



# Synthèse et caractérisations physico-chimiques et biologiques de revêtements implantaires bioactifs

Mélanie d'Almeida

## ► To cite this version:

Mélanie d'Almeida. Synthèse et caractérisations physico-chimiques et biologiques de revêtements implantaires bioactifs. Ingénierie biomédicale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. ⟨NNT: 2014LYO10297⟩. ⟨tel-01340858⟩

**HAL Id: tel-01340858**

**<https://theses.hal.science/tel-01340858v1>**

Submitted on 2 Jul 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

N° d'ordre 297-2014

Année 2014

Présentée devant

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

*pour obtenir*

LE DIPLOME DE DOCTORAT

SPECIALITE :

INGENIERIE BIOLOGIQUE ET MEDICALE, BIOTECHNOLOGIE

(arrêté du 7 août 2006)

*par*

**Mélanie D'Almeida**

---

## **Synthèse et caractérisations physico-chimiques et biologiques de revêtements implantaires bioactifs.**

---

Soutenance prévue le 15 décembre 2014

Thèse dirigée par Pr. Brigitte Grosgeat & Dr. Bérangère Toury

Membres du jury :

Mr Laurent David	PU - Université Claude Bernard Lyon 1	Président
Mme V. Migonney	PU - Université Paris 13	Rapportrice
Mme M. Bonnaure-Mallet	PU - PH Université de Rennes 1	Rapportrice
Mme F. Mammeri	MCF - HDR - Université Paris 7	Rapportrice
Mr F. Renaud	Pr. émérite - Université Claude Bernard Lyon 1	Membre invité
Mme B. Grosgeat	PU - PH Université Claude Bernard Lyon 1	Directrice de thèse
Mme B. Toury	MCF - HDR - Université Claude Bernard Lyon 1	Co-encadrante



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE





Je tiens à remercier le professeur Christian Brylinski, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces de l'Université de Lyon. Je remercie également les professeurs Arnaud Brioude et Brigitte Grosogeat pour m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives : l'équipe Matériaux Fonctionnels et Nanostructures et l'équipe Biommatériaux et Interfaces Biologiques.

Je remercie également Mme Brigitte Grosogeat pour avoir accepté la direction de ma thèse. Je tiens à remercier également Mme Bérangère Toury, pour son co-encadrement de ma thèse, ses conseils avisés et ses encouragements au cours de ces trois dernières années.

Je remercie les professeurs Véronique Migonney et Martine Bonnaure-Mallet, ainsi que Mme Fayna Mammeri, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mes travaux. Je remercie également les professeurs François Renaud et Laurent David d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Cette thèse a été financée dans le cadre d'un projet FUI. Je remercie tous les membres du consortium, et plus particulièrement les membres de la société porteuse de ce projet ; l'entreprise Global D : Mr Damien Allaz et Mr Roméo Casimiro pour les surfaces premières fournies dans le cadre du projet. Je tiens également à remercier mes collaborateurs :

- Les docteurs Céline Brunon et Julien Amalric pour les analyses MEB, XPS et ToF-SIMS de mes échantillons, ainsi que pour le temps accordé et les échanges d'échantillons aux aurores devant le campus.

- Mme Agnès Crépet, le Dr Alexandra Montembault et les professeurs Thierry Delaire et Laurent David pour leur accueil au sein de l'IMP et leurs conseils durant les études de restitution du polymère.

- Mme Aurélia Vettesse pour son aide technique lors de l'évaluation des activités antibactériennes des revêtements ainsi que le Pr François Renaud pour son accueil au sein de la société Nosoco.Tech et ses conseils avisés.

- Dr Philippe Sainsot pour les analyses en profilométrie optique sur mes échantillons au sein du laboratoire LacMos de l'INSA de Lyon.

- Dr Béatrice Burdin, du CTμ, pour son support technique et ses conseils lors des analyses MEB de mes échantillons.

- Dr Alice Ferrand, pour les tests de cytocompatibilité.

Je tiens également à remercier mes collègues Catherine, Krystelle, Pauline, Florian, Tony, Doris, Nina, Hazem, Franck, France, Malika, Nicolas, Sheng et Victor pour les moments de détente au cours de ces trois dernières années.

J'ajoute des remerciements groupés à tous les membres du LMI. Ces trois ans passés avec vous ont été particulièrement enrichissantes, tant au niveau scientifique qu'au niveau humain.

