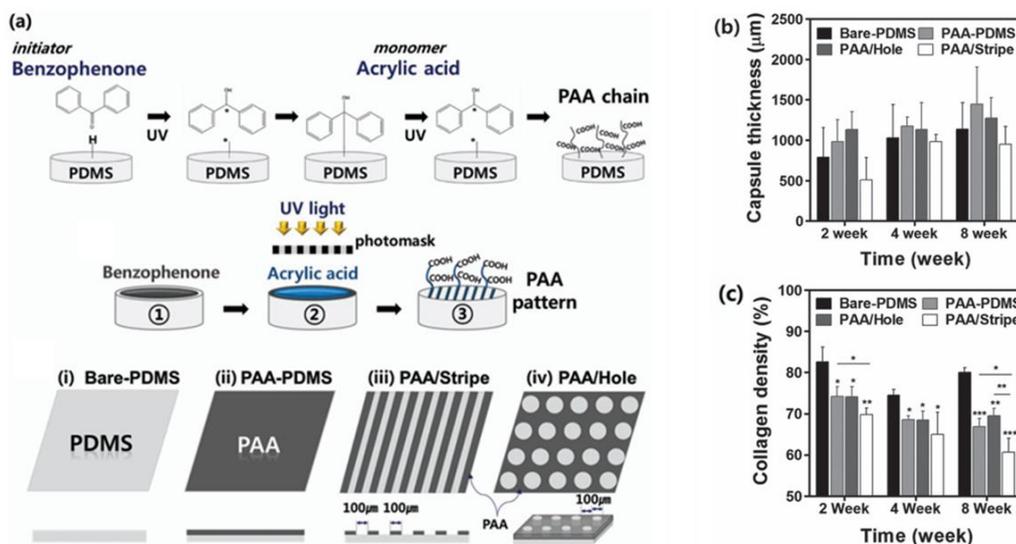


Figure 92 : (a) Schéma descriptif de la préparation de surfaces de PDMS greffées de différentes structures de PAAc par photolithographie; (b) Épaisseur de la capsule fibreuse formée autour des implants de PDMS et (c) densité de collagène présente dans la capsule [31]

Ces résultats et observations, ainsi que les résultats issus de la littérature ont encouragé à orienter l'étude sur le mécanisme intervenant dans l'adhésion des cellules, notamment à l'adhésion des protéines. Arima *et al.* ont mis en évidence dans leur étude que les propriétés de surface contribuent principalement aux interactions avec les protéines et peu avec les cellules. C'est la conformation adoptée par les protéines en surface qui influence l'adhésion des cellules. Aussi, les forces d'adhésion de surface entrent en jeu. Lorsqu'une cellule adhère à la matrice extracellulaire grâce à ses intégrines, elles exercent des forces de traction. Si la force de traction de la cellule est supérieure à la force d'adhésion de la protéine, celle-ci ne pourra pas s'y ancrer et sera libérée de la surface [42].

Ainsi, que ce soit pour de l'antiadhésion ou pour améliorer l'intégration d'un implant, des études additionnelles sont nécessaires pour approcher les mécanismes précis d'action des groupements de surface à l'égard des composés biologiques. *In fine*, les résultats permettent d'exploiter le plein potentiel de ces stratégies de fonctionnalisation.

2. Adsorption de protéines et rôle dans les mécanismes de surfaces

L'adsorption des protéines est le processus se produisant instantanément dès l'implantation d'un biomatériau [20]. Cette étape fait partie d'un mécanisme global plus complexe de la FBR mais en constitue son point de départ. Les protéines, une fois adsorbées, vont servir de guide à l'adhésion d'autres composés biologiques et aux réactions qui se produiront à l'interface. L'adhésion des bactéries en fait partie. Maîtriser ou approcher la compréhension du mécanisme peut donc aider à moduler ces réponses.

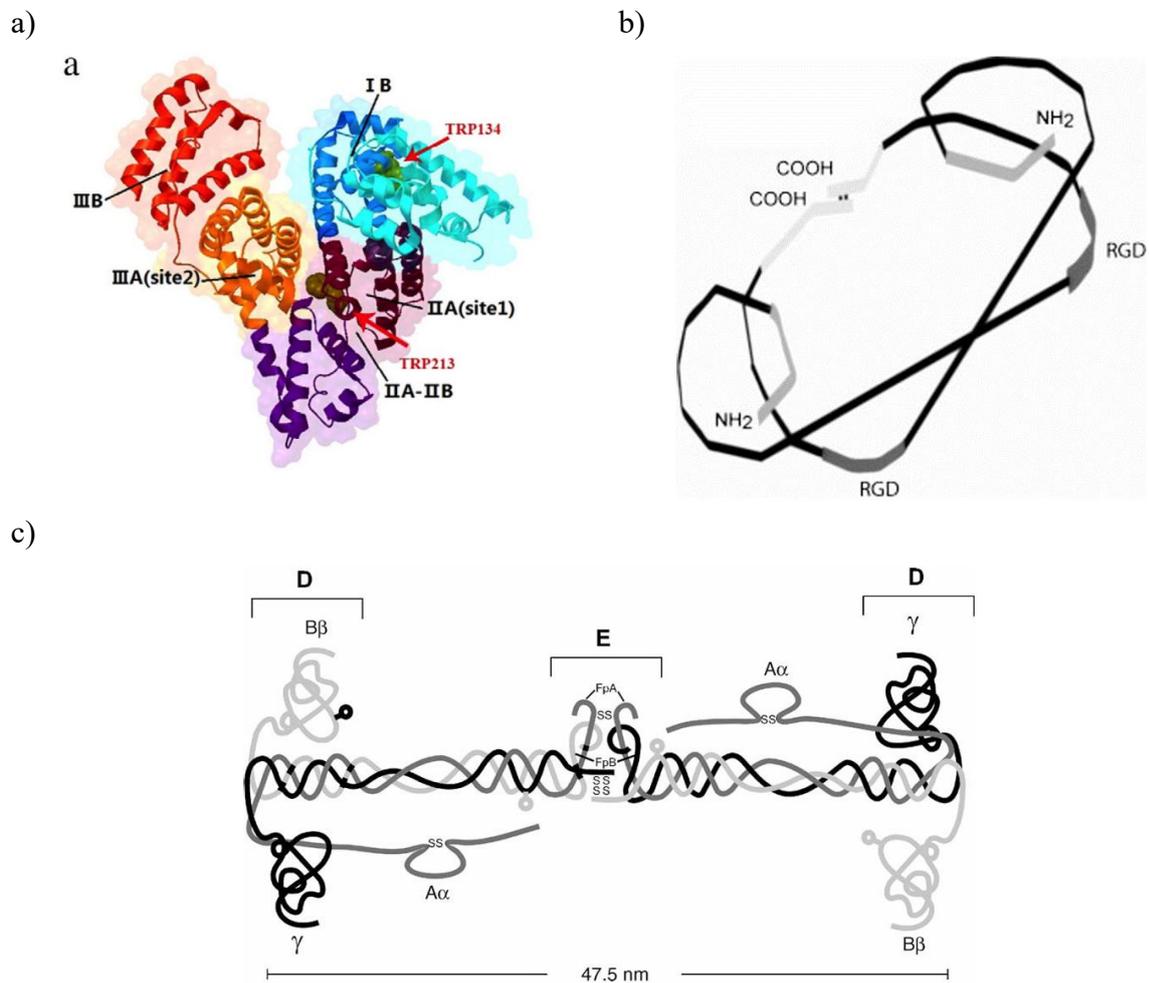
2.1. Choix des protéines et adsorption

Trois protéines ont été choisies pour réaliser cette étude :

- L'albumine de sérum bovin (BSA) : l'albumine est présente en majorité dans la matrice extracellulaire et est la protéine majoritaire du plasma sanguin ($35\text{-}50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) [42]. Elle en devient une protéine de référence dans la littérature pour étudier les nombreux phénomènes réactionnels [34,124]. Elle possède un poids moléculaire d'environ 66 kDa et est composée de 583 acides aminés. Sa structure est composée de trois domaines principaux homologues, d'assemblages semblables à la forme d'un cœur (Figure 93a) [137]. L'albumine intervient également dans le blocage de régions d'adsorption non spécifiques de protéines [34] et peut ainsi être adsorbée sur les surfaces en plus grande quantité que d'autres protéines.
- La fibronectine (Fn) est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, environ 440 kDa, constituée de deux sous-unités identiques (Figure 93b) [138–140]. Elle est étudiée pour son ubiquité au sein de la matrice extracellulaire et pour son rôle dans la reconnaissance spécifique des membranes réceptrices des cellules permettant leur adhésion aux matériaux. Ces protéines sont biosynthétisées par certaines cellules dont les fibroblastes [96,139].
- Le fibrinogène (Fg) est une protéine dimérique de 340 kDa. Sur la Figure 93c la protéine est représentée par deux ensembles de trois différentes chaînes polypeptidiques reliées par des liaisons disulfures ($A\alpha$, $B\beta$ et γ). Elle est présente en majorité dans le plasma sanguin et est impliquée dans les mécanismes de coagulation et de l'inflammation [35]. Lorsque le sang entre en contact avec les matériaux, les protéines y sont adsorbées en premier. Le fibrinogène en fait partie et est considéré comme l'une des plus importantes en raison de sa capacité à se lier aux récepteurs des plaquettes [10].

Par ailleurs, il a été prouvé que ces deux dernières protéines sont impliquées dans l'adhésion de bactéries à la surface des matériaux. En effet, lors d'essais réalisés sur des surfaces de titane en présence de Fg et de Fn, Vasconcelos *et al.* ont montré que la bactérie *S. epidermidis*

adhérait préférentiellement sur les titanes recouverts de Fg [92]. Tang *et al.* ont également montré que le *S. epidermidis* adhère préférentiellement sur des surfaces de silicone où le Fg était immobilisé [124]. De la même manière, Chourifa *et al.* mettent en évidence que les bactéries *S. aureus* adhèrent préférentiellement sur des surfaces de titane où la Fn est préalablement adsorbée [94].



Les premières caractérisations de l'adhésion de ces trois protéines remarquables sur les surfaces de PDMS fonctionnalisées permettent d'approcher la compréhension de leur comportement en surface. Des hypothèses sur les possibles interactions physico-chimiques ayant lieu pourront être émises. Aussi, ces expériences souligneront les potentielles différences de comportement entre chacune des protéines en raison de leurs structures initiales différentes et leurs différents poids moléculaires.

2.2. Interactions entre la surface de PDMS fonctionnalisée et les protéines

Dans cette partie, les méthodes de caractérisation de surface utilisées précédemment vont permettre d'obtenir des indices quant à la compréhension du mécanisme d'adhésion des protéines. L'objectif ici est de comprendre comment la fonctionnalisation du PDMS par le PAAc-pH induit des changements physico-chimiques de surface impactant la conformation et l'orientation des protéines. La composition chimique, les charges de surface, la rugosité, le pH en surface ou encore la mouillabilité sont autant de paramètres pouvant influencer leur adhésion [38,96,141–143].

2.2.1. Caractérisations simples : aWCA et spectroscopie FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier représente un moyen de caractérisation efficace pour mettre en évidence la présence des protéines en surface après adsorption. La Figure 94 présente les spectres FTIR du PDMS non greffé et greffé par le PAAc-pH adsorbés de chacune des protéines. Les concentrations de BSA et de fibronectine en solution ont été déterminées en se basant sur les travaux du Dr. Felgueiras réalisés au laboratoire CB3S [33]. L'adsorption de fibrinogène a été réalisée à une concentration en solution établie en se basant sur les travaux de Sivaraman *et al.*, de manière à couvrir suffisamment la surface de protéines sans générer de multicouches [39].

En plus des bandes caractéristiques du PDMS et du greffage du PAAc-pH observées précédemment (Chapitre 3), de nouvelles bandes traduisant la présence des protéines apparaissent. On remarque une bande large entre 3020 cm^{-1} et 3725 cm^{-1} attribuée à la bande dite amide A, une bande autour de 1650 cm^{-1} correspondant à la vibration amide I et une bande autour de 1150 cm^{-1} correspondant à la vibration de la bande amide II [127]. Ces bandes sont caractéristiques du squelette protéique et sont liées aux vibrations d'élongation des liaisons peptidiques N-H, C=O et C-N respectivement [126,127,143], ainsi qu'à la flexion de la liaison N-H pour la bande amide II [127,143]. Pour les trois protéines adsorbées, l'intensité des bandes caractéristiques est plus importante sur les spectres du PDMS greffé que sur ceux du PDMS non greffé. Par ailleurs, la bande amide I est plus intense que la bande amide II pour le PDMS non greffé. Sur le PDMS fonctionnalisé, le comportement contraire est observé. C'est le changement d'environnement moléculaire autour des liaisons amide I et amide II qui peut contribuer à influencer voire renforcer leur intensité. Cela inclue par exemple les liaisons hydrogène et autres interactions faibles, ou encore la présence de certains groupements fonctionnels capables d'interagir avec ces liaisons [34,79,96]. Mais d'après Roach *et al.*, la bande amide II est moins sensible aux changements de conformation que la bande amide I [143].

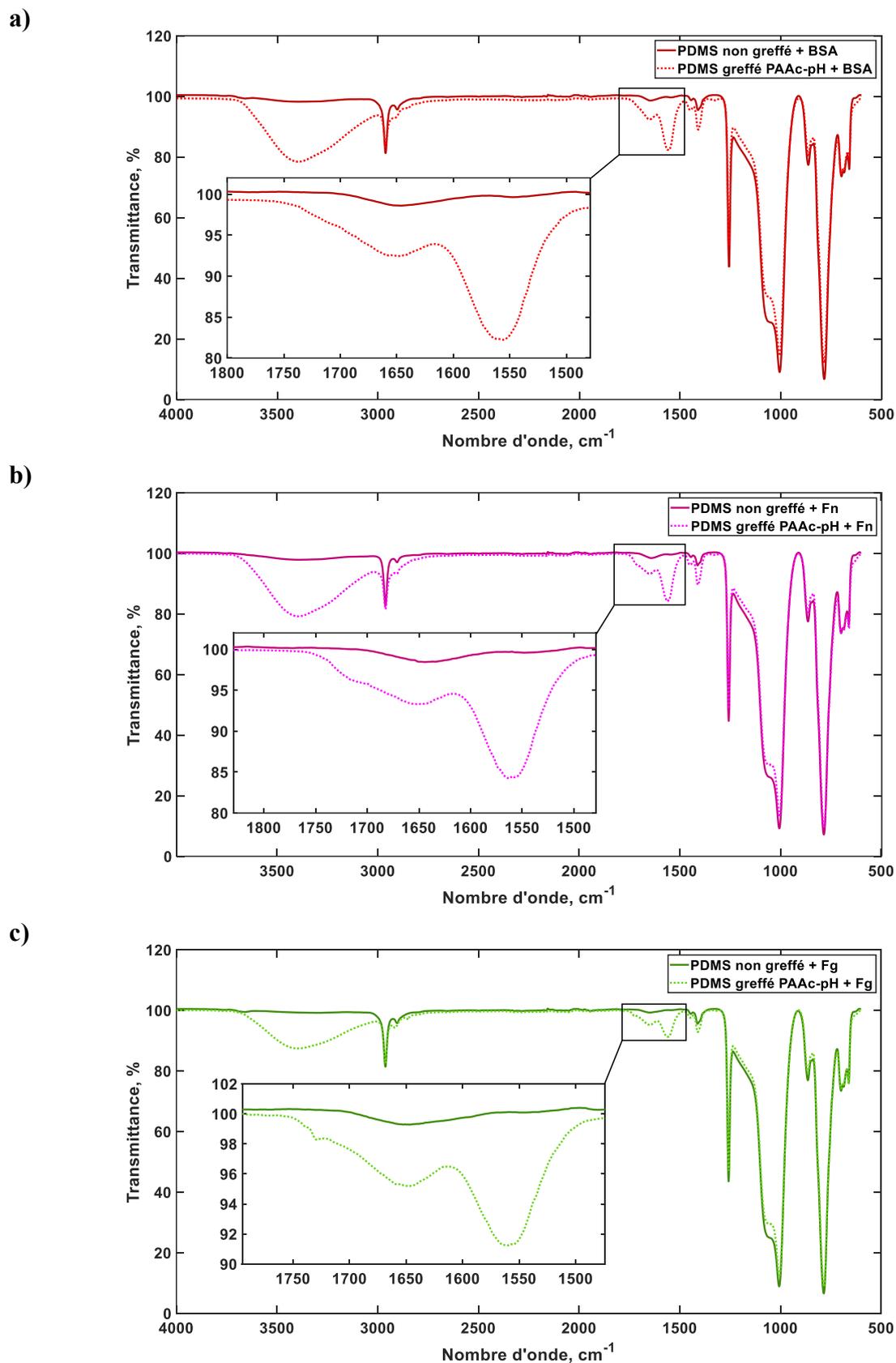


Figure 94 : Spectres FTIR du PDMS non greffé et greffé par le PAAC-pH adsorbé par : a) la BSA, b) la Fn, c) le Fg

Dans le cas de la fonctionnalisation du PDMS par le PAAc-pH, les phénomènes pouvant contribuer à perturber les interactions de surface avec les protéines sont les suivants :

- Selon les valeurs de pKa des groupements COOH, ceux-ci sont présents sous la forme COO⁻ dans le milieu biologique (pH = 7,4). Ainsi, des interactions ioniques ou encore la formation de liaisons moléculaires avec les molécules constitutives de l'environnement biologique sont attendues [82].
- La présence des groupements COO⁻ et leur densité modifient la charge de surface initiale. Les interactions électrostatiques entre la surface chargée et les protéines peuvent influencer leur adhésion et leur orientation.
- Les groupements carboxylates peuvent servir de sites de liaisons spécifiques pour les protéines. Certains acides-aminés peuvent former des liaisons ioniques ou des liaisons hydrogène avec les groupements COO⁻, influençant donc l'adhésion de la protéine, son orientation ainsi que sa conformation.
- La longueur et la distribution des chaînes de polymère formées est générateur de nouvelles interactions faibles et ioniques avec l'environnement biologique mais également entre les chaînes [74,85]. En conséquence, ces phénomènes peuvent perturber l'adhésion des protéines.
- La présence des groupements acide carboxylique peut générer une modification locale du pH, générant de nouvelles interactions [85,86,104].
- La fonctionnalisation augmente la mouillabilité de surface. Cela influence l'adsorption des protéines car de nouvelles affinités sont créées avec certains fragments de leur structure, généralement les fragments hydrophiles.

Concernant ce dernier point, les angles de contact apparents ont donc été mesurés avant et après adsorption des protéines sur les surfaces de PDMS non greffées (Figure 95a) et greffées par le PAAc-pH (Figure 95b). Le changement de mouillabilité met de nouveau en évidence la présence des protéines sur les surfaces. Sur les surfaces non-greffées, l'adsorption de BSA fait faiblement augmenter la mouillabilité, tandis que pour l'adsorption de Fn et Fg, il n'y a pas de changement significatif observé (Figure 95a). Pour le PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH, l'adsorption de BSA induit une mouillabilité de surface plus importante qu'elle ne l'est initialement après fonctionnalisation. Lorsque les surfaces sont adsorbées par la Fn et le Fg, la mouillabilité diminue même si la surface reste plutôt hydrophile (Figure 95b).

À noter que ces résultats restent indicatifs, ils correspondent à des concentrations fixées de protéines en solution, qui ont été déposées pendant un temps précis (5.4.2). Néanmoins, les conditions expérimentales ont été choisies de manière à refléter au plus près les phénomènes réels. Ainsi, les résultats dénotent l'adsorption particulière de chaque protéine sur les surfaces fonctionnalisées. Chaque protéine peut avoir tendance à interagir préférentiellement par une fraction de leur structure avec les groupements fonctionnels. En conséquence, elles arborent

probablement une orientation préférentielle une fois adhérees au PDMS. Les différents changements de mouillabilité observés d’une protéine à l’autre dépeignent une affinité ou une dépendance unique d’une protéine pour la surface. L’analyse des spectres FTIR peut appuyer ces résultats. Même si les bandes amide I et amide II sont présentes pour l’adsorption de chacune des protéines, leur forme, leur intensité et leur position précise sont indicatrices de potentiels changements d’orientation et de conformation (Figure 94). Ces paramètres étant légèrement différents d’une protéine à l’autre, ils suggèrent une affinité particulière de chacune d’entre elles pour la surface fonctionnelle.

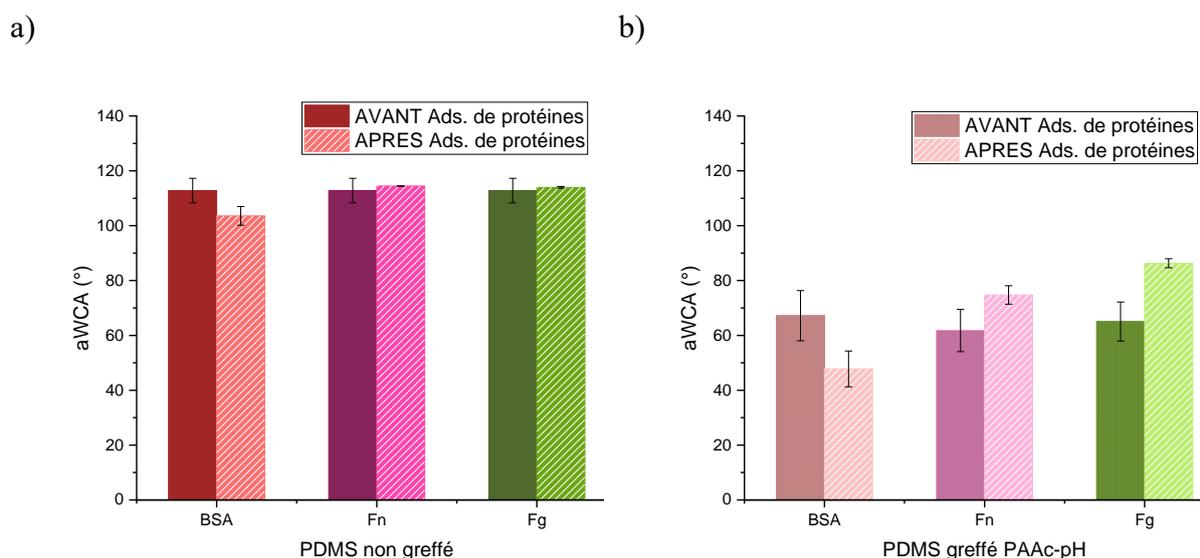


Figure 95 : Angles de contact apparents mesurés sur le PDMS a) non greffé et b) greffé par le PAAc-pH, avant et après adsorption des protéines

Finalement, ces résultats montrent l’affinité des protéines pour les surfaces de PDMS dans chacune des conditions étudiées. Cependant, la fonctionnalisation induit des changements concernant leur configuration. Ceux-ci ont pour conséquence la modification des propriétés de surface du PDMS. Par la mesure d’angle de contact, on observe que la mouillabilité de surface est changée. Les analyses FTIR montrent également que des interactions spécifiques sont engagées entre les protéines et les groupements de surface. Désormais, des caractérisations supplémentaires sont nécessaires afin d’accéder à plus d’informations concernant l’orientation des protéines, elles font l’objet de la partie 2.5.

2.3. Morphologie et prolifération des cellules en présence de protéines

En parallèle de ces travaux, l'étude de la prolifération et de la morphologie cellulaire par coloration a été menée de manière identique à celle effectuée dans la partie 1.2, à l'exception de l'adsorption préalable de fibronectine sur les surfaces. Ces expériences sont motivées par le rôle clé de la fibronectine dans l'adhésion des cellules. En effet, les domaines RGD de la fibronectine (domaines 9 et 10 Figure 96) se lient aux intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_5\beta_3$ des cellules afin de permettre leur attachement à la matrice extracellulaire [43,138,144]. Forcer au préalable le dépôt de fibronectine en surface augmente le nombre de récepteurs pour les cellules. Une fois adhérentes, les intégrines transmettent des signaux vers l'intérieur de la cellule [43]. Ces signaux permettent la prolifération et la différenciation cellulaire [144]. On souhaite alors chercher de quelle manière la fonctionnalisation influence l'adhésion de la Fn en observant l'adhésion des cellules à leur contact.

Dans un souci de lisibilité, les échantillons de PDMS où la Fn a été adsorbée seront notés PDMS-Fn. Si ces derniers sont greffés, ils seront notés PDMS-g-Fn.

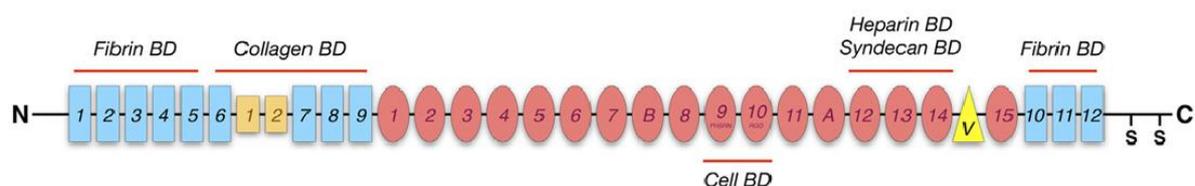


Figure 96 : Schéma représentant la structure d'une sous-unité de la fibronectine. L'acronyme BD (« Binding Domains ») indique les sites de liaisons spécifiques. [138]

La prolifération des fibroblastes sur le PDMS-Fn est améliorée voire accélérée (Figure 97) en comparaison aux précédents résultats (Figure 90). L'allure de la surface après 24 heures d'incubation (Figure 97a et b) est semblable à celle après 3 jours d'incubation sur les surfaces où il n'y a pas eu de pré-adsorption de Fn. Après 7 jours d'incubation (Figure 97e et f), la surface est couverte de cellules très étalées et orientées les unes par rapport aux autres pour former un réseau. Des images de l'ensemble de la surface de PDMS visible à l'œil nu après 3 et 7 jours d'incubation sont présentées Figure 98. On y voit l'importante évolution de la prolifération des cellules, soulignant le rôle éminent de la fibronectine dans leur adhésion. À noter que l'absence de cellules en bordure d'échantillon correspond à l'emplacement de l'insert maintenant l'échantillon pendant l'expérience.

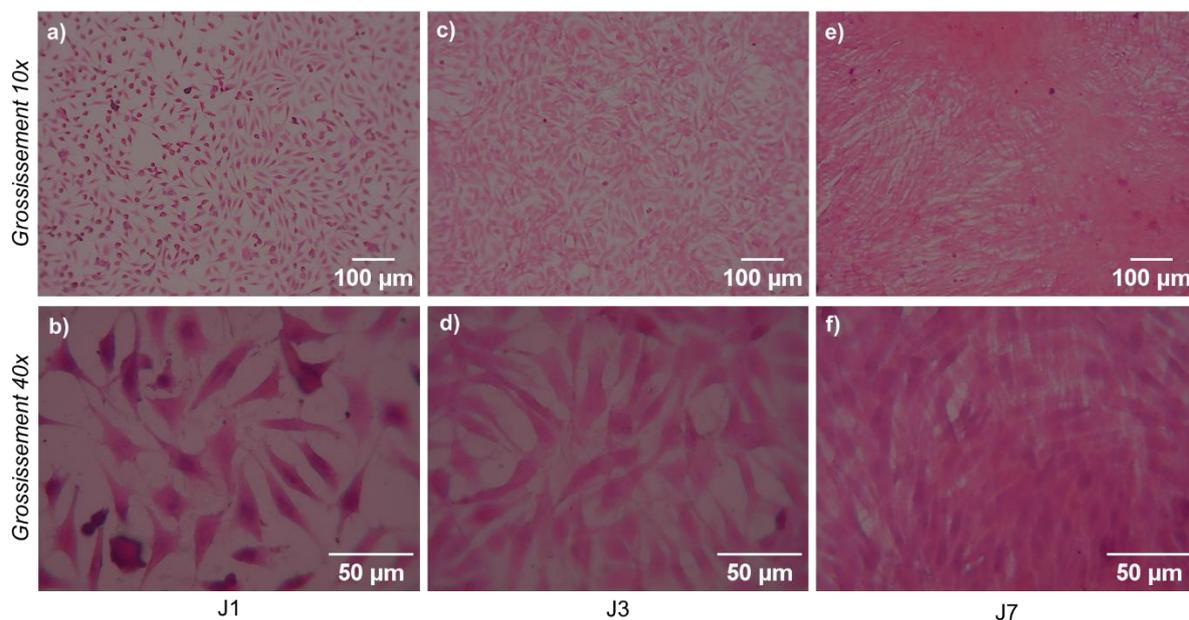


Figure 97 : Images au microscope optique de PDMS-Fn incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x

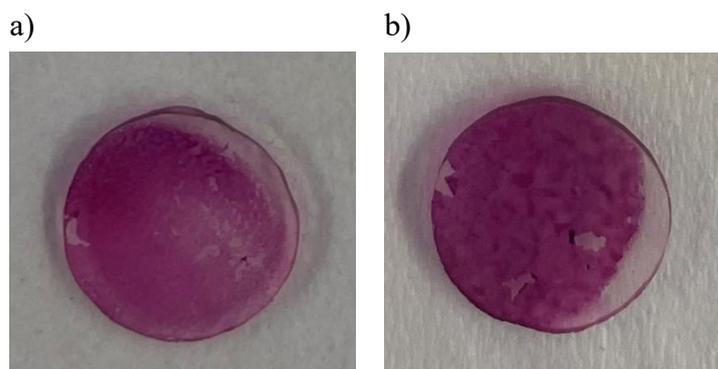


Figure 98 : Photographies de PDMS-Fn après a) 3 jours et b) 7 jours d'incubation avec des fibroblastes

Sur le PDMS-g-Fn, à partir du premier jour d'incubation, quelques cellules adhèrent en surface et arborent déjà une forme étalée (Figure 99a et b) en comparaison aux précédentes analyses sans adsorption de Fn (Figure 89). Néanmoins, en comparaison aux surfaces non greffées, le nombre de cellules adhérentes est moins important. Après trois jours d'incubation (Figure 99c et d), les amas de cellules précédemment observés après 7 jours d'incubation (Figure 89e et f) sont déjà présents. La pré-adsorption de la Fn a donc favorisé le processus d'adhésion des cellules. Cependant, les surfaces greffées montrent la même tendance que lors des précédentes expériences : les cellules adhèrent peu en surface hormis sur quelques zones où elles s'accumulent et se superposent dans le temps. Après 7 jours d'incubation (Figure 99e

et f), quelques amas cellulaires restent dispersés sur la surface et quelques cellules seules adhèrent à d'autres endroits. Les photographies Figure 100a et b montrent l'ensemble de l'échantillon de PDMS après 3 et 7 jours d'incubation. Les amas de cellules y sont visibles mais l'on constate à l'œil nu que peu de cellules envahissent la surface en comparaison au PDMS non greffé (Figure 98). Les cellules sont par ailleurs principalement localisées sur les bords de l'échantillon (Figure 100c). Ce phénomène est probablement lié aux conditions expérimentales où moins de composés se greffent en périphérie de l'échantillon.

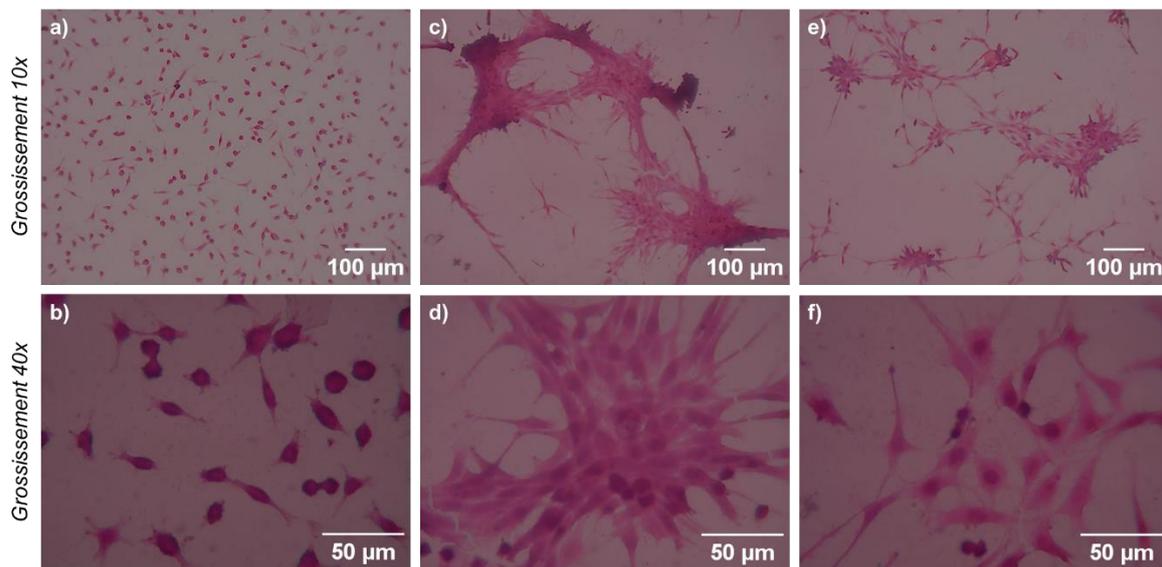


Figure 99 : Images au microscope optique de PDMS-g-Fn incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x et f) grossissement 40x

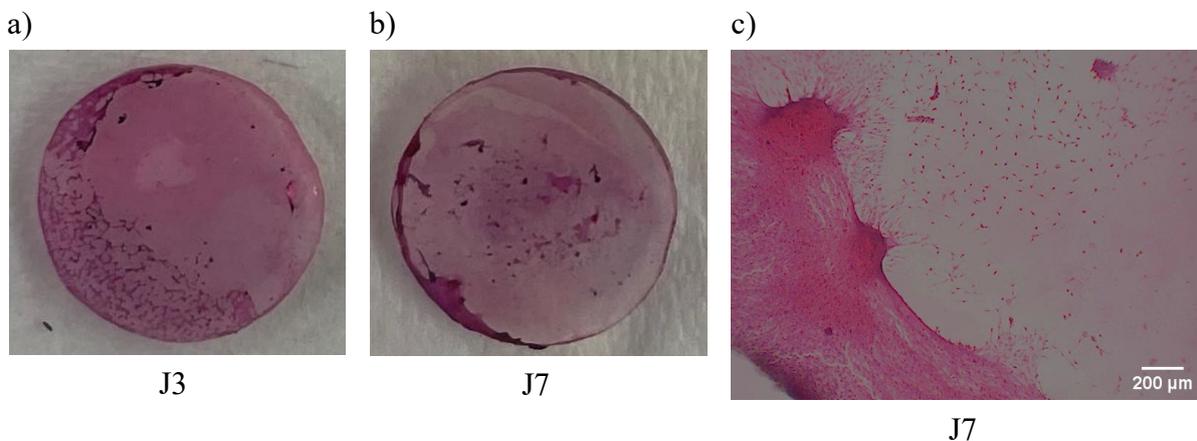


Figure 100 : Photographies de PDMS-g-Fn après, a) 3 jours et b) 7 jours d'incubation avec des fibroblastes, et c) Image au microscope optique en bordure de PDMS-g-Fn à grossissement 4x après 7 jours d'incubation de fibroblastes

La fibronectine reconnaît les récepteurs membranaires des fibroblastes responsables de leur attachement sur le matériau. Le Dr. Felgueiras explique dans ses travaux de thèse, que la séquence RGD de la protéine se lie aux intégrines des cellules pour former ensemble un réseau fibrillaire constituant la structure primitive de la matrice extracellulaire. Au même moment, d'autres régions de la Fn agissent pour garantir l'intégrité de la molécule lors de son étirement, et des séquences de la protéine situées à proximité du domaine RGD agissent de manière synergique avec celui-ci afin de maintenir sa stabilité. Toutes ces interactions vont déclencher différentes voies de signalisation influençant la réponse cellulaire [33,43]. Alors, en fonction de la conformation et de l'orientation adoptées par la protéine, de nombreuses possibilités d'action vis-à-vis des cellules mais également d'autres composés biologiques sont possibles. Ici, l'analyse FTIR (Figure 94b) a montré l'affinité de la fibronectine pour les surfaces greffées, néanmoins l'adhésion des cellules y est compromise. Une hypothèse expliquant ce phénomène peut être formulée : les groupements carboxylate COO^- exposés en surface peuvent interagir avec les domaines RGD des protéines, les rendant indisponibles pour les cellules (Figure 101). Cette hypothèse pourrait par ailleurs justifier la différence d'intensité des bandes amide I et II, indiquant des interactions spécifiques. Ces expériences appuient une nouvelle fois l'idée de changement d'orientation ou de conformation des protéines s'adsorbant sur les surfaces greffées. Alors, comme conclu dans la partie précédente, d'autres moyens de caractérisation sont désormais nécessaires pour accéder à plus d'informations concernant ces hypothèses.

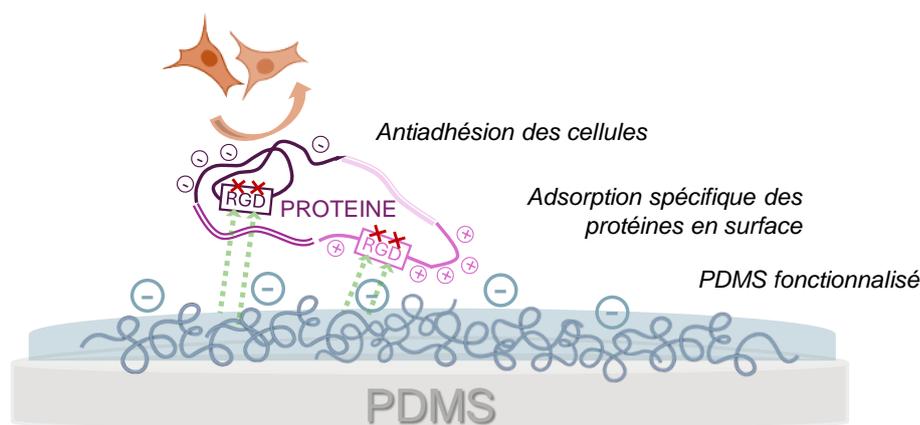


Figure 101 : Représentation schématique de l'adsorption d'une protéine (Fn) sur un échantillon de PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH et hypothèses sur les différentes interactions possibles

Zhang *et al.* rapportent dans leur revue de littérature, que les mécanismes d'adhésion ou d'antiadhésion de protéines en surface sont très complexes. En raison de leur diversité, leur différents poids moléculaires, leurs composants et même leur influence et dépendance à l'égard

du milieu biologique, la structure et la conformation de protéines peut varier dans différents environnements [20]. À titre d'exemple, Rabe *et al.* ont schématisé les changements d'orientation de la β -Lactoglobuline au contact d'une surface chargée (Figure 102). La protéine est d'abord schématisée comme une entité comprenant une importante quantité de composés chargés. L'illustration suivante montre qu'à une faible densité de charge surfacique, la protéine peut interagir avec ses groupements chargés. En revanche, la dernière illustration montre qu'une importante densité de charge surfacique favorise les interactions entre protéines menant à des changements d'orientation [38]. Les caractérisations réalisées en surface permettent de postuler que ce phénomène peut plausiblement se dérouler sur les surfaces greffées par le PAAc-pH. Ainsi, il est toujours intéressant d'approfondir les principes conduisant à la compréhension du procédé d'adsorption des protéines. Chaque information obtenue peut contribuer au développement de surfaces fonctionnelles de plus en plus adaptées à des applications biomédicales précises.

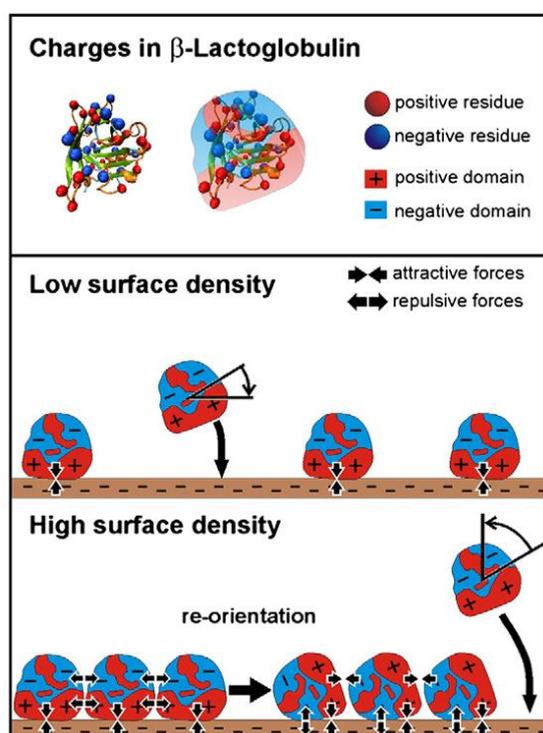


Figure 102 : Représentation schématique du changement d'orientation d'une protéine chargée, induite par les densités de charge de surface [38]

Jusqu'à présent les analyses chimiques et biologiques ont permis de mettre en évidence les premières réponses biologiques en surface du PDMS fonctionnalisé avec le PAAc-pH. En effet, la fonctionnalisation a ralenti la prolifération des cellules en surface. Seuls quelques amas de cellules persistants apparaissent sur certaines régions. Une antiadhésion des cellules est

manifeste, pourtant la caractérisation de la surface a également souligné l'adhésion des protéines en surface. Ce constat a alors questionné le type d'interaction ayant lieu entre les protéines et les groupements fonctionnels. L'hypothèse principale repose sur le changement de conformation ou d'orientation des protéines, motivé par la densité de charges présentes. Les caractérisations suivantes poursuivent les investigations dans ce sens.

À l'avenir, comprendre d'autant plus les mécanismes à l'interface entre le biomatériau et l'environnement biologique orientera le type de fonctionnalisation à adopter afin de cibler les problématiques encourues pour chaque application.

2.4. Quantification des protéines en surface

Au cours de cette étude il a également été question de tenter de quantifier le nombre de protéines adsorbées en surface du matériau fonctionnalisé. En effet, la spectroscopie FTIR a permis de mettre en évidence la présence de protéines et l'on constate que l'intensité des bandes caractéristiques correspondantes est plus importante dans le cas des surfaces greffées. Deux hypothèses principales peuvent être attribuées à ce constat :

- Une quantité de protéines adsorbées en surface plus importante dans le cas de la surface greffé,
- et/ou
- Un changement d'orientation ou de conformation de la protéine.

La méthode de caractérisation par spectroscopie FTIR reste alors semi-quantitative. Pour vérifier les hypothèses formulées, une quantification des protéines en surface doit être effectuée.

Au cours de ces travaux, il a été question de tenter d'y accéder en utilisant la méthode de Bradford. Cette technique emploie la spectroscopie UV-visible afin d'accéder à la concentration de protéines en solution. Le protocole a été adapté ici, de manière à déterminer la proportion de protéines adsorbées sur le PDMS. La méthode est décrite dans le Chapitre 2 partie 5.5.2.

Il est important de noter que le protocole mis en place est en cours d'amélioration. Les résultats obtenus permettent d'établir une comparaison entre les surfaces et permettent de formuler de premières interprétations, mais nécessitent d'être considérés avec précaution. En effet, plusieurs paramètres décrits ci-après sont gages d'incertitudes :

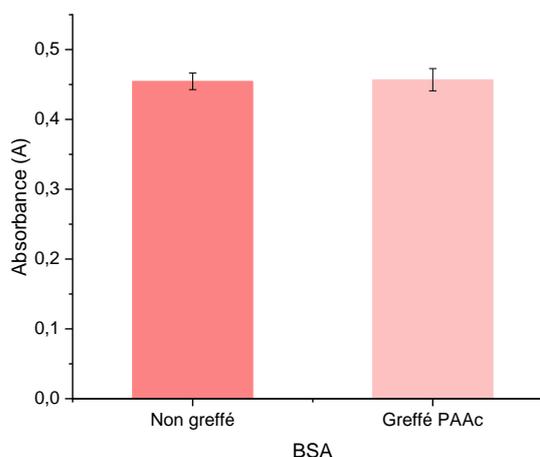
- Les concentrations initiales en protéines en solution choisies pour ces expériences correspondent aux concentrations utilisées dès le départ pour réaliser les

adsorptions. Néanmoins, elles peuvent ne pas être adaptées (trop élevées ou trop peu concentrées) aux expériences impliquant des mesures d'absorption au spectrophotomètre UV-visible.

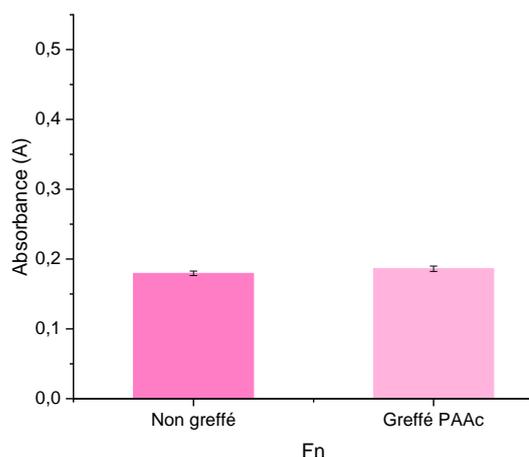
- Par sa taille et en raison des gênes stériques, la molécule de bleu de Coomassie G-250 peut ne pas atteindre et donc ne pas complexer avec toutes les protéines en surface.
- L'orientation de la protéine sur les surfaces est un point caractéristique ici des interactions avec les surfaces greffées. Alors, certains domaines des protéines nécessaires pour interagir avec la molécule de bleu de Coomassie G-250 peuvent ne pas être accessibles.
- La molécule de bleu de Coomassie G-250 est susceptible d'interagir avec les groupements greffés présents sur le PDMS.
- Les échantillons ne remplissant pas l'intégralité du puits de culture, les calculs sont ramenés à la surface du PDMS. Néanmoins, il faut pour cela considérer que les protéines s'adsorbent de manière homogène sur l'échantillon et la plaque de culture.
- Le volume de solution de Bradford ajouté à la solution de protéine a été au préalable déterminé visuellement par des tests successifs.
- Les transferts de solution dans les plaques et les dilutions successives sont des paramètres d'incertitude supplémentaires.

Les résultats sont présentés dans un premier temps en fonction des absorbances mesurées (Figure 103). Ils permettent d'établir si des différences sont observées entre les échantillons. Ensuite, sont présentées et critiquées les concentrations surfaciques résultant des mesures d'absorption obtenues grâce à l'équation (7) (Tableau 17).

a)



b)



c)

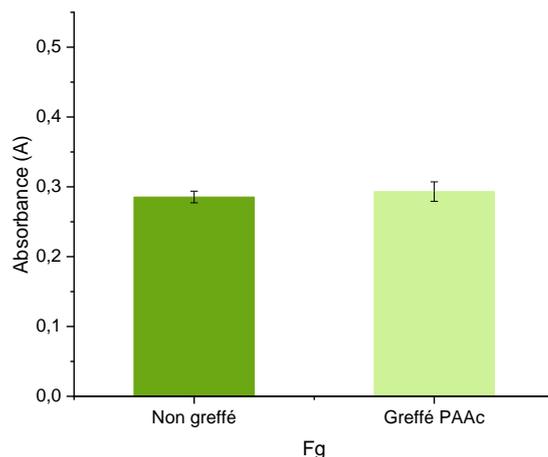


Figure 103 : Absorbances mesurées après dosage par la méthode de Bradford de solutions de a) BSA, b) Fn et c) Fg, déposées sur du PDMS non greffé et greffé

Le Figure 103 montre que pour chaque protéine adsorbée, les absorbances mesurées sont proches entre une surface greffée et non greffée. Ce résultat suggère que le greffage ne modifie pas la quantité de protéines adsorbées en surface. Alors, l'hypothèse à conserver serait que le changement d'orientation et de conformation de la protéine seraient responsables des modifications à l'interface entre le matériau et le milieu biologique. Les résultats obtenus par Baujard-Lamotte *et al.* peuvent appuyer ces résultats [145]. Les auteurs ont étudié la cinétique d'adsorption de Fn sur des surfaces hydrophiles et hydrophobes. Ils montrèrent que la densité de surface de Fn entre une surface hydrophobe et hydrophile était la même, et que le changement de mouillabilité avait plutôt un impact sur la conformation des protéines. Néanmoins, ils précisent que ce phénomène est également dépendant de la concentration volumique en protéines.

Les concentrations surfaciques résultantes résumées dans le Tableau 17 montrent à nouveau qu'entre le PDMS non greffé et greffé, des valeurs similaires sont obtenues. Cependant, si l'on se penche plus précisément sur les valeurs en elles-mêmes, des failles sont constatées. En effet, dans le cas de la BSA, le calcul du pourcentage de protéines adsorbées montre que 97,1 % soit la quasi-totalité des protéines déposées, s'adsorbent en surface. En raison de la concentration initiale importante de protéines en solution déposée, il peut être cohérent qu'une forte proportion s'y adsorbe. Dardouri *et al.* ont également utilisé la solution de Bradford afin de quantifier la BSA en surface d'échantillons de PDMS fonctionnalisés par des rhamnolipides. Les auteurs observent lors de leur expérience une réduction de 38,7 % de l'adsorption de BSA après fonctionnalisation. Ils attribuent cette réduction à l'augmentation de l'hydrophilie de surface après fonctionnalisation par les rhamnolipides. La BSA aurait tendance

à établir préférentiellement des interactions hydrophobes [55]. Cependant, le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface n'est pas le seul paramètre d'interaction à prendre en compte. La haute densité de charges négatives présentes en surface dans le cas du greffage du PAAc-pH, source d'interactions ioniques est non négligeable. Sivaraman *et al.* mettent également en évidence que l'augmentation de l'hydrophobie de surface avait tendance à augmenter la quantité de Fg et de BSA en surface. Cependant le taux d'adhésion était également augmenté par la concentration en protéines [79]. Les résultats et conclusions variés obtenus dans la littérature reflètent le complexe mécanisme d'adsorption des protéines.

Pour la Fn, seul 0,97 % soit une quantité quasi-nulle de protéines s'adsorbent sur le PDMS et une valeur négative est obtenue en moyenne pour les surfaces greffées. Cette valeur reflète les incertitudes obtenues quant à la faible concentration déposée en surface. Cependant, il peut être entendu qu'une plus faible proportion s'adsorbe. En effet, Sivaraman *et al.* et Baujard-Lamotte *et al.* ont montré que lorsqu'une faible concentration de protéines est déposée, celles-ci ont le temps de s'adsorber et s'étaler sur la surface, laissant moins d'espace aux autres protéines pour s'installer [79,145]. De plus, la taille importante de la Fn, avec un poids moléculaire d'environ 440 kDa par exemple contre 66 kDa pour la BSA peut influencer son adhésion et les répulsions intermoléculaires [138]. À titre d'exemple, Sivaraman *et al.* ont travaillé sur l'adsorption de Fg sur des surfaces de SAMs d'alcanethiol sur de l'or et expliquent qu'une adsorption du Fg par son extrémité permet une couverture de surface de $2,26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, tandis qu'une adsorption latérale offre une couverture de surface bien moins importante, équivalente à $0,24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ [79]. Par ailleurs, Cheng *et al.* précisent que l'action de surface de la Fn, notamment à l'égard des fibroblastes, est davantage impactée par sa conformation que par son nombre [146]. Néanmoins, les mesures d'absorbance effectuées après application du protocole de Bradford restent ici imprécises pour une faible concentration initiale en solution.

Dans le cas de l'adsorption de Fg, où une concentration initiale plus importante que pour le Fn a été déposée, 43,0 % et 40,3 % de protéines ont colonisé les surfaces non greffées et greffées respectivement. Les valeurs obtenues sont intermédiaires aux résultats obtenus pour la BSA et le Fn.

	BSA ($C_i = 4000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Fn ($C_i = 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		Fg ($C_i = 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	% _{adsorbé}	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	% _{adsorbé}	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	% _{adsorbé}
Non greffé	$4944,9 \pm 5,3$	97,1	$0,248 \pm 1,399$	0,97	$54,80 \pm 3,71$	43,0
Greffé PAAc	$4943,8 \pm 7,1$	97,1	$-2,680 \pm 1,677$	-10,5	$51,33 \pm 6,27$	40,3

Tableau 17 : Concentrations surfaciques en protéines adsorbées sur le PDMS non greffé et greffé, obtenues après dosage par la solution de Bradford

Finalement, ces premiers résultats restent indicateurs de la concentration surfacique en protéines adsorbées. Afin de préciser le protocole établi, une étude cinétique pour chaque protéine doit être réalisée afin d'évaluer la fiabilité des mesures. Néanmoins, ces résultats mettent en évidence qu'entre une surface greffée et non greffée, la quantité de protéines adsorbée serait similaire. Ceci confirme, par corrélation avec les analyses FTIR, qu'un changement d'orientation et de conformation des protéines entre une surface greffée et non greffée est à privilégier. La suite de l'étude s'intéresse à la mise en évidence de ce phénomène.

2.5. Vers une analyse du comportement des protéines en surface

Roach *et al.* expliquent que le rapport d'intensité des bandes amide I/II représente un premier outil utile pour évaluer qualitativement les changements d'orientation. En effet, les transitions vibrationnelles sont observées sous un angle rasant et permettent alors uniquement à celles dont le moment dipolaire est normal à la surface d'absorber. Sachant que les moments dipolaires de l'amide I et de l'amide II sont approximativement perpendiculaires, leur rapport d'intensité change si la protéine adsorbée arbore une conformation différente [143]. Ce constat est observable sur les spectres Figure 94, et les valeurs précises des maxima des bandes spectrales ainsi que les ratios d'intensités sont présentés dans le Tableau 18 pour plus de précision. Par conséquent, les différences observées entre les conditions greffée et non greffée permettent de valider la réalisation d'études complémentaires sur le changement d'orientation ou de conformation des protéines adsorbées. Elles font l'objet de cette partie.

		Maxima amide I (cm⁻¹)	Maxima amide II (cm⁻¹)	Rapport d'intensité amide I/II
BSA	Non greffé	1646,5	1546,5	2,98
	Greffé PAAc-pH	1649,5	1561	0,36
Fn	Non greffé	1644	1547,85	2,54
	Greffé PAAc-pH	1649,25	1558,5	0,47
Fg	Non greffé	1647	Non visible	-
	Greffé PAAc-pH	1648	1562	0,47

Tableau 18 : Positions des maxima des bandes spectrales attribuées à l'amide I et l'amide II sur les spectres FTIR Figure 94 et rapports des intensités des bandes amide I/II

Les protéines sont généralement caractérisées par leur proportion en structures secondaires. Les conformations principales répertoriées sont les hélices α , les feuillets β (Figure 104), les spires β et les structures aléatoires. En spectroscopie FTIR, la bande amide I est formée

de la superposition des vibrations engendrées par les composants de ces structures. Sur les spectres FTIR de la Figure 94, pour chaque protéine greffée en surface, la position maximale et la largeur de la bande amide I obtenue sont différentes. Ce point est indicateur de l'organisation différente des protéines sur les surfaces et suggère qu'elles adoptent donc une orientation préférentielle. Le décryptage de cette bande permet d'estimer les proportions en structures secondaires pour chaque protéine sur les surfaces de PDMS.

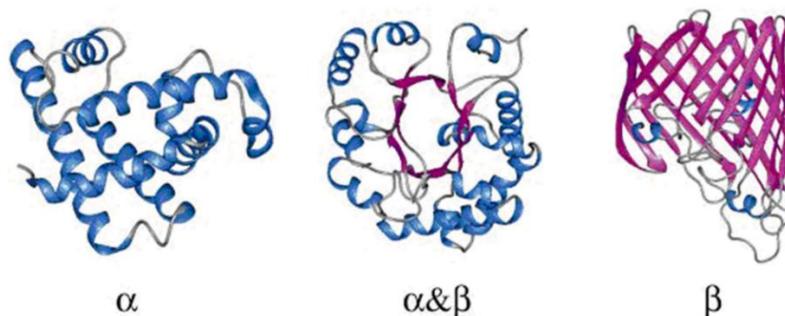


Figure 104 : Représentation schématique des structures secondaires des protéines en hélice α , mélange d'hélice α et feuillet β , et feuillet β [127]

2.5.1. Estimation des structures secondaires

Afin d'accéder à la distribution en structures secondaires de chaque protéine, la méthode décrite dans la partie 5.5.1 du Chapitre 2 a été appliquée. Elle repose sur la déconvolution de la bande amide I obtenue sur le spectre FTIR après adsorption des protéines. Un code en langage Python (Annexe 2) a été établi afin d'approximer la bande amide I par la somme des aires attribuées aux structures secondaires (Figure 105). Grâce aux données de la littérature [126,127], la position des bandes caractéristiques de ces structures a été fixée, permettant l'exécution des calculs. L'accès aux aires sous les courbes permet d'estimer les proportions en structures secondaires de chaque protéine.

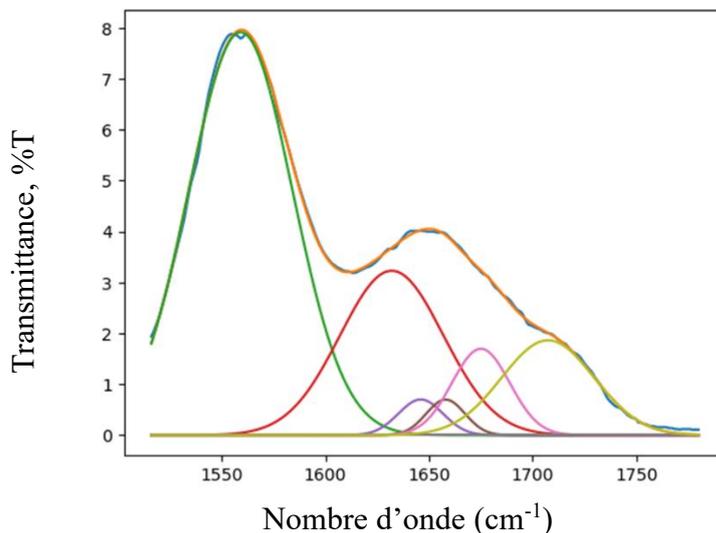


Figure 105 : Exemple de la déconvolution de la bande amide I de protéine adsorbée sur une surface de PDMS fonctionnalisée par le PAAc-pH

Il est important de préciser que ces résultats ne sont que des estimations, les valeurs obtenues sont à prendre avec précaution. En effet, l'analyse a été réalisée de manière à approcher au mieux la bande FTIR initiale, mais comprend son lot d'incertitudes :

- Les concentrations en protéines en solution utilisées sont celles fixées au départ pour toutes les expériences de caractérisations. Les protéines doivent donc être considérées indépendamment les unes des autres.
- Ce sont les structures secondaires majoritaires qui ont été estimées lors de ces analyses, mais d'autres conformations peuvent également être détectées, comme la structure en hélices 3_{10} [126] (Annexe 1).
- La méthode de la dérivée seconde n'ayant pas été appliquée sur le spectre FTIR, les données correspondantes aux positions des bandes spectrales des structures secondaires ainsi que leurs limites ont été obtenues dans la littérature [126].
- Les paramètres d'amplitude de la bande et de largeur à mi-hauteur ainsi que leurs limites ont été ajustés visuellement de manière à approcher au mieux la bande amide I.

Sous la bande amide I, apparaît également la vibration correspondant à la liaison C=O du PAAc-pH greffé déjà observée à 1709 cm^{-1} (Figure 73). Celle-ci doit donc être prise en compte dans les calculs afin de ne pas fausser l'estimation des structures secondaires (courbe jaune Figure 105). Sont superposés sur la Figure 106, les spectres FTIR du PDMS greffé et du PDMS-g-Fn à titre d'exemple. La présence de la bande caractéristique de la liaison C=O est mise en évidence. Elle est considérablement diminuée lorsque la protéine est adsorbée, reflétant les modifications en surface, mais un épaulement reste présent au même nombre d'onde. De la

même manière, la position de la bande amide II proche de la bande amide I est prise en compte dans l'estimation. Ainsi, l'aire notée A_f , obtenue sous la courbe orange superposant la courbe du spectre FTIR (Figure 105) est égale dans le cas du PAAc-pH greffé à :

$$A_f = \sum A_{structures\ secondaires} + A_{(C=O)} + A_{amide\ II} \quad (8)$$

Où :

- $A_{structures\ secondaires}$, correspond aux aires sous les courbes attribuées aux structures secondaires, en rouge, violet, marron, rose et gris sur la Figure 105,
- $A_{(C=O)}$, correspond à l'aire sous la courbe attribuée à la vibration de la liaison C=O de l'AAc, en jaune sur la Figure 105,
- $A_{amide\ II}$, correspond à l'aire sous la courbe de la bande amide II, en vert sur la Figure 105.

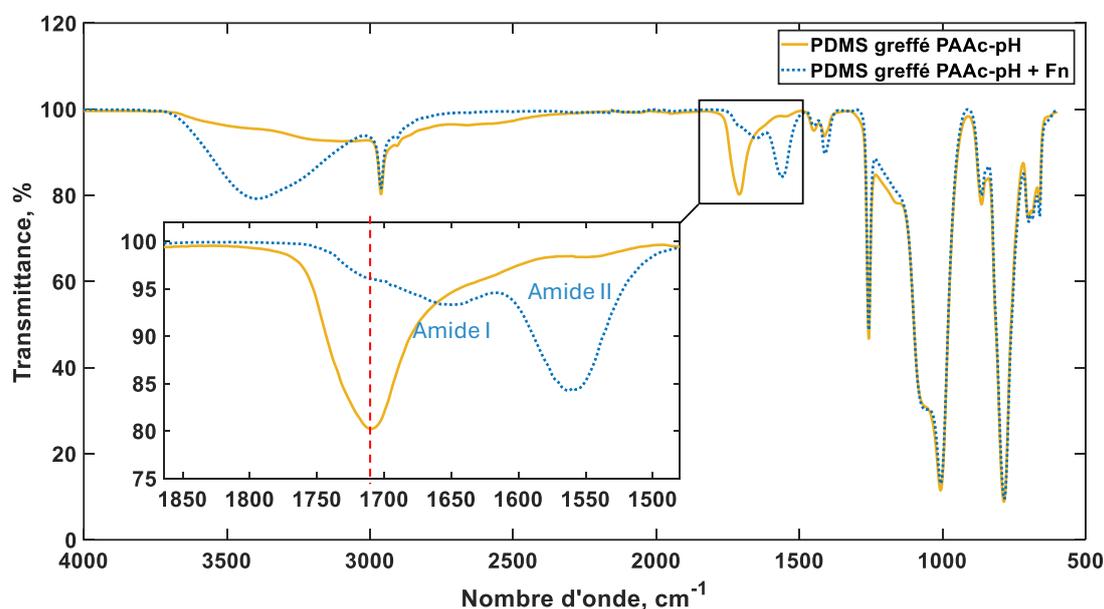


Figure 106 : Spectre FTIR du PDMS greffé par le PAAc-pH (trait jaune) et du PDMS-g-Fn (trait bleu pointillé)

La Figure 107 représente les distributions des structures secondaires estimées pour chacune des protéines. La proportion en structure aléatoire de la BSA est moins importante sur une surface greffée en comparaison à une surface non greffée. Cependant la proportion de spires β est plus importante sur les surfaces greffées (Figure 107a). Il n'y a pas d'autres différences importantes constatées pour la proportion en feuillets β et en hélices α . Des différences plus

marquées sont observées entre les deux surfaces pour l'adsorption de Fn et de Fg. Lors de l'adsorption de Fn, une proportion en feuillets β plus faible est générée sur les surfaces fonctionnalisées, en faveur d'une proportion plus élevée en structures aléatoires, en hélices α et en spires β où une différence plus importante est observée en comparaison au PDMS non greffé (Figure 107b). Concernant l'adsorption de Fg, bien que les écarts-types soient importants, la tendance mène également à une proportion moins importante de feuillets β . En contrepartie, plus de structures aléatoires et de spires β sont observées, mais cette fois, la proportion d'hélices α est moins importante que pour le PDMS non greffé (Figure 107c).

Ces résultats mettent en évidence que la proportion des structures secondaires des protéines est différente entre une surface de PDMS greffée et non greffée. Ceci suggère fortement que la fonctionnalisation de surface génère des interactions modifiant l'orientation de la protéine lors de son adsorption. La présence des groupements COO^- peut provoquer le déploiement ou le repliement de la protéine et favoriser ou non des interactions intramoléculaires. Les groupements exposés à l'environnement biologique sont donc changés en comparaison au PDMS non greffé, perturbant ainsi les propriétés de surface initiales.

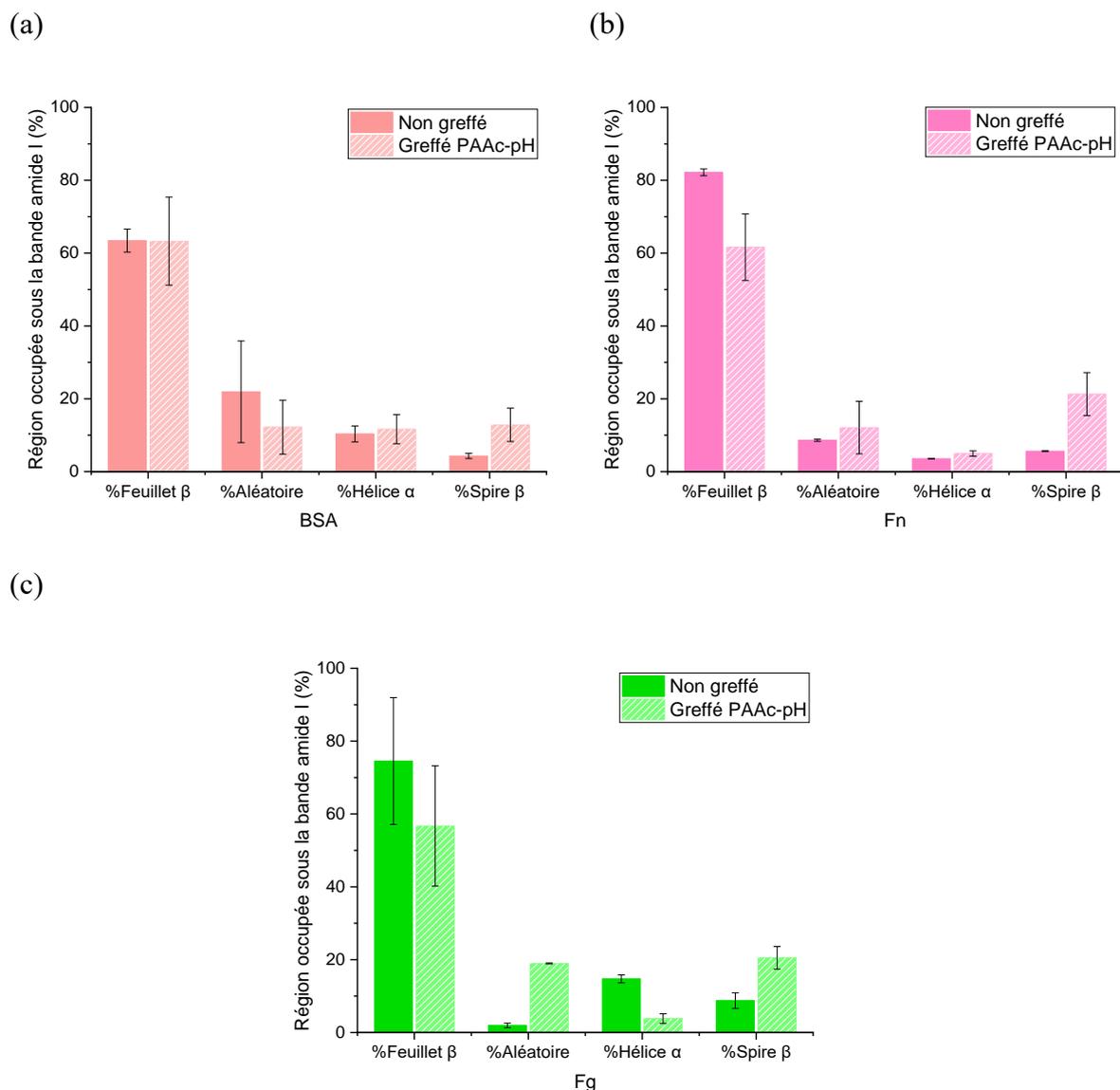


Figure 107 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées et greffées par le PAAc-pH

De manière générale, ce sont les feuillets β qui sont majoritairement présents au sein de la protéine. Mais la tendance générale montre une diminution de leur présence en comparaison à une surface non greffée lorsque la surface est fonctionnalisée. La proportion de spires β est plus importante pour chacune des protéines lorsque la surface est greffée. Les structures aléatoires et en hélice α varient d'une protéine à l'autre. On constate alors également une affinité propre de la protéine pour les surfaces fonctionnalisées ou non. Ce résultat peut également être dépendant de la quantité adsorbée comme mentionné précédemment [39].

Sivaraman *et al.* ont étudié l'adsorption de protéines sur des SAMs fonctionnalisés par des groupements COOH. Ils mettent en évidence un réarrangement structural du Fg et de la

BSA sur ces surfaces en comparaison à leur structure native. Leurs hypothèses sont que les groupements carboxylates chargés négativement peuvent interagir avec des résidus d'acides aminés chargés positivement en surface des protéines, et que des ponts salins peuvent se former par des paires de résidus d'acides aminés. Les auteurs supposent aussi que la présence de nouveaux types d'interactions peut également générer de nouvelles forces externes sur les protéines. Alors, leur conformation native ne représente plus leur état d'énergie libre le plus bas. Un repliement vers une nouvelle conformation leur permet alors de retrouver cet état d'énergie libre [79].

L'orientation de la protéine est donc clairement impactée par la fonctionnalisation de surface. De manière à obtenir plus d'éléments de réponse sur ce changement, l'observation des protéines adsorbées au microscope à force atomique doit être entreprise. En raison du caractère « mou » et électrostatique du matériau, il est complexe d'obtenir les scans AFM pour toutes les conditions. L'étude est alors toujours en cours et constituera une perspective d'analyse.

3. Comparaison des effets de surface du PAAc et du PNaSS

Les analyses biologiques précédentes ont également été réalisées sur les surfaces de PDMS fonctionnalisées par le PNaSS afin de réaliser une comparaison avec les précédents travaux. Ces résultats permettent de comparer l'impact des groupements chimiques greffés sur le PDMS étudiés au laboratoire.

3.1. Morphologie et prolifération

Le protocole de coloration des fibroblastes a été réalisé sur les surfaces greffées par le PNaSS à titre de comparaison. Les expériences ont été réalisées à partir du même échantillon de fibroblastes sur l'ensemble des surfaces et les images obtenues sont présentées avec un grossissement au microscope optique 10x (Figure 108). La prolifération cellulaire augmentée en présence du PNaSS en comparaison aux surfaces non greffées, déjà mis en évidence par la mesure de la viabilité cellulaire lors de précédents travaux [95] est également visible sur les images Figure 108. Les cellules forment un réseau plus dense, visible en particulier après 7 jours d'incubation.

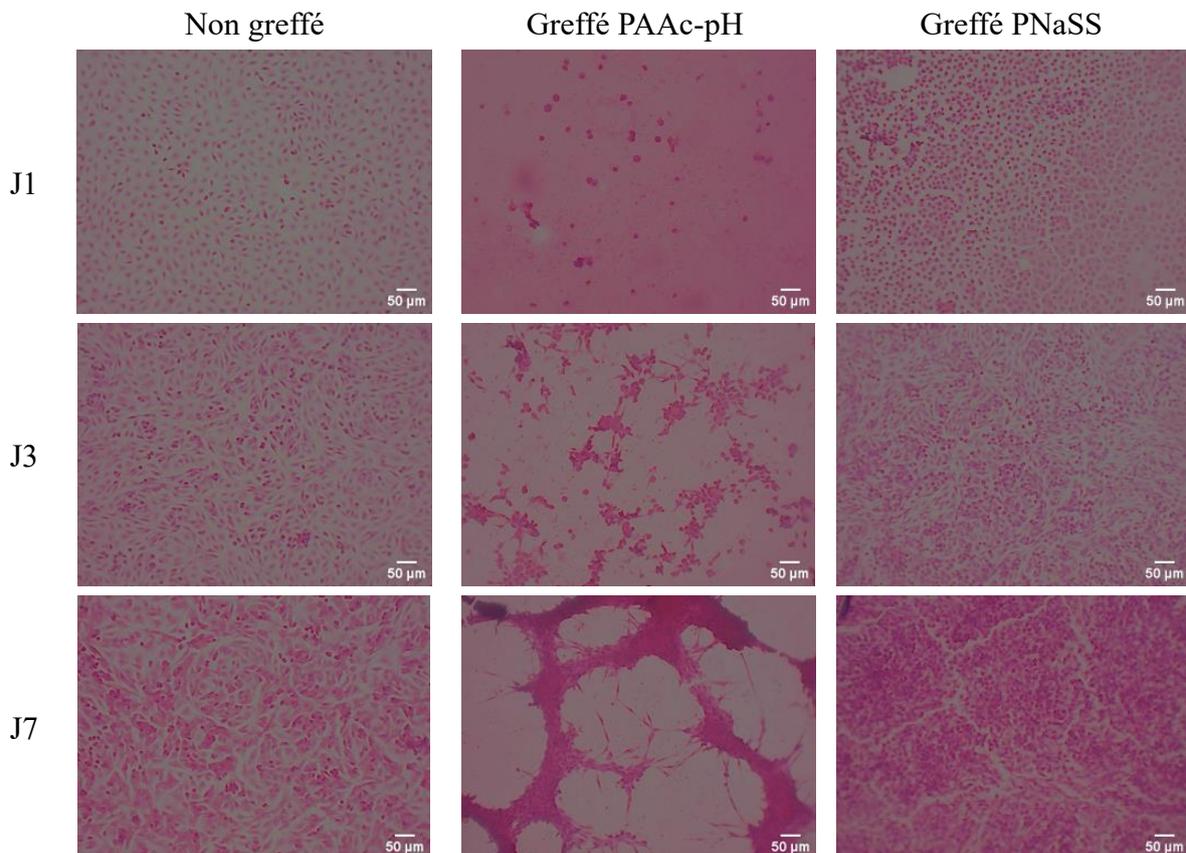


Figure 108 : Images au microscope optique de la prolifération des fibroblastes en surface d'échantillon de PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et le PNaSS après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation

Le suivi de la prolifération cellulaire dans le temps grâce au test MTT (Figure 109) met d'autant plus en lumière ce phénomène de prolifération cellulaire. En comparaison aux surfaces non greffées, le pourcentage de viabilité cellulaire sur les surfaces greffées de PNaSS est plus élevé. Il atteint 120 % après 3 jours d'incubation et 146 % au bout de 7 jours. Ce résultat souligne l'amélioration de la prolifération des fibroblastes dès les premiers jours d'incubation au contact des surfaces greffées.

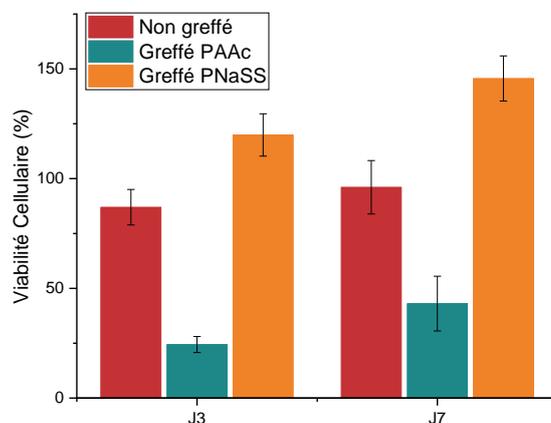


Figure 109 : Étude de la prolifération des fibroblastes en surface de PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et par le PNaSS, après 3 jours et 7 jours d'incubation

3.2. Adsorption de protéines

3.2.1. Analyses par spectroscopie FTIR

La Figure 110 présente le spectre FTIR associé à l'adsorption de Fn sur le PDMS greffé par le PNaSS (trait plein) et le PAAc-pH (trait pointillé). Les résultats soulignent que la protéine exhibe des affinités différentes entre les deux surfaces. Le premier constat est que bien que les bandes spectrales associées à la protéine soient présentes, leur intensité est différente d'une surface à l'autre. Ensuite, il est observé que la bande amide I est plus intense que la bande amide II pour la Fn adsorbée sur les surfaces greffées de PNaSS, l'effet inverse est observé pour le PAAc-pH. Enfin, la position précise de ces bandes subit de légers décalages de nombre d'onde. Il a été choisi de ne présenter ici que le spectre associé à l'adsorption de Fn, mais ces mêmes constats sont observables pour l'adsorption de BSA et de Fg. Les données concernant les positions des bandes et rapports d'intensités sont regroupées dans le Tableau 19, elles soulignent les variations mentionnées.

Ces différents constats mettent en évidence les interactions distinctes des protéines pour les deux surfaces. Ces résultats appuient ceux observés lors de l'attachement des cellules en

surface. De manière générale, ils mettent également en lumière la perturbation du mécanisme biologique de surface lorsque le PDMS est fonctionnalisé. Des caractérisations complémentaires doivent confirmer les hypothèses.