Je tiens particulièrement à remercier mes amis, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce chemin sinueux. Merci à mes parisiennes préférées, Natacha et Sarah, pour votre amitié et votre soutien sans faille. Un merci particulier à Sophie, mon amie depuis les bancs de la prépa, pour ton amitié et les moments de détente autour d'un thé. Merci également à mes amis de Lyon, Alexia, Thomas, Julien, Guillaume, Laure, Emily, Laetitia, Alice et Nicolas, pour votre accueil chaleureux et votre amitié durant ces trois dernières années.

Enfin, je tenais à remercier toute ma famille, qui m'a toujours encouragée et écoutée tout au long de mon cursus et m'a permis d'arriver jusqu'ici.

## Résumé :

L'accès aux soins dentaires est devenu, au cours de ces dernières années, un service de plus en plus demandé par la population. En particulier, la pose d'un implant, destiné à remplacer une dent manquante, en recréant une racine artificielle, devient un acte de plus en plus courant. Une des principales sources de complications entraînant l'échec de la pose d'un implant est une maladie inflammatoire : la péri-implantite. Cette maladie induit la perte des os de soutien dans les tissus entourant l'implant fonctionnel. Actuellement, il n'existe pas d'implant prévenant ces infections bactériennes, seuls des traitements curatifs sont proposés. Le développement d'un traitement antibactérien implantaire apparaît alors comme une solution préventive pertinente pour limiter les complications post-opératoires et représente un défi de santé publique. Pour parvenir à cet objectif, dans ce travail de thèse, plusieurs solutions pour préparer un revêtement implantaire bioactif ont été étudiées et évaluées. Elles sont toutes basées sur le recouvrement d'une surface modèle de titane par un polymère naturel bioactif, le chitosane. Le greffage du biopolymère au substrat a été réalisé *via* une liaison covalente en utilisant un agent de couplage. Les différentes étapes de la synthèse du revêtement ainsi que ses propriétés biologiques ont été caractérisées à l'aide de techniques d'analyses de chimie de surface, par des études de tenue et de restitution du biopolymère en milieu acide ainsi que par des études *in vitro* de l'activité antibactérienne et des propriétés biologiques des revêtements. Les résultats de ce travail ont permis de sélectionner le revêtement bioactif possédant les meilleurs propriétés pour l'application visée, notamment en raison de sa tenue en milieu acide et de son activité antibactérienne en présence des bactéries communes.

---

## Abstract :

In the past years, population requirement for dental care service increased. More precisely, replacement of missing tooth using dental implant is now a common intervention. As implant provides an artificial root, this procedure is permanent. The failure of the placement procedure is mainly due to an inflammatory disease: peri-implantitis. This disease leads to the death of bone tissues surrounding the dental implant. Today only curative solutions are available, and no implants can prevent bacterial development. It appears that preventing post-surgical complications by designing antibacterial implants is now a public health issue. To achieve this goal, we evaluate in this thesis different solutions to design bioactive implant coatings. We focused our work on coating of a model titanium surface by a bioactive polymer: chitosan. Polymer binding on the substrate is achieved by covalent link using a coupling agent. We described each step of the coating synthesis and characterized its biological properties using both surface chemistry analysis and cell biology techniques. We studied its behavior in an acid environment and analyzed its biological and antibacterial properties *in vitro*. Results of this work were used to select the bioactive coating with the best properties for the intended application, particularly due to its resistance in acidic condition and its antibacterial activity against common bacteria.

# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre I – Etude bibliographique .....</b>	<b>17</b>
I.    Implantologie orale .....	20
II.   Les revêtements implantaires antibactériens .....	29
III.  Le chitosane (CS).....	34
IV.  Mode de dépôt du chitosane sur substrat .....	37
V.    Stérilisation des matériaux .....	42
<b>Chapitre II – Elaboration des revêtements de chitosane.....</b>	<b>57</b>
I.    Les substrats utilisés.....	60
II.   Le chitosane comme biopolymère .....	72
III.  Etude du simple dépôt du chitosane sur une surface de titane.....	86
IV.  Greffage covalent de chitosane .....	87
V.    Les couples substrat/greffage étudiés .....	95
VI.  Application de la voie sélectionnée à la fabrication d'un prototype ...	113
<b>Chapitre III – Etude de la résistance des revêtements .....</b>	<b>125</b>
I.    Restitution du biopolymère en milieu acide .....	127
II.   Impact de la stérilisation .....	136
<b>Chapitre IV – Caractérisations biologiques des revêtements .....</b>	<b>147</b>
I.    Tests microbiologiques .....	149
II.   Cytocompatibilité des revêtements .....	159
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>177</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>181</b>