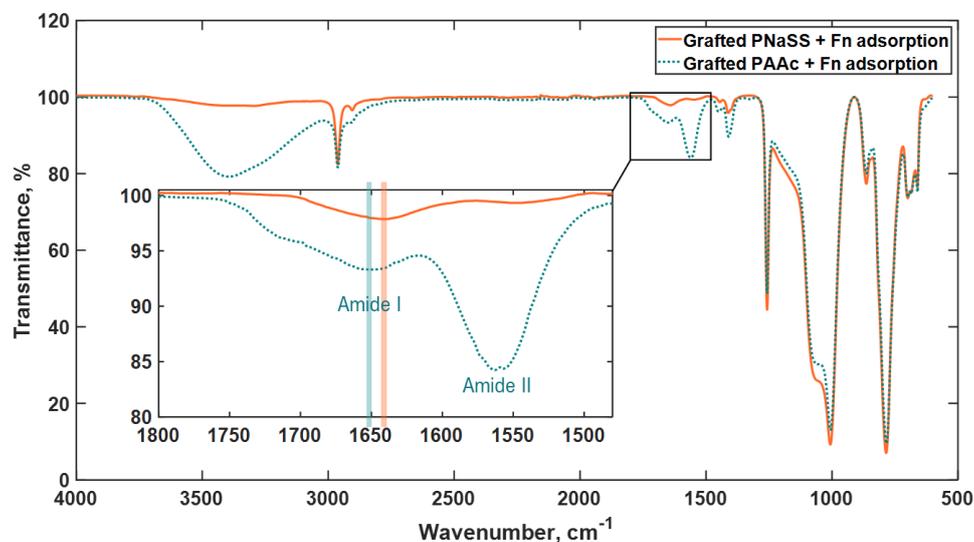


Figure 110 : Spectre FTIR de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH (trait pointillé bleu) et par le PNaSS (trait orange continu) adsorbé par la Fn

		Maxima amide I (cm^{-1})	Maxima amide II (cm^{-1})	Rapport d'intensité amide I/II
BSA	Non greffé	1646,5	1546,5	2,98
	Greffé PAAc-pH	1649,5	1561,0	0,36
	Greffé PNaSS	1657,0	1547,0	2,17
Fn	Non greffé	1644,0	1547,9	2,54
	Greffé PAAc-pH	1649,3	1558,5	0,47
	Greffé PNaSS	1639,5	1546,0	2,65
Fg	Non greffé	1647,0	Non visible	-
	Greffé PAAc-pH	1648,0	1562,0	0,47
	Greffé PNaSS	1650,3	1548,3	1,98

Tableau 19 : Position des maxima des bandes spectrales attribuées à l'amide I et l'amide II sur les spectres FTIR du PDMS non greffé, greffé par le PAAc-pH et le PNaSS, et rapports des intensités des bandes amide I/II

3.2.2. Quantification des protéines

Le dosage indirect des protéines par la méthode de Bradford a également été réalisé sur le PDMS fonctionnalisé par le PNaSS. Le Tableau 20 résume les résultats obtenus. Les mêmes conclusions peuvent être apportées que lors du greffage du PAAc-pH (Tableau 17) : la quantité de protéines adsorbées pour chacune des conditions est identique à la condition non greffée. La fonctionnalisation de surface ne semble pas influencer le nombre de protéines adsorbées. Une nouvelle fois, l'hypothèse à privilégier est le changement d'orientation ou de conformation de la protéine s'adsorbant sur la surface fonctionnalisée.

	BSA ($C_i = 4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$)		Fn ($C_i = 20 \mu\text{g.mL}^{-1}$)		Fg ($C_i = 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g.cm}^{-2})$	% _{adsorbé}	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g.cm}^{-2})$	% _{adsorbé}	$C_{\text{Sprot}} (\mu\text{g.cm}^{-2})$	% _{adsorbé}
Greffé PNaSS	$4944,9 \pm 5,3$	97,1	$0,248 \pm 1,399$	0,97	$54,80 \pm 3,71$	43,0

Tableau 20 : Concentrations surfaciques calculées en surface d'échantillon de PDMS greffé par le PNaSS adsorbé par les différentes protéines après dosage indirect utilisant la solution de Bradford

3.2.3. Estimation des structures secondaires

Enfin, les structures secondaires des protéines adsorbées en surface de PDMS greffé par le PNaSS ont été estimées (Figure 111). Les résultats obtenus précédemment pour les surfaces non greffées et greffées par le PAAc-pH ont été ajoutées sur les figures pour permettre la comparaison. Quelques différences sont à noter :

- Dans le cas où la BSA est adsorbée (Figure 111a), moins de configuration en feuillets β sont détectées. Cette différence est compensée par une proportion plus importante en structures aléatoires et spires β en comparaison au PDMS non greffé.
- L'adsorption de Fn en surface du PNaSS (Figure 111b) montre des différences de proportions notables par rapport à un échantillon non greffé. La tendance est similaire à ce qui était observé pour l'adsorption de Fn sur le PDMS greffé par le PAAc-pH, à la seule différence que pour le PNaSS, la proportion en hélices α devient moins importante, voire quasi-nulle. Aussi, même si la proportion en structures aléatoires est également plus importante, elle l'est bien plus dans le cas du PNaSS greffé. Ces différences peuvent contribuer à interpréter les changements de prolifération des fibroblastes en surface, la Fn étant la protéine responsable de leur adhésion.
- Enfin, l'adsorption de Fg sur le PDMS greffé par le PNaSS montre également une tendance similaire à la fonctionnalisation de la surface par le PAAc-pH (Figure 111c). Moins de feuillets β sont présents pour une proportion en structures aléatoires

et spires β plus élevée que pour le PDMS non greffé. La proportion en hélices α est bien moins importante lorsque la surface est greffée par le PAAc-pH en comparaison à la surface non greffée. Elle l'est également pour les surfaces greffées de PNaSS mais reste significativement plus élevée que lorsque le PAAc-pH est présent.

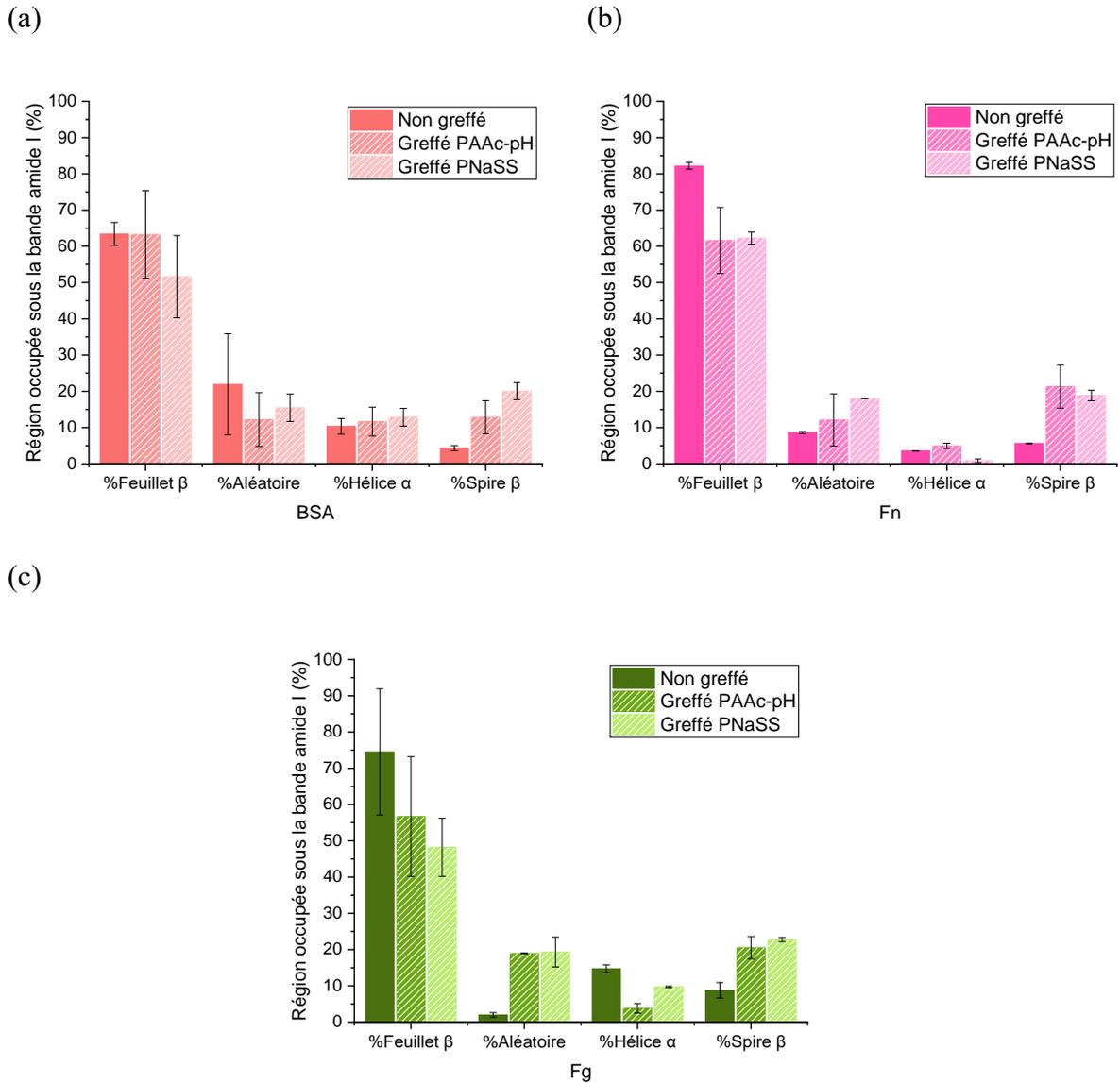


Figure 111 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées, greffées par le PAAc-pH et par le PNaSS

Le Tableau 21 résume les tendances à l'augmentation ou la diminution de chacune des structures secondaires pour les deux fonctionnalisations par rapport à une surface non greffée. On constate que peu importe la fonctionnalisation, la proportion en structure exposée par les protéines suit la même tendance. Les groupements fonctionnels greffés sont tous les deux

hydrophiles et chargés négativement. Ces propriétés peuvent alors fortement contribuer aux changements d'orientation de la protéine, menant à l'exposition préférentielle de certaines de leurs régions. Néanmoins, des variations restent présentes concernant la proportion exacte de chaque structure et dans le cas de la fibronectine, la proportion en hélices α a tendance à fortement diminuer sur les surfaces greffées par le PNaSS, alors qu'elle augmente pour le PAAc-pH. La différence de densité en groupements chargés pour les deux fonctionnalisations, mis en évidence par dosage colorimétrique au BT, peut contribuer à expliquer les variations.

Ces résultats restent estimatoires, mais permettent de réaliser de premières comparaisons et de formuler des hypothèses concernant les différentes réponses biologiques observées, notamment concernant l'adhésion des fibroblastes.

Greffage	BSA		Fn		Fg	
	PAAc-pH	PNaSS	PAAc-pH	PNaSS	PAAc-pH	PNaSS
%Feuillet β	-					
%Aléatoire						
%Hélice α	-	-				
%Spire β						

Tableau 21 : Résumé des tendances à la diminution ou à l'augmentation de la proportion en différentes structures secondaires des protéines sur des surfaces greffées par le PAAc-pH et le PNaSS en comparaison aux surfaces de PDMS non greffées

3.3. Interactions entre les polymères bioactifs et le collagène, vers des perspectives d'immobilisation de composés en surface

Le collagène est une protéine abondante de la matrice extracellulaire. C'est une protéine structurale jouant le rôle de support pour les cellules. Dans la littérature, de nombreux auteurs mettent en avant l'utilisation de composés biologiques, notamment les protéines, pour fonctionnaliser les surfaces. La compréhension plus avancée de leur mode d'action en surface à l'égard de l'environnement biologique permet d'utiliser ces composés en alternatives aux méthodes physico-chimiques [147]. Kefallinou *et al.* réalisent l'immobilisation du collagène sur des surfaces de PDMS. Celle-ci est effectuée directement après traitement par plasma des surfaces. L'objectif est de pallier les problèmes d'hydrophobie du PDMS, contraignante pour l'attachement de cellules, pour des applications en microfluidique où la culture de souches mésenchymateuses est effectuée. Les auteurs mettent en avant l'aspect très compatible du collagène avec les cellules. Ainsi, leur stratégie ne nécessite pas l'utilisation de molécules chimiques. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la prolifération des cellules mésenchymateuses sur le PDMS fonctionnalisé [125]. Kasálková *et al.* vont plus loin en

fonctionnalisant des surfaces de PDMS par plasma et immobilisation de collagène, en créant différentes structures par photolithographie [148]. Les auteurs ont de cette manière été capables de guider la prolifération de myoblastes de souris. L'architecture de surface couplée à l'immobilisation de protéine constitue alors une voie de fonctionnalisation prometteuse de biomatériaux. Ao *et al.* ont de leur côté immobilisé du collagène de type I sur des surfaces de titane. Les auteurs mettent en avant l'importance de l'attachement covalent de la protéine sur leur surface en prouvant l'amélioration de la prolifération et la différenciation de cellules mésenchymateuses dans ces conditions [147]. Ao *et al.* et Müller *et al.* utilisent des agents chimiques pour immobiliser de manière covalente le collagène [147,149].

C'est à partir de ce constat de la littérature que quelques expériences ont été menées afin d'observer l'influence des greffages réalisés sur le collagène. Ces expériences ont également pour but d'observer si une immobilisation du composé peut être envisagée en surface, avec ses conséquences. Les études réalisées dans cette partie sont cependant préliminaires, elles nécessitent d'être peaufinées et davantage complétées et exploitées. Elles sont tout de même présentées car les différences observées sont pertinentes et peuvent constituer un appui pour la continuité du projet.

La concentration en collagène utilisée lors de ces expériences a été déterminée par des tests successifs de manière à détecter la présence de la protéine en surface. Ensuite, des adsorptions d'une heure et de 24 heures ont été réalisées afin d'observer si des différences apparaissaient. Celles-ci ont été mises en évidence par spectroscopie FTIR et n'ont été testées que sur des surfaces non greffées et greffées PAAc-pH. On observe sur la Figure 112, que seuls des épaulements de faible intensité caractéristiques des bandes amide I et amide II sont visibles sur les surfaces non greffées. En revanche, ces bandes sont plus marquées en intensité sur les surfaces greffées. La bande large à $3100-3700\text{ cm}^{-1}$ caractéristique de la bande amide A est également visible. Curieusement, la bande amide II est plus intense que la bande amide I après 1 heure d'adsorption. Après 24 heures c'est l'inverse, la bande amide I est plus intense que la bande amide II. Cette observation reflète l'influence du temps d'adsorption des protéines sur leur conformation et leur orientation [79]. Ce paramètre ne pourra pas être traité ici mais mérite d'être pris en compte pour de futures études et caractérisations. Ces premiers résultats ont finalement montré la présence de collagène sur les surfaces.

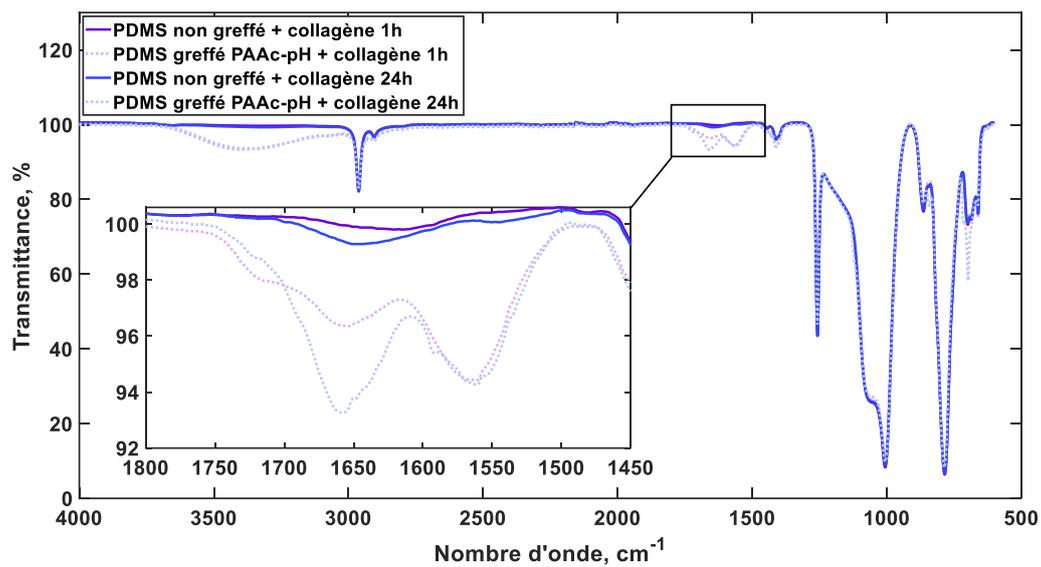


Figure 112 : Essais d'adsorption de collagène sur du PDMS non greffé et greffé PAAc-pH pendant 1 heure et 24 heures

À partir de ces résultats, il a été envisagé d'observer microscopiquement le collagène adsorbé sur le PDMS. Pour cela, les expériences décrites dans le Chapitre 2 partie 5.4.3 ont été réalisées. Grâce à l'utilisation d'un kit de trichrome de Masson, les surfaces ont été colorées pour permettre l'observation des cellules et du collagène. Elles sont présentées Figure 113 pour l'expérience avec incubation des cellules puis adsorption de collagène, et Figure 114 pour l'expérience de 24 heures d'incubation avec un mélange de fibroblastes et collagène.

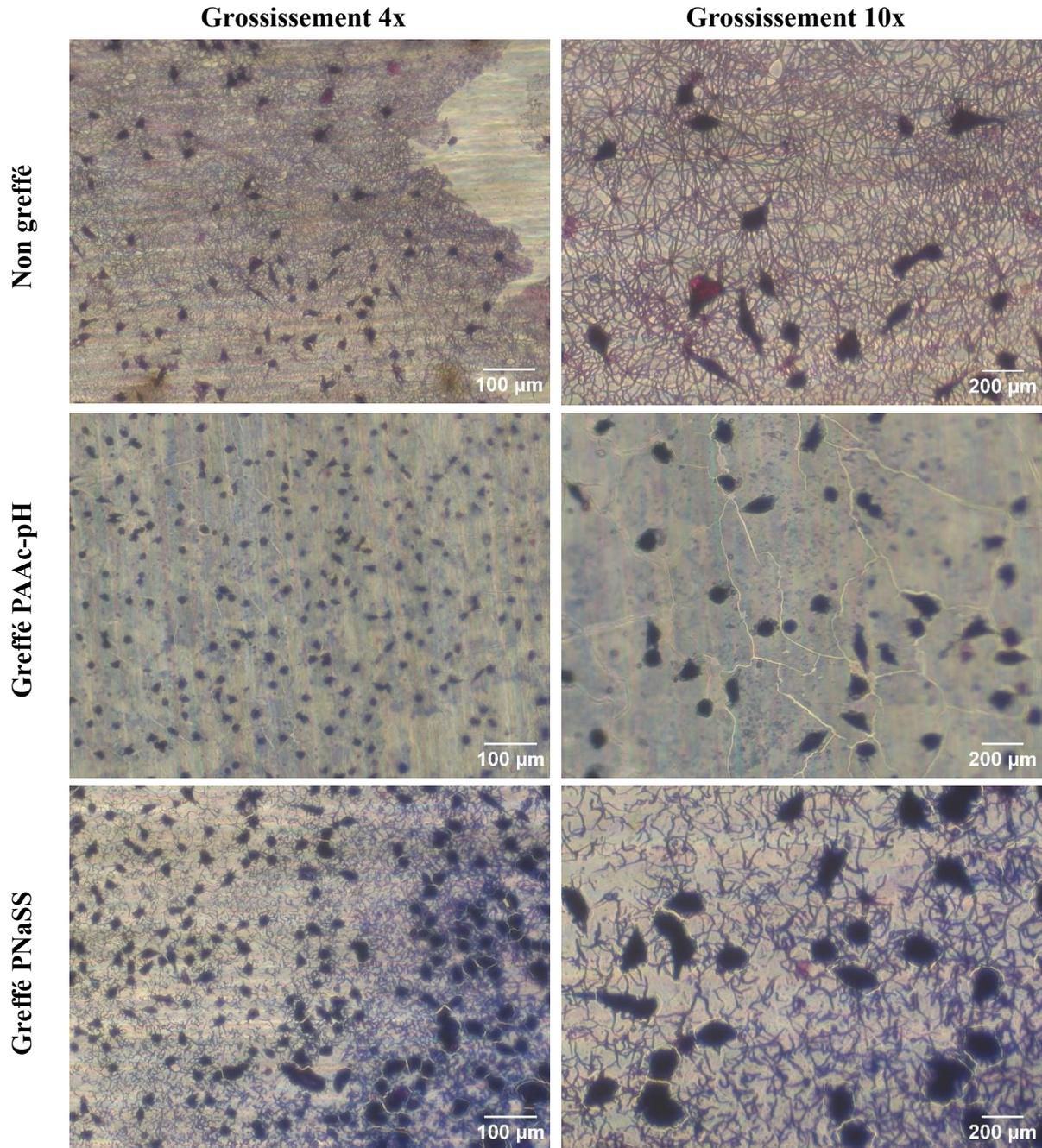


Figure 113 : État des surfaces de PDMS colorées après incubation de fibroblastes pendant 2 heures puis adsorption de collagène pendant 24 heures, pour des surfaces non greffées, greffées PAAC-pH et greffées PNaSS à grossissements 4x et 10x

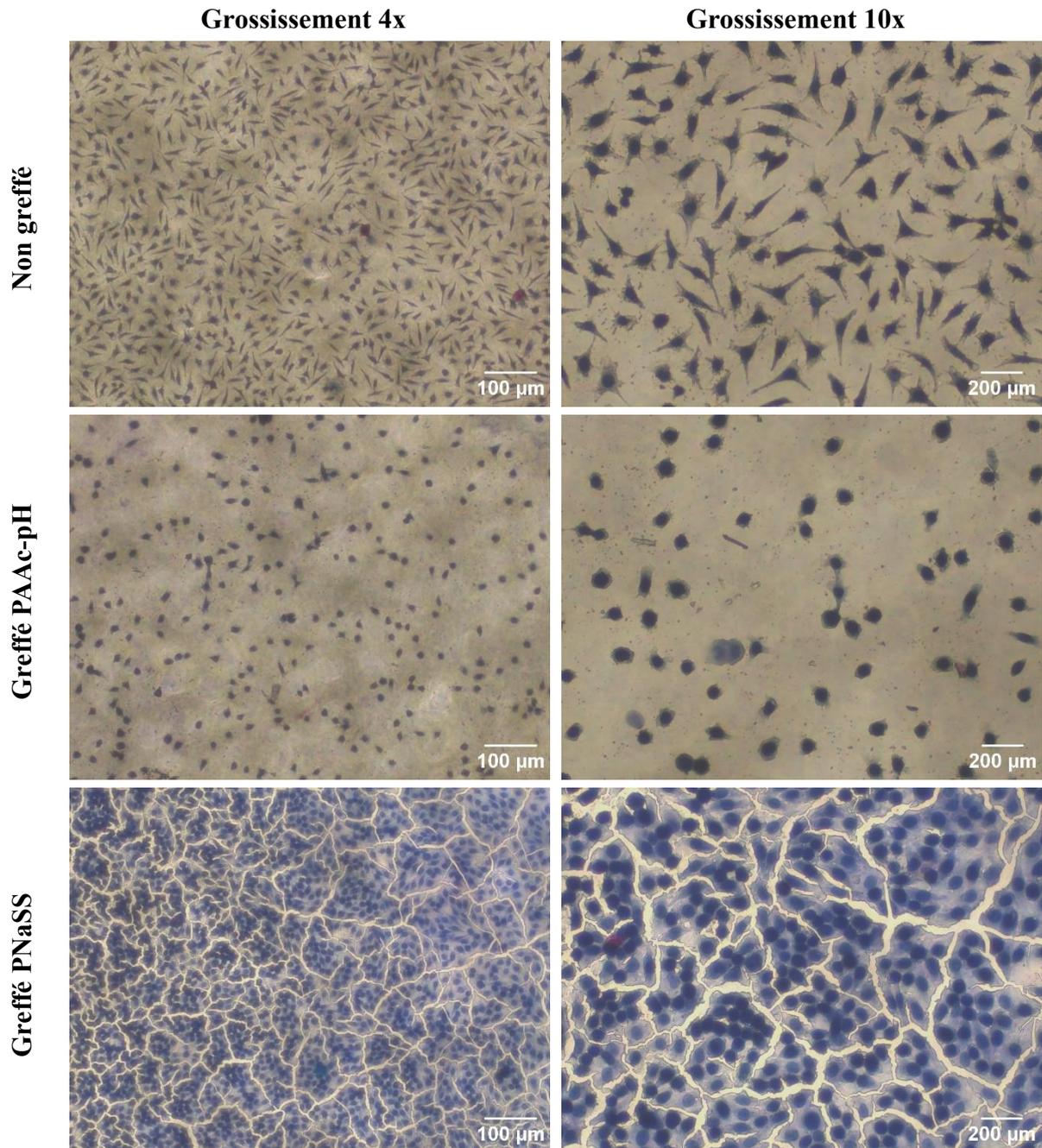


Figure 114 : État des surfaces de PDMS colorées après incubation en présence d'un mélange de fibroblastes et de collagène pendant 24 heures, pour des surfaces non greffées, greffées PAAc-pH et greffées PNaSS à grossissements 4x et 10x

Ces images de microscopie montrent des tendances différentes pour chaque condition. Dans le cas où les fibroblastes sont d'abord incubés puis le collagène ensuite adsorbé (Figure 113), les surfaces greffées par le PAAc-pH ne semblent pas favoriser l'immobilisation d'une quantité importante de collagène. Les quelques cellules adhérentes sont colorées en bleues et sont entourées de quelques zones bleutées. En revanche, le PDMS non greffé et greffé par le PNaSS

montre le développement d'un réseau fibreux de collagène. Mais on observe que sur le PDMS non greffé un réseau étendu est formé, tandis que sur le PNaSS, le collagène semble être plus dispersé et les fibres disjointes les unes des autres. Par ailleurs, les zones observées sont assez inhomogènes. Ce constat peut s'expliquer soit par les conditions expérimentales de coloration et aux mélanges successifs à répétition, soit par une inhomogénéité du greffage. Ces expériences doivent être à nouveau menées pour confirmer leur répétabilité. Néanmoins ces premières observations mettent en évidence que le greffage de polymère influe sur l'adhésion spécifique du collagène.

Dans l'expérience réalisée pendant 24 heures avec un mélange de collagène et de cellules (Figure 114), les réseaux fibreux ne sont plus observés. Les surfaces non greffées sont couvertes de cellules développées et arborant une forme étirée. Sur le PDMS greffé par le PAAc-pH, moins de cellules se sont attachées et gardent toutes une forme arrondie. Pour ces deux conditions, les fibroblastes ont tout de même pris une coloration bleutée caractéristique de la présence de collagène. C'est pour le PDMS greffé par le PNaSS que la différence est plus flagrante. La surface montre un développement très important de cellules entourées par une suspension bleue. Leur prolifération est largement augmentée. La présence du collagène aurait une incidence favorable sur le développement des cellules avec ce greffage. Ainsi, on peut imaginer que pour des applications nécessitant le développement des cellules, comme précédemment évoqué avec Kefallinou *et al.* [125], la présence d'une couche greffée de PNaSS immobilisant le collagène pourrait favoriser et accélérer la prolifération.

François *et al.* décrivent que la fibronectine exprime plusieurs domaines structuraux et fonctionnels permettant la liaison sélective de composés tels que le collagène [47]. Sur le même principe, nous avons vu précédemment que c'est le domaine RGD, lorsqu'il est exposé, qui favorise l'attachement des fibroblastes. C'est sur ce même raisonnement que peut s'expliquer l'attachement favorable du collagène observé ici sur les surfaces fonctionnalisées par le PNaSS. De la même manière que pour l'attachement des cellules, le polymère peut orienter la fibronectine sécrétée par les cellules de manière à favoriser l'attachement du collagène.

Ces observations préliminaires mettent en évidence les modifications engendrées quant à l'immobilisation de collagène sur les surfaces lorsque le PDMS est fonctionnalisé. Elles constituent une piste de recherche mais restent à l'état d'observation et nécessitent d'être approfondies. Des expériences complémentaires doivent être menées en augmentant notamment les temps d'incubation et en modifiant les concentrations déposées. La répétabilité des expériences doit être vérifiée, ou encore l'uniformité ou l'homogénéité de la répartition des molécules immobilisées. À l'échelle du laboratoire, des mesures d'angles de contact apparent peuvent être menées, ainsi que la quantification du collagène déposé en utilisant la méthode de Bradford. Néanmoins, à ce stade, ces premiers résultats permettent d'imaginer la fonctionnalisation d'un biomatériau par de multicouches permettant d'agir sur différents

paramètres de l'environnement biologique. Le greffage à lui seul a montré une action sur les protéines du milieu biologique et par conséquent sur l'attachement des cellules. L'immobilisation du composé biologique ajoute une fonctionnalité, susceptible d'agir en elle-même sur l'environnement biologique ou d'améliorer les fonctionnalités initiales.

3.4. Conclusion partielle

La principale différence observée entre les deux polymères bioactifs à l'égard de la réponse biologique réside dans l'adhésion des fibroblastes en surface. Le PNaSS a tendance à accélérer l'adhésion et la prolifération des cellules, tandis que le PAAc arbore un comportement plutôt antiadhésif agissant en faveur du ralentissement de la prolifération cellulaire. Les investigations autour de la fibronectine, protéine intervenant dans l'adhésion des cellules, permettent de formuler des explications. L'estimation de sa structure secondaire montre des similarités entre une fonctionnalisation par le PAAc et le PNaSS. Mais la proportion en hélices α , initialement faible, se voit fortement diminuée après greffage du PNaSS. De manière générale, en comparaison à une surface non greffée, l'estimation de la structure secondaire des protéines adsorbées sur les PDMS fonctionnalisés suit la même tendance. C'est lors de l'analyse des spectres FTIR que la différence est plus flagrante. La bande correspondant à l'amide I est plus intense que la bande amide II sur le spectre du PDMS greffé par le PNaSS, tandis que le contraire est observé pour le greffage du PAAc. L'environnement moléculaire autour de ce dernier semble alors différent. La plus haute densité de charges en surface et la forte possibilité pour la protéine de former des liaisons hydrogène avec les groupements carboxylate peut expliquer cette différence. Alors, même si la proportion en différentes structures des protéines semble similaire, l'orientation de la protéine peut différer. Les domaines RGD des protéines favorisant l'adhésion des cellules peuvent être exposés dans le cas du PNaSS, mais cachés dans le cas du PAAc.

L'observation des protéines adsorbées sur les surfaces par AFM pourrait confirmer ces hypothèses. En effet, Lam *et al.* ont mis en évidence le changement d'orientation de la BSA et de la Fn sur des surfaces de silicone fonctionnalisées par le PNaSS [96]. La BSA arbore une structure globulaire sur les surfaces non greffées. Cette même structure est observée sur le silicone greffé mais avec des globules de taille plus petite. L'arrangement de la Fn sur les surfaces greffées est sous forme globulaire, alors qu'elle arbore une structure fibrillaire sur les surfaces non greffées. Tunc *et al.* ont quant à eux comparé l'orientation du Fg entre une surface hydrophobe et hydrophile [35]. Sur la première, le Fg arborait une forme globulaire tandis que sur la seconde, la forme trinodulaire du Fg était clairement visible. Sit *et al.* ont eux observé l'orientation du Fg sur des surfaces hydrophobes chargées positivement et négativement [150]. Cette fois, une forme trinodulaire apparaissait dans les deux cas (Figure 115), mais pour la

surface chargée négativement, la protéine arborait une forme en « U » sur certaines zones, visible sur la Figure 115b. De la même manière on peut s'attendre à observer des changements d'orientation sur nos surfaces densément chargées négativement, hydrophiles et dont les spectres FTIR ont mis en évidence le probable changement de conformation. Ces observations sont en cours de réalisation.

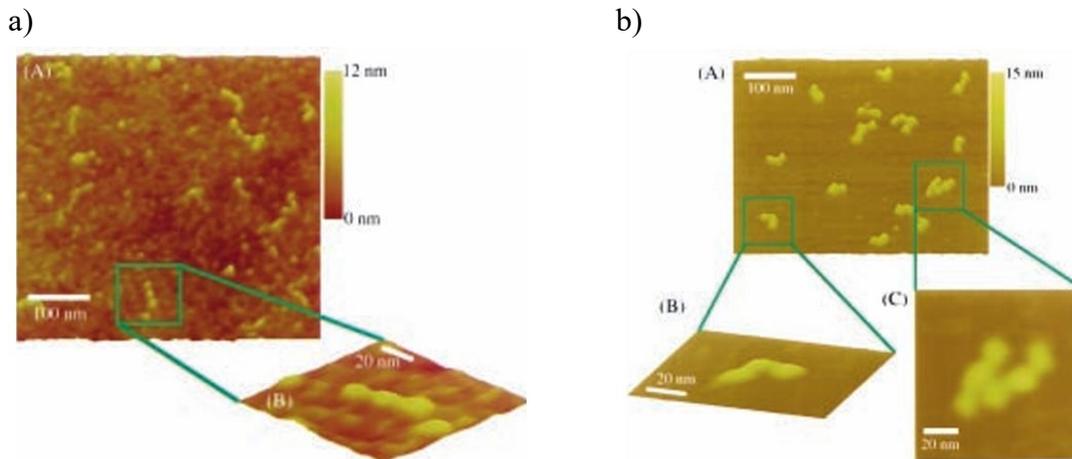


Figure 115 : Images AFM du Fg déposé sur des surfaces hydrophobes a) chargées positivement, b) chargées négativement, la forme en « U » de certaines protéines est visible sur l'image (B) [150]

Finalement, si l'on reprend la problématique de l'implant mammaire, le PNaSS a été choisi pour fonctionnaliser les surfaces car il favoriserait une intégration rapide de l'implant dans le corps via la prolifération cellulaire accélérée. Néanmoins, cette condition doit être accompagnée d'une limitation de la colonisation bactérienne, sinon, la dégénération de la capsule fibreuse et les complications persistent. Ce phénomène conduit par ailleurs à un retrait difficile de l'implant si une intervention est nécessaire. La fonctionnalisation par le PAAc-pH perturbe le mécanisme initial en limitant au départ la colonisation de la surface par les cellules et par conséquent le développement rapide d'une capsule. En revanche, doit s'ensuire également l'antiadhésion de bactéries. Dès les premiers instants après implantation, si l'antiadhésion des bactéries est également vérifiée, la fonctionnalisation par le PAAc-pH peut permettre de limiter les infections liées à l'intervention opératoire. Cependant, les questions liées aux conséquences d'une implantation à long terme persistent. Alors, cette fonctionnalisation unique est peut-être plus adaptée à l'implantation de dispositifs médicaux sur de courtes durées, tels que les sondes endotrachéales [32]. La pandémie de la covid-19 soulève d'autant plus cette problématique. Le matériel médical comme la sonde endotrachéale initialement mise en place pour une courte durée, se retrouve posée pendant plusieurs mois chez le patient [151–154]. Par conséquent son intégration dans le corps n'est pas souhaitée, induisant un retrait difficile du dispositif. Aussi, le prolongement de son utilisation favorise les risques

d'infections. Ainsi, la fonctionnalisation de la surface par des composés tels que le PAAc sont attractifs pour limiter ce type de problématiques.

Enfin, la multiplication de plusieurs groupements fonctionnels en surface du matériau peut permettre de combiner les propriétés induites par ces groupements. On peut notamment penser à combiner les effets des groupements carboxylates et sulfonates étudiés ici. Cette notion est d'autant plus attrayante si elle permet de toucher un plus large spectre de bactéries pouvant adhérer en surface. Sur la même idée, l'immobilisation d'autres composés sur ces surfaces fonctionnalisées a été envisagé. Le collagène en tant que composé naturel biologique a donc été évoqué comme perspective. La protéine a alors dans un premier temps été mise au contact de ces surfaces pour étudier les interactions possibles. Les résultats restent pour le moment à l'état d'observation, où par exemple le PNaSS combiné au collagène semble davantage favoriser la prolifération de fibroblastes. Ces résultats constituent des perspectives de travail attrayantes pour améliorer les fonctionnalités de surface de biomatériaux.

Afin de compléter ces résultats et ajouter des paramètres d'analyse, des premières analyses microbiologiques ont été réalisées sur le PDMS fonctionnalisé et font l'objet de la partie suivante.

4. Analyses microbiologiques

4.1. Choix des conditions et des bactéries

Des analyses microbiologiques ont été mises en place afin d'observer l'impact de la fonctionnalisation des surfaces de PDMS sur des bactéries. Ce sont les bactéries *S. epidermidis* qui ont été choisies afin de réaliser cette étude en raison de leur implication dans le développement du LAGC mis en cause par la pose d'implants mammaires en silicone [11,29,30]. Dans le but d'envisager d'autres applications à fonctionnaliser avec les groupements carboxylate, l'étude doit également être appliquée à d'autres bactéries. Cependant, ce travail devrait alors faire l'objet d'une étude à part entière consacrée essentiellement à ce point. L'analyse réalisée ici constitue néanmoins une base de travail. Elle permet de formuler de premières interprétations concernant l'impact de la fonctionnalisation réalisée au cours de ces travaux de thèse et d'effectuer une comparaison avec le polyNaSS. En effet, lors des précédents travaux réalisés au laboratoire [50], la fonctionnalisation du PDMS par le PNaSS a été spécifiquement établie afin de lutter contre les problèmes liés aux implants mammaires. L'étude misait sur une intégration améliorée de l'implant une fois fonctionnalisé par les groupements sulfonates, combiné à une action antibactérienne. L'influence de ces deux groupements chimiques greffés vis-à-vis de la réponse microbiologique est alors discutée ici.

Dans le Chapitre 2 partie 6 est décrit le protocole mis en place pour réaliser cette étude microbiologique. Le Tableau 11 y résume les conditions étudiées. Chaque surface de PDMS : non greffée, fonctionnalisée par le PAAc-pH et par le PNaSS a été mise en contact de *S. epidermis*. Les mêmes expériences ont également été réalisées avec pré-adsorption de Fn et Fg.

4.2. Résultats

La Figure 116a présente les résultats obtenus après dépôt de bactéries sur les surfaces sans adsorption préalable de protéines. Il est observé qu'une quantité plus importante de bactéries s'attachent aux surfaces greffées en comparaison au PDMS non greffé. Ce phénomène correspond probablement à l'ajout de matière organique en surface susceptible d'interagir avec les *S. epidermidis*. Lors de ces expériences, l'adhésion des bactéries sur les surfaces fonctionnalisées par le PNaSS est en moyenne plus élevée. Kara *et al.* ont montré en immobilisant du chitosane sur des films de polyuréthane, que la réduction de l'adhésion bactérienne en surface était plus marquée pour *P. aeruginosa* que pour *S. aureus*. Les auteurs expliquent que le mécanisme d'action antibactérienne du chitosane, molécule chargée positivement, repose sur son interaction avec les membranes microbiennes chargées négativement. Cette interaction empêche le transfert de masse à travers la paroi cellulaire conduisant à la fuite de constituants intracellulaires des bactéries accélérant leur mort. La

membrane externe de *P. aeruginosa* est composée principalement de lipopolysaccharides contenant des groupes phosphate et pyrophosphate. Ces groupes augmentent la densité de charge négative de la molécule, ce qui conduit à une attraction plus importante vers la surface chargée positivement du chitosane [155]. Ainsi, l'attraction de *P. aeruginosa* avec le chitosane est plus importante que celle de *S. aureus*. Cet exemple de la littérature met en avant une sélectivité vis-à-vis de bactéries. La présence de charge en surface et leur densité permet d'agir spécifiquement contre une catégorie de bactérie. Ces paramètres peuvent expliquer les différences obtenues entre les deux fonctionnalisations lors de nos expériences. Ces expériences ont pour la suite été réalisées en présence des protéines. Elles permettent de se rapprocher un peu plus des conditions réelles.