## Liste des abréviations

Abréviations	Correspondance
DA	Degré d'Acétylation
DD	Degré de Désacétylation
IR-ATR	Infrarouge en mode réflexion totale atténuée
ToF-SIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaires en mode statique
DSIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaires en mode dynamique
MEB	Microscopie ou microscope électronique à balayage.
XPS	Spectrométrie de photoélectrons X
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TESPSA	TriEthoxySilylPropylSuccinic Anhydride
APTES	AminoPropylTriEthoxySilane
CS	Chitosane
AS	Anhydride succinique
PDMS	PolyDiMethylSiloxane
AFM	Microscope à force atomique
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
EDS	Spectroscopie des rayons-X dispersive en énergie



# **Introduction générale**



Les biomatériaux sont des « matériaux utilisés dans un dispositif médical et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'un organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle » [1]. Cette définition, établie pour la première fois lors de la conférence de consensus de Chester de 1986, est toujours considérée, de nos jours, comme la définition la plus satisfaisante. Elle suggère ainsi, l'utilisation de matériaux comme système d'amélioration et/ou de remplacement d'un organe ou d'une fonction dans l'organisme [2]. Ce contact étroit entre les matériaux et les tissus et/ou fluides biologiques implique nécessairement la prise en compte du temps de contact (temporaire ou permanent) du matériau avec les tissus et/ou les fluides vivants. Celui-ci conduit également à la notion de biocompatibilité, définie par « la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique » [1].

À la notion de biocompatibilité peuvent s'ajouter deux autres notions indispensables pour des matériaux implantables. Il s'agit des concepts de « bioactivité » [3] et de « biodégradabilité » [4]. Le premier correspond à l'interaction positive entre le biomatériau et les tissus, entraînant ainsi une différenciation des tissus avec une forte adhésion et interconnexion le long de l'interface biomatériau-tissus. Le second définit le processus de détérioration d'un matériau au sein de l'hôte en fonction du temps, les composés issus de cette détérioration ne devant pas être toxiques. Les matériaux utilisés ne doivent pas être détériorés par les procédés de stérilisation utilisés. Par ailleurs, les caractéristiques du matériau doivent être en adéquation avec l'application visée et son industrialisation doit être également envisageable (en termes de production et de coût) [3].

Les biomatériaux sont utilisés dans de nombreux domaines d'applications médicales tels que la chirurgie esthétique, l'ophtalmologie, la chirurgie orthopédique et cardiaque, l'urologie et l'odontologie [5]. Dans le cadre de notre projet, nous nous intéresserons uniquement au dernier domaine présenté, et plus particulièrement à l'implantologie orale.

Parmi les soins actuellement proposés par les chirurgiens dentistes, la pose d'implants destinés à remplacer des dents manquantes en recréant une racine artificielle, devient un acte de plus en plus courant. Toutefois, une pathologie associée peut se déclarer autour de l'implant: il s'agit de la péri-implantite, maladie inflammatoire induisant la perte d'os de soutien dans les tissus entourant l'implant fonctionnel [6]. En effet, comme de nombreuses études le démontrent, après la pose d'un implant

dentaire, des complications inflammatoires d'origine infectieuse telles que la mucosite et la péri-implantite peuvent affecter les tissus péri-implantaires [7-9]. Actuellement, les risques d'infection postopératoire sont limités par des prescriptions médicamenteuses (antibiotique et antiseptique) et/ou des conditions opératoires stériles. Cependant, les patients à risque (diabétiques, greffés, porteurs HIV...) restent, à ce jour, le plus souvent exclus de ce type de soin. Le développement d'un traitement antibactérien implantaire apparaît, alors, comme une solution préventive pertinente pour limiter ces risques et représente un défi majeur de la santé publique. Le but de ce projet sera à terme, d'offrir un accès thérapeutique implantaire aux patients à risque et de limiter les complications postopératoires pour tous.

Pour parvenir à ce but, un consortium piloté par Global D et réunissant, en outre, le LMI, Science et Surface, Rescoll et Nosoco.Tech, propose de développer un revêtement implantaire à base de polymère naturel bioactif aux propriétés antiseptiques et/ou cicatrisantes dont la restitution lente et contrôlée permettra, après la pose de l'implant en cavité buccale, une action curative. Il s'agit d'un projet collaboratif à Fond Unique Interministériel (RIBIO) labellisé par le pôle de compétitivité Plastipolis et initié en 2011. C'est dans ce contexte que cette thèse a été menée avec pour mission principale le développement d'un revêtement bioactif sur substrat à base de titane en accord avec un cahier des charges strict. L'objectif de ce projet est de développer un revêtement biocompatible et possédant des propriétés antibactériennes. Le choix d'un polymère naturel bioactif et résorbable : le chitosane, s'est ainsi légitimement imposé en lien avec ses propriétés antibactériennes et sa biocompatibilité reconnue. La solution développée dans ce travail est basée sur le greffage covalent du chitosane *via* un agent de couplage de type silane.

Par ailleurs, le revêtement polymère obtenu doit être conforme à un cahier des charges strict. En effet, le revêtement doit être homogène en surface et en épaisseur, mais également adhérent au substrat. La tenue du biopolymère sur l'implant dans la cavité buccale doit également être validée pendant la durée de la cicatrisation (au minimum 8 jours et idéalement 2 semaines), et ce, malgré les variations de pH. Un autre objectif de ce projet sera de montrer la résistance du revêtement polymère au processus de stérilisation. A côté de ces premiers verrous à lever, il sera nécessaire de valider les propriétés biologiques et bactériologiques des revêtements proposés.

Ce rapport de thèse est divisé en quatre chapitres.

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique générale présentant la péri-implantite et les différentes solutions mises en œuvre pour traiter cette complication. Une attention particulière sera portée sur la description du chitosane et sur les possibilités de sa mise en forme. Enfin, l'aspect stérilisation sera abordé d'un point assez vue général avec une description des voies les plus couramment utilisées avant d'aborder le cas précis de la stérilisation du chitosane.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons tout d'abord, les substrats et les polymères utilisés ainsi que deux méthodes d'élaboration des revêtements. Ensuite, une caractérisation fine des

différentes étapes du greffage sera réalisée avant de montrer la possibilité de recouvrir un prototype par la solution la plus pertinente.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude de la stabilité chimique des revêtements polymères en milieu acide. Puis une étude de l'impact des méthodes de stérilisation sur les composés utilisés sera effectuée.

Le quatrième et dernier chapitre évaluera, enfin, les propriétés biologiques des revêtements bioactifs en termes de biocompatibilité et d'activité antibactérienne, celles-ci déterminées *in vitro*.

Enfin, une conclusion générale reprendra l'ensemble des résultats pertinents de l'étude et proposera des pistes d'amélioration du système retenu.

## Références

1. Williams DF: **Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering.** In: *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. Edited by Elsevier Ny, vol. 4. Chester, England. Amsterdam, New York; 1986.
2. Arntz Y, Bail V, Benkirane-jessel N, Boulmedais F, Debry C, Dimitrova M, René E, Haikel Y, Hemmerle J, Lavallo P *et al*: **Les polymères utilisés dans le domaine des biomatériaux : De la fonctionnalisation de surface à l'ingénierie tissulaire** *L'actualité chimique* 2007, **310**:20-22.
3. Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J: **Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces.** *Progress in Materials Science* 2013, **58**(3):261-326.
4. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW: **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013, **65**(4):581-603.
5. Sedel L, Janot C: **Biomatériaux: rapport rédigé sous la co-responsabilité de Laurent Sedel et Christian Janot.** In. [http://averousl.free.fr/fichiers/Bio-materiaux%20\(Fr\).pdf](http://averousl.free.fr/fichiers/Bio-materiaux%20(Fr).pdf): Intercommision n°1 de l'INSERM.
6. Giovannoli J-L, Renvert S: **Péri-implantites**; 2012.
7. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T: **The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects.** *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2012, **14**(2):170-183.
8. Tenenbaum H: **Péri-implantites.** *EMC - Médecine buccale* 2012, **7**(6):1-7.
9. Lang NP, Berglundh T: **Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology.** *J Clin Periodontol* 2011, **11**:178-181.