Sur la Figure 116b et la Figure 116c sont présentés les résultats obtenus après adsorption préalable de Fn et de Fg respectivement sur les surfaces. Ces conditions ont été retenues en raison du rôle joué par ces protéines dans l'adsorption de bactéries sur les surfaces de biomatériaux [19,47,92]. Les bactéries de type staphylocoque possèdent des adhésines qui reconnaissent spécifiquement les récepteurs de ces protéines [19]. D'emblée, on constate que la quantité de bactéries adsorbées sur les échantillons non greffés est beaucoup plus importante que pour la condition sans protéines. Lorsque les surfaces sont greffées, une augmentation de la quantité de bactéries adhérees est également constatée. Dans le cas de l'adsorption préalable de Fn (Figure 116b), peu de variations sont observées lorsque les surfaces sont fonctionnalisées en comparaison au PDMS non greffé. Le changement d'orientation de la fibronectine ne semble pas influencer de manière significative l'adhésion des bactéries *S. epidermidis*. Il a en effet été montré par Chourirfa *et al.* que ces protéines intervenaient préférentiellement dans l'inhibition de l'adhésion d'autres catégories de bactéries comme les *S. Aureus* [94,156]. Par ailleurs, la faible quantité de Fn adsorbée en surface pourrait également expliquer ce constat. En revanche, un changement significatif est observé lorsque le Fg est adsorbé (Figure 116c). Sur les surfaces non greffées, $8,08.10^5$ CFU.mL⁻¹ ont adhéré en surface. Ce résultat montre dans un premier temps l'affinité importante de la bactérie *S. epidermidis* pour le Fg adsorbé sur une surface non greffée. La quantité de bactéries adhérees semble alors être dépendante de la protéine présente en surface. Lorsque les surfaces sont fonctionnalisées, la quantité de bactéries adhérees est considérablement diminuée avec $3,72.10^5$ CFU.mL⁻¹ et $3,07.10^5$ CFU.mL⁻¹ pour le PDMS greffé par le PAAc-pH et le PNaSS respectivement. Ces résultats représentent 54 % et 62 % d'inhibition bactérienne. Vasconcelos *et al.* ont travaillé sur l'adsorption de *S. epidermidis* sur des surfaces de titane fonctionnalisées par le PNaSS. L'étude a été menée avec adsorption préalable de Fn et de Fg. Le constat est similaire aux résultats obtenus dans notre étude : lorsque le Fg est pré-adsorbé sur le titane, une diminution significative du nombre de bactéries adhérees est observée entre une surface non greffée et greffée. Tandis qu'avec la pré-adsorption de Fn, une quantité similaire de *S. epidermidis* est adhéree entre les deux conditions [92].

Peu de différences sont observées entre les deux fonctionnalisations. Ce résultat peut être corrélé avec la proportion en structures secondaires similaire, analysée précédemment lors de l'adsorption de Fg sur ces surfaces fonctionnalisées (Figure 111).

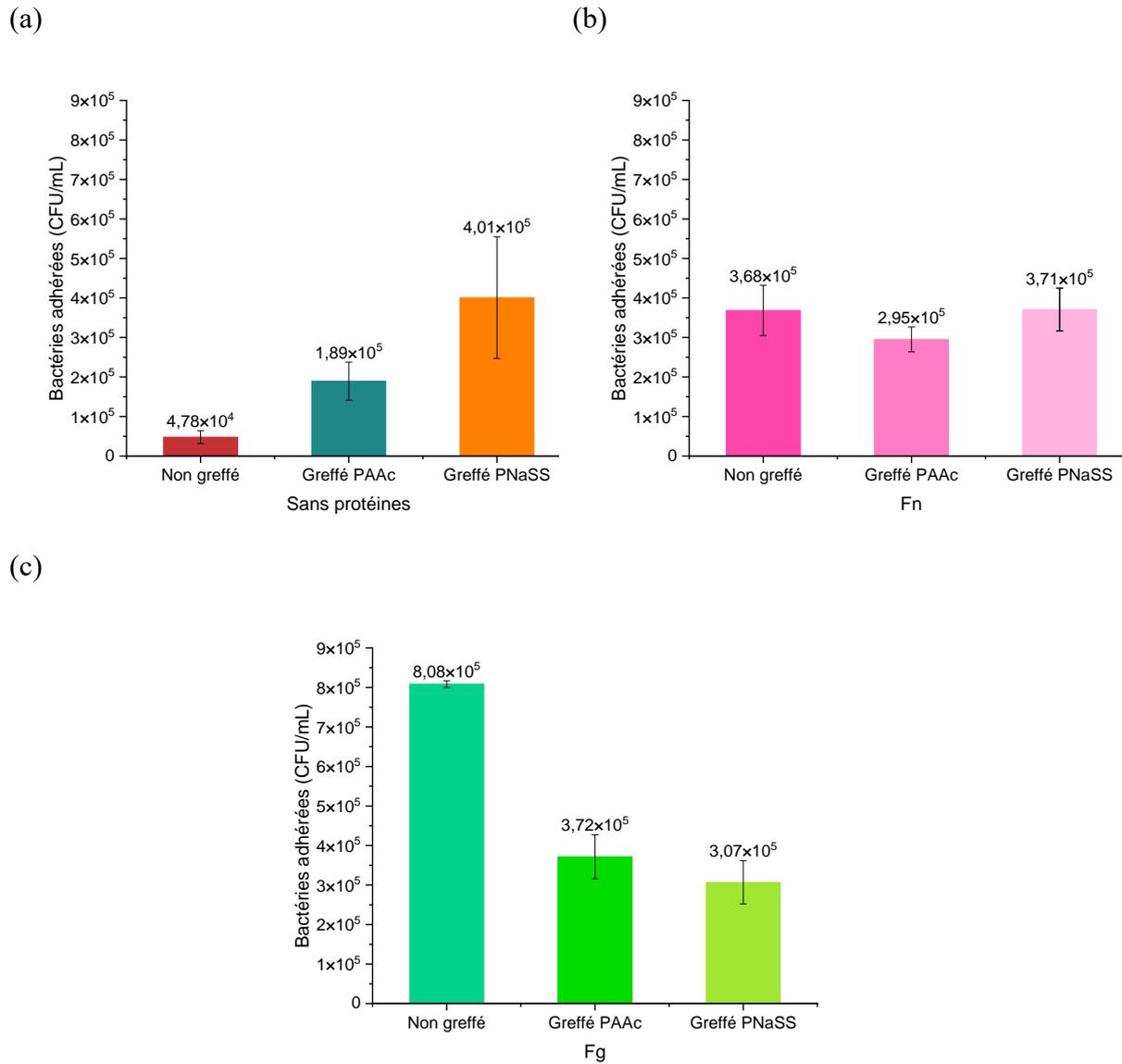


Figure 116 : Concentration en *S. epidermidis* adhérent sur les surfaces de PDMS (CFU/mL) (a) sans adsorption préalable de protéines, (b) avec pré-adsorption de Fn et (c) avec pré-adsorption de Fg

Finalement, ces premiers tests microbiologiques se sont avérés révélateurs de plusieurs paramètres :

- L'importance de la présence de la couche protéique en surface du biomatériau, intervenant dans le mécanisme biologique de surface. Les résultats et tendances observés sont contradictoires si ce paramètre n'est pas pris en compte.
- L'affinité particulière de *S. epidermidis* pour le Fg.
- La réduction majeure de l'adhésion de *S. epidermidis* sur les surfaces fonctionnalisées où le Fg s'est adsorbé en comparaison à la surface non greffée. Ce résultat serait principalement motivé par le changement d'orientation des protéines sur les surfaces fonctionnalisées.
- Ces deux derniers points mettent en évidence la dépendance bactérie/protéine et protéine/surface.
- Le greffage des composés anioniques carboxylate et sulfonate a montré des résultats similaires concernant l'inhibition de *S. epidermidis* lorsque le Fg entre en jeu.

À l'avenir, l'étude doit être complétée avec l'analyse de l'adsorption d'autres bactéries telles que *R. Pickettii* ou encore *P. aeruginosa*. Ces bactéries interviennent également dans la dégénérescence des capsules post opératoires des implants mammaires et dans le développement du LAGC [11]. Ces analyses complémentaires préciseront l'influence de la fonctionnalisation à l'égard de différents composés bactériens et d'autres dépendances de ces bactéries vis-à-vis des protéines.

5. Bilan

L'ensemble de ce chapitre fait le point sur les premières réponses biologiques obtenues lors de la fonctionnalisation des surfaces de PDMS par le PAAc-pH, puis par le PNaSS à titre de comparaison.

Lorsque les fibroblastes sont incubés avec les surfaces fonctionnalisées par le PAAc-pH, ceux-ci adhèrent peu et montrent par conséquent un ralentissement considérable de leur prolifération sur l'implant. Le constat est similaire lorsque les protéines d'adhésion des cellules sont préalablement adsorbées sur les surfaces. Alors, deux hypothèses ont été mises en avant : soit les protéines subissent également un mécanisme d'antiadhésion en surface, soit celles-ci subissent un réarrangement conformationnel et/ou d'orientation. Les méthodes de caractérisation par spectroscopie FTIR et mesure d'angle de contact apparent ont d'abord mis en évidence la présence des protéines sur les surfaces. Puis, le dosage colorimétrique par la solution de Bradford ainsi que l'estimation des structures secondaires des protéines ont permis de confirmer la seconde hypothèse. Enfin, des premiers essais microbiologiques en présence de *S. epidermidis* ont été menés. Les résultats montrent que la fonctionnalisation du PDMS réduit notablement la quantité de bactéries adhérentes en surface lorsque le fibrinogène y est pré-adsorbé. Ce résultat est notamment intéressant d'un point de vue mécanistique. Il montre en effet la dépendance d'une catégorie de bactéries envers une classe de protéines, ainsi que l'effet du changement d'orientation du Fg sur leur adhésion.

Finalement, la fonctionnalisation chimique des surfaces de PDMS perturbe les mécanismes biologiques de surface. Le Tableau 22 résume les principales conclusions pouvant être tirées lors de la fonctionnalisation du PDMS par le PAAc-pH et le PNaSS à l'égard des cellules, des protéines et des bactéries (*S. epidermidis*). Ces nouvelles propriétés de surface mises en lumière permettent d'apporter des éléments de réponse quant aux avantages et inconvénients à tirer de ces différentes fonctionnalisations. Ainsi, s'ajoutent des paramètres permettant de déterminer quelles fonctionnalisations sont les mieux adaptées à des applications biomédicales spécifiques.

Ces différents résultats pointent également les dépendances uniques de chaque protéine vis-à-vis des surfaces et vis-à-vis de la fonctionnalisation. Aussi, le comportement des protéines en surface est dépendant de leur concentration initiale en solution. Enfin, une affinité particulière des bactéries à l'égard des protéines est établie.

Ces différents constats mettent en évidence la complexité des mécanismes biologiques en surface du biomatériau. La fonctionnalisation de surface a, certes, des conséquences importantes sur les schémas biologiques initiaux, mais les interdépendances entre biomolécules et les nombreuses interactions possibles sont toutes à prendre en compte.

	PAAc-pH	PNaSS
Cellules	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'adhésion des fibroblastes. • Ralentissement considérable de la prolifération des fibroblastes en surface après au moins 7 jours d'incubation. • Formation d'amas cellulaires après 7 jours d'incubation, sur certaines régions de la surface où l'adhésion restait possible. 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la viabilité cellulaire de surface, conséquence de l'amélioration de la prolifération des fibroblastes [95].
Protéines	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion de BSA, de Fn et de Fg en surface en quantité similaire à une surface témoin. • Orientation préférentielle des protéines adsorbées. • Proportions en structures secondaires des protéines modifiées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion de BSA, de Fn et de Fg en surface en quantité similaire à une surface témoin. • Orientation préférentielle des protéines adsorbées [96] : La BSA arbore une structure globulaire plus petite mais plus dense que la surface témoin. La Fn arbore une structure globulaire tandis que sur la surface témoin, une structure fibrillaire était observée. • Proportions en structures secondaires des protéines modifiées.
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'adhésion de <i>S. epidermidis</i> en présence de fibrinogène. 	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'adhésion de <i>S. epidermidis</i> en présence de fibrinogène.

Tableau 22 : Bilan des principales différences observées en surface de PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH et le PNaSS à l'égard des cellules, des protéines et bactéries étudiées

Chapitre 5 – Perspectives analytiques de la fonctionnalisation de surfaces de PDMS

Ce dernier chapitre est construit de manière à parcourir les derniers travaux réalisés autour de la fonctionnalisation du PDMS et de la compréhension des mécanismes de surface. Les résultats obtenus constituent des perspectives de poursuite d'étude.

Ce chapitre est composé de plusieurs parties indépendantes divisées comme telles :

- Une première partie est consacrée à l'étude du rôle du motif moléculaire du monomère choisi sur le greffage en surface et la réponse biologique. En effet, on constate que les groupements sulfonate et carboxylate peuvent avoir des points communs, comme conférer une mouillabilité et des charges négatives en surface. Néanmoins, la réponse biologique diffère : le poly(NaSS) accélère la prolifération des cellules en surface, le PAAc la freine. Alors, de nouveaux monomères porteurs de groupements carboxylate mais de motifs moléculaires changés ont été greffés par la méthode « grafting from ». Leur comportement en surface ainsi que les mécanismes à l'interface entre le matériau et le milieu biologique ont été étudiés.
- Sur le même ordre d'idée, il a été question de greffer sur le PDMS des chaînes de polymère de taille contrôlée par la méthode « grafting to » afin d'étudier les différences avec les précédents greffages. Ces essais ont pour but d'évaluer l'impact d'une configuration précise du polymère attaché en surface.
- La multifonctionnalisation des surfaces étant un point soulevé lors de l'étude bibliographique, les effets synergiques du PAAc et du PNaSS greffés en surface du PDMS ont été examinés. Cette étude a été menée par la synthèse et le greffage d'un copolymère.

1. Rôle du motif moléculaire du polymère bioactif sur les propriétés de surface

Au cours des chapitres précédents, les méthodes de caractérisation ont permis d'étudier le comportement et l'influence des polymères bioactifs utilisés. L'intérêt final réside dans leur action envers le milieu biologique. Il a été démontré que ces polymères agissaient principalement sur la conformation et l'orientation des protéines en surface, impactant la réponse cellulaire. Les hypothèses principales, appuyées par la littérature [10,38,79], mettent en avant que le caractère hydrophile et les charges apportées par ces polymères en surface sont les paramètres qui influent le plus le comportement des protéines. Portés par les groupements COO^- et SO_3^- , ces deux propriétés composent les polymères PAAc et PNaSS. Or, le premier engendre l'antiadhésion des cellules, tandis que le second favorise leur prolifération (Figure 117). D'autres propriétés doivent alors influencer sur ce phénomène. Les analyses biologiques ont alors montré des différences entre la conformation des protéines adsorbées sur ces deux greffages. Aussi, les caractérisations chimiques ont montré qu'une densité plus importante de groupements était présente en surface du PDMS greffé par le PAAc. Les résultats topographiques enfin, ont souligné le comportement différent des polymères greffés en surface. Alors, pour aller plus loin sur ces analyses, des investigations ont été menées autour de polymères porteurs des mêmes groupements chimiques principaux, mais avec un motif moléculaire changé. Les différentes caractérisations menées permettront de voir de quelle manière la méthode « grafting from » influe sur la configuration de ces nouveaux polymères, et s'ils modifient la réponse biologique.



Figure 117 : Schéma illustratif des interactions possibles entre le PDMS greffé (PAAc ou PNaSS), les protéines et les cellules

1.1. Choix des monomères

Pour réaliser cette étude, deux nouveaux monomères ont été choisis pour réaliser l'étape de greffage : l'acide vinylbenzoïque (AcV) (Figure 118a) et l'acide 4-(4-(acryloyloxy)butoxy)benzoïque (AbAc) (Figure 118b).

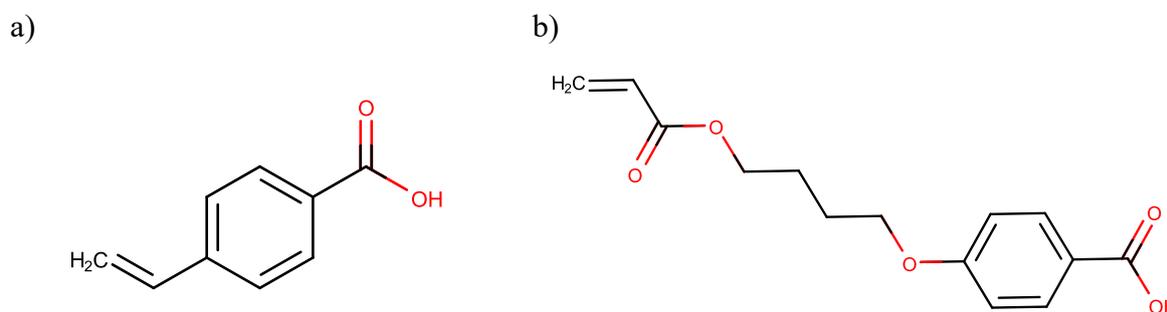


Figure 118 : Schéma moléculaire de a) l'acide vinylbenzoïque et b) l'acide 4-(4-(acryloyloxy)butoxy)benzoïque

Le premier monomère a été étudié car il possède la même structure moléculaire que le NaSS, à l'exception du groupement fonctionnel en bout de chaîne, $-\text{COOH}$, identique à celui de l'AAC. Le second monomère arbore la même configuration que l'AcV en bout de chaîne : la présence du cycle aromatique porteur du groupement fonctionnel $-\text{COOH}$. En revanche il possède une chaîne moléculaire principale plus longue.

Le greffage de l'acide poly(vinylbenzoïque) (PVAc) permettra de vérifier plusieurs aspects : la réactivité du monomère en comparaison à l'AAC et le rôle éventuel du cycle aromatique dans la gêne stérique et dans la configuration du polymère formé. En effet, nous avons vu dans le premier chapitre partie 2.2.2, que la méthode « grafting from » génère en surface des configurations spécifiques en fonction du monomère utilisé et de sa réactivité. Cela impacte la longueur des chaînes formées, la densité de charges présentes, ou encore la topographie de surface (Figure 17) [10]. De la même manière, le greffage de l'acide 4-(4-(acryloyloxy)butoxy)benzoïque (PAbAc) permettra de suivre l'impact du greffage en solution et la configuration d'un polymère obtenu à partir d'un plus grand monomère. Les conditions de greffage de ces deux monomères sont décrites dans la sous-partie suivante.

1.2. Greffage en surface du PDMS

1.2.1. L'acide poly(vinylbenzoïque)

Le défi concernant le greffage du PVAc résidait en sa faible solubilité $s \approx 1,060 \text{ g.L}^{-1}$ dans l'eau. Ainsi, à 0,35 M, concentration habituellement utilisée pour greffer le PNaSS ou le PAAc, le monomère AcV était insoluble. Plusieurs alternatives ont alors été envisagées afin de parvenir au greffage du polymère. Celles-ci seront brièvement décrites afin d'exposer la démarche expérimentale, mais les diverses caractérisations correspondantes, non concluantes, ne seront pas présentées.

La première solution proposée fut de solubiliser le composé à même concentration (0,35 M) dans une solution de NaOH. Cependant, l'équilibrage du pH en solution était complexe, atteignant rapidement $\text{pH} > 12$ pour obtenir une solubilisation complète du produit. Dans ces conditions, les caractérisations ont montré que le greffage en surface n'a pas pu être établi. L'option suivante consistait à solubiliser le produit dans un solvant organique. L'AcV étant soluble dans le méthanol, celui-ci a été choisi pour entreprendre les greffages. Seulement, la caractérisation des échantillons de PDMS n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un greffage. L'ajout d'amorceur de polymérisation en solution, l'azobisisobutyronitrile à 1 %, n'a pas permis d'obtenir meilleurs résultats. Ces mêmes essais ont été réalisés en diminuant progressivement la concentration en monomère en solution, à 0,2 M puis 0,1 M. Une nouvelle fois, le greffage en surface n'a pas pu être concluant.

Finalement, les conditions de greffage du PVAc retenues consistent à solubiliser le monomère dans l'eau à une concentration de 7.10^{-3} M . C'est la concentration maximale pour laquelle le monomère y est soluble. Les caractérisations ont permis de conclure au greffage significatif du polymère en surface. Elles sont exposées dans la sous-partie suivante.

1.2.2. L'acide 4-(4-poly(acryloyloxy)butoxy)benzoïque

Le monomère AbAc n'étant pas soluble dans l'eau, des alternatives à la méthode de greffage classique ont également dû être trouvées. Après plusieurs essais de solubilisation du composé dans des solvants organiques (éthanol et méthanol), le greffage de l'AbAc a été obtenu pour une concentration en monomère de 0,05 M dans le méthanol. Jusqu'à maintenant, les diverses caractérisations ont déterminé que ces paramètres étaient les plus favorables.

Concernant le dispositif expérimental utilisé pour le greffage des deux nouveaux polymères, il est similaire au greffage du PNaSS exposé précédemment (Figure 29). Pour rappel, il consiste à d'abord activer la surface du PDMS dans l'eau face aux rayonnements UV de la lampe LO à 160 mW.cm^{-2} . Ensuite, la polymérisation est réalisée en plaçant l'échantillon

activé dans la solution de monomère pendant une heure face aux rayonnements à 220 mW.cm^{-2} . L'échantillon greffé est ensuite lavé 48 heures dans de l'eau distillée avec changement régulier de la solution de lavage.

À noter que dans un souci d'optimisation continue du greffage, ces mêmes expériences ont été réalisées avec allongement du temps de l'étape de polymérisation. Cependant, les caractérisations n'ont pas montré un greffage plus important en surface du PDMS.

1.3. Caractérisations

1.3.1. Mesure d'angle de contact

L'angle de contact apparent moyen obtenu lors des différents greffages du PVAc est de $97,4^\circ$. La surface reste hydrophobe, mais cette légère diminution de l'angle par rapport au PDMS non greffé témoigne tout de même de l'éventuelle présence du composé (Figure 119). On peut alors supposer que la densité en groupements carboxylate est faible, traduisant un faible greffage en surface ou une répartition importante des chaînes avec différentes tailles. L'hypothèse pouvant être mise en avant ici est que la présence du cycle aromatique renforce la gêne stérique en solution et avec la surface, générant une configuration variée du polymère. Ce constat est proche des résultats obtenus lors du greffage du PNaSS. En effet, les angles de contact mesurés étaient variés d'un greffage à l'autre (Annexe 3). La mesure des taux de greffage et les observations topographiques permettront de vérifier cette conjecture.

Le greffage du PAbAc ne génère pas non plus d'augmentation de la mouillabilité de surface (Figure 119). La mesure d'angle de contact ne change quasiment pas, elle atteint en moyenne 104° . Néanmoins, l'affaissement de la goutte en surface après quelques secondes témoigne d'un changement. Même si l'augmentation de la mouillabilité n'est pas observée, ce résultat expérimental dénote de possibles irrégularités en surface. On peut supposer que la plus longue chaîne moléculaire composant le monomère expose moins les groupements hydrophiles (COO^-) en surface. Aussi, peu de chaînes peuvent avoir été formées en surface via la méthode « grafting from ». En conséquence, la densité en groupements carboxylate peut être plus faible, notamment en comparaison au greffage du PAAc. Par ailleurs, la mesure d'angle de contact étant opérée à sec, les chaînes peuvent être recroquevillées et les groupements hydrophiles moins exposés. Les mesures de taux de greffage et de topographie de surface vont compléter ces suppositions.

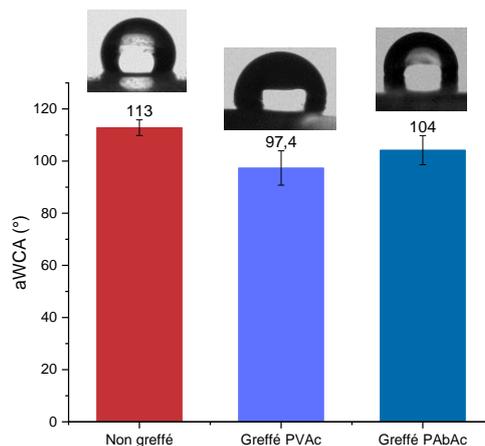


Figure 119 : Mesures d'angles de contact apparents sur les surfaces de PDMS greffées par le PVAc et le PAbAc en comparaison au PDMS non greffé

1.3.2. Taux de greffage en surface

Les taux de greffage mesurés par la méthode de dosage colorimétrique au BT montrent un greffage significatif des deux nouveaux composés sur les surfaces de PDMS. Dans les deux cas, la surface greffée présente un taux supérieur d'au moins une puissance de dix à celui correspondant à une surface non greffée. Il est de $8,35 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ en moyenne pour le greffage du PVAc contre $1,19 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour la surface non greffée lors de l'expérience (Figure 120a). L'écart-type obtenu est non négligeable et peut correspondre aux variations déjà constatées lors des mesures d'angles de contact. La configuration et la densité de polymère greffé peuvent être variables. Toutefois, ces résultats soulignent que dans ces conditions le greffage s'opère en surface du PDMS. Ce résultat permet de poursuivre les caractérisations et d'envisager des essais biologiques. Pour le PAbAc un taux de $2,42 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ est obtenu, contre $1,56 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour la surface non greffée (Figure 120b). De la même manière, cette différence témoigne du greffage effectif des surfaces de PDMS et permet la poursuite des recherches.

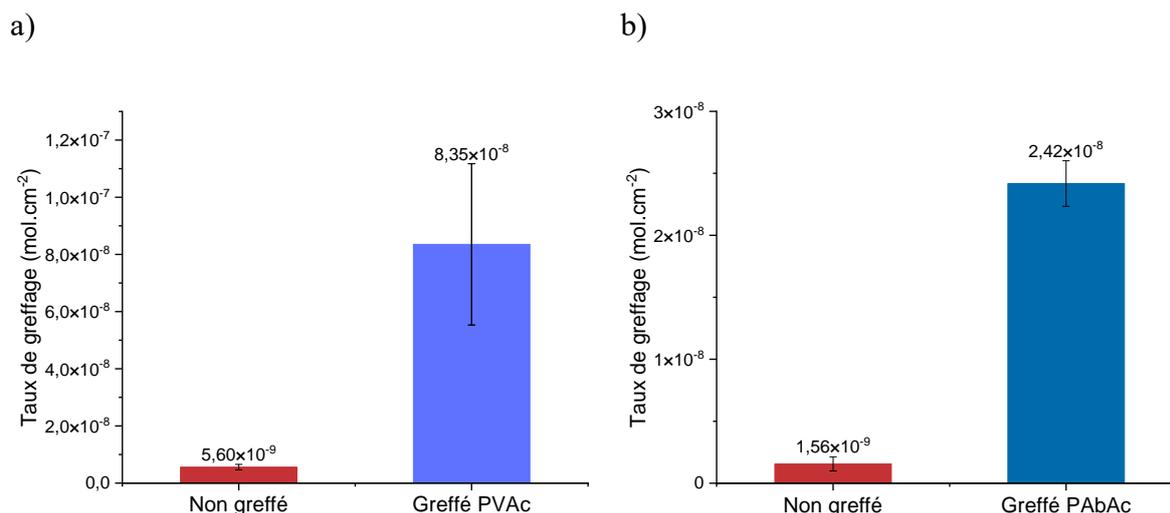


Figure 120 : Taux de greffage moyens du PDMS non greffé et a) greffé PVAc et b) greffé PAbAc

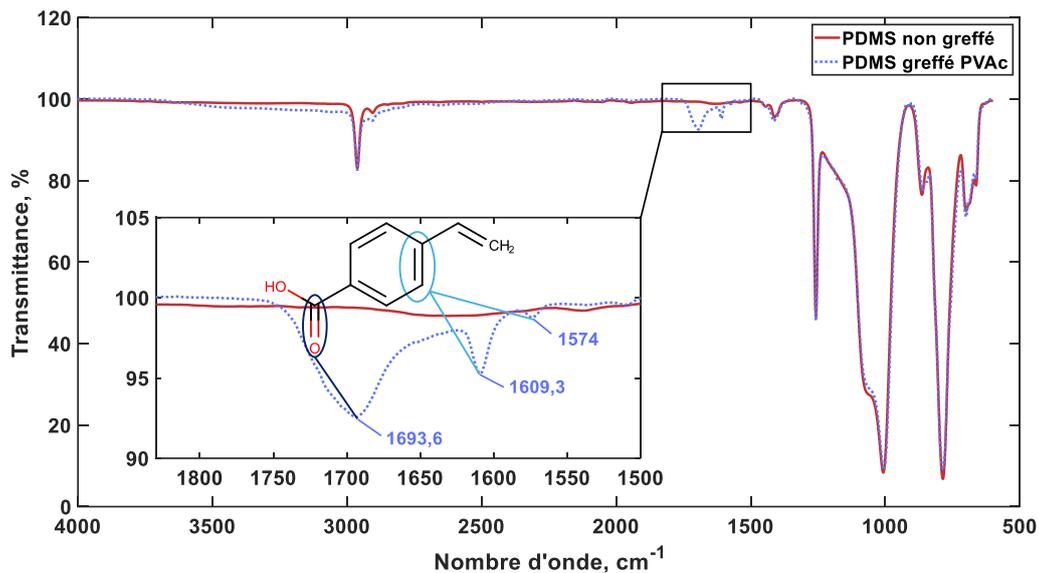
1.3.3. Caractérisation du greffage par spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR permet une nouvelle fois de confirmer la présence du polymère sur les surfaces de PDMS.

Le spectre représentatif du greffage du PVAc (Figure 121a) met en évidence trois nouvelles bandes spectrales. Une à $1694,8 \text{ cm}^{-1}$ qui est caractéristique de la liaison C=O d'un acide carboxylique saturé. Les deux autres bandes à $1609,4 \text{ cm}^{-1}$ et $1574,4 \text{ cm}^{-1}$ sont représentatives des liaisons C=C présentes au sein du cycle aromatique.

Pour le spectre représentant le greffage du PAbAc (Figure 121b), la bande présente à 1731 cm^{-1} correspond au groupement ester (C=O)O présent sur le motif AbAc. Les bandes à $1606,7 \text{ cm}^{-1}$, $1593,5 \text{ cm}^{-1}$ et $1513,8 \text{ cm}^{-1}$ correspondent aux liaisons C=C du cycle aromatique. La bande à 1683 cm^{-1} correspond à la liaison C=O acide carboxylique de l'AbAc.

a)



b)

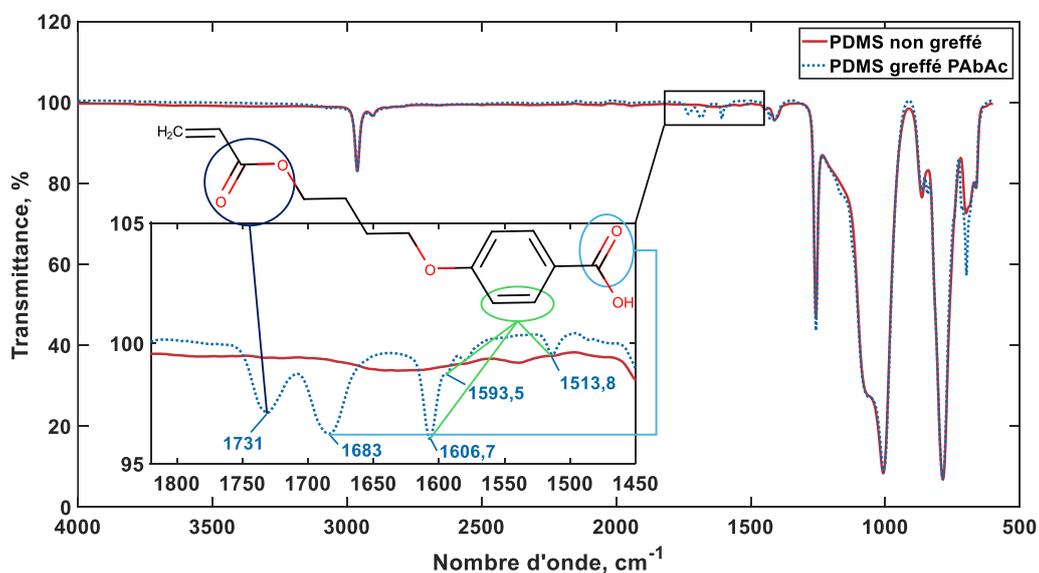


Figure 121 : Spectres FTIR de surfaces de PDMS non greffée et a) greffée PVAc, b) greffée PABAc

1.3.4. Spectroscopie photoélectronique à rayons X

Les expériences ayant été réalisées en fin de projet, les caractérisations de surface effectuées par XPS n'ont pu être réalisées que pour le greffage du PVAc. Les résultats présentés dans le Tableau 23 mettent en évidence la présence d'une couche de polymère en surface. Cette affirmation est déduite du pourcentage atomique en atomes de carbone augmenté en comparaison à une surface non greffée, et au pourcentage atomique du silicium diminué. Le

pourcentage atomique d'oxygène reste stable. Ces résultats rejoignent le constat précédemment établi lors du greffage du PAAc et confirment donc la présence du polymère.

Atome	Position* (eV)	%at. non greffé	%at. greffé PVAc
C1s	283	49,1 ± 2,2	58,3 ± 0,4
O1s	531	23,0 ± 0,3	22,2 ± 0,8
Si2p	101	27,9 ± 2,1	19,4 ± 0,4

Tableau 23 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surface de PDMS non greffé et greffé PVAc. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné)

1.3.5. Topographie de surface

Une fois la présence du greffage vérifiée, l'étape suivante se concentre sur les aspects de surface. Il est important de noter que les caractérisations chimiques de surface ont pu être menées car le greffage du PVAc et du PAbAc n'induisait pas d'altération du matériau visible macroscopiquement. Pour rappel, le greffage du PMAc et du PAAc sans ajustement du pH permettait la pénétration du monomère dans la matrice du PDMS et induisait son durcissement. Ce phénomène était limité lors de l'ajustement du pH. Le monomère était ainsi obtenu sous sa forme carboxylate, lui permettant de générer des interactions ioniques en surface. Par ailleurs, on remarquait précédemment des différences d'aspect de surface entre les greffages des monomères MAc et AAc, bien que proches structurellement. Ici, on peut supposer que la taille et la structure moléculaire des deux nouveaux monomères limitent également ce phénomène. Le greffage et la polymérisation n'auraient lieu qu'en surface. Les observations topographiques vont confirmer ces hypothèses.

La Figure 122 montre les images acquises au MEB de surfaces de PDMS greffées par les deux nouveaux polymères. De la même manière que pour les greffages du PAAc et du PMAc, les résultats sont présentés à grossissement 150x (Figure 122 A1 et B1) puis à grossissement plus important 3000x (Figure 122 A2 et B2). C'est à partir de ce grossissement que les irrégularités de surface, composées de crêtes et crevasses, étaient visibles pour le greffage du PAAc. Ici, que ce soit pour le PVAc ou le PAbAc, hormis quelques impuretés, les défauts de surface ne sont pas présents.

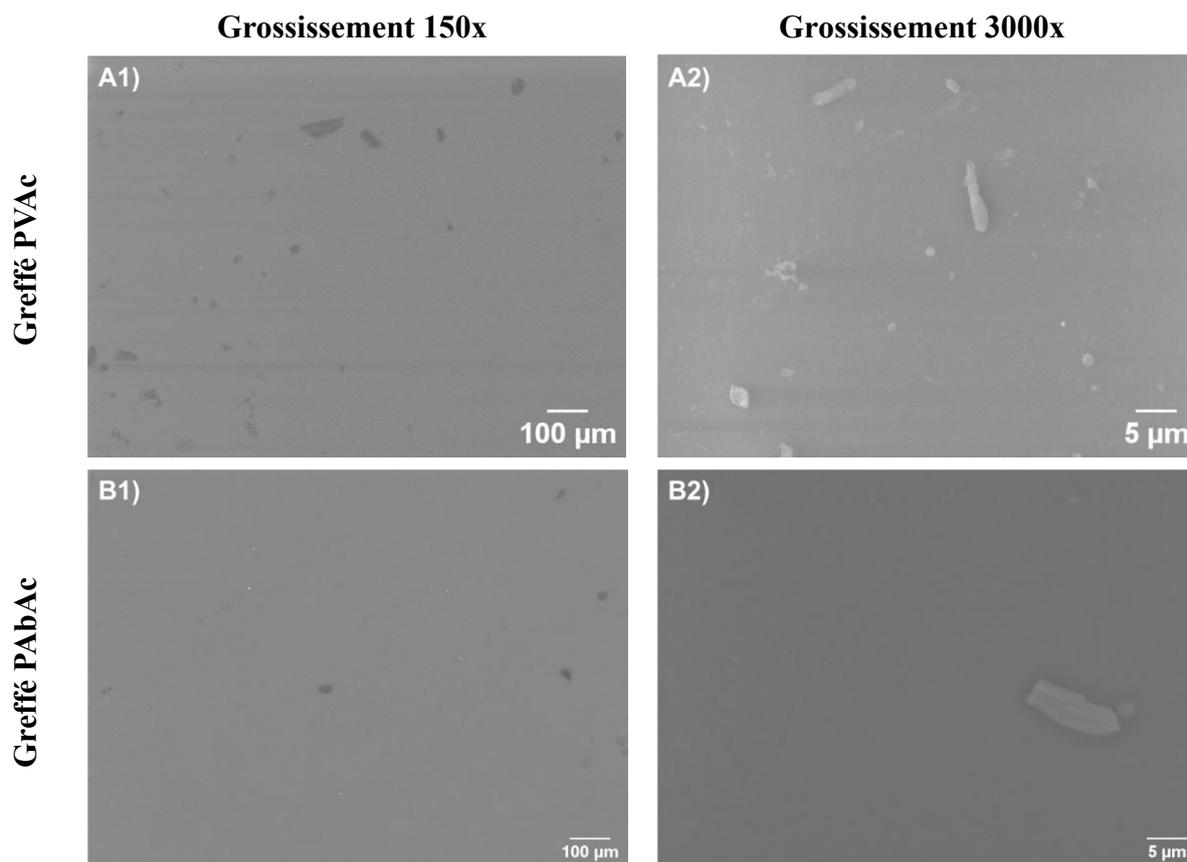


Figure 122 : Images MEB du PDMS greffé PVAc à grossissement A1) 150x, A2) 3000x ; et greffé PAbAc à grossissement B1) 150x, B2) 3000x

Sur la Figure 123a est rappelé le scan obtenu au profilomètre optique d'un PDMS non greffé. La Figure 123b, c et d montrent l'état de surface du PDMS greffé par le PVAc sur trois zones différentes de trois échantillons différents. Ils ont été sélectionnés les plus représentatifs possible de l'ensemble des scans. De manière générale, en considérant que les rugosités sont représentatives du greffage, on constate une couverture homogène de la surface par le polymère. Par ailleurs, on semble même pouvoir observer une orientation régulière du polymère sur la surface, notamment sur la Figure 123d. Si l'on considère que le monomère ne pénètre pas la matrice du PDMS, on peut conclure avec les scans présentés ici que le greffage est notable et homogène sur l'ensemble des surfaces. Ce constat valide le protocole de greffage de ce polymère et permet de le considérer pour réaliser des essais biologiques. Il est intéressant de comparer sa réactivité et son impact sachant que la structure du monomère est proche du NaSS mais qu'il porte un groupement acide carboxylique. En fonction des résultats biologiques et microbiologiques, le greffage de ce polymère ambitionne le remplacement du greffage du PAAc-pH. Il éviterait l'ajustement du pH en solution et la présence de dommages encore visibles en surface malgré la réalisation des essais de traction satisfaisants.