# **Chapitre I**

## **Etude Bibliographique**

# SOMMAIRE

<b>I.</b>	<b>IMPLANTOLOGIE ORALE.....</b>	<b>20</b>
I.1	<i>Les implants dentaires .....</i>	20
I.1.1	Définition .....	20
I.1.2	Différence histologique entre un implant et une dent .....	20
I.1.3	Matériaux utilisés dans le domaine de l'implantologie.....	21
I.2	<i>Les complications infectieuses suite à la pose d'un implant dentaire.....</i>	22
I.2.1	Problèmes éventuels suite à la pose d'un implant.....	22
I.2.2	La péri-implantite .....	25
I.3	<i>Les moyens de lutte contre la péri-implantite .....</i>	28
I.3.1	Traitements non-chirurgicaux.....	28
I.3.2	Traitements chirurgicaux .....	28
I.3.3	Nouvelles perspectives dans les traitements préventifs .....	28
<b>II.</b>	<b>LES REVETEMENTS IMPLANTAIRES ANTIBACTERIENS .....</b>	<b>29</b>
II.1	<i>Stratégies pour l'élaboration de matériaux bioactifs .....</i>	29
II.2	<i>Surfaces antiadhésives .....</i>	30
II.2.1	Dépôt d'une couche moléculaire antiadhésive.....	30
II.2.2	Revêtements de polymères bioactifs.....	30
II.3	<i>Matériau contenant des molécules antimicrobiennes .....</i>	31
II.3.1	Surfaces antimicrobiennes irréversibles.....	31
II.3.2	Revêtement utilisé comme vecteur d'antibiotiques.....	32
II.4	<i>Surfaces couplant propriétés antiadhésives et antimicrobiennes .....</i>	34
<b>III.</b>	<b>LE CHITOSANE (CS) .....</b>	<b>34</b>
III.1	<i>Origine du biopolymère .....</i>	34
III.2	<i>Méthodes d'élaboration du chitosane.....</i>	35
III.3	<i>Propriétés du chitosane .....</i>	36
<b>IV.</b>	<b>MODE DE DEPOT DU CHITOSANE SUR SUBSTRAT .....</b>	<b>37</b>
IV.1	<i>Dépôt de CS sous forme d'une monocouche ou d'une multicouche sans agent de couplage .....</i>	37
IV.2	<i>Utilisation d'un agent de couplage.....</i>	39
IV.2.1	Greffage <i>via</i> des groupements catéchol .....	39
IV.2.2	Fixation du chitosane <i>via</i> l'emploi d'un silane .....	40
<b>V.</b>	<b>STERILISATION DES MATERIAUX .....</b>	<b>42</b>
V.1	<i>Généralités.....</i>	42
V.2	<i>Stérilisation par UV.....</i>	42
V.3	<i>Stérilisation par autoclave.....</i>	42
V.4	<i>Stérilisation par ionisation .....</i>	43
V.4.1	Stérilisation par irradiation bêta ( $\beta$ ) .....	43
V.4.2	Stérilisation par rayons gamma ( $\gamma$ ) .....	43
V.5	<i>Stérilisation par traitement chimique .....</i>	44

V.5.1	Stérilisation par exposition à l'oxyde d'éthylène .....	44
V.5.2	Stérilisation par plasma.....	44
V.6	<i>Cas particulier de la stérilisation des dispositifs médicaux à base de polymère dont le CS .....</i>	<i>45</i>



## I. Implantologie orale

### I.1 Les implants dentaires

#### I.1.1 Définition

Parmi les différents types de soins proposés par les chirurgiens-dentistes, la pose d'implant dentaire est un traitement de plus en plus fréquent. Selon la définition proposée en 1999 par Muster *et al.* un implant dentaire est une « racine artificielle destinée à créer des ancrages osseux stables, résistants, efficaces, durables, sur lesquels s'adapte une prothèse amovible ou fixée » [1]. Un implant peut être utilisé afin de remplacer une ou plusieurs dents manquantes. Il y a, le plus souvent, trois phases principales lors de la pose d'un implant dentaire : une phase de chirurgie où l'implant est placé dans la mâchoire du patient, une phase de cicatrisation correspondant à l'intégration osseuse de l'implant ou ostéo-intégration et une dernière phase correspondant en la mise en fonction de l'implant avec la pose d'une prothèse dentaire, par exemple une couronne (Figure I- 1).

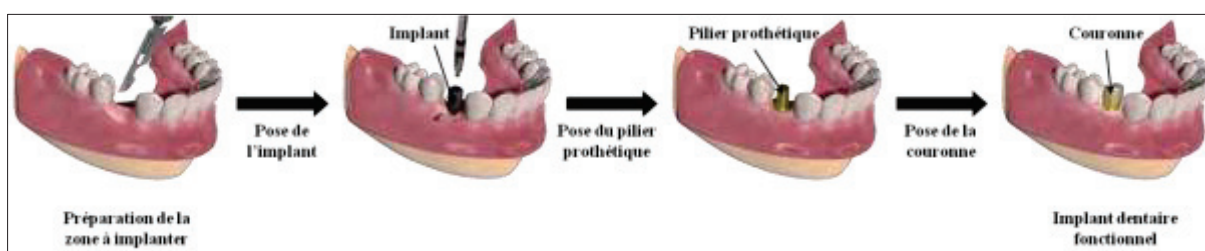
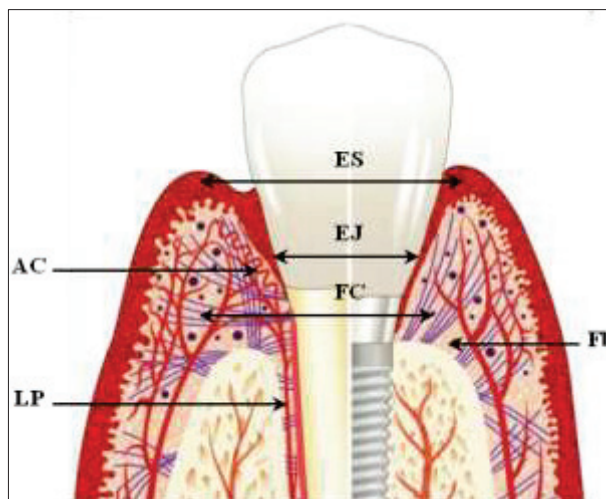


Figure I- 1 : Les différentes étapes lors de la pose d'un implant dentaire dans le cas d'un édentement unitaire (images fournies par Global D).

#### I.1.2 Différence histologique entre un implant et une dent

La principale différence histologique entre un implant fonctionnel et une dent se situe au niveau des tissus mous péri-implantaires, comme le montre l'illustration de la Figure I- 2 [2]. Ce tissu est constitué, au niveau de l'implant, de trois zones bien définies : l'épithélium sulculaire, l'épithélium de jonction et le tissu conjonctif [3]. Bien que la structure de l'épithélium sulculaire soit similaire à celle du tissu parodontal, l'épithélium de jonction péri-implantaire est quant à lui plus étendu que l'épithélium parodontal. Au niveau du tissu conjonctif des implants, les fibres de collagène en nombre

conséquent sont parallèles à l'axe de l'implant contrairement aux parodontes où les fibres de collagène sont perpendiculaires à la surface cémentaire. Par ailleurs le tissu conjonctif péri-implantaire est moins vascularisé, notamment du fait de l'absence de ligament parodontal. Enfin, la faible concentration de fibroblastes dans ce tissu entraîne une résistance aux contraintes limitée [4].



**Figure I- 2 : Schéma comparatif des tissus parodontaux et péri-implantaires sains ;ES = Epithélium Sulculaire ;EJ = Epithélium de Jonction ; FC = Fibres de Collagène ; AC = Attache Conjonctive ; Fb = Fibroblastes et LP = Ligament parodontal (Giovannoli, 2012).**

Ces différences peuvent interférer sur la tenue de l'implant au sein de la cavité buccale. Dans ce sens, il est important de posséder une compréhension accrue de l'interface hôte-implant et de définir un système de contrôle efficace [5].

### I.1.3 Matériaux utilisés dans le domaine de l'implantologie

Il existe une grande variété de matériaux pouvant être utilisés dans le domaine de l'implantologie orale en tant que biomatériaux, à savoir :

#### **- Les biomatériaux métalliques :**

Ces matériaux ont été les premiers à être utilisés en tant que biomatériaux, notamment du fait de leurs bonnes propriétés mécaniques. Les matériaux utilisés en chirurgie orale et plus particulièrement en tant que dispositifs implantables sont essentiellement constitués de titane pur ou d'alliages de titane [6, 7]. En effet, le titane est davantage utilisé du fait de sa biocompatibilité [8] et de sa plus grande résistance à la corrosion [9]. Cependant l'ajout d'éléments d'alliages dans le titane pur augmente considérablement ses propriétés mécaniques. L'alliage de titane, qui reste pour l'instant le plus utilisé, est le Ti6Al4V en raison de sa résistance mécanique [10]. Un seul autre type d'alliage de titane est disponible commercialement, il s'agit de l'alliage de titane enrichi en zircone et vendu par l'entreprise Straumann [11, 12]. A noter qu'il existe d'autres types d'alliages de titane étudiés actuellement en laboratoire, tels que, par exemple, les alliages Ti-Nb enrichi en zircone (Zr) [13, 14]. Cependant, le

principal inconvénient des matériaux métalliques est leur corrosion dans les conditions physiologiques [15, 16].

- **Les biomatériaux céramiques :**

Les céramiques possèdent comme avantage par rapport aux matériaux métalliques une plus grande résistance aux frottements et à la dégradation dans un milieu physiologique. Ils peuvent être séparés en deux catégories. Bien que tous soient biocompatibles, certains sont bio-inertes, c'est-à-dire qu'ils n'induisent aucune réaction chez l'hôte [6], et d'autres sont au contraire, bioactifs. Comme exemple de matériaux céramiques bio-inertes, on peut citer la zircone ( $ZrO_2$ ), qui est utilisé dans le domaine dentaire [17]. Un autre exemple de biocéramique est la famille des vitrocéramiques, les bioverres, dont l'emploi en tant qu'implant dentaire est en cours d'évaluation en laboratoire [18].