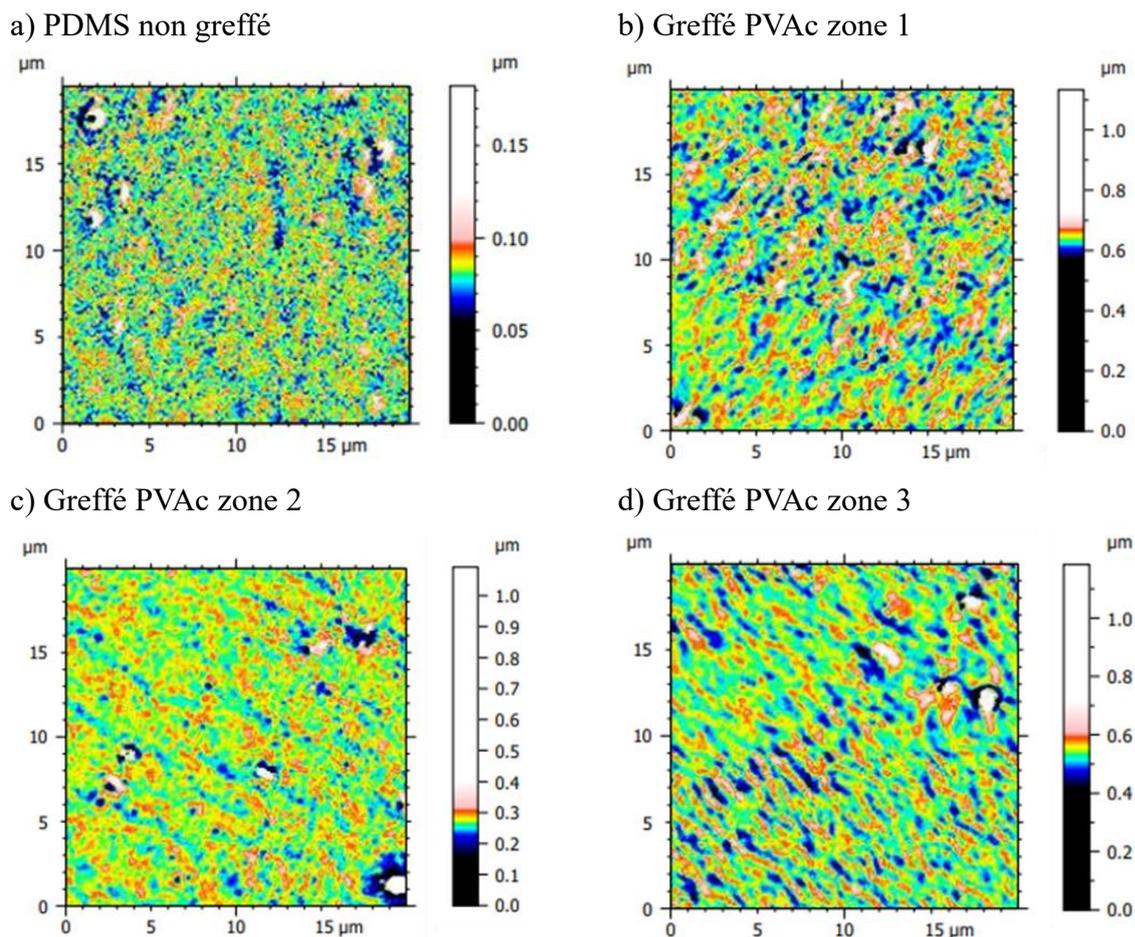


Figure 123 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b), c) et d) greffé PVAc sur différents échantillons et différentes zones

La Figure 124 présente les scans obtenus pour le greffage du PAbAc. De la même manière que précédemment, le scan d'un PDMS non greffé est rappelé sur la Figure 124a à titre de comparaison. De nouveau, un greffage effectif de la surface est observable sur les trois scans représentatifs du PDMS greffé par le PAbAc. Néanmoins, la répartition des irrégularités est plus hétérogène. On peut supposer que la taille du monomère empêche la formation de longues chaînes de polymère. L'effet inverse était observé lors des greffages du PAAc et du PMAc, où des amas étaient visibles sur les scans, semblant représenter des chaînes de polymère repliées sur elles-mêmes. Ici, les régions hautes sont plus petites et réparties, à l'exception de la zone 3 (Figure 124d) où les régions en rouge et en blanc semblent plus larges. Ce résultat met en évidence en premier lieu le caractère moins répétable du greffage. Si l'hypothèse de courtes chaînes plus réparties sur la surface se confirme, elle rejoint le constat observé avec les résultats d'angle de contact apparent. Même si le polymère se greffe, il ne rend pas la surface mouillable, rendant compte d'une plus faible densité en groupements acide carboxylique. Cependant, la mesure de taux de greffage a montré un taux important en groupements fonctionnels, mais il reste moins important que pour le greffage du PAAc. Par ailleurs, cette méthode de dosage

colorimétrique a ses limites. Tous les groupements fonctionnels ne sont pas nécessairement complexés par la molécule de BT, notamment les groupements présents en début de chaîne à proximité de la surface, en raison de la taille importante de la molécule colorée.

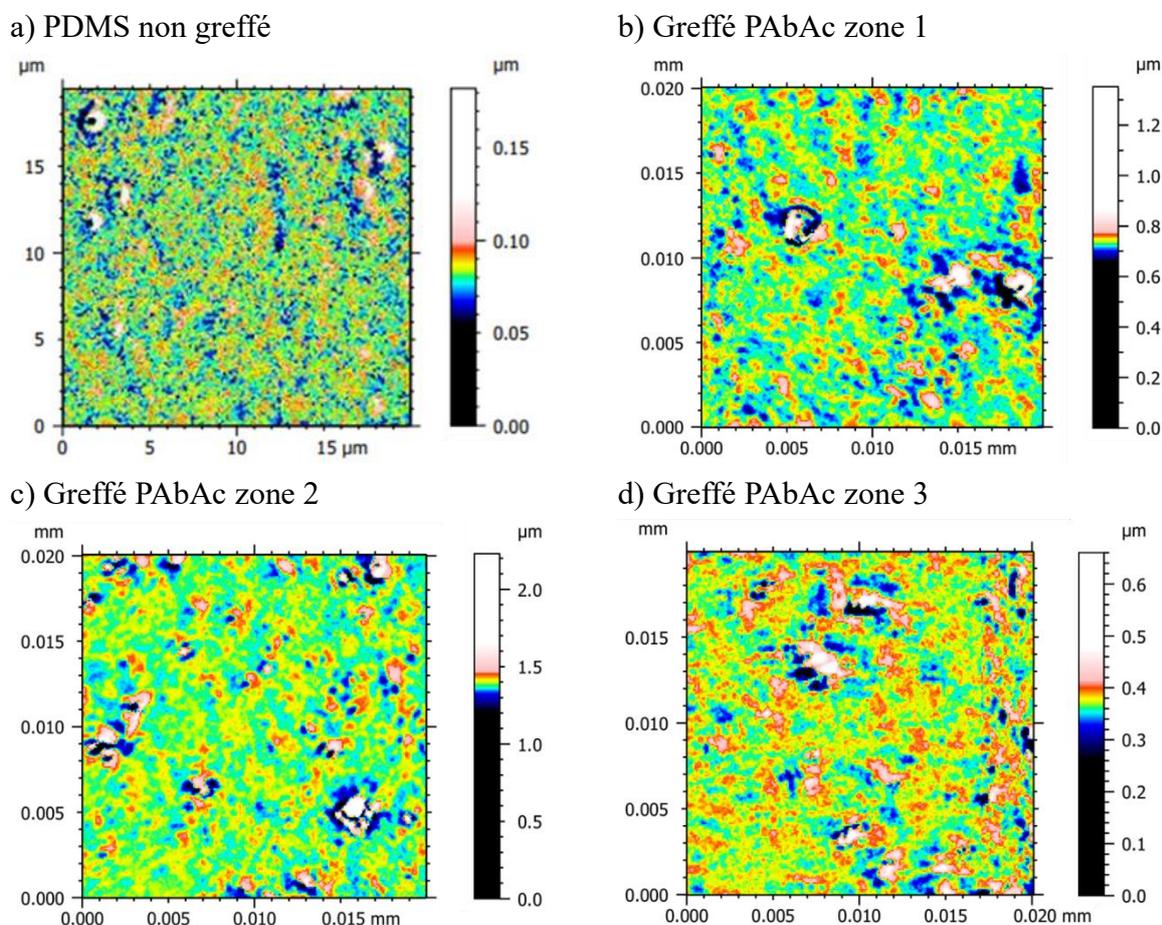


Figure 124 : Topographie de surface de PDMS a) non greffé, b), c) et d) greffé PAbAc sur différents échantillons et différentes zones

Finalement, ces résultats montrent que le PAbAc est bien présent sur les surfaces et que des caractérisations biologiques peuvent être réalisées afin d'aller plus loin dans la compréhension de son action. Néanmoins, les caractérisations ont tout de même mis en évidence des irrégularités concernant la répétabilité et l'homogénéité du greffage et la mouillabilité de surface n'a pas été améliorée.

Les hauteurs moyennes arithmétiques S_a obtenues à partir des scans sont présentées sur la Figure 125. Celles-ci sont plus élevées dans le cas du PAbAc, mais avec un écart-type relativement plus élevé. Ce résultat souligne les irrégularités présentes sur ces surfaces greffées, ainsi que l'insuffisante répétabilité de l'expérience. Sont rappelées à titre comparatif, les S_a obtenues dans le cas des greffages du PNaSS et du PAAc-pH en surface. On constate alors que

la Sa correspondant au greffage du PVAc reste relativement proche d'une surface non greffée et ne générerait donc pas d'irrégularités trop importantes en surface. Ces résultats montrent que le greffage ne modifie pas drastiquement la rugosité de surface du matériau. Ils restent cependant indicatifs, car les mesures sont réalisées sur des surfaces séchées où les chaînes de polymère formées ne peuvent pas être déployées.

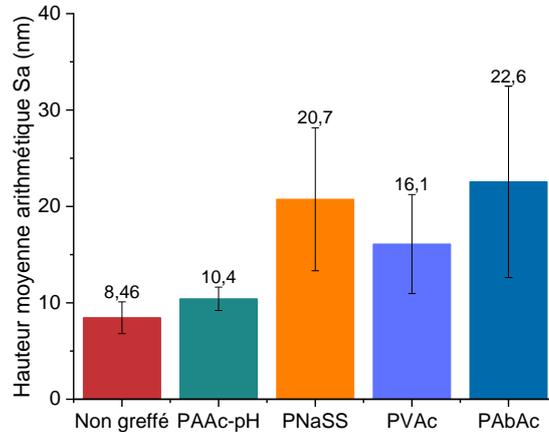


Figure 125 : Rugosités de surface / Hauteurs moyennes arithmétiques du PDMS non greffé et greffé

1.4. Évaluation de la réponse biologique

1.4.1. Évaluation de la viabilité cellulaire

En fonction des expériences, les taux de viabilité cellulaire obtenus pour chacun des greffages après 24 heures d'incubation avec les fibroblastes étaient similaires entre une surface greffée et non greffée (Figure 126). Le premier constat important est que ces deux greffages n'ont pas d'effet antiadhésif en surface comme précédemment observé pour le PAAc. Une légère augmentation est obtenue en moyenne mais la différence avec le PDMS non greffé n'est pas significative. Ce résultat montre que les greffages ne sont pas toxiques pour les cellules, mais qu'ils n'ont pas d'effet particulier sur leur adhésion après 24 heures.

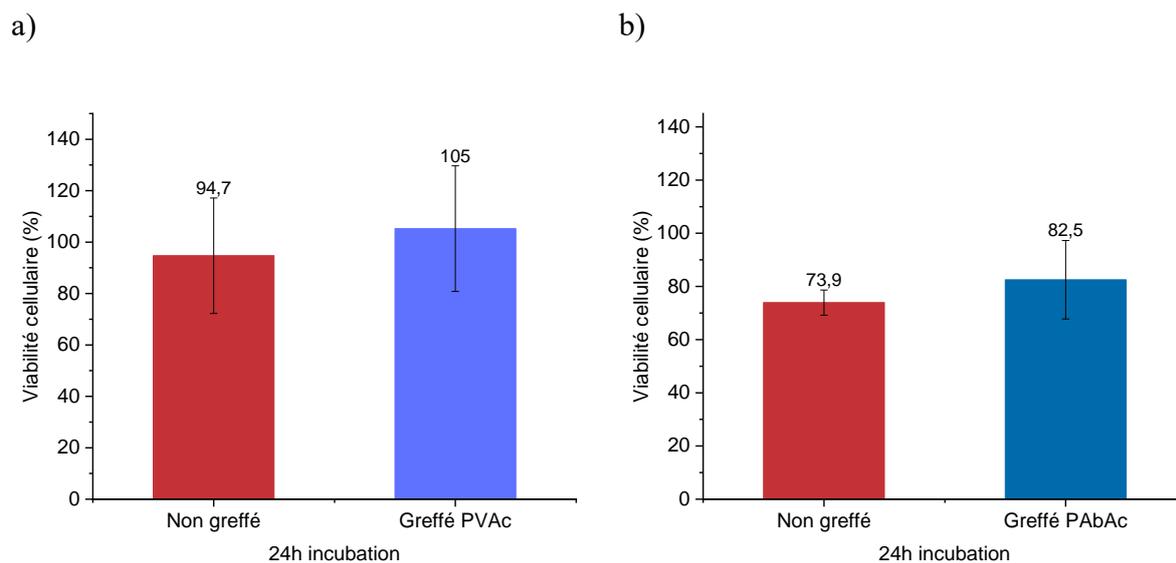


Figure 126 : Viabilité cellulaire en surface d'échantillon non greffé et a) greffé PVAc, b) greffé PAbAc

Il est probable que la densité en groupements COO^- ne soit pas suffisante pour provoquer un changement d'orientation des protéines permettant l'antiadhésion des cellules [38]. Une autre hypothèse peut être attribuée à la longueur des chaînes polymériques [157]. En effet, l'antiadhésion de protéines provoquée par des polymères comme le PEG est expliquée par la mobilité de leurs chaînes lorsqu'elles sont hydratées et à l'importante gêne stérique provoquée [10,16]. Alors, il est probable que ces paramètres ne soient pas obtenus ici. Ces résultats et les scans obtenus au profilomètre optique laissent supposer la présence de courtes chaînes en surface et par conséquent d'une plus faible densité en groupements carboxylate. En 24 heures, pas d'amélioration de la prolifération cellulaire n'est observée. En conséquence, ces greffages n'ont pour l'instant pas d'influence particulière sur la réponse cellulaire. Ces résultats restent à compléter par davantage de caractérisations et des essais microbiologiques.

Contrainte par les conditions expérimentales et l'évolution des travaux de thèse, la suite des analyses biologique n'a pour l'instant été réalisée que pour le greffage du PVAc en surface.

1.4.2. Morphologie des cellules en surface du PDMS greffé par le PVAc

La morphologie cellulaire a été évaluée uniquement en surface des échantillons greffés par le PVAc (Figure 127). Elle montre peu de différences avec une surface non greffée (Figure 128), ce qui est représentatif des résultats obtenus lors des tests de viabilité cellulaire. Après 24 heures, les cellules ont déjà adhéré et sont étalées sur la surface (Figure 127b). La prolifération aux jours 3 et 7 (Figure 127c et Figure 127e) montre une quantité importante de cellules présentes et même orientées parallèlement les unes aux autres (Figure 127f). Des tests de

prolifération par mesures de viabilité cellulaire après 3 jours et 7 jours doivent être réalisés pour compléter cette étude. Ils permettront d'évaluer si des différences existent sur la prolifération dans le temps par rapport à une surface non greffée.

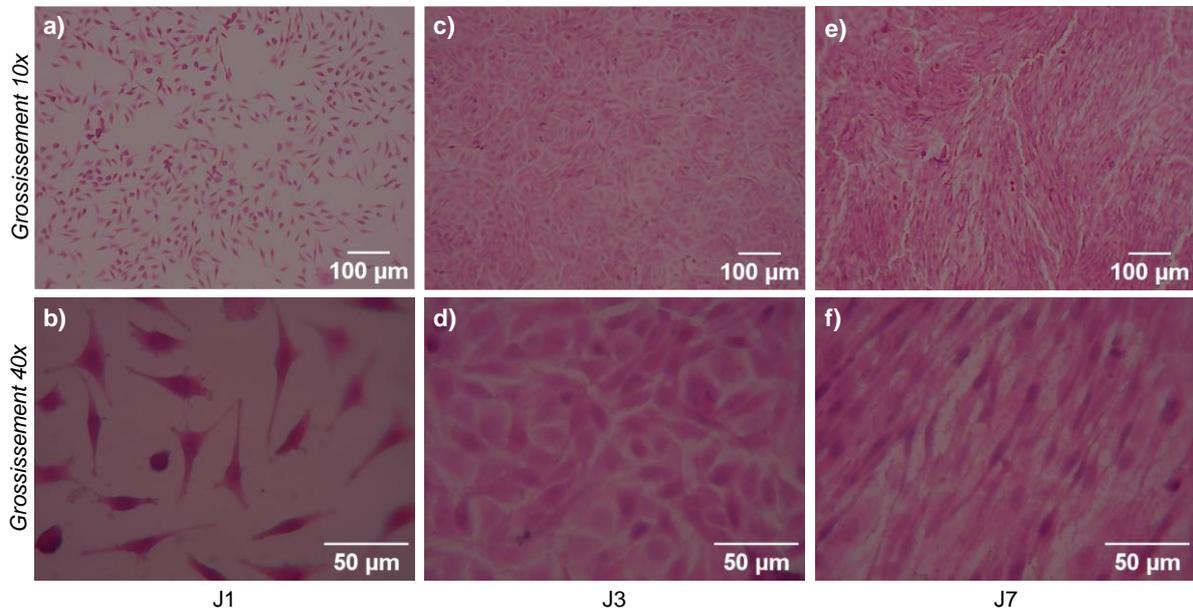


Figure 127 : Images au microscope optique de PDMS greffé par le PVAc incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x, f) grossissement 40x

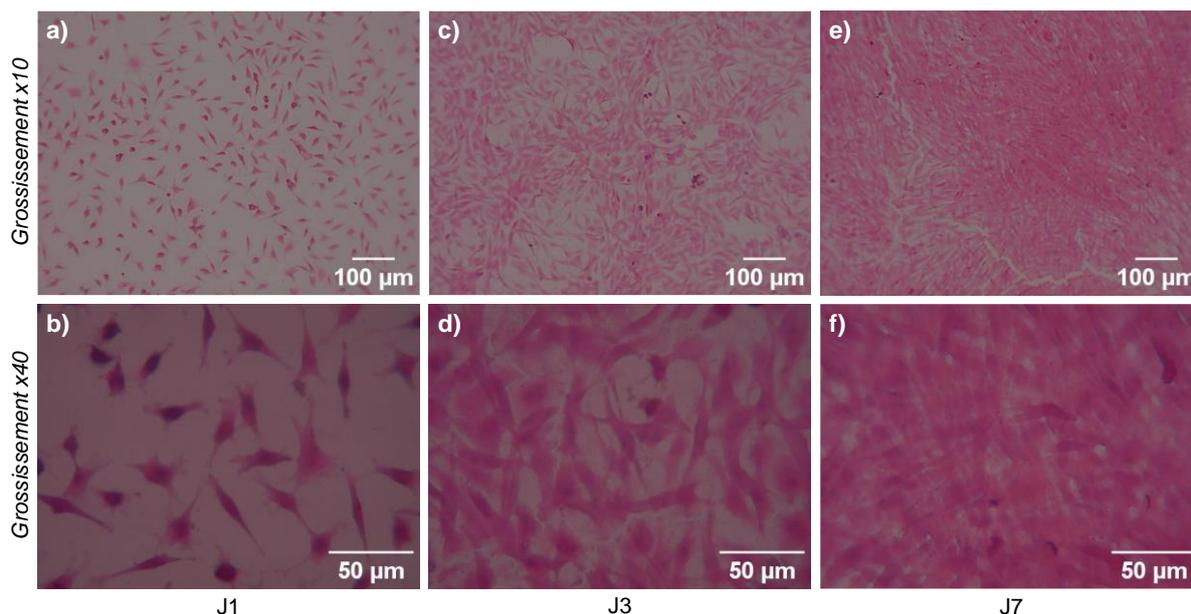


Figure 128 : Images au microscope optique de PDMS non greffé incubé avec des fibroblastes après : a) 24 heures à grossissement 10x et b) grossissement 40x, c) 3 jours à grossissement 10x et d) grossissement 40x, e) 7 jours à grossissement 10x, f) grossissement 40x

1.4.3. Interactions avec les protéines

De la même manière que pour le greffage du PAAc, les interactions entre la surface greffée PVAc et les protéines BSA, Fn et Fg ont été étudiées. Dans un premier temps, l'évaluation de la prolifération des cellules sur les surfaces où la fibronectine a été pré-adsorbée a été réalisée. Ces essais ont pour but de forcer une adsorption préalable de la Fn et d'évaluer les conséquences sur l'adhésion des cellules. Ces expériences permettent d'évaluer si le greffage en surface engendre des changements conformationnels ou d'orientation de la protéine, impactant l'adhésion des cellules.

La viabilité cellulaire a d'abord été évaluée dans ces conditions. Les résultats Figure 129 montrent que plus de cellules ont adhéré sur la surface greffée sur laquelle la Fn a été adsorbée, en comparaison à la surface non greffée. À titre comparatif, la Figure 130 présente la prolifération cellulaire en surface du PDMS greffé par rapport au PDMS non greffé sans (Figure 130a) et avec adsorption préalable de Fn sur la surface (Figure 130b). On constate la prolifération plus importante à hauteur de 49 % de cellules adhérentes en plus sur les surfaces greffées où la fibronectine a été adsorbée, contre 11 % uniquement pour l'expérience initiale. Ce résultat suppose que le greffage en surface agirait sur la configuration ou l'orientation de la protéine. Ce constat est proche des observations obtenues pour le greffage du PNaSS. La molécule a pour particularité d'accélérer la prolifération des cellules en surface et, par conséquent, améliore l'intégration des implants.

1. Rôle du motif moléculaire du polymère bioactif sur les propriétés de surface

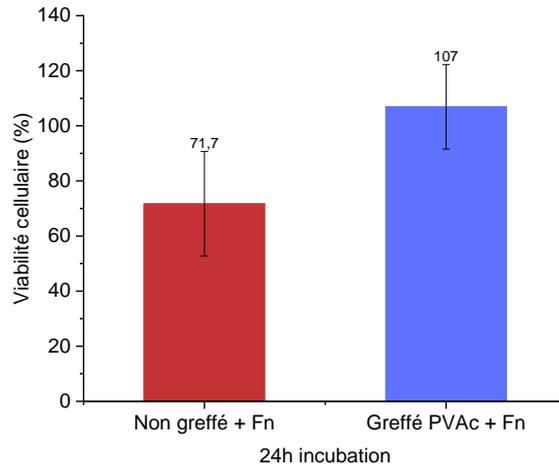


Figure 129 : Viabilité cellulaire en surface de PDMS non greffé et greffé PVAc avec adsorption préalable de Fn

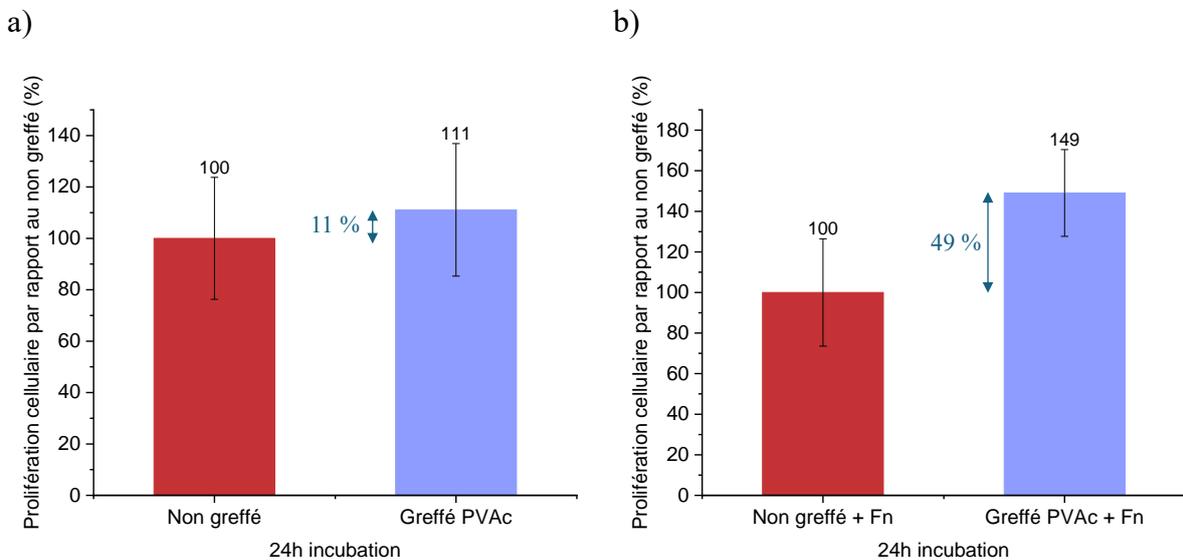


Figure 130 : Taux de prolifération des cellules sur le PDMS greffé par le PVAc par rapport au PDMS non greffé
a) directement sur les surfaces, b) avec adsorption préalable de Fn sur le PDMS

Les interactions avec les protéines ont été évaluées par spectroscopie FTIR. Sur chacun des spectres les bandes amide A, amide I et amide II sont présentes (Annexe 4). À la différence du greffage du PAAc, la bande amide I est cette fois plus intense que la bande amide II. Ce résultat peut expliquer les différences observées à l'égard des cellules entre les deux greffages : un ralentissement de la prolifération pour le PAAc, une amélioration de la prolifération pour le PVAc.

Une nouvelle fois, la position et la forme de la bande amide I des protéines permet d'accéder à l'estimation de leurs structures secondaires. D'une protéine à l'autre, la position de la bande amide I est décalée (Figure 131), signifiant des affinités et donc potentiellement des orientations particulières à considérer. Les structures secondaires des protéines ont donc été évaluées et comparées à celles obtenues pour l'adsorption des protéines sur les greffages précédents. Les résultats sont présentés sur la Figure 132.

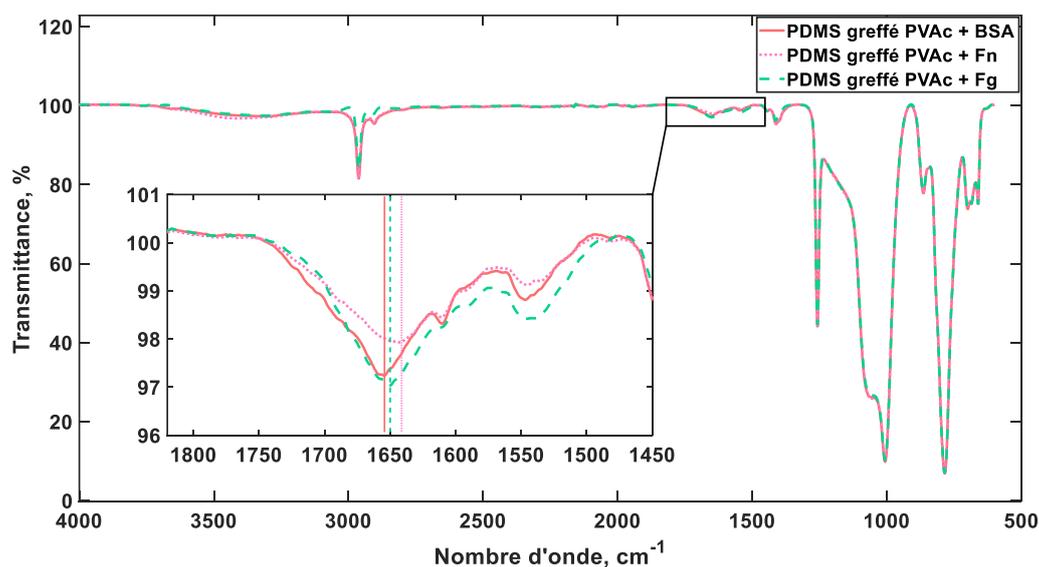


Figure 131 : Mise en évidence des positions spectrales des bandes amide I des protéines (BSA, Fn et Fg) adhérentes sur les surfaces de PDMS fonctionnalisées par le PVAc

Les structures secondaires des protéines adsorbées sur les surfaces greffées par le PVAc sont très différentes des structures obtenues pour les précédentes conditions. De manière générale, la proportion en feuillets β est moins importante pour chaque protéine. La proportion en hélice α a tendance à être plus importante. Des différences notables sont par ailleurs observées pour la fibronectine. Sa structure secondaire est constituée de peu de feuillets β , mais les proportions en structures aléatoires et hélices α sont considérablement plus importantes qu'en surface des autres greffages. Aucune similitude ou tendance ne peut être corrélée avec un autre greffage. Ces résultats peuvent donc caractériser l'affinité unique de chaque fonctionnalisation à l'égard des protéines. Alors, même si l'orientation de la Fn est différente du PNaSS, elle semble tout de même adopter une orientation favorable à la prolifération des fibroblastes. Une étude comparative de la prolifération des fibroblastes dans le temps en surface du PDMS greffé par le PNaSS et le PVAc pourrait permettre d'évaluer leur performance. À noter une nouvelle fois que les résultats présentés ici restent des estimations. Les analyses sont effectuées à sec une fois l'adsorption des protéines effectuée.

Des analyses microbiologiques doivent à l'avenir être réalisées afin de compléter ces résultats. Elles permettront de mettre en évidence si des changements opèrent vis-à-vis des bactéries. La surface restant hydrophobe, elle est a priori propice à l'adhésion de certaines bactéries. En revanche, d'autres mécanismes liés à la structure du polymère, à ses groupements fonctionnels et à leur densité peuvent entrer en jeu.

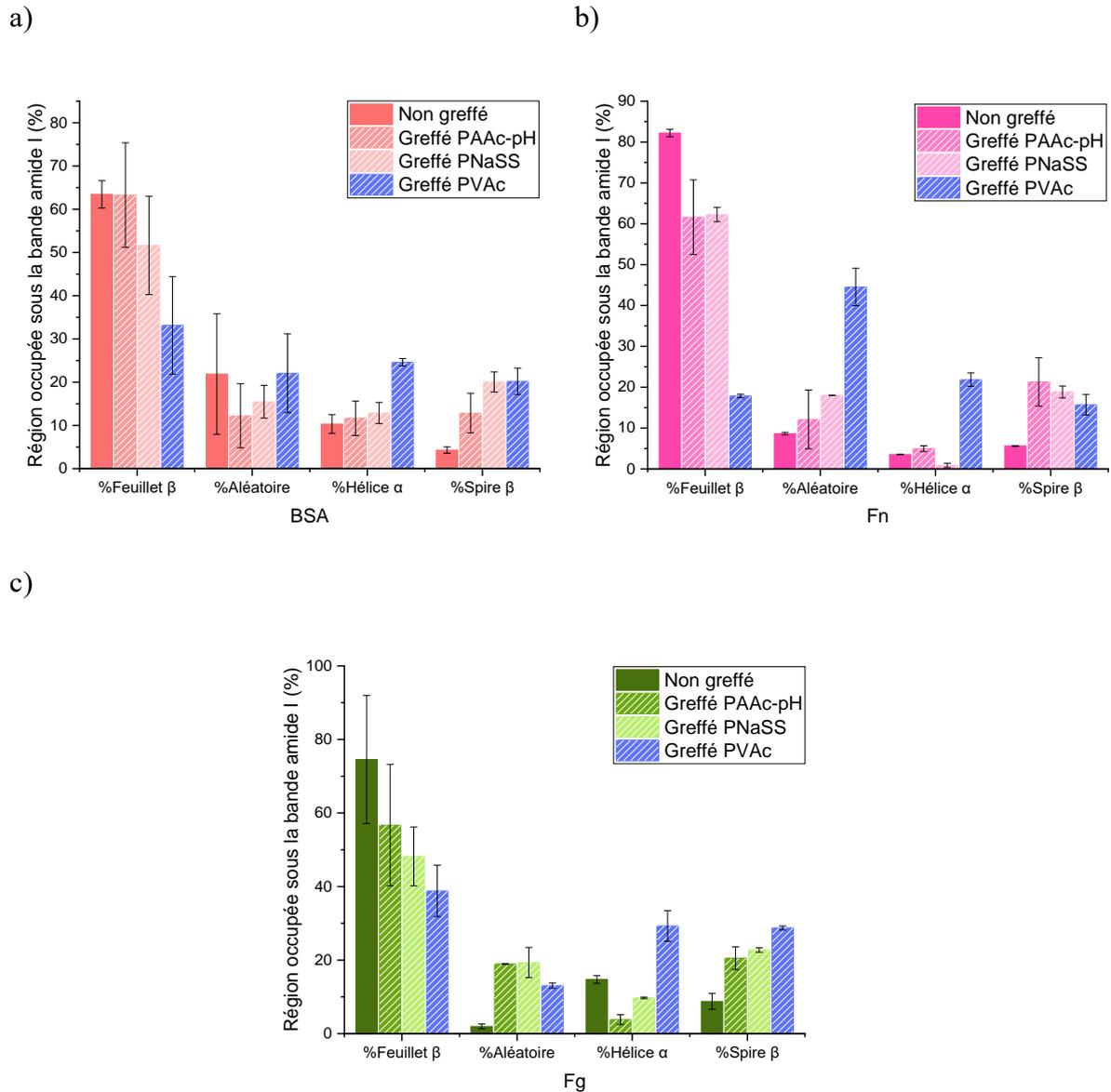


Figure 132 : Estimation des structures secondaires (a) de la BSA, (b) de la Fn et (c) du Fg, adsorbés sur des surfaces de PDMS non greffées, greffées par le PAAc-pH, par le PNaSS et par le PVAc

1.5. Bilan

Les stratégies de greffage sont des outils prometteurs pour améliorer les fonctionnalités de surface d'un biomatériau. Ces études complémentaires ont permis d'interpréter l'influence de l'architecture du monomère utilisé sur sa capacité à se greffer et sur la réponse biologique apportée. Examiner les modifications engendrées par le changement d'architecture du polymère permet de moduler les propriétés conférées à une surface. Au-delà des groupements fonctionnels, l'importance du rôle des longueurs de chaînes, de leur répartition et de leur densité est mise en évidence.

Le Tableau 24 ci-dessous regroupe les principales caractérisations et observations réalisées sur les surfaces de PDMS fonctionnalisées par les différents polymères au cours de ces travaux de thèse. Les caractérisations notamment mécaniques et des analyses microbiologiques doivent compléter ces résultats. Néanmoins, ces différents paramètres sont indicateurs des principales propriétés conférées à la surface après greffage via la méthode « grafting from ».

	PAAc	PNaSS	PVAc	PAbAc
aWCA (°)	67,0 ± 8,60 Augmentation significative de la mouillabilité	90,5 ± 9,96 Légère augmentation de la mouillabilité	97,4 ± 6,57 Peu de changement de mouillabilité	104 ± 5,58 Pas de changement de mouillabilité
Taux de greffage (mol.cm⁻²)	1,59.10 ⁻⁷ Haute densité en COO ⁻	2,68.10 ⁻⁸ Densité modérée en SO ₃ ⁻	8,35.10 ⁻⁸ Importante densité en COO ⁻	2,42.10 ⁻⁸ Densité modérée en COO ⁻
Résultats topographiques	Surface couverte par le polymère. De longues chaînes sont probablement formées.	Inhomogénéité du greffage en surface. De courtes chaînes sont probablement formées.	Homogénéité du greffage. De courtes chaînes sont probablement formées.	Inhomogénéité du greffage.
Influence sur les fibroblastes	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de l'adhésion des fibroblastes. • Ralentissement de la prolifération. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la prolifération des fibroblastes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la prolifération des fibroblastes en présence de Fn. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion de fibroblastes. ➔ Étude de la prolifération à réaliser.
Influence sur les protéines	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion de BSA, de Fn et de Fg en surface en quantité similaire à une surface NG. • Orientation préférentielle des protéines adhérees. • Proportions en structures secondaires modifiées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adhésion de BSA, de Fn et de Fg en surface en quantité similaire à une surface NG. • Orientation préférentielle des protéines adhérees [96] : La BSA et la Fn arborent une structure globulaire. • Proportions en structures secondaires modifiées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Orientation préférentielle des protéines adhérees. ➔ Étude à compléter 	<ul style="list-style-type: none"> ➔ Étude à réaliser.

Tableau 24 : Tableau résumé des principaux résultats de caractérisations des différents greffages réalisés en surface de PDMS

2. Vers un greffage de polymères bioactifs à architecture contrôlée

Au cours de ces travaux, une autre stratégie a été utilisée afin de greffer les polymères sur les surfaces de PDMS. Elle consiste à accrocher en surface des polymères de taille contrôlée. Cette stratégie a pour but de comparer l'impact d'un tel greffage sur la réponse biologique. Feng *et al.* montrent par exemple que la taille des chaînes influe sur le nombre de protéines pouvant s'adsorber en surface. Avec la longueur, l'adsorption de Fg diminue [158]. Pour cela, la méthode indirecte « grafting to » a été employée ici. Elle utilise une molécule d'ancrage, ici l'acrylamide de dopamine (ADOPA) ou l'acide caféique, à laquelle est ensuite couplée le polyNaSS (Chapitre 2 2.2). À l'heure actuelle l'avancée des expériences est au stade de caractérisation du greffage sur les surfaces. En effet, le greffage ou l'adhésion de ces composés sur le PDMS est pour le moment complexe. Les démarches entreprises sont décrites dans cette partie.