- **Autres biomatériaux envisageables:**

L'utilisation de polymères, synthétiques ou naturels, en tant que biomatériaux peut être également envisagée. Ce type de biomatériaux est souvent proposé en ingénierie tissulaire, notamment dans le but d'une régénération des tissus présents dans la cavité orale [19, 20]. En particulier, de nombreux chercheurs s'orientent actuellement vers l'utilisation de matériaux d'origine naturelle pour l'élaboration de leurs dispositifs médicaux [1]. Parmi les composés existants, le chitosane, est un polymère naturel dont l'utilisation est en pleine expansion. Une étude plus approfondie sur les propriétés et les domaines d'applications du chitosane sera présentée dans la partie III.3 de ce chapitre.

## I.2 Les complications infectieuses suite à la pose d'un implant dentaire

### I.2.1 Problèmes éventuels suite à la pose d'un implant

#### I.2.1.1 Localisation de la « zone à risque »

Lors des phases de cicatrisation dentaire (ou phase de bio-intégration) et de maintenance dentaire, des complications peuvent avoir lieu au niveau de la zone de jonction entre l'implant et les tissus mous, celle-ci est présentée comme la « zone à risque » (Figure I- 3).

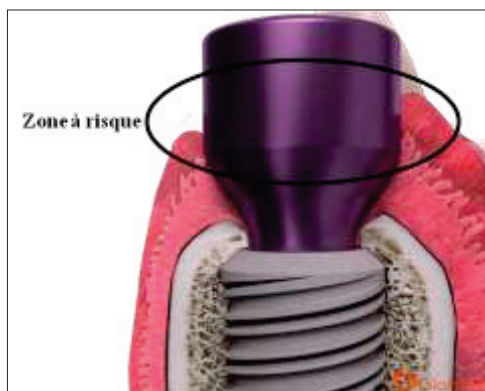


Figure I- 3 : Localisation de la zone à risque au niveau d'un implant dentaire (image fournie par Global D).

Comme expliqué dans la partie I.1.2, les tissus mous péri-implantaires présentent des différences au niveau histologique. Selon Tenenbaum, ces tissus « ont les caractéristiques d'un tissu cicatriciel » [21], ce qui expliquerait la faible réaction de ceux-ci lors d'une agression. La cavité buccale étant connue comme le système le plus riche en terme de diversité bactérienne, la probabilité d'une colonisation bactérienne au niveau de cette zone est importante [22]. D'autres facteurs peuvent être cause d'échecs dans le traitement implantaire. En effet, l'échec dans la pose d'un implant dentaire dépend également des conditions chirurgicales, des conditions d'implantation et de mise en place de l'élément prothétique, ainsi que de l'état de santé général du patient [23].

#### I.2.1.2 Colonisation bactérienne

##### - Colonisation des surfaces et formation du biofilm en dentaire

D'une manière générale, la croissance bactérienne est plus importante sur une surface qu'en solution. La formation du biofilm a été largement étudiée dans la littérature et peut être résumée par le schéma présenté Figure I- 4 [24]. En dentaire, la première étape consiste en l'adhésion des bactéries puis à la formation de colonies bactérienne à la surface du matériau. Il s'ensuit alors une étape de croissance et de prolifération des bactéries adhérees (étape 2-3) pour donner, en dernier lieu, le biofilm bactérien. Celui-ci est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) qui contient l'ensemble des bactéries dans une couche protectrice. Cette matrice est constituée en majorité de protéines et de polysaccharides et peut atteindre une épaisseur de quelques micromètres à quelques millimètres.