2.1. Stratégies

Afin de s'assurer de la bonne synthèse des produits ADOPA et polyNaSS, dont le protocole est décrit dans le Chapitre 2 partie 2.2.1, ceux-ci ont été caractérisés par RMN. Les spectres obtenus ont été regroupés en Annexe 5.

2.1.1. Voie de greffage n°1 : Fixation de l'ancre et couplage du pNaSS-SH

Dans un premier temps, la stratégie « grafting to » par la voie n°1 décrite dans le Chapitre 2 a été utilisée pour fixer les molécules en surface. Celle-ci est rappelée sur la Figure 133.

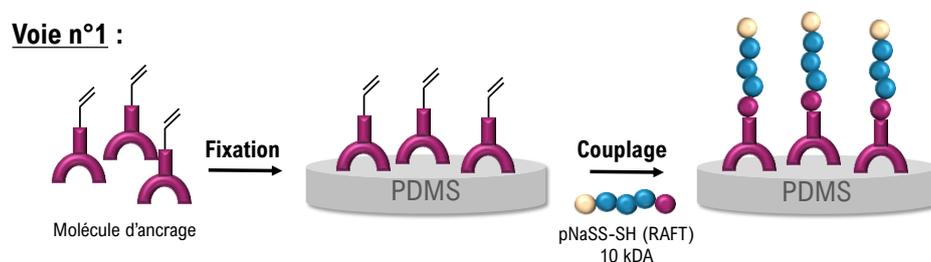


Figure 133 : Stratégie "grafting to" par la voie n°1

Les expériences réalisées se sont appuyées sur les travaux de Chouirfa *et al.*, dans lesquels des surfaces de titane ont été fonctionnalisées avec du PNaSS par cette voie. La stratégie s'appuie sur l'utilisation d'une ancre fixée sur la surface, sur laquelle vient se coupler

un polymère de taille connue [94,118]. Les composés porteurs de groupements catéchol, en raison de leurs fortes propriétés d'adhésion, sont de bons candidats pour réaliser ce rôle d'ancre [94,118,159]. Cette méthode s'inspire des protéines d'adhésion naturelles sécrétées par des organismes marins tels que les moules, riches en dihydroxyphenylalanine (DOPA) et en lysine [19]. Messersmith *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence l'ancrage de groupements catéchols sur des surfaces d'acier inoxydable [119]. Par simple immersion, la DOPA est capable d'adhérer à différents matériaux. Ensuite, le groupement amine réagit avec différents composés par addition de type Michael ou par réaction de base de Schiff [19]. Depuis, les catéchols dont la DOPA ont été couplés à de nombreux polymères [160–163]. L'acide caféique est également porteur du groupement catéchol. La molécule, possédant également des propriétés antibactériennes, antioxydantes et anticancéreuses est par ailleurs elle-même greffée sur différents substrats [164–167]. Ce potentiel conféré par l'acide caféique a donc constitué une option aux tentatives de fixation d'une ancre sur la surface de PDMS.

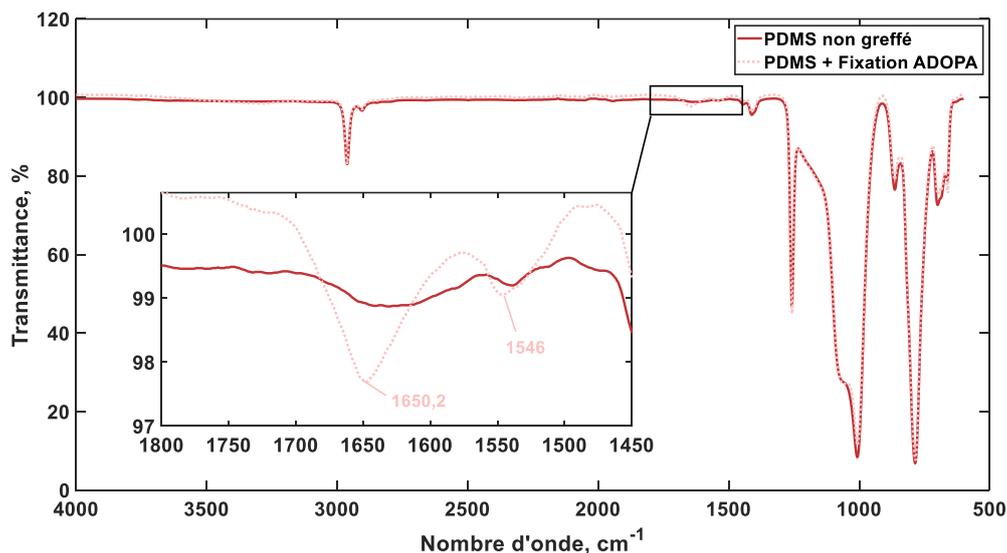
Il a dans un premier temps été question d'immobiliser l'ADOPA sur les surfaces de PDMS. Des essais ont été réalisés avec et sans activation préalable de la surface aux irradiations UV. La molécule a été solubilisée dans de l'eau avec quelques gouttes de NaOH (1 M), à une concentration de 1 mg.mL^{-1} . Cependant, pour chacun des essais réalisés, la mesure d'angle de contact apparent et la spectroscopie FTIR n'ont pas mis en évidence la présence du composé. L'hypothèse principale pouvant expliquer ces résultats réside dans les caractéristiques du matériau. Contrairement au titane, le PDMS est relativement « mou » et flexible. La molécule d'ADOPA relativement petite pourrait alors pénétrer dans le réseau. Cela expliquerait pourquoi la molécule n'est pas détectée sur le spectre FTIR. Ainsi, elle n'est pas disponible pour se coupler avec le polymère pNaSS-SH en solution.

Il a alors été décidé d'augmenter la concentration en ADOPA en solution à 10 mg.mL^{-1} , de manière à voir si plus d'ADOPA est susceptible d'être détectée. Il s'est avéré que sur le spectre FTIR correspondant, de nouvelles bandes sont apparues (Figure 134a). Leurs intensités sont faibles mais elles peuvent être attribuées à l'ADOPA. La nouvelle bande aux alentours de 1650 cm^{-1} peut correspondre à la liaison C=O amide, tandis que la bande vers 1646 cm^{-1} peut être attribuée à des liaisons C=C aromatiques. S'est alors ensuivi l'étape de couplage avec le pNaSS-SH. En spectroscopie FTIR, les bandes caractéristiques précédemment observées n'apparaissent plus, ce qui peut être synonyme de couplage. En effet, le pNaSS n'est pas visible en infrarouge, ses bandes caractéristiques étant superposées à celles du PDMS. En revanche la mesure d'angle de contact n'a pas montré de changement de mouillabilité de surface. Seul le dosage colorimétrique au BT permettait d'évaluer un greffage. Mais le taux obtenu était de $7,9.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ contre $5,6.10^{-9} \text{ cm}^{-2}$ en moyenne pour le PDMS non greffé. Le couplage n'a donc pas abouti et la fixation de l'ADOPA n'est plus mise en évidence.

De manière similaire, les travaux n'ont pas permis de faire adhérer l'acide caféique sur les surfaces de PDMS. La concentration du composé soluble dans l'éthanol a donc également été augmenté à 10 mg.mL^{-1} . Le spectre FTIR Figure 134b montre la présence d'une bande

faiblement intense à environ 1648 cm^{-1} . Elle pourrait être attribuée aux liaisons C=C du cycle aromatique. Aussi, une petite bande à 1593 cm^{-1} pourrait correspondre au groupement acide carboxylique. La mesure d'angle de contact ne montre cependant pas de changement de mouillabilité. Le composé est probablement adhérent en petite quantité. En raison des nombreux essais entrepris et des résultats obtenus, la fixation de l'acide caféique est une condition mise de côté pour la suite des essais expérimentaux. Néanmoins, elle constitue une perspective à exploiter à l'avenir.

a)



b)

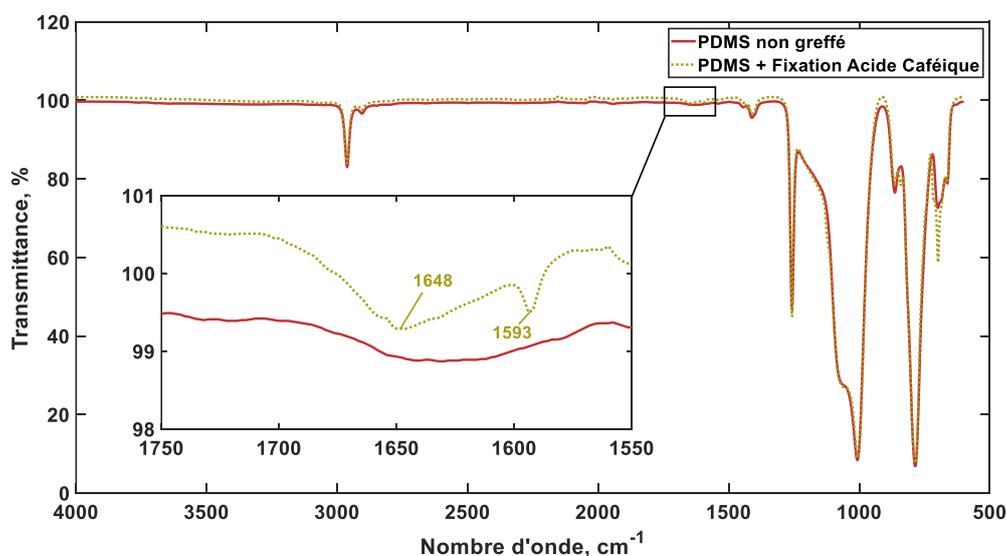


Figure 134 : Spectres FTIR a) de l'ADOPA (10 mg.mL^{-1} dans l'eau) adhérent en surface du PDMS, b) de l'acide caféique (10 mg.mL^{-1} dans l'éthanol) adhérent sur le PDMS

Augmenter la concentration en ADOPA constitue alors un espoir de fixation du composé sur le PDMS mais reste encore à l'état d'amorce. Le faible taux de greffage obtenu ne permet pas de valider cette condition pour poursuivre avec la réalisation d'analyses biologiques. Par ailleurs, la faible quantité d'ADOPA synthétisée conditionne également les choix expérimentaux. Alors, toujours sur l'hypothèse de la faible détection de la molécule ADOPA, la stratégie « grafting to » n°2 a été envisagée.

2.1.2. Voie de greffage n°2 : Couplage du pNaSS-SH à l'ancre et fixation de la molécule

La fixation de la molécule d'ancrage et sa détection étant compliquée, la voie de greffage n°2 a été envisagée, elle est rappelée sur la Figure 135. Cette fois le couplage entre le pNaSS-SH et la molécule d'ancrage est d'abord effectué, puis la fixation sur la surface de PDMS est réalisée. Cette méthode permet de fixer directement le composé polymérique, plus grand, sur la surface.

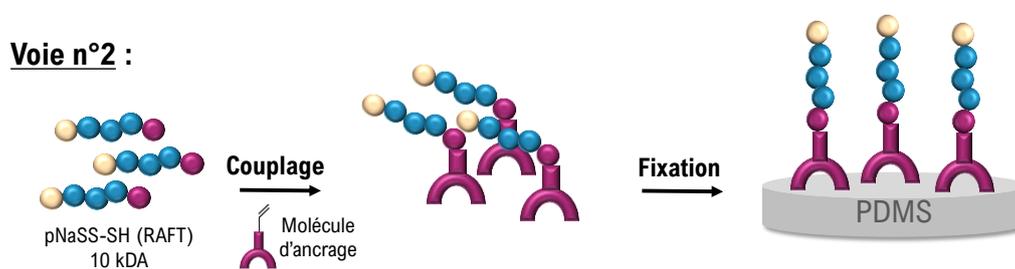


Figure 135 : Stratégie "grafting to" par la voie n°2

Les essais ont été réalisés pour une concentration de 10 mg.mL^{-1} en composé couplé. Les fixations ont été effectuées avec et sans activation préalable du PDMS, puis par immersion de l'échantillon dans la solution contenant le composé pendant 24 heures sous agitation. Les échantillons ont été caractérisés par mesures d'angle de contact et dosage colorimétrique au BT. La mesure d'angle de contact n'a pas montré de changement de mouillabilité de surface. Cependant, la mesure du taux de greffage bien que relativement faible à nouveau, est tout de même légèrement augmentée en comparaison à une surface non greffée (Figure 136). La moyenne obtenue atteint $8,84.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ contre $5,60.10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ pour la surface non greffée lors de ces expériences. L'écart obtenu entre les deux conditions est très faible si l'on compare aux résultats des différents greffages réalisés au cours de ces travaux. Néanmoins, c'est jusqu'à présent la condition qui aspire le plus à une adhésion de ce composé en surface. Enfin, des analyses XPS ont été réalisées pour ces conditions (Tableau 25). On constate que les variations en atomes de carbone, d'oxygène et de silicium sont faibles. Cependant, la tendance

reste à l'augmentation du pourcentage atomique de l'atome de carbone et à la diminution du pourcentage de Si. L'espérance qu'une petite quantité de composé se soit fixée en surface est à nouveau soulignée, mais le soufre du NaSS n'est quant à lui pas détecté. Ces résultats ne sont donc pas concluants quant à une fixation de l'ADOPA-pNaSS-SH en surface. À l'avenir, les expériences devront se poursuivre et se concentrer sur une augmentation encore plus élevée de la concentration pour observer si plus de composé peut se fixer en surface. Puis, dans le cas où les résultats obtenus sont satisfaisants, des caractérisations biologiques pourront être réalisées.

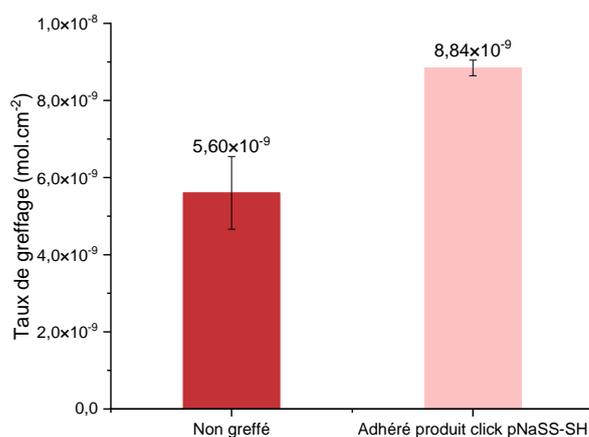


Figure 136 : Mesure du taux de greffage en surface du PDMS adhéré par le produit click ADOPA-pNaSS-SH en comparaison au PDMS non greffé

Atome	Position* (eV)	%at. non greffé	%at. ADOPA-pNaSS-SH
C1s	283	49,1 ± 2,2	50,7 ± 0,7
O1s	531	23,0 ± 0,3	22,3 ± 0,1
Si2p	101	27,9 ± 2,1	27,0 ± 0,7
S2p	174	-	Non détecté

Tableau 25 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surfaces de PDMS non greffées et avec fixation d'ADOPA-pNaSS-SH. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné)

2.2. Autres stratégies

Shin *et al.* ont dans leurs travaux synthétisé de la dopamine zwitterionique (ZW-DOPA) dans le but de l'immobiliser sur des surfaces de silicone. Les auteurs souhaitaient utiliser ce composé pour ses propriétés antiadhésives afin de limiter la formation de biofilm sur des implants mammaires : objectif similaire à nos travaux. Pour revêtir leurs surfaces de silicone, les auteurs ont réalisé une polymérisation oxydative. Ils ont alors dissout leur ZW-DOPA dans une solution tampon tris à pH = 8,5 à des concentrations de 0,005, 0,05, 0,5 et 10 mg.mL⁻¹. Cette solution a été mélangée à du NaIO₄ dans de l'eau à un ratio molaire de 2 : 1. Le substrat a été placé dans ce mélange et le tout a été agité pendant 24 heures. Les auteurs sont parvenus à revêtir ainsi leurs échantillons. 0,5 mg.mL⁻¹ de ZW-DOPA étaient nécessaires afin d'observer un changement en surface. Celui-ci était démontré par le changement de mouillabilité de surface, passant de 113,2° à 25,3°, ainsi que par analyses XPS et AFM. Les auteurs ont par ailleurs montré un effet antibactérien vis-à-vis de *S. epidermidis* pour des concentrations de 1 mg.mL⁻¹ en ZW-DOPA (Figure 137a) et une inhibition de la formation de capsule autour de l'implant chez la souris (Figure 137b). L'inhibition de la capsule a été justifiée par l'interruption de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, mis en évidence expérimentalement par l'examen de la quantité de ces derniers dans les capsules [99].

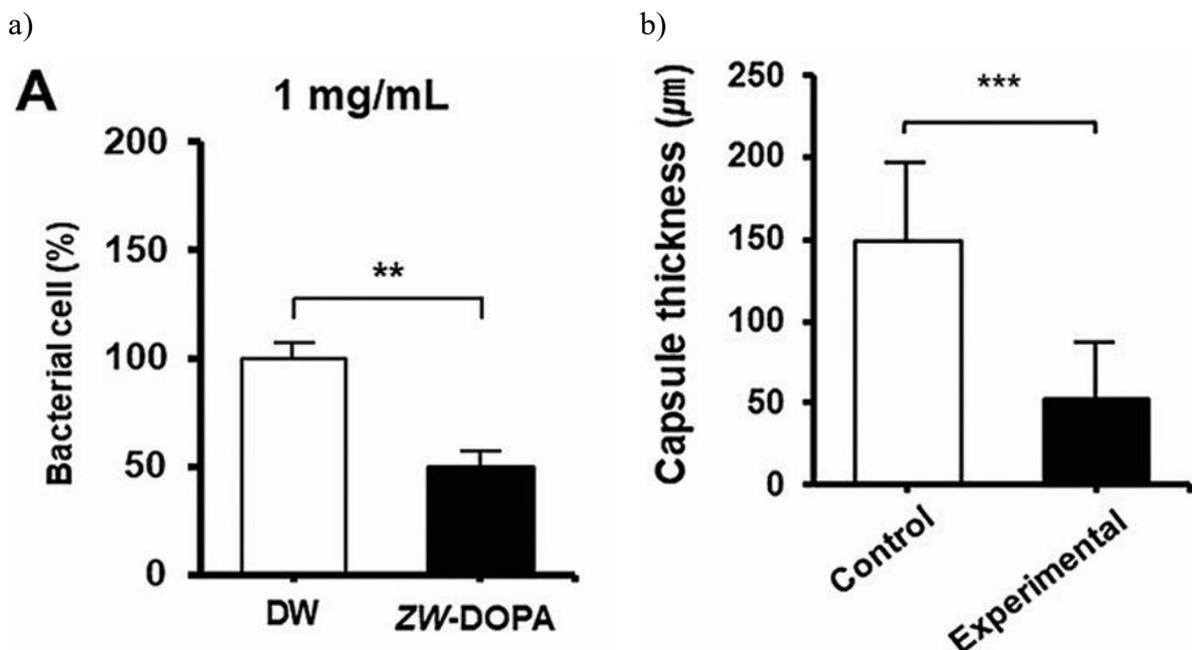


Figure 137 : a) Pourcentage de *S. epidermidis* calculé sur des surfaces de silicone contrôles (DW) en comparaison à des surfaces fonctionnalisées avec la ZW-DOPA. b) Épaisseur de la capsule formée autour d'implant en silicone contrôles et fonctionnalisés par la ZW-DOPA, implantés chez la souris [99]

Alors, inspirés par ces travaux remarquables, il a été question d'appliquer ce protocole avec l'ADOPA synthétisée au cours de nos travaux afin d'observer si l'on pouvait former une

couche de ce composé sur les échantillons de PDMS. Des échantillons de PDMS ont alors été placés en présence d'ADOPA à des concentrations de 0,5 et 1 mg.mL⁻¹ mélangé à du tampon tris et du périodate de sodium. Le mélange a été placé 24 heures sous agitation. L'oxydation en solution a pu être confirmée par le changement de couleur de la solution, passant de transparent à brun (Figure 138). Néanmoins, les résultats escomptés n'ont pas été obtenus. La mouillabilité de surface reste inchangée et les spectres FTIR ne présentent pas de modifications.

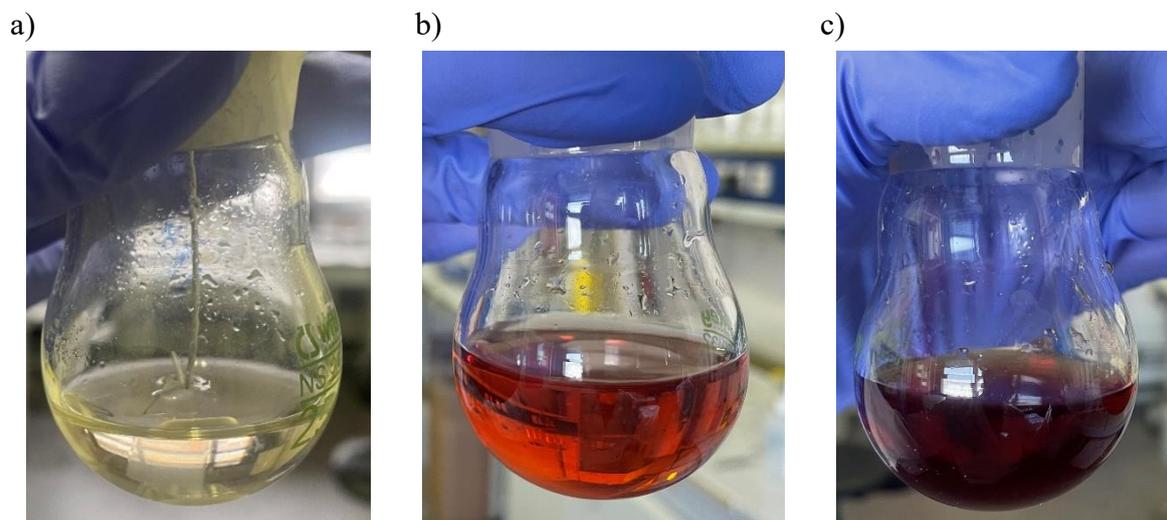


Figure 138 : Photographies d'expériences de polymérisation oxydative de l'ADOPA à a) début d'expérience, b) 0,5 mg.mL⁻¹ et c) 1 mg.mL⁻¹

2.3. Bilan

Les travaux relatifs à la fonctionnalisation du PDMS par un polymère de taille contrôlée en utilisant l'ADOPA ou l'acide caféique sont donc pour l'instant maintenus au stade de fixation des molécules. L'adhésion d'une molécule porteuse de groupement catéchol ne semble pas si évidente sur un matériau tel que le silicone. Par ailleurs, la polymérisation oxydative, bien que réalisée dans la littérature, n'a pas été concluante sur nos échantillons avec l'ADOPA synthétisée.

Cette voie de greffage nécessite désormais d'être poursuivie et constitue donc une perspective de travail pour la fonctionnalisation contrôlée du PDMS. Une fois les conditions d'adhésion déterminées, il faudra comme pour les expériences précédentes réaliser les essais biologiques et microbiologiques.

3. Greffage du copolymère AAc/NaSS en surface de PDMS

Des premiers essais ont été réalisés afin d'observer si un effet synergique des deux polymères PAAc et PNaSS pouvait avoir lieu en surface. Le greffage simultané de ces deux polymères a alors été mis en place. Pour cela, les deux polymères ont été introduits à même concentration (0,35 M) dans de l'eau et exposés aux rayonnements UV avec un échantillon préalablement activé. Les expériences ont été réalisées dans un premier temps de manière directe, sans modification du pH, puis en ajustant le pH de la même manière que pour le greffage du PAAc-pH seul. Les échantillons ont été caractérisés par mesure d'angle de contact et dosage colorimétrique au BT (Figure 139). Dans un souci de lisibilité, le greffage du copolymère PAAc/PNaSS sera noté « CoAA », tandis que le greffage PAAc/PNaSS avec ajustement du pH sera noté « CoAA-pH ». Les deux polymères constitutifs du copolymère sont hydrophiles, néanmoins on ne constate qu'une légère diminution de l'angle de contact apparent, atteignant $93,1^\circ$ pour le CoAA et 101° pour le CoAA-pH en moyenne. Les taux de greffages, bien que plus élevés que pour l'échantillon non greffé restent faible. Le greffage du CoAA atteint $4,58 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$, et plus faible encore, le CoAA-pH atteint $2,48 \cdot 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ contre $7,58 \cdot 10^{-9}$ en moyenne pour le PDMS non greffé. Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à un greffage efficient des surfaces. Si l'on s'intéresse aux rapports de réactivité des deux monomères (Tableau 26) on constate en effet qu'ils sont très différents l'un de l'autre. Or la copolymérisation est idéale lorsque le produit $r_1 \cdot r_2$ tend vers 1, mais elle vaut ici 0,1. Alors, cette condition de greffage ne sera pas retenue. Une autre stratégie doit être envisagée pour ces deux monomères. On peut imaginer deux greffages en deux temps, ou l'utilisation de l'AcV avec le NaSS. Ces propositions peuvent constituer des perspectives pour davantage évaluer l'influence des polymères bioactifs étudiés en surface du PDMS.

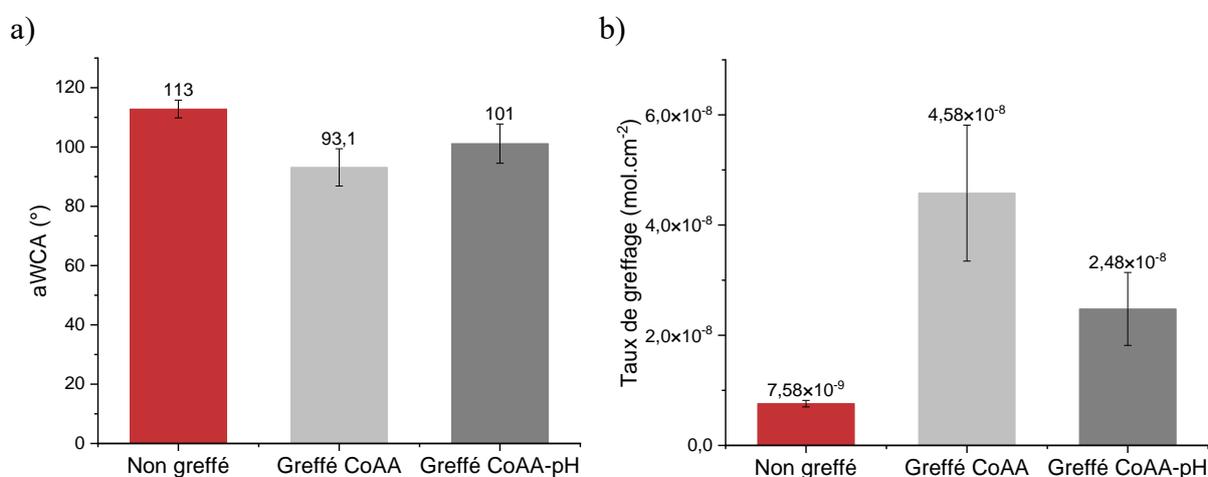


Figure 139 : a) aWCA et b) taux de greffages obtenus pour le greffage du copolymère PAAc/PNaSS avec et sans ajustement du pH, en comparaison au PDMS non greffé

Monomère 1	Monomère 2	r ₁	r ₂	Ref.
NaSS	MAc	0,75	0,62	Tosoh Spinomar [168]
NaSS	AAc	1,0	0,1	[169]

Tableau 26 : Rapports de réactivité des monomères NaSS, MAc et AAc

Le Tableau 26 montre cependant que le NaSS pourrait davantage copolymériser avec le monomère MAc, leurs rapports de réactivité étant plus proches. Des expériences de copolymérisation de ces deux monomères ont fait l'objet de précédents travaux au laboratoire [23,48,83,84].

Ici, de la même manière que précédemment, les premiers essais de copolymérisation ont été réalisés en mélangeant proportionnellement le NaSS au MAc. L'ajustement du pH n'est pas utilisé pour greffer le MAc car les précédents résultats ont montré que le greffage n'était pas concluant dans ces conditions. Le greffage est donc effectué pour un mélange des deux polymères à une concentration de 0,35 M et face aux rayonnements UV du pavé LED afin de limiter le durcissement de l'échantillon. Les résultats de mesure d'angle de contact apparent montrent des résultats satisfaisants, la mouillabilité augmente atteignant 78,8° (Figure 140a). Les taux de greffages obtenus sont également élevés, atteignant $3,84 \cdot 10^{-7}$ mol.cm⁻² en moyenne contre $6,10 \cdot 10^{-9}$ mol.cm⁻² pour le PDMS non greffé (Figure 140b). Malgré des pourcentages atomiques proches pour l'atome de carbone et d'oxygène, les résultats XPS (Tableau 27) montrent que la tendance reste à la diminution du pourcentage atomique du silicium et à la légère augmentation de celui du carbone. Aussi, la présence du soufre présent dans le PNaSS est détectée. Ces résultats mettent en évidence la présence du copolymère en surface. L'inconvénient persistant est que l'échantillon reste rigide et blanchi, le protocole n'est donc pas optimal pour une utilisation sur les enveloppes d'implant mammaire en PDMS.

Cependant, dans le but d'explorer les premières réponses biologiques, des observations microscopiques ont été réalisées sur des échantillons incubés avec des fibroblastes puis colorés (Figure 141). Ces surfaces de PDMS ont été comparées avec du PDMS non greffé et greffé par le PMAc, même si une nouvelle fois, les échantillons obtenus ont durci. Les résultats montrent que le greffage avec le PMAc a tendance à rendre la surface antiadhésive, ou à ralentir la prolifération cellulaire comme précédemment observé avec le PAAc. Après 3 jours d'incubation, seules certaines zones sont occupées par des cellules, agglomérées et peu développées. Le greffage du copolymère ne montre pas cet effet, la tendance est à la prolifération cellulaire. En revanche, les cellules restent arrondies les premières 24 heures. Puis, après 3 jours et 7 jours d'incubation, même si l'échantillon est recouvert de cellules, elles semblent plus agglomérées et moins étendues que pour une surface non greffée.

3. Greffage du copolymère AAc/NaSS en surface de PDMS

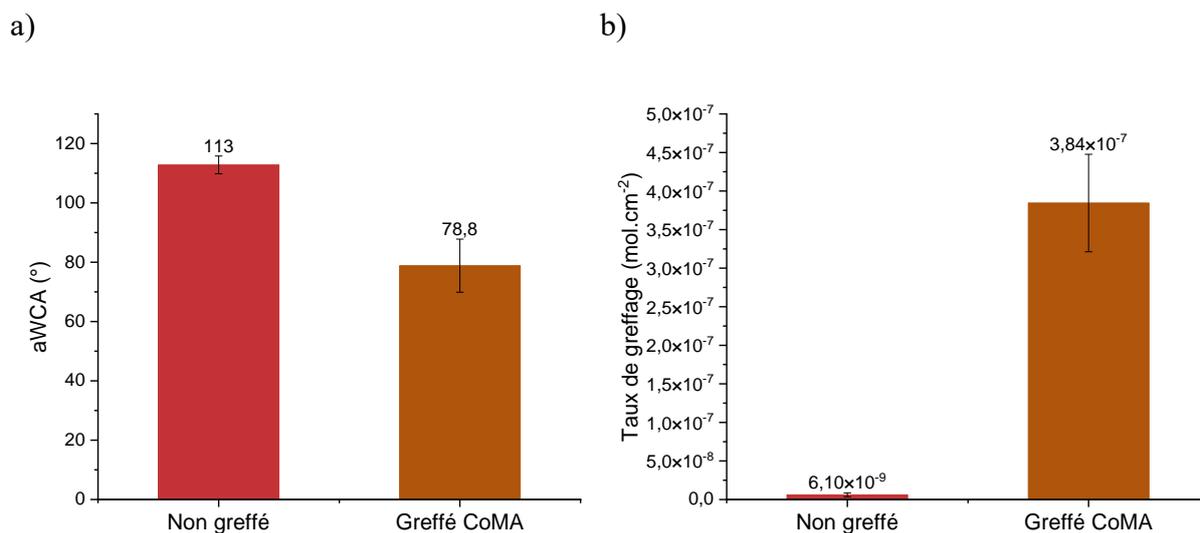


Figure 140 : a) aWCA et b) taux de greffages obtenus du copolymère PMAc/PNaSS en comparaison au PDMS non greffé

Atome	Position* (eV)	%at. non greffé	%at. greffé CoMA
C1s	283	49,1 ± 2,19	51,1 ± 0,86
O1s	531	23,0 ± 0,29	22,8 ± 0,74
Si2p	101	27,9 ± 2,143	24,6 ± 1,71
S2p	174	Non détecté	0,87 ± 0,05

Tableau 27 : Compositions élémentaires en pourcentage atomique obtenues par analyses XPS de surfaces de PDMS non greffées et greffées CoMA. (*Énergie de liaison pour le signal principal de l'élément donné)

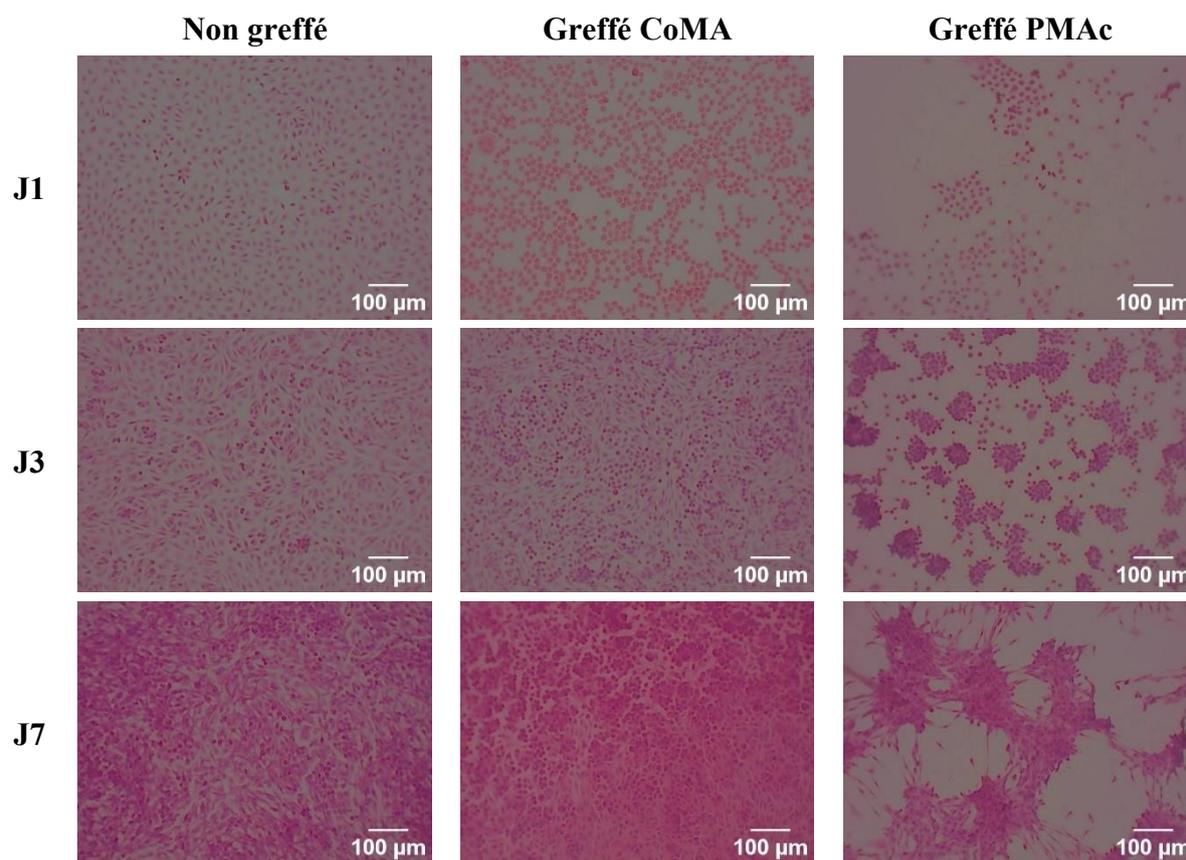


Figure 141 : Images au microscope optique de la prolifération des fibroblastes en surface d'échantillons de PDMS non greffé, greffé CoMA et greffé PMAc après 24 heures, 3 jours et 7 jours d'incubation

4. Conclusion partielle

L'ensemble des travaux présentés dans ce dernier chapitre ont constitué des pistes d'optimisation de la fonctionnalisation et de compréhension des mécanismes de surface.

Le greffage du PVAc et du PAbAc a permis l'amélioration de la prolifération des fibroblastes en surface, et ce, malgré la présence de groupements fonctionnels COO^- qui ralentissaient cette prolifération lors du greffage du PAAc. On ne peut alors pas parler de greffage d'un polymère bioactif à lui seul. Sa densité en surface, sa répartition sur la surface, la longueur de ses chaînes sont autant de paramètres à considérer pour définir son action envers l'environnement biologique. Cela est par ailleurs régi par la technique de greffage employée et par le matériau ou le substrat utilisé. La méthode de greffage « grafting to » a alors également été envisagée. Elle permet d'immobiliser en surface des chaînes de polymère de taille contrôlée. Cependant, elle n'est pour l'instant qu'au stade de développement sur le matériau PDMS. Les différentes méthodes de caractérisation n'ont pas permis de détecter la présence du polymère bioactif en surface. Le caractère mou et flexible du matériau peut expliquer la difficulté à réaliser cette fonctionnalisation en deux étapes. Ce constat souligne d'une part le caractère simple et efficace de la méthode « grafting from », mais également la dépendance des méthodes de fonctionnalisation vis-à-vis du substrat et du polymère. Finalement, ces deux pistes d'étude présentées ont montré que la stratégie employée pour greffer le PDMS avait des conséquences sur la conformation du polymère et par conséquent sur son mode d'action. Mais aussi, elles ont permis d'obtenir de nouveaux résultats et de nouvelles données concernant d'autres polymères bioactifs pouvant être utilisés sur ces surfaces.

Le PVAc se greffant sur le PDMS par la méthode « grafting from » sans l'altérer, il peut être envisagé d'étudier sa copolymérisation avec le PAAc ou le PNaSS. En effet, la copolymérisation fut l'une des pistes exploitées pour davantage fonctionnaliser la surface. Les effets synergiques du PAAc et du PNaSS ont été investigués. Cependant, la réactivité de ce premier ne lui permet pas de copolymériser favorablement avec le PNaSS via la méthode « grafting from ». Le PMAc étudié au début de ce manuscrit est plus adapté à ce procédé, mais le durcissement des surfaces reste une problématique à pallier.

Conclusion générale

Les études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité des travaux entrepris au laboratoire CB3S concernant la fonctionnalisation de surface de biomatériaux. Les objectifs se regroupant autour de la limitation des complications et infections, les études n'ont pour but que d'améliorer les traitements de surface en ce sens. Porté par les scandales sanitaires concernant les implants mammaires, le projet de thèse s'est concentré sur l'utilisation du PDMS dans les dispositifs médicaux. L'idée est de conférer de nouvelles propriétés biologiques et antibactériennes au matériau afin de prévenir les risques.

Le greffage de polymères bioactifs sur les surfaces est la stratégie mise en place. En particulier, ces travaux se sont concentrés sur les polymères porteurs de groupements carboxylates. Leur greffage sur les surfaces de PDMS via les irradiations UV s'est présenté comme un nouveau défi. Les principaux objectifs étaient d'étudier leur action envers l'environnement biologique et vis-à-vis des bactéries.

Les monomères acide acrylique et acide méthacrylique ont été choisis pour leur structure moléculaire simple, leur biocompatibilité et leurs propriétés antiadhésives. Le greffage a été entrepris par la méthode « grafting from » et à une concentration de 0,35 M en solution aqueuse. Les différentes techniques de caractérisation ont mis en évidence la présence du greffage sur le PDMS. Cependant, le matériau était endommagé : durci, blanchi et cassant. Si cette méthode peut convenir à des applications ne nécessitant pas le maintien de la flexibilité du PDMS, pour certains dispositifs microfluidiques par exemple, il est en revanche important de conserver ces propriétés initiales pour d'autres applications. Les échantillons de PDMS utilisés provenant d'enveloppes d'implants mammaires doivent conserver leur élasticité. La pénétration du monomère dans le réseau du PDMS et sa polymérisation sont la cause de ce phénomène d'altération. Alors, pour le limiter, le pH de la solution de polymérisation a été modifié. En se plaçant à $pK_a(\text{monomère}) + 1$, le monomère arbore sa forme basique et est ainsi chargé. La présence de charges aura pour effet de générer des répulsions stériques, limitant la pénétration du monomère dans la matrice du PDMS et favorisant ainsi son greffage en surface. Ce protocole est adapté au greffage du PAAc, mais pas à celui du PMAc qui n'est pas homogène ni répétable. La suite des expériences a alors été poursuivie avec le greffage du premier. Des caractérisations de l'état de surface du PDMS greffé ont été menées et ont montré qu'au niveau microscopique des crêtes et fissures étaient encore visibles. Les essais de traction ont cependant montré qu'en comparaison aux surfaces non fonctionnalisées, le comportement élastique du PDMS était maintenu. Enfin, les analyses topographiques de surface ont permis de formuler des hypothèses sur l'allure et le comportement du polymère. Les résultats montrent que de longues chaînes sont probablement formées, couvrant l'ensemble de l'échantillon. Cette première partie a alors permis la mise en place du greffage effectif en surface et donne de nombreuses indications sur la densité et le comportement du polymère greffé.

L'effet des propriétés de surface sur la réponse biologique a été investigué. Le greffage du PAAc sur le PDMS perturbe les mécanismes biologiques. Il engendre une adhésion limitée et un ralentissement considérable de la prolifération des fibroblastes. Les caractérisations complémentaires ont montré que l'orientation et la conformation des protéines au contact des surfaces greffées pouvaient être responsables de ce phénomène. La mesure d'angle de contact apparent et la spectroscopie FTIR mettent en évidence des interactions différentes entre les protéines et la surface greffée en comparaison à une surface témoin. Des analyses à l'AFM ont débuté afin d'accéder à l'orientation des protéines sur les surfaces. Elles ont été réalisées sur le PDMS greffé par le PAAc-pH en présence de Fn et de Fg (Figure 142). Cependant, le caractère « mou » et électrostatique du PDMS rend complexe l'acquisition des scans. Peu d'images ont pour le moment été acquises. Des différences d'aspect de surface sont observables, mais elles ne permettent pas pour l'instant de conclure quant au changement d'orientation des protéines en comparaison à la surface non greffée. Les expériences doivent être poursuivies et plus de scans doivent être réalisés.

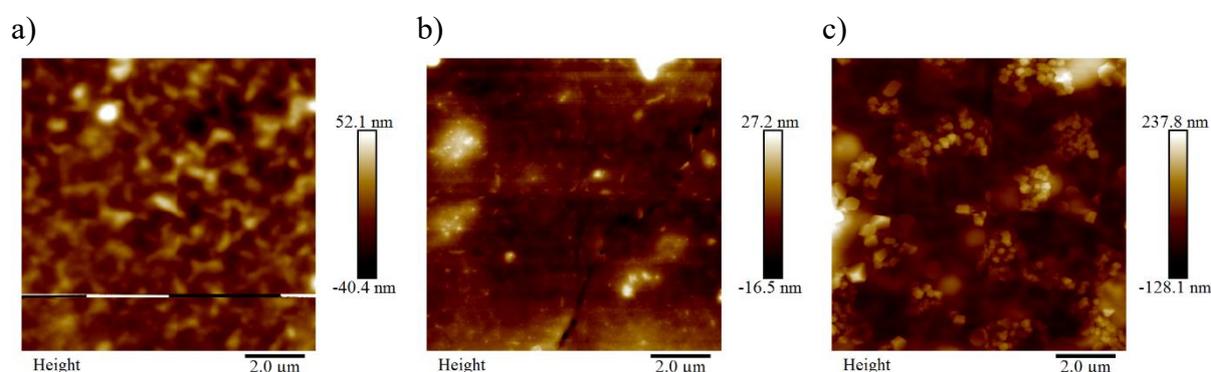


Figure 142 : Scans AFM de surfaces de PDMS greffées par le PAAc-pH a) seul, b) avec adsorption de Fn, c) avec adsorption de Fg

Enfin, de premières analyses microbiologiques des surfaces au contact de *S. epidermidis* ont été réalisées. Les résultats mettent en évidence une inhibition de l'adhésion bactérienne lorsque le fibrinogène est pré-adsorbé sur les surfaces. Dans un premier temps, ce constat a mis en évidence l'affinité d'une catégorie de bactérie à l'égard de certaines protéines et en particulier de certaines de ses régions. Puis, on constate finalement des interdépendances entre les matériaux étudiés, la fonctionnalisation choisie, les protéines et autres composés biologiques : cellules et bactéries. Ce résultat pointe du doigt l'importance du choix de la fonctionnalisation vis-à-vis de l'application visée. Dans cette étude, les expériences n'ont pour le moment été réalisées qu'en présence d'une certaine catégorie de cellules, les fibroblastes, et de bactéries, les *S. epidermidis*. Mais les résultats permettent d'émettre des hypothèses concernant un type d'application. Le PAAc-pH peut fonctionnaliser des dispositifs où l'accumulation des cellules n'est pas souhaité et où il faut agir pour prévenir une potentielle contamination bactérienne. C'est le cas de la face interne des sondes. Dans le cas où la pose

d'un dispositif est provisoire, son intégration dans le corps n'est pas souhaitable afin de permettre son retrait. Ainsi, la fonctionnalisation de la face externe par le composé antiadhésif peut également convenir. À l'inverse le PNaSS est potentiellement davantage adapté à des implants à long terme afin d'améliorer leur intégration dès les premiers instants d'implantation.

Des perspectives de travail concernant la compréhension des interactions entre la surface fonctionnalisée et l'environnement biologique ont été amorcées. Ces travaux passent par le greffage de deux nouveaux polymères bioactifs, porteurs de groupements carboxylates mais plus proches structurellement du PNaSS : le PVAc et le PAbAc. On constate d'abord que même si le protocole doit être adapté à chaque polymère, l'utilisation des irradiations UV pour activer les surfaces (160 mW.cm^{-2}) et provoquer la réaction de polymérisation (220 mW.cm^{-2}) s'est montrée efficace. En revanche, elle ne permet pas d'avoir le contrôle sur la qualité du greffage en surface. La taille des chaînes et leur répartition, même si elles couvrent généralement l'ensemble de la surface, sont aléatoires. En fonction du polymère bioactif employé, de sa réactivité et de son architecture initiale, la topographie en surface du PDMS est impactée. En conséquence, pour les polymères utilisés au cours de ces travaux, la densité de groupements, de charges et la rugosité de surface se voit changée. Enfin, tous ces paramètres ont une conséquence directe sur la réponse biologique et microbiologique. Les deux premières parties du Chapitre 5 mettent en évidence ce point. Elles soulignent que la mise en place d'une fonctionnalisation de surface d'un biomatériau ne dépend pas uniquement des groupements fonctionnels choisis mais également du protocole de greffage mis en place. Le greffage du PVAc a ainsi montré que la prolifération des fibroblastes en présence de fibronectine était améliorée. Ce résultat est plus proche des effets provoqués par le PNaSS. En revanche, la concentration, la densité de groupements présents et l'estimation de la structure secondaire des protéines adhérees montrent des différences. Finalement, ces différents greffages de polymères par la technique « grafting from » permettent également de constituer une base de résultats permettant de choisir la fonctionnalisation adaptée à une application visée. Enfin, il peut être envisagé d'approfondir davantage la fonctionnalisation. Ce point de vue prend en compte la combinaison des propriétés conférées par les différents polymères bioactifs en passant par la synthèse de copolymères. Aussi, les polymères étant porteurs de groupements réactifs, ils peuvent jouer le rôle de support d'une fonctionnalisation additionnelle en plus de leurs propriétés initiales. Sur cette idée, l'immobilisation de composés biologiques tels que le collagène a été envisagée.

De manière à approfondir cette étude, les différents points abordés dans le Chapitre 5 doivent être poursuivis. En termes de perspectives, il serait également pertinent de spécifier davantage la réalisation des tests biologiques vis-à-vis d'une application. Si l'on reprend l'exemple du greffage du PAAc-pH sur la face interne d'une sonde, la réalisation de tests biologiques en présence de cellules épithéliales peuvent être plus appropriées. Aussi, les analyses microbiologiques sont à poursuivre, notamment avec des échantillons greffés au PVAc et au PAAc, mais aussi avec d'autres catégories de bactéries. On peut citer le *P. aeruginosa* et

R. pickettii pour la poursuite des investigations concernant les infections bactériennes liées aux problématiques impliquant les implants mammaires. Il peut également être pertinent d'évaluer la stabilité de la fonctionnalisation dans le temps. Malgré les résultats de caractérisation mécanique satisfaisants, le Chapitre 3 a souligné les défauts de surface engendrés par la fonctionnalisation du PDMS par le PAAc. Réaliser ces mêmes essais de caractérisation dans le temps permettra de vérifier d'autant plus la fiabilité du greffage. La poursuite des caractérisations, notamment biologiques, pour la condition de polymérisation du PAAc-pH aux UV pendant 30 minutes peut par ailleurs constituer une alternative à l'altération des surfaces.

Enfin le manque de procédés pour produire le PDMS fonctionnalisé à l'échelle industrielle est une difficulté. L'utilisation du pavé LED pour étendre la surface de greffage fut déjà une option envisagée. Mais elle a déjà montré des difficultés concernant la densité de greffage et son uniformité. La répétabilité des conditions expérimentales à plus grande échelle doit alors devenir un nouvel enjeu de la fonctionnalisation.

Annexes

Annexe 1

Fréquences attribuées aux structures secondaires des protéines sous la bande amide I déconvoluée dans H₂O et D₂O [126].

H ₂ O [†]		D ₂ O [‡]	
Mean frequencies	Assignment	Mean frequencies	Assignment
1624±1.0	β-sheet	1624±4.0	β-sheet
1627±2.0	β-sheet		
1633±2.0	β-sheet	1631±3.0	β-sheet
1638±2.0	β-sheet	1637±3.0	β-sheet
1642±1.0	β-sheet	1641±2.0	3 ₁₀ Helix
1648±2.0	Random	1645±4.0	Random
1656±2.0	α Helix	1653±4.0	α-Helix
1663±3.0	3 ₁₀ Helix	1663±4.0	β-Turn
1667±1.0	β-Turn	1671±3.0	β-Turn
1675±1.0	β-Turn	1675±5.0	β-sheet
1680±2.0	β-Turn	1683±2.0	β-Turn
1685±2.0	β-Turn	1689±2.0	β-Turn
1691±2.0	β-sheet	1694±2.0	β-Turn
1696±2.0	β-sheet		

[†] Data are from Dong *et al.* [12,13]; [‡] Data from Susi *et al.* [4,7].

Annexe 2

Exemple du code en langage Python élaboré pour permettre la déconvolution de la bande spectrale amide I et estimer les proportions en structures secondaires.

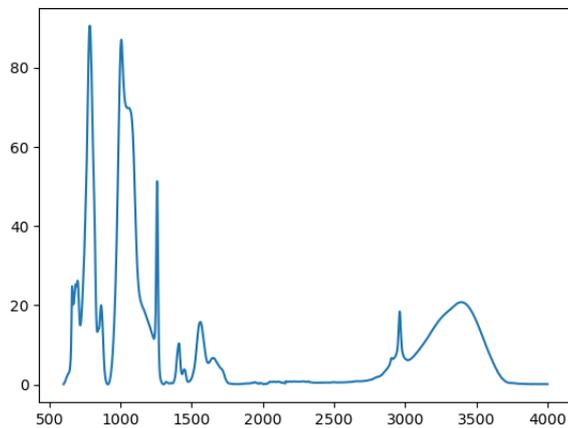
Dans l'exemple, le code est appliqué pour le spectre FTIR de la fibronectine adsorbée sur du PDMS fonctionnalisé par le PAAc-pH

```
Entrée [1]: #Importation des bibliothèques
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.optimize import curve_fit
```

```
Entrée [2]: #Charge des données expérimentales du spectre IR sous forme de fichier .txt
x = np.loadtxt("C:ChemIn1.txt")
y = 100-np.loadtxt("C:ChemIn2.txt")
```

```
Entrée [3]: plt.plot(x,y)
```

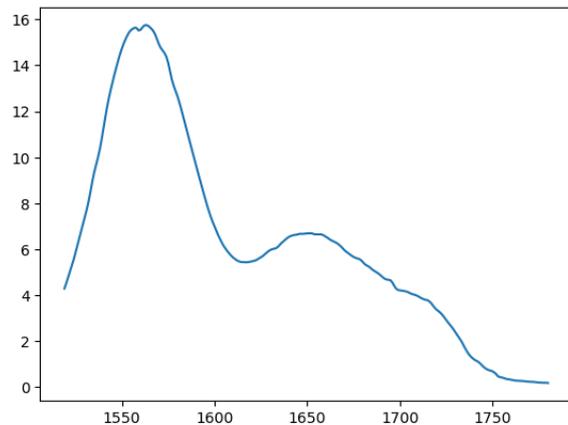
```
Out[3]: [<matplotlib.lines.Line2D at 0x1e45da65a90>]
```



```
Entrée [4]: x2 = x[2220:2482] #1519-1781 cm-1
y2 = y[2220:2482]
```

```
Entrée [5]: plt.plot(x2,y2)
```

```
Out[5]: [<matplotlib.lines.Line2D at 0x1e45fa73090>]
```



```
Entrée [6]: def gaussian(x, amp, mu, sig):
fun_val = amp*np.exp(-np.power(x-mu,2.)/(2*np.power(sig,2.)))
return fun_val
```

```
Entrée [7]: def obj(x, amp0, mu0, sig0, amp1, mu1, sig1, amp2, mu2, sig2, amp3, mu3, sig3, amp4, mu4, sig4, amp5, mu5, sig5, amp6, mu6, sig6):
    fun_val0 = amp0*np.exp(-np.power(x-mu0,2.)/(2*np.power(sig0,2.)))
    fun_val1 = amp1*np.exp(-np.power(x-mu1,2.)/(2*np.power(sig1,2.)))
    fun_val2 = amp2*np.exp(-np.power(x-mu2,2.)/(2*np.power(sig2,2.)))
    fun_val3 = amp3*np.exp(-np.power(x-mu3,2.)/(2*np.power(sig3,2.)))
    fun_val4 = amp4*np.exp(-np.power(x-mu4,2.)/(2*np.power(sig4,2.)))
    fun_val5 = amp5*np.exp(-np.power(x-mu5,2.)/(2*np.power(sig5,2.)))
    fun_val6 = amp6*np.exp(-np.power(x-mu6,2.)/(2*np.power(sig6,2.)))
    return fun_val0 + fun_val1 + fun_val2 + fun_val3 + fun_val4 + fun_val5 + fun_val6
```

```
Entrée [8]: initial_guess_peak = [15,1560,20, 2,1633,20, 4,1648,10, 4,1656,10, 1,1676,10, 0.5,1694,10, 0.5,1709,20] #estimations initiales p0
```

```
Entrée [9]: bnd= ((7,1557,2, 0,1632,2, 0,1646,2, 0,1654,2, 0,1675,2, 0,1692,2, 0,1704,2),(16,1563,50, 8,1634,25, 8,1650,25, 8,1658,25, 8,1677,25))
```

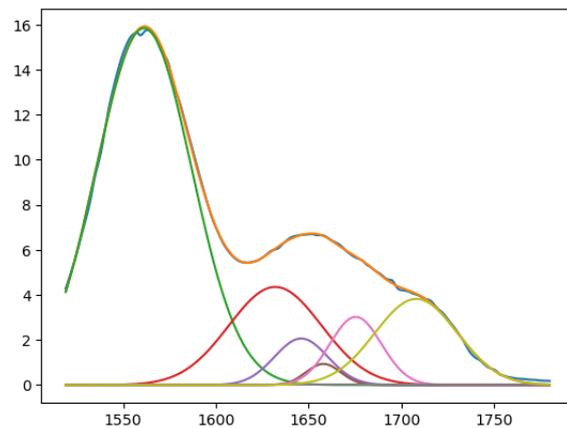
```
Entrée [10]: popt, pcov = curve_fit(obj, x2, y2, p0 = initial_guess_peak, bounds=bnd)
```

```
Entrée [11]: y_fit = obj(x2, *popt)
```

```
Entrée [12]: y_fit0 = gaussian(x2, *popt[0:3])
y_fit1 = gaussian(x2, *popt[3:6])
y_fit2 = gaussian(x2, *popt[6:9])
y_fit3 = gaussian(x2, *popt[9:12])
y_fit4 = gaussian(x2, *popt[12:15])
y_fit5 = gaussian(x2, *popt[15:18])
y_fit6 = gaussian(x2, *popt[18:21])
```

```
Entrée [13]: plt.plot(x2,y2)
plt.plot(x2,y_fit)
plt.plot(x2,y_fit0)
plt.plot(x2,y_fit1)
plt.plot(x2,y_fit2)
plt.plot(x2,y_fit3)
plt.plot(x2,y_fit4)
plt.plot(x2,y_fit5)
plt.plot(x2,y_fit6)
```

```
Out[13]: [<matplotlib.lines.Line2D at 0x1e45faa1050>]
```



```
Entrée [14]: from numpy import trapz
```

```
Entrée [15]: bsheet1 = trapz(y_fit1)
rdm = trapz(y_fit2)
ahelix = trapz(y_fit3)
bturn = trapz(y_fit4)
bsheet2 = trapz(y_fit5)
total = bsheet1 + rdm + ahelix + bturn + bsheet2
```

```
Entrée [16]: print(total, bsheet1, rdm, ahelix, bturn, bsheet2)
```

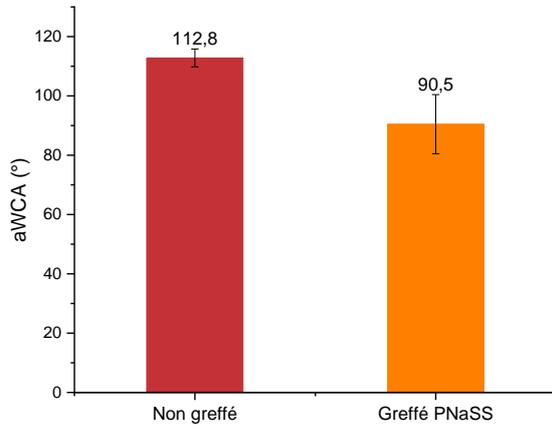
```
474.07324699899436 272.7834910005239 74.46229444407706 21.91295225409521 104.91450929657077 3.72738698836436e-09
```

Annexe 3

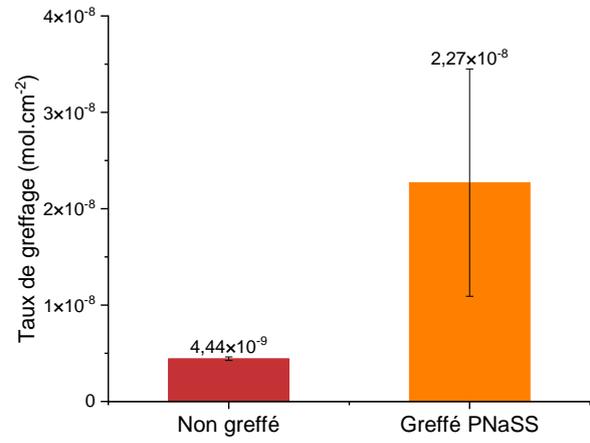
Données concernant le greffage du PNaSS sur les surfaces de PDMS

- a) Mesures d'aWCA
- b) Taux de greffage en surface

a)



b)

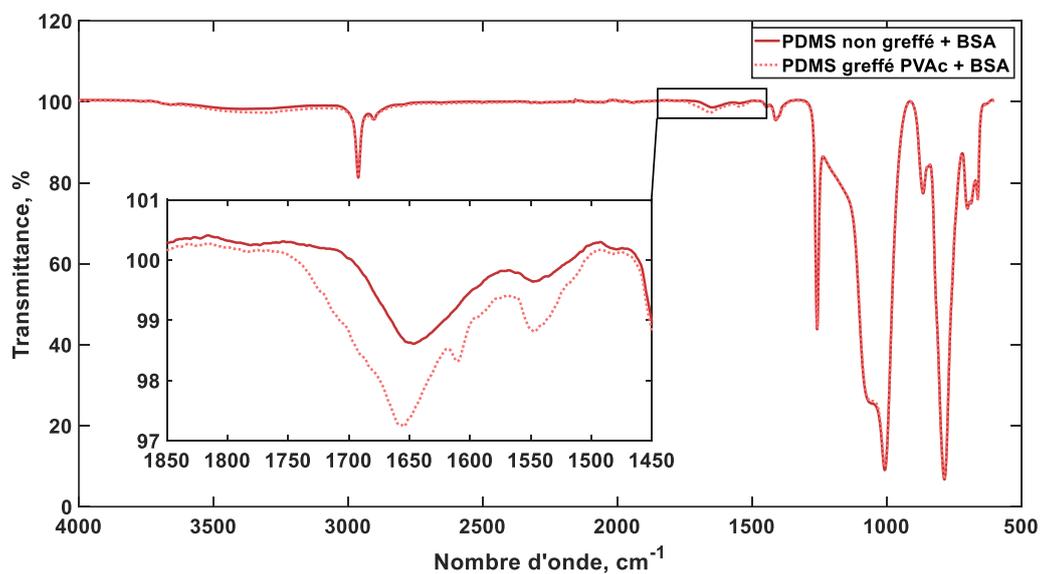


Annexe 4

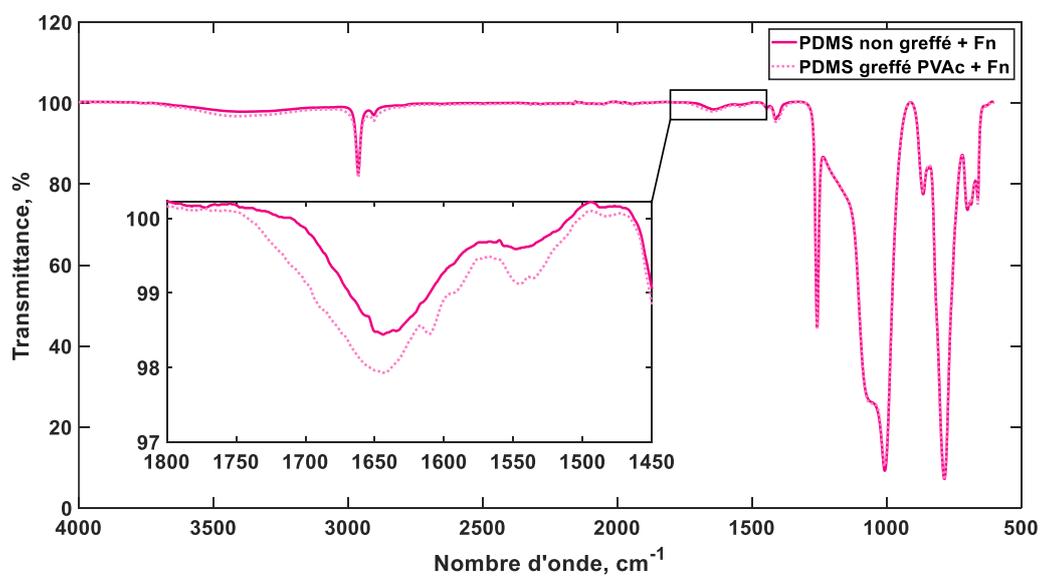
Interactions des protéines avec les surfaces de PDMS greffées par le PVAc

- a) BSA
- b) Fn
- c) Fg

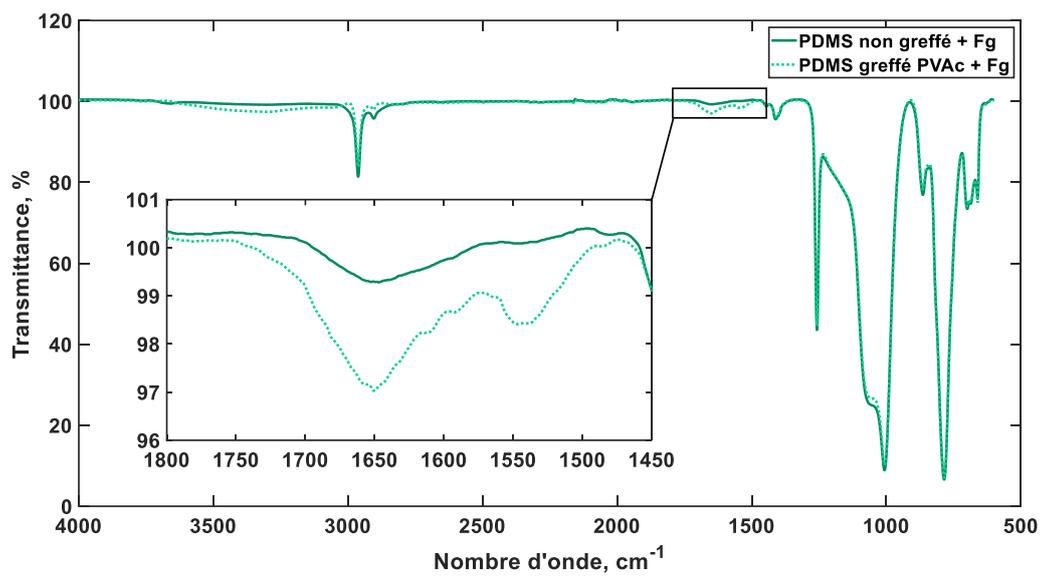
a)



b)



c)

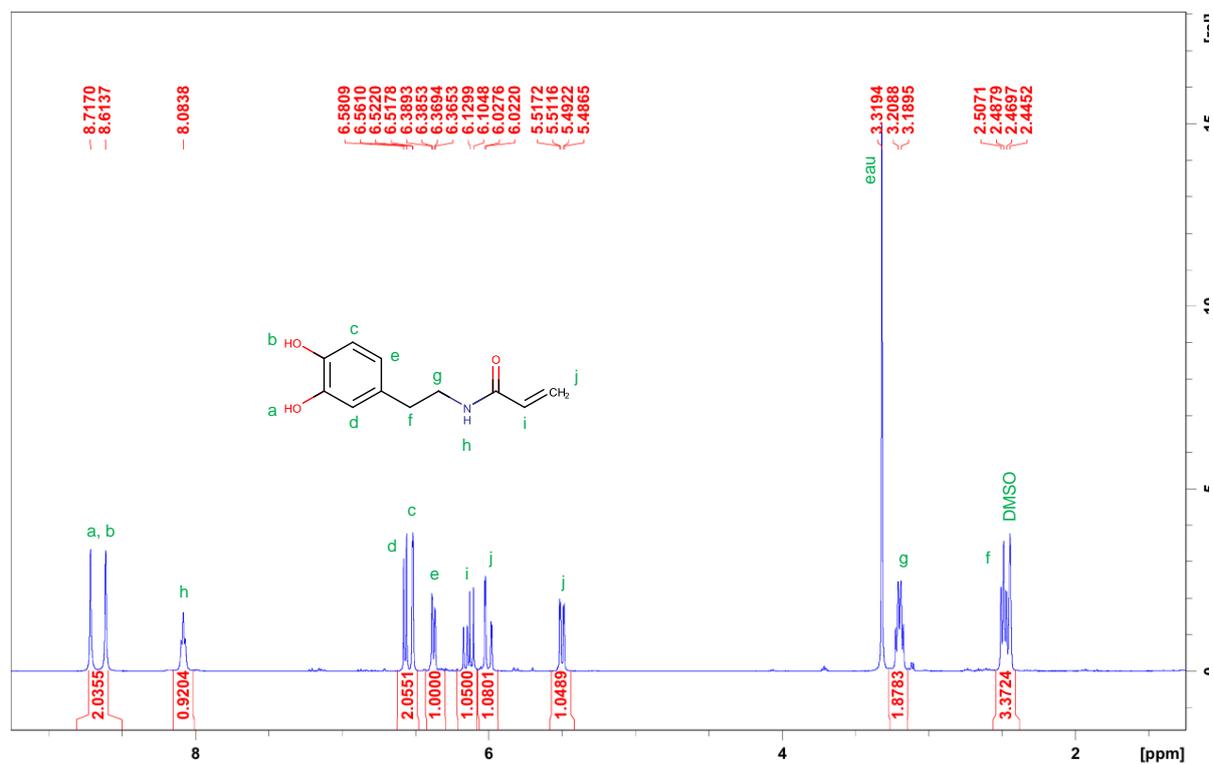


Annexe 5

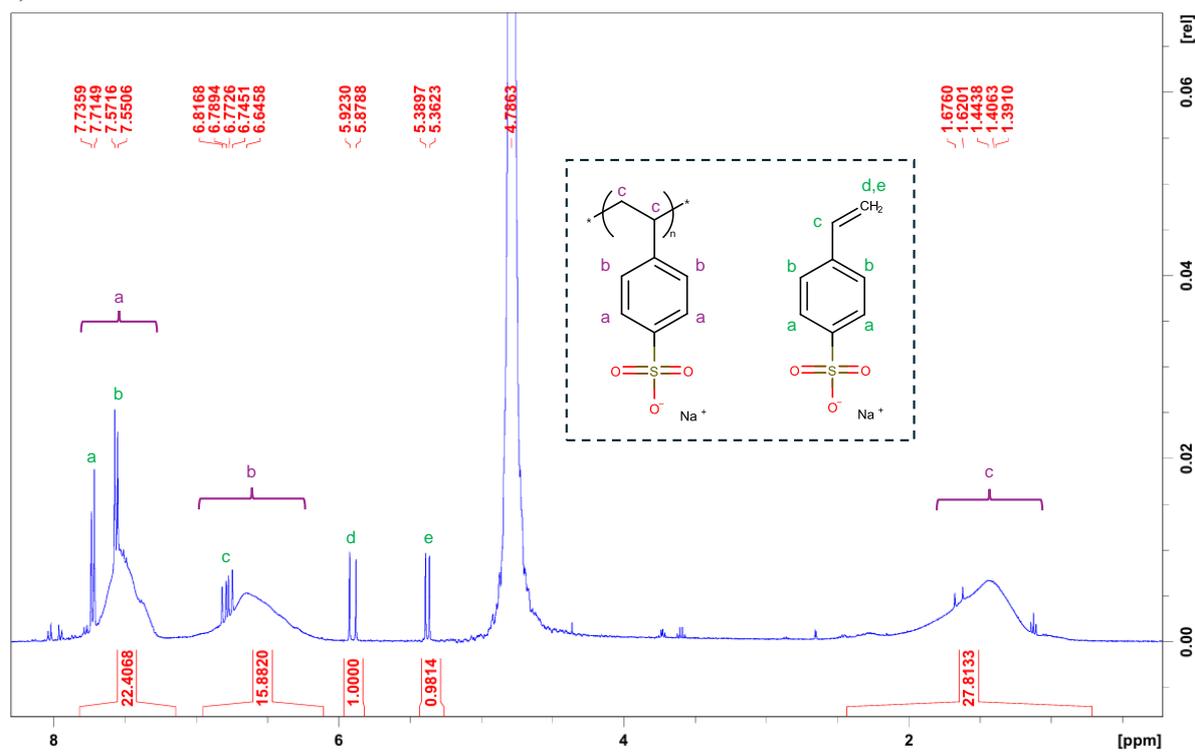
Spectre RMN attribué à :

- La synthèse de l'ADOPA
- La synthèse du polyNaSS (10 kDa) avant RAFT

a)



b)



Le taux de conversion du monomère NaSS en polymère polyNaSS obtenu est d'environ 88 %.

Production scientifique

Publications scientifiques

- A. Wozniak, V. Humblot, R. Vayron, R. Delille, C. Falentin-Daudré, Simple UV-Grafting of PolyAcrylic and PolyMethacrylic Acid on Silicone Breast Implant Surfaces: Chemical and Mechanical Characterizations, *Coatings* 13 (2023) 1888. <https://doi.org/10.3390/coatings13111888>.
- A. Wozniak, C. Falentin-Daudré, First biological response on polyAcrylic Acid UV-grafted PDMS surface: Towards medical application, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 703 (2024) 135346. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.135346>.
- A. Fantou, A. Malchère, A. Wozniak, L. Roiban, S. Meille, K. Masenelli-Varlot, S. Tadier, In operando study of gypsum crystal growth through in-cell environmental SEM, *J. Cryst. Growth* 628 (2024) 127515. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2023.127515>.

Références bibliographiques

- [1] Sta Apolónia, Bragança, Portugal, andrews.va.souza@alunos.ipb.pt, A. Victor, J. Ribeiro, Campus Sta Apolónia;Bragança;Portugal; jribeiro@ipb.pt, F. F. Araújo, CEFET/RJ Campus Angra dos Reis;Rio de Janeiro;Brasil; fernando.araujo@cefet-rj.br, Study of PDMS characterization and its applications in biomedicine: A review, *JMEB* 4 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.24243/JMEB/4.1.163>.
- [2] P. Hron, Hydrophilisation of silicone rubber for medical applications, *Polym. Int.* 52 (2003) 1531–1539. <https://doi.org/10.1002/pi.1273>.
- [3] M. Zare, E.R. Ghomi, P.D. Venkatraman, S. Ramakrishna, Silicone-based biomaterials for biomedical applications: Antimicrobial strategies and 3D printing technologies, *J of Applied Polymer Sci* 138 (2021) 50969. <https://doi.org/10.1002/app.50969>.
- [4] F. Schneider, T. Fellner, J. Wilde, U. Wallrabe, Mechanical properties of silicones for MEMS, *J. Micromech. Microeng.* 18 (2008) 065008. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/6/065008>.
- [5] M.P. Wolf, G.B. Salieb-Beugelaar, P. Hunziker, PDMS with designer functionalities— Properties, modifications strategies, and applications, *Progress in Polymer Science* 83 (2018) 97–134. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.001>.
- [6] 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>.
- [7] I. Miranda, A. Souza, P. Sousa, J. Ribeiro, E.M.S. Castanheira, R. Lima, G. Minas, Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review, *JFB* 13 (2021) 2. <https://doi.org/10.3390/jfb13010002>.
- [8] M. Lam, C. Falentin-Daudré, Implication of the Nature and Texturation of Silicone Surfaces on the Grafting of PolyNaSS, a Bioactive Polymer, *IRBM* 43 (2022) 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2021.12.003>.
- [9] S. Manav, M.S. Ayhan, E. Deniz, E. Özkoçer, Ç. Elmas, M. Yalinay, E. Şahin, Capsular contracture around silicone miniimplants following bacterial contamination: an in vivo comparative experimental study between textured and polyurethane implants, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 73 (2020) 1747–1757. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.02.049>.
- [10] W. Sun, W. Liu, Z. Wu, H. Chen, Chemical Surface Modification of Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications, *Macromol. Rapid Commun.* 41 (2020) 1900430. <https://doi.org/10.1002/marc.201900430>.
- [11] 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 Biomaterialia* 121 (2021) 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.020>.
- [12] B.N. Muñoz-Sánchez, S.F. Silva, D. Pinho, E.J. Vega, R. Lima, Generation of micro-sized PDMS particles by a flow focusing technique for biomicrofluidics applications, *Biomicrofluidics* 10 (2016) 014122. <https://doi.org/10.1063/1.4943007>.
- [13] K.M.F. Rossi De Aguiar, M.V. Nascimento, J.L. Faccioni, P.-L.M. Noeske, L. Gätjen, K. Rischka, U.P. Rodrigues-Filho, Urethanes PDMS-based: Functional hybrid coatings for metallic dental implants, *Applied Surface Science* 484 (2019) 1128–1140. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.04.058>.

- [14] M.J. Schöning, M. Jacobs, A. Muck, D.-T. Knobbe, J. Wang, M. Chatrathi, S. Spillmann, Amperometric PDMS/glass capillary electrophoresis-based biosensor microchip for catechol and dopamine detection, *Sensors and Actuators B: Chemical* 108 (2005) 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.032>.
- [15] F. Abbasi, H. Mirzadeh, A.-A. Katbab, Modification of polysiloxane polymers for biomedical applications: a review, *Polym. Int.* 50 (2001) 1279–1287. <https://doi.org/10.1002/pi.783>.
- [16] A. Shakeri, S. Khan, T.F. Didar, Conventional and emerging strategies for the fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices, *Lab Chip* 21 (2021) 3053–3075. <https://doi.org/10.1039/D1LC00288K>.
- [17] P.-Y. Yeh, N.A.A. Rossi, J.N. Kizhakkedathu, M. Chiao, A silicone-based microfluidic chip grafted with carboxyl functionalized hyperbranched polyglycerols for selective protein capture, *Microfluid Nanofluid* 9 (2010) 199–209. <https://doi.org/10.1007/s10404-009-0535-1>.
- [18] M.H. Schneider, H. Willaime, Y. Tran, F. Rezgui, P. Tabeling, Wettability Patterning by UV-Initiated Graft Polymerization of Poly(acrylic acid) in Closed Microfluidic Systems of Complex Geometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8848–8855. <https://doi.org/10.1021/ac101345m>.
- [19] C.M.C. Faustino, S.M.C. Lemos, N. Monge, I.A.C. Ribeiro, A scope at antifouling strategies to prevent catheter-associated infections, *Advances in Colloid and Interface Science* 284 (2020) 102230. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102230>.
- [20] H. Zhang, M. Chiao, Anti-fouling Coatings of Poly(dimethylsiloxane) Devices for Biological and Biomedical Applications, *J. Med. Biol. Eng.* 35 (2015) 143–155. <https://doi.org/10.1007/s40846-015-0029-4>.
- [21] C.R. Arciola, R. Caramazza, A. Pizzoferrato, In vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* on heparin-surface-modified intraocular lenses, *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 20 (1994) 158–161. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(13\)80157-5](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(13)80157-5).
- [22] L. Santos, D. Rodrigues, M. Lira, M.E.C.D.R. Oliveira, R. Oliveira, E.Y.-P. Vilar, J. Azeredo, The influence of surface treatment on hydrophobicity, protein adsorption and microbial colonisation of silicone hydrogel contact lenses, *Contact Lens and Anterior Eye* 30 (2007) 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2006.12.007>.
- [23] 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>.
- [24] F. El Khadali, G. Hélyary, 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>.
- [25] S. Anjum, S. Singh, L. Benedicte, P. Roger, M. Panigrahi, B. Gupta, Biomodification Strategies for the Development of Antimicrobial Urinary Catheters: Overview and Advances, *Global Challenges* 2 (2018) 1700068. <https://doi.org/10.1002/gch2.201700068>.
- [26] A. Braem, N.H.N. Kamarudin, N. Bhaskar, Z. Hadzhieva, A. Mele, J. Soulié, D.P. Linklater, L. Bonilla-Gameros, A.R. Boccaccini, I. Roy, C. Drouet, E.P. Ivanova, D. Mantovani, B. Basu, Biomaterial strategies to combat implant infections: new perspectives to old challenges, *International Materials Reviews* (2023) 1–39. <https://doi.org/10.1080/09506608.2023.2193784>.

- [27] 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, *British Journal of Surgery* 100 (2013) 768–774. <https://doi.org/10.1002/bjs.9084>.
- [28] P. Susini, G. Nisi, D.M. Pierazzi, F.R. Giardino, M. Pozzi, L. Grimaldi, R. Cuomo, Advances on Capsular Contracture—Prevention and Management Strategies: A Narrative Review of the Literature, *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open* 11 (2023) e5034. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000005034>.
- [29] 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>.
- [30] A.S. Mehdi, G. Bitar, R.K. Sharma, S. Iyengar, D. El-Sharkawi, M.K. Tasoulis, A.D. Attygalle, D. Cunningham, B. Sharma, Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma (BIA-ALCL): a good practice guide, pictorial review, and new perspectives, *Clinical Radiology* 77 (2022) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2021.09.002>.
- [31] J.S. Lee, B.H. Shin, B.Y. Yoo, S. Nam, M. Lee, J. Choi, H. Park, Y.B. Choy, C.Y. Heo, W. Koh, Modulation of Foreign Body Reaction against PDMS Implant by Grafting Topographically Different Poly(acrylic acid) Micropatterns, *Macromol. Biosci.* 19 (2019) 1900206. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900206>.
- [32] V. Moris, M. Lam, L. Amoureux, A. Magallon, A. Guilloteau, T. Maldiney, N. Zwetyenga, C. Falentin-Daudre, C. Neuwirth, What is the best technic to dislodge *Staphylococcus epidermidis* biofilm on medical implants?, *BMC Microbiol* 22 (2022) 192. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02606-x>.
- [33] H. Felgueiras, Synthesis and grafting of bioactive polymers to create biomimetic surfaces which can control the host response : Study of the biological mechanisms from the origin of the observed activity, Université Paris XIII, n.d. <https://theses.hal.science/tel-01253854>.
- [34] 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>.
- [35] S. Tunc, M.F. Maitz, G. Steiner, L. Vázquez, M.T. Pham, R. Salzer, In situ conformational analysis of fibrinogen adsorbed on Si surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42 (2005) 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.03.004>.
- [36] T.A. Horbett, J.L. Brash, eds., *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0602>.
- [37] V. Hlady, J. Buijs, Protein adsorption on solid surfaces, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996) 72–77. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80098-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80098-X).
- [38] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science* 162 (2011) 87–106. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>.
- [39] B. Sivaraman, R.A. Latour, The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen, *Biomaterials* 31 (2010) 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.008>.
- [40] J.E. Dyr, I. Tichý, M. Jiroušková, P. Tobiška, R. Slavík, J. Homola, E. Brynda, M. Houska, J. Suttner, Molecular arrangement of adsorbed fibrinogen molecules characterized by

- specific monoclonal antibodies and a surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical* 51 (1998) 268–272. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00204-4).
- [41] S.L. Hirsh, D.R. McKenzie, N.J. Nosworthy, J.A. Denman, O.U. Sezerman, M.M.M. Bilek, The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103 (2013) 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039>.
- [42] Y. Arima, H. Iwata, Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 4079. <https://doi.org/10.1039/b708099a>.
- [43] 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>.
- [44] C.C. Barrias, M.C.L. Martins, G. Almeida-Porada, M.A. Barbosa, P.L. Granja, The correlation between the adsorption of adhesive proteins and cell behaviour on hydroxyl-methyl mixed self-assembled monolayers, *Biomaterials* 30 (2009) 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.048>.
- [45] D. Kwak, Y. Wu, T.A. Horbett, Fibrinogen and von Willebrand’s factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma, *J Biomedical Materials Res* 74A (2005) 69–83. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30365>.
- [46] G. Pavon-Djavid, G. Héлары, V. Migonney, « Les biomatériaux inhibiteurs de l’adhérence et de la prolifération bactérienne : un enjeu pour la prévention des infections sur matériel prothétique », *ITBM-RBM* 26 (2005) 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2005.04.012>.
- [47] P. Francois, D. Letourneur, D.P. Lew, J. Jozefonwicz, P. Vaudaux, Inhibition by heparin and derivatized dextrans of Staphylococcus epidermidis adhesion to in vitro fibronectin-coated or explanted polymer surfaces, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 10 (1999) 1207–1221. <https://doi.org/10.1163/156856299X00027>.
- [48] A.-C. Cremieux, G. Pavon-Djavid, A. Saleh Mghir, G. Helary, V. Migonney, Bioactive polymers grafted on silicone to prevent Staphylococcus aureus prosthesis adherence: in vitro and in vivo studies, *J Appl Biomater Biomech* 1 (2003) 178–185.
- [49] R. Bayston, Capsule formation around breast implants, *JPRAS Open* 31 (2022) 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.jptra.2021.11.004>.
- [50] M. Lam, Greffage d’un polymère bioactif sur des surfaces de silicone pour améliorer la réponse biologique, Université Sorbonne Paris Nord, n.d. <https://theses.hal.science/tel-03894960>.
- [51] V. Moris, Analyse de la biocompatibilité des implants en silicone greffé par polyNaSS, Université Sorbonne Paris Nord, n.d.
- [52] 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>.
- [53] D. Ajdic, Y. Zoghbi, D. Gerth, Z.J. Panthaki, S. Thaller, The Relationship of Bacterial Biofilms and Capsular Contracture in Breast Implants, *Aesthet Surg J* 36 (2016) 297–309. <https://doi.org/10.1093/asj/sjv177>.
- [54] A.S. Mohan, J. Sullivan, M.M. Tenenbaum, K.B. Broderick, T.M. Myckatyn, Toward a Consensus Approach for Assessing Capsular Contracture Severity and Progression: A

- Systematic Review, *Plastic & Reconstructive Surgery* 153 (2024) 7–22. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000010573>.
- [55] M. Dardouri, A. Bettencourt, V. Martin, F.A. Carvalho, C. Santos, N. Monge, N.C. Santos, M.H. Fernandes, P.S. Gomes, I.A.C. Ribeiro, Using plasma-mediated covalent functionalization of rhamnolipids on polydimethylsiloxane towards the antimicrobial improvement of catheter surfaces, *Biomaterials Advances* 134 (2022) 112563. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112563>.
- [56] Y. Lou, D. Schapman, D. Mercier, S. Alexandre, E. Dé, J.-M. Brunel, N. Kébir, P. Thébault, Modification of poly(dimethyl siloxane) surfaces with an antibacterial claramine-derivative through click-chemistry grafting, *Reactive and Functional Polymers* 170 (2022) 105102. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105102>.
- [57] K. Ding, Y. Wang, S. Liu, S. Wang, J. Mi, Preparation of medical hydrophilic and antibacterial silicone rubber *via* surface modification, *RSC Adv.* 11 (2021) 39950–39957. <https://doi.org/10.1039/D1RA06260C>.
- [58] C. De Menezes Atayde, I. Doi, Highly stable hydrophilic surfaces of PDMS thin layer obtained by UV radiation and oxygen plasma treatments, *Phys. Status Solidi (c)* 7 (2010) 189–192. <https://doi.org/10.1002/pssc.200982419>.
- [59] J. Liu, Y. Yao, X. Li, Z. Zhang, Fabrication of advanced polydimethylsiloxane-based functional materials: Bulk modifications and surface functionalizations, *Chemical Engineering Journal* 408 (2021) 127262. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127262>.
- [60] Y.-Z. Chang, J.-T. Lin, A. Prasanna, P.-C. Chen, C.-Y. Ko, H.-C. Tsai, Evaluation of the bacterial anti-adhesive properties of polyacrylic acid, chitosan and heparin-modified medical grade Silicone rubber substrate, *J Polym Res* 22 (2015) 131. <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0767-6>.
- [61] 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>.
- [62] L. Giraud, A. Tourrette, E. Flahaut, Carbon nanomaterials-based polymer-matrix nanocomposites for antimicrobial applications: A review, *Carbon* 182 (2021) 463–483. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.06.002>.
- [63] A. Gökaltun, Y.B. Kang, M.L. Yarmush, O.B. Usta, A. Asatekin, Simple Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) via Surface Segregating Smart Polymers for Biomicrofluidics, *Sci Rep* 9 (2019) 7377. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43625-5>.
- [64] A. Köllnberger, R. Schrader, C.A. Briehn, Carboxylic acid mediated antimicrobial activity of silicone elastomers, *Materials Science and Engineering: C* 113 (2020) 111001. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111001>.
- [65] F. Askari, M. Zandi, P. Shokrolahi, M.H. Tabatabaei, E. Hajirasoliha, Reduction in protein absorption on ophthalmic lenses by PEGDA bulk modification of silicone acrylate-based formulation, *Prog Biomater* 8 (2019) 169–183. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00119-x>.
- [66] H.L. Seldon, M.C. Dahm, G.M. Clark, S. Crowe, Silastic with polyacrylic acid filler: swelling properties, biocompatibility and potential use in cochlear implants, *Biomaterials* 15 (1994) 1161–1169. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90237-2).
- [67] A. Bhattacharya, Grafting: a versatile means to modify polymers Techniques, factors and applications, *Progress in Polymer Science* 29 (2004) 767–814. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.05.002>.

- [68] M. Lu, L. Ding, T. Zhong, Z. Dai, Improving Hydrophilicity and Adhesion of PDMS through Dopamine Modification Assisted by Carbon Dioxide Plasma, *Coatings* 13 (2023) 126. <https://doi.org/10.3390/coatings13010126>.
- [69] J. Zhang, C.Q. Cui, T.B. Lim, E.-T. Kang, K.G. Neoh, S.L. Lim, K.L. Tan, Chemical Modification of Silicon (100) Surface via UV-Induced Graft Polymerization, *Chem. Mater.* 11 (1999) 1061–1068. <https://doi.org/10.1021/cm981046i>.
- [70] P. Alves, S. Pinto, J.-P. Kaiser, A. Bruinink, H.C. De Sousa, M.H. Gil, Surface grafting of a thermoplastic polyurethane with methacrylic acid by previous plasma surface activation and by ultraviolet irradiation to reduce cell adhesion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82 (2011) 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.09.021>.
- [71] 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>.
- [72] A. Salati, H. Keshvari, A. Karkhaneh, S. Taranejoo, Design and Fabrication of Artificial Skin: Chitosan and Gelatin Immobilization on Silicone by Poly Acrylic Acid Graft Using a Plasma Surface Modification Method, *Journal of Macromolecular Science, Part B* 50 (2011) 1972–1982. <https://doi.org/10.1080/00222348.2010.549438>.
- [73] S. Cabana, C.S. Lecona-Vargas, H.I. Meléndez-Ortiz, A. Contreras-García, S. Barbosa, P. Taboada, B. Magariños, E. Bucio, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Silicone rubber films functionalized with poly(acrylic acid) nanobrushes for immobilization of gold nanoparticles and photothermal therapy, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 42 (2017) 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.006>.
- [74] M.A. Velazco-Medel, L.A. Camacho-Cruz, E. Bucio, Modification of PDMS with acrylic acid and acrylic acid/ethylene glycol dimethacrylate by simultaneous polymerization assisted by gamma radiation, *Radiation Physics and Chemistry* 171 (2020) 108754. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108754>.
- [75] J.-S. Yang, G.-H. Hsiue, Synthesis of acrylic acid grafted silicone rubber via preirradiation graft copolymerization and its physical and dielectric properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 61 (1996) 221–229. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960711\)61:2<221::AID-APP5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960711)61:2<221::AID-APP5>3.0.CO;2-R).
- [76] H. Yang, Z. Hou, Homogenous Grafted Poly(acrylic acid) Brushes on Ultra-flat Polydimethylsiloxane (PDMS) Films by UV Irradiation, *Nano BioMed ENG* 3 (2011) 42–46. <https://doi.org/10.5101/nbe.v3i1.p42-46>.
- [77] 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>.
- [78] S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C.E. Sims, G.P. Li, N. Allbritton, Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices by Ultraviolet Polymer Grafting, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4117–4123. <https://doi.org/10.1021/ac025700w>.
- [79] B. Sivaraman, K.P. Fears, R.A. Latour, Investigation of the Effects of Surface Chemistry and Solution Concentration on the Conformation of Adsorbed Proteins Using an Improved Circular Dichroism Method, *Langmuir* 25 (2009) 3050–3056. <https://doi.org/10.1021/la8036814>.
- [80] Z. Zdanowski, B. Koul, E. Hallberg, C. Schalén, Influence of heparin coating on in vitro bacterial adherence to poly(vinyl chloride) segments, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 8 (1997) 825–832. <https://doi.org/10.1163/156856297X00029>.
- [81] M. Dufay, M. Jimenez, M. Casetta, F. Chai, N. Blanchemain, G. Stoclet, F. Cazaux, S. Bellayer, S. Degoutin, PCL covered PP meshes plasma-grafted by sulfonated monomer

- for the prevention of postoperative abdominal adhesions, *Materials Today Communications* 26 (2021) 101968. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101968>.
- [82] S. Degoutin, M. Jimenez, F. Chai, T. Pinalie, S. Bellayer, M. Vandebossche, C. Neut, N. Blanchemain, B. Martel, Simultaneous immobilization of heparin and gentamicin on polypropylene textiles: A dual therapeutic activity: SIMULTANEOUS IMMOBILIZATION OF HEPARIN AND GENTAMICIN ON PP TEXTILES, *J. Biomed. Mater. Res.* 102 (2014) 3846–3854. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35059>.
- [83] L. Skhiri, G. Pavon-Djavid, G. Helary, A. Bartegi, V. Migonney, Nouvel agent antitumoral : activité in vitro sur les cellules de carcinomes mammaires, *Pathologie Biologie* 57 (2009) e9–e15. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.02.004>.
- [84] A. Michiardi, G. Héлары, P.-C.T. Nguyen, L.J. Gamble, F. Anagnostou, D.G. Castner, V. Migonney, Bioactive polymer grafting onto titanium alloy surfaces, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.043>.
- [85] 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>.
- [86] E. Bucio, G. Burillo, Radiation-induced grafting of sensitive polymers, *J Radioanal Nucl Chem* 280 (2009) 239–243. <https://doi.org/10.1007/s10967-009-0505-9>.
- [87] V. Migonney, C. Baquey, B. Basse-Cathalinat, B. Masson, S. Winnock, D. Ducassou, E. Serne, D. Labarre, C. Fougnot, M. Jozefowicz, Haemocompatibility of polyethylene-polystyrene modified tubings, *Life Support Syst 1 Suppl 1* (1983) 227–230.
- [88] V. Migonney, C. Fougnot, M. Jozefowicz, Heparin-like tubings I. Preparation, characterization and biological in vitro activity assessment, *Biomaterials* 9 (1988) 145–149. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(88\)90113-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(88)90113-5).
- [89] C. Pereira, J.-S. Baumann, P. Masson, G. Pourroy, A. Carradò, V. Migonney, C. Falentin-Daudre, Double Functionalization for the Design of Innovative Craniofacial Prostheses, *JOM* 74 (2022) 87–95. <https://doi.org/10.1007/s11837-021-04997-0>.
- [90] 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>.
- [91] K. Benabderrahmane, J. Stirnemann, S. Ramtani, C. Falentin-Daudré, Development of a double-layer electrospun patch as a potential prenatal treatment for myelomeningocele, *Wound Repair Regeneration* (2023) wr.13123. <https://doi.org/10.1111/wrr.13123>.
- [92] D.M. Vasconcelos, C. Falentin-Daudré, D. Blanquaert, D. Thomas, P.L. Granja, V. Migonney, Role of protein environment and bioactive polymer grafting in the S. epidermidis response to titanium alloy for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C* 45 (2014) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.054>.
- [93] A. Alcheikh, G. Pavon-Djavid, G. Helary, H. Petite, V. Migonney, F. Anagnostou, PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion, *J Mater Sci: Mater Med* 24 (2013) 1745–1754. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4932-3>.
- [94] H. Chouirfa, M.D.M. Evans, P. Bean, A. Saleh-Mghir, A.C. Crémieux, D.G. Castner, C. Falentin-Daudré, V. Migonney, Grafting of Bioactive Polymers with Various Architectures: A Versatile Tool for Preparing Antibacterial Infection and Biocompatible Surfaces, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 1480–1491. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14283>.

- [95] M. Lam, R. Vayron, R. Delille, V. Migonney, C. Falentin-Daudré, Influence of poly(styrene sodium sulfonate) grafted silicone breast implant's surface on the biological response and its mechanical properties, *Materials Today Communications* 31 (2022) 103318. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103318>.
- [96] M. Lam, C. Falentin-Daudré, Characterization of plasmatic proteins adsorption on poly(styrene sodium sulfonate) functionalized silicone surfaces, *Biophysical Chemistry* 285 (2022) 106804. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106804>.
- [97] H. Arkaban, M. Barani, M.R. Akbarizadeh, N. Pal Singh Chauhan, S. Jadoun, M. Dehghani Soltani, P. Zarrintaj, Polyacrylic Acid Nanoplatfoms: Antimicrobial, Tissue Engineering, and Cancer Theranostic Applications, *Polymers* 14 (2022) 1259. <https://doi.org/10.3390/polym14061259>.
- [98] 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>.
- [99] C.M. Shin, S. Cho, D.H. Kim, Y. Ha, H.J. Shin, N. Shin, D.W. Kim, C.H. Choi, W.K. Cho, S.-H. Oh, Zwitterionic polydopamine coatings suppress silicone implant-induced capsule formation, *Biomater. Sci.* 9 (2021) 3425–3432. <https://doi.org/10.1039/D0BM02215B>.
- [100] 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>.
- [101] A. Roosjen, H.J. Busscher, W. Norde, H.C. Van Der Mei, Bacterial factors influencing adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to a poly(ethylene oxide) brush, *Microbiology* 152 (2006) 2673–2682. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29005-0>.
- [102] 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>.
- [103] Y. Liu, Y. Han, Y. Wu, L. Xiong, T. Hang, H. Ling, A. Hu, L. Gao, M. Li, Grafting of poly(methacrylic acid-co-acrylamide) film on silicon surface via a simultaneous hydrolysis process, *Materials Today Communications* 21 (2019) 100678. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100678>.
- [104] J. Pirkin-Benameur, D. Bouyer, D. Quemener, Self-oscillating polymer membranes with chemically fueled pore size oscillation mediated by pH-responsive polymer, *Journal of Membrane Science* 658 (2022) 120742. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.120742>.
- [105] H.H. Sokker, A.M.A. Ghaffar, A.M.A. Nada, Synthesis and characterization of radiation grafted copolymer for removal of nonionic organic contaminants, *J of Applied Polymer Sci* 100 (2006) 3589–3595. <https://doi.org/10.1002/app.22957>.
- [106] M. Tavakolian, S.M. Jafari, T.G.M. Van De Ven, A Review on Surface-Functionalized Cellulosic Nanostructures as Biocompatible Antibacterial Materials, *Nano-Micro Lett.* 12 (2020) 73. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-0408-4>.
- [107] N. Blanchemain, M.R. Aguilar, F. Chai, M. Jimenez, E. Jean-Baptiste, A. El-Achari, B. Martel, H.F. Hildebrand, J.S. Roman, Selective biological response of human pulmonary microvascular endothelial cells and human pulmonary artery smooth muscle cells on cold-plasma-modified polyester vascular prostheses, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 065003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/6/065003>.

- [108] G. Gratzl, C. Paulik, S. Hild, J.P. Guggenbichler, M. Lackner, Antimicrobial activity of poly(acrylic acid) block copolymers, *Materials Science and Engineering: C* 38 (2014) 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.050>.
- [109] V.F. Coindre, S.M. Kinney, M.V. Sefton, Methacrylic acid copolymer coating of polypropylene mesh chamber improves subcutaneous islet engraftment, *Biomaterials* 259 (2020) 120324. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120324>.
- [110] K.F. El-Tahlawy, S.M. El-Rafie, A.S. Aly, Preparation and application of chitosan/poly(methacrylic acid) graft copolymer, *Carbohydrate Polymers* 66 (2006) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.001>.
- [111] M. Abbasian, M.-M. Roudi, F. Mahmoodzadeh, M. Eskandani, M. Jaymand, Chitosan-grafted-poly(methacrylic acid)/graphene oxide nanocomposite as a pH-responsive de novo cancer chemotherapy nanosystem, *International Journal of Biological Macromolecules* 118 (2018) 1871–1879. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.036>.
- [112] R. Wang, K.G. Neoh, E. Kang, P.A. Tambyah, E. Chiong, Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters, *J Biomed Mater Res* 103 (2015) 519–528. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33230>.
- [113] E. De Giglio, S. Cometa, N. Cioffi, L. Torsi, L. Sabbatini, Analytical investigations of poly(acrylic acid) coatings electrodeposited on titanium-based implants: a versatile approach to biocompatibility enhancement, *Anal Bioanal Chem* 389 (2007) 2055–2063. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1299-7>.
- [114] I. Zuñiga-Zamorano, H.I. Meléndez-Ortiz, A. Costoya, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, E. Bucio, Poly(vinyl chloride) catheters modified with pH-responsive poly(methacrylic acid) with affinity for antimicrobial agents, *Radiation Physics and Chemistry* 142 (2018) 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.02.008>.
- [115] M. García-Vargas, C. González-Chomón, B. Magariños, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, E. Bucio, Acrylic polymer-grafted polypropylene sutures for covalent immobilization or reversible adsorption of vancomycin, *International Journal of Pharmaceutics* 461 (2014) 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.060>.
- [116] S. Ganguly, P.P. Maity, S. Mondal, P. Das, P. Bhawal, S. Dhara, N.Ch. Das, Polysaccharide and poly(methacrylic acid) based biodegradable elastomeric biocompatible semi-IPN hydrogel for controlled drug delivery, *Materials Science and Engineering: C* 92 (2018) 34–51. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.034>.
- [117] 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>.
- [118] H. Chouirfa, M.D.M. Evans, D.G. Castner, P. Bean, D. Mercier, A. Galtayries, C. Falentin-Daudré, V. Migonney, Grafting of architecture controlled poly(styrene sodium sulfonate) onto titanium surfaces using bio-adhesive molecules: Surface characterization and biological properties, *Biointerphases* 12 (2017) 02C418. <https://doi.org/10.1116/1.4985608>.
- [119] H. Lee, S.M. Dellatore, W.M. Miller, P.B. Messersmith, Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science* 318 (2007) 426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
- [120] S. Wang, W.H. Hu, Y. Nakamura, N. Fujisawa, A.E. Herlyng, M. Ebara, M. Naito, Bio-Inspired Adhesive with Reset-On Demand, Reuse-Many (RORM) Modes, *Adv Funct Materials* 33 (2023) 2215064. <https://doi.org/10.1002/adfm.202215064>.

- [121] J.H. Scofield, Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV, *Journal of Electron Spectroscopy and Related 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).
- [122] 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>.
- [123] Q. Nguyen, Mise au point d'un spectromètre à l'échelle nanoscopique et son application, Ecole Polytechnique X, 2008. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00004206>.
- [124] H. Tang, A. Wang, X. Liang, T. Cao, S.O. Salley, J.P. McAllister, K.Y.S. Ng, Effect of surface proteins on Staphylococcus Epidermidis adhesion and colonization on silicone, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 51 (2006) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.011>.
- [125] D. Kefallinou, M. Grigoriou, V. Constantoudis, I. Raptis, E. Xenogiannopoulou, A. Dimoulas, D.T. Boumpas, A. Tserepi, Enhanced and stabilized mesenchymal stem cell growth inside plasma pre-treated and collagen-coated PDMS-based microfluidic chambers, *Surface and Coatings Technology* 466 (2023) 129658. <https://doi.org/10.1016/j.surcoat.2023.129658>.
- [126] J. Kong, S. Yu, Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, *ABBS* 39 (2007) 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
- [127] Y. Aboul-enein, A. Bunaciu, S. Fleschin, Evaluation of the Protein Secondary Structures Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Gazi University Journal of Science* 27 (2014) 637–644.
- [128] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8168–8173. <https://doi.org/10.1021/ja042898o>.
- [129] R. Bitar, P. Cools, N. De Geyter, R. Morent, Acrylic acid plasma polymerization for biomedical use, *Applied Surface Science* 448 (2018) 168–185. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.129>.
- [130] D. Yoo, S.S. Shiratori, M.F. Rubner, Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes, *Macromolecules* 31 (1998) 4309–4318. <https://doi.org/10.1021/ma9800360>.
- [131] C. Pereira, J.-S. Baumann, V. Humblot, C. Falentin-Daudré, Biological properties of direct grafting by ultraviolet irradiation of vinyl benzyl phosphonic acid onto titanium surfaces, *Reactive and Functional Polymers* 173 (2022) 105215. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105215>.
- [132] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreze, S. Ramakrishna, D. Williams, Key terminology in biomaterials and biocompatibility, *Current Opinion in Biomedical Engineering* 10 (2019) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>.
- [133] 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>.
- [134] M. Lu, L. Ding, T. Zhong, Z. Dai, Improving Hydrophilicity and Adhesion of PDMS through Dopamine Modification Assisted by Carbon Dioxide Plasma, *Coatings* 13 (2023) 126. <https://doi.org/10.3390/coatings13010126>.
- [135] I. Chaduc, M. Lansalot, F. D'Agosto, B. Charleux, RAFT Polymerization of Methacrylic Acid in Water, *Macromolecules* 45 (2012) 1241–1247. <https://doi.org/10.1021/ma2023815>.

- [136] M. Ravikanth, P. Soujanya, K. Manjunath, T. Saraswathi, C. Ramachandran, Heterogeneity of fibroblasts, *J Oral Maxillofac Pathol* 15 (2011) 247. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84516>.
- [137] Y.-Y. Lou, K.-L. Zhou, D.-Q. Pan, J.-L. Shen, J.-H. Shi, Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA), *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167 (2017) 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.029>.
- [138] L. Parisi, A. Toffoli, B. Ghezzi, B. Mozzoni, S. Lumetti, G.M. Macaluso, A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface, *Japanese Dental Science Review* 56 (2020) 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.11.002>.
- [139] C. Palomino-Durand, E. Pauthe, A. Gand, Fibronectin-Enriched Biomaterials, Biofunctionalization, and Proactivity: A Review, *Applied Sciences* 11 (2021) 12111. <https://doi.org/10.3390/app112412111>.
- [140] M. Bergkvist, J. Carlsson, S. Oscarsson, Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy, *J Biomedical Materials Res* 64A (2003) 349–356. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10423>.
- [141] 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>.
- [142] 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).
- [143] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8168–8173. <https://doi.org/10.1021/ja042898o>.
- [144] A. García, Integrin–fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling, *Biomaterials* 20 (1999) 2427–2433. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00170-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00170-2).
- [145] L. Baujard-Lamotte, S. Noinville, F. Goubard, P. Marque, E. Pauthe, Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 63 (2008) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.015>.
- [146] S.-S. Cheng, K.K. Chittur, C.N. Sukenik, L.A. Culp, K. Lewandowska, The Conformation of Fibronectin on Self-Assembled Monolayers with Different Surface Composition: An FTIR/ATR Study, *Journal of Colloid and Interface Science* 162 (1994) 135–143. <https://doi.org/10.1006/jcis.1994.1018>.
- [147] H. Ao, Y. Xie, H. Tan, X. Wu, G. Liu, A. Qin, X. Zheng, T. Tang, Improved hMSC functions on titanium coatings by type I collagen immobilization: Improved hMSC Functions on Titanium Coatings, *J. Biomed. Mater. Res.* 102 (2014) 204–214. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34682>.
- [148] N.S. Kasálková, V. Juřicová, D. Fajstavr, B. Frýdlová, S. Rimpelová, V. Švorčík, P. Slepíčka, Plasma activated PDMS microstructured pattern with collagen for improved myoblast cell guidance, *Int. J. Mol. Sci.* (2023).
- [149] R. Müller, J. Abke, E. Schnell, F. Macionczyk, U. Gbureck, R. Mehrl, Z. Ruszczak, R. Kujat, C. Englert, M. Nerlich, P. Angele, Surface engineering of stainless steel materials

- by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility, *Biomaterials* 26 (2005) 6962–6972. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.013>.
- [150] P.S. Sit, R.E. Marchant, Surface-dependent conformations of human fibrinogen observed by atomic force microscopy under aqueous conditions, *Thromb Haemost* 82 (1999) 1053–1060.
- [151] M. Amini, A. Javanmard, A. Davati, G. Azimi, Bacterial Colonization in Tracheal Tubes of ICU Patients, (2009).
- [152] L. Berra, F. Curto, G. Li Bassi, P. Laquerriere, A. Baccarelli, T. Kolobow, Antibacterial-coated tracheal tubes cleaned with the Mucus Shaver: A novel method to retain long-term bactericidal activity of coated tracheal tubes, *Intensive Care Med* 32 (2006) 888–893. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0125-6>.
- [153] X. Chen, X. Ling, G. Liu, J. Xiao, Antimicrobial Coating: Tracheal Tube Application, *IJN Volume 17* (2022) 1483–1494. <https://doi.org/10.2147/IJN.S353071>.
- [154] M. Zuo, Y. Huang, W. Ma, Z. Xue, J. Zhang, Y. Gong, L. Che, Expert Recommendations for Tracheal Intubation in Critically ill Patients with Noval Coronavirus Disease 2019, *Cmsj* 0 (2020) 0. <https://doi.org/10.24920/003724>.
- [155] F. Kara, E.A. Aksoy, Z. Yuksekdog, N. Hasirci, S. Aksoy, Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers* 112 (2014) 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.019>.
- [156] P.E. Vaudaux, E. Huggler, P.G. Lerch, J.J. Morgenthaler, U.E. Nydegger, F. Schumacher-Perdreau, P.D. Lew, F.A. Waldvogel, Inhibition by Immunoglobulins of *Staphylococcus aureus* Adherence to Fibronectin-Coated Foreign Surfaces, *Journal of Investigative Surgery* 2 (1989) 397–408. <https://doi.org/10.3109/08941938909018265>.
- [157] E.N. Chiang, R. Dong, C.K. Ober, B.A. Baird, Cellular Responses to Patterned Poly(acrylic acid) Brushes, *Langmuir* 27 (2011) 7016–7023. <https://doi.org/10.1021/la200093e>.
- [158] W. Feng, S. Zhu, K. Ishihara, J.L. Brash, Adsorption of Fibrinogen and Lysozyme on Silicon Grafted with Poly(2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine) via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization, *Langmuir* 21 (2005) 5980–5987. <https://doi.org/10.1021/la050277i>.
- [159] E. Faure, C. Falentin-Daudré, C. Jérôme, J. Lyskawa, D. Fournier, P. Woisel, C. Detrembleur, Catechols as versatile platforms in polymer chemistry, *Progress in Polymer Science* 38 (2013) 236–270. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.004>.
- [160] L.W. Teunissen, J. Van Den Beukel, M.M.J. Smulders, H. Zuilhof, Thermoresponsive Polymer Brushes for Switchable Protein Adsorption via Dopamine-Assisted Grafting-To Strategy, *Adv Materials Inter* 9 (2022) 2201198. <https://doi.org/10.1002/admi.202201198>.
- [161] N. Patil, C. Falentin-Daudré, C. Jérôme, C. Detrembleur, Mussel-inspired protein-repelling ambivalent block copolymers: controlled synthesis and characterization, *Polym. Chem.* 6 (2015) 2919–2933. <https://doi.org/10.1039/C5PY00127G>.
- [162] R. Hlushko, H. Hlushko, S.A. Sukhishvili, A family of linear phenolic polymers with controlled hydrophobicity, adsorption and antioxidant properties, *Polym. Chem.* 9 (2018) 506–516. <https://doi.org/10.1039/C7PY01973D>.
- [163] C. Zobrist, J. Sobocinski, J. Lyskawa, D. Fournier, V. Miri, M. Traisnel, M. Jimenez, P. Woisel, Functionalization of Titanium Surfaces with Polymer Brushes Prepared from a Biomimetic RAFT Agent, *Macromolecules* 44 (2011) 5883–5892. <https://doi.org/10.1021/ma200853w>.
- [164] J.C. Shiu, M.-H. Ho, S.-H. Yu, A.-C. Chao, Y.-R. Su, W.-J. Chen, Z.-C. Chiang, W.P. Yang, Preparation and characterization of caffeic acid grafted chitosan/CPTMS hybrid

- scaffolds, Carbohydrate Polymers 79 (2010) 724–730. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.025>.
- [165] Z.-C. Chiang, H.-Y. Li, A.-C. Chao, Y.-R. Su, Characterization of the morphology and hydrophilicity of chitosan/caffeic acid hybrid scaffolds, J Polym Res 18 (2011) 2205–2212. <https://doi.org/10.1007/s10965-011-9631-5>.
- [166] P. Chuysinuan, P. Pavasant, P. Supaphol, Preparation and Characterization of Caffeic Acid-Grafted Electrospun Poly(L-Lactic Acid) Fiber Mats for Biomedical Applications, ACS Appl. Mater. Interfaces 4 (2012) 3031–3040. <https://doi.org/10.1021/am300404v>.
- [167] M. Kępa, M. Mikłasińska-Majdanik, R.D. Wojtyczka, D. Idzik, K. Korzeniowski, J. Smoleń-Dzirba, T.J. Wąsik, Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains, BioMed Research International 2018 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>.
- [168] Tosoh SPINOMAR, Tosoh Spinomar technical and commercial documentation, (n.d.).
- [169] C.E. Grabiell, D.L. Decker, Copolymerization characteristics of sodium styrenesulfonate, J. Polym. Sci. 59 (1962) 425–431. <https://doi.org/10.1002/pol.1962.1205916818>.

Influence du greffage covalent de polymères bioactifs sur des surfaces de PDMS sur la biocompatibilité et les propriétés antibactériennes

Résumé : La fonctionnalisation de surface est un outil précieux pour conférer de nouvelles propriétés aux biomatériaux. Afin de limiter et prévenir les infections bactériennes en surface du PDMS, utilisé dans de nombreux dispositifs médicaux et implants, le greffage covalent de polymères bioactifs a été développé. Des polymères porteurs de groupements carboxylates ont été choisis pour réaliser ces études. En adaptant le protocole (ajustement du pH, modification du solvant) l'utilisation de la méthode « grafting from » sous irradiations UV s'est montrée performante pour greffer ces polymères sur le matériau sans modifier ses propriétés initiales. Elle consiste dans un premier temps à activer le matériau de manière à rendre la surface réactive, puis à amorcer la polymérisation radicalaire en solution.

Par sa structure moléculaire simple et ses propriétés antiadhésives, le greffage de l'acide poly(acrylique) a été mis en place. Le PDMS ainsi fonctionnalisé montre une réduction de l'adhésion de fibroblastes et par conséquent un ralentissement de leur prolifération. Ce phénomène est expliqué par un probable changement d'orientation et de conformation de la fibronectine au contact de ces surfaces. L'inhibition de l'adhésion de *S. epidermidis* a également été mis en évidence en présence de fibrinogène. De la même manière, la fonctionnalisation permet d'agir sur l'orientation de la protéine et provoquer cet effet. Ces caractérisations ont permis de souligner la complexité des mécanismes à l'interface entre le biomatériau et l'environnement biologique. La mouillabilité, la densité de charges, l'architecture du polymère (taille, encombrement, répartition) sont des paramètres à prendre en compte pour trouver la fonctionnalisation la plus adaptée à l'application visée. Ainsi, l'utilisation des polymères porteurs de groupements carboxylates constitue une voie prometteuse pour moduler les propriétés du PDMS et même, ouvrir la voie vers de la multifonctionnalisation de surfaces.

Mots clés : Fonctionnalisation de surface, PDMS, biomatériau, greffage, polymère bioactif

Influence of bioactive polymers covalent grafting on PDMS surfaces on biocompatibility and antibacterial properties

Abstract: Surface functionalization is a promising tool to lend new attractive properties on biomaterials. PDMS material is often used to design medical devices and implants. In order to restrict and prevent bacterial infections on its surface, the covalent grafting of bioactive polymers has been developed. To carry out this work, polymers carrying carboxylate groups were chosen. By adjusting the protocol (pH, solvent), the use of the "grafting from" method under UV irradiations was efficient to graft these kinds of polymers without damaging the initial PDMS properties. First, it consists of material surface activation to make it reactive. Then, the radical polymerization is initiated by sample immersion in monomer solution still under UV.

Due to its simple molecular structure and its antiadhesive properties, the grafting of poly(acrylic) acid was developed. Once functionalized, the PDMS surface show a decrease in fibroblast adhesion and consequently a slowed down proliferation. This phenomenon is probably generated by fibronectin conformation and orientation change when interacting with the grafted polymer. *S. epidermidis* inhibition was also generated when fibrinogen was present. In the same way, the functionalization acted on the protein behavior to induce this change. The surface characterizations have highlighted the complexity of the mechanism at the interface between the material and the biological environment. The wettability, the charge density, the polymer architecture (size, distribution) are parameters that must be carefully studied to choose the most adapted functionalization to a targeted application. Here, the use of carboxylic acid groups has shown a promising way to modulate PDMS surface properties and even to generate further functionalization.

Key words: Surface functionalization, PDMS, biomaterial, grafting, bioactive polymer