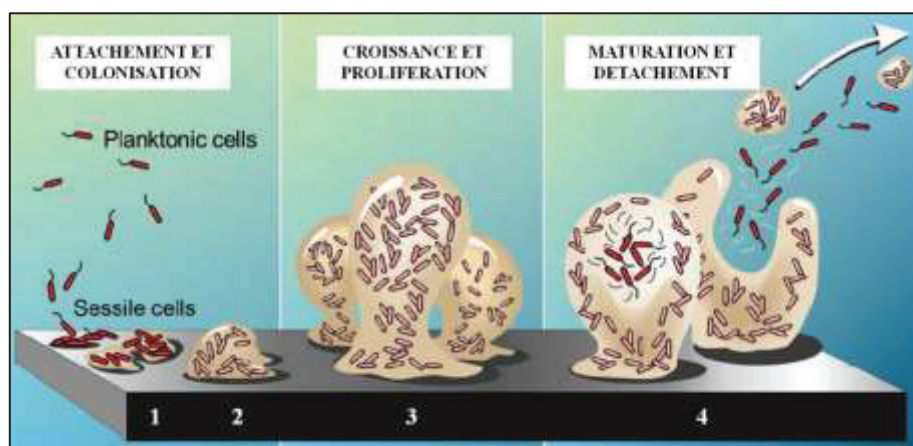


Figure I- 4 : Illustration des différentes étapes de la formation d'un biofilm : 1- adhésion et colonisation de la surface ; 2 + 3- accroissement ; 4- maturation du biofilm et détachement (Peters, 2005).

De nombreuses études ont été menées quant à la formation du biofilm bactérien et de sa composition au niveau des implants dentaires aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [25-28]. Une étude récente *in vitro* a montré notamment une formation et une composition initiale du biofilm bactérien différentes en fonction des surfaces en titane employées, celles-ci de topographie et d'hydrophilie variées [27]. Sanchez *et al.* ont par ailleurs montré lors de l'étude de différentes surfaces (titane, zircone, hydroxyapatite), que les différences observées au niveau du biofilm sont plutôt en termes d'épaisseur,

de composition de la matrice extracellulaire, de disposition des cellules bactériennes au sein de la matrice [25].

Néanmoins, une étude *in vivo* a démontré que le choix d'implants de nature et de structure différente n'entraîne pas de changements significatifs au niveau de la composition du biofilm bactérien après 3 et 5 jours d'incubation des implants (montés sur un système de *splint* pour incubation), l'étape de maturation du biofilm bactérien compense les différences observées dans un premier temps [26].

Les facteurs pouvant influencer la formation du biofilm sont très nombreux et rendent la comparaison des résultats issus de différentes études très difficiles, c'est pourquoi beaucoup d'études se limitent en premier lieu à l'étude en présence de seulement quelques bactéries.

#### - Colonisation bactérienne au niveau de la zone à risque

Dans la cavité buccale, la flore bactérienne d'un tissu sain est essentiellement constituée de bactéries aérobies de type Gram positif. Les premières bactéries à coloniser une surface dentaire sont celles appartenant au genre *Actinomyces* et *Streptococcus* [28, 29]. De plus, celles impliquées dans les maladies inflammatoires, aussi bien au niveau des dents qu'au niveau des implants dentaires, appartiennent au système illustré en rouge défini par Socransky *et al.* (Figure I- 5): *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola* [30-32].

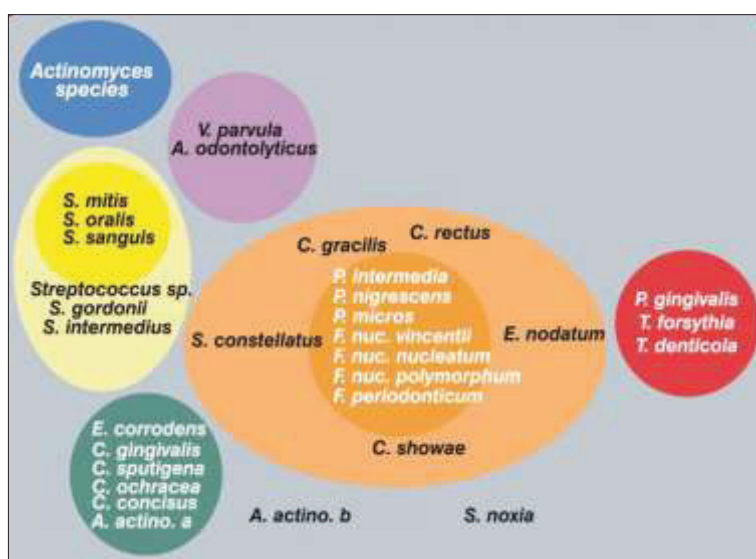


Figure I- 5 : Représentation schématique des relations entre les différentes espèces de bactéries présentes dans la cavité buccale (Socransky, 1998).

Fürst *et al.* ont démontré une colonisation rapide de la muqueuse péri-implantaire par ces bactéries pathogènes 30 minutes seulement après la pose de l'implant [33]. D'autres bactéries peuvent également être impliquées dans les maladies inflammatoires telles que les deux bactéries du système illustré en orange *Prevotella intermedia* et *Fusobactérium nucleatum* [34, 35]. L'étude de Van Winkelhoff *et al.* montre que la bactérie pathogène *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est parfois présente dans les poches péri-implantaires [2, 34].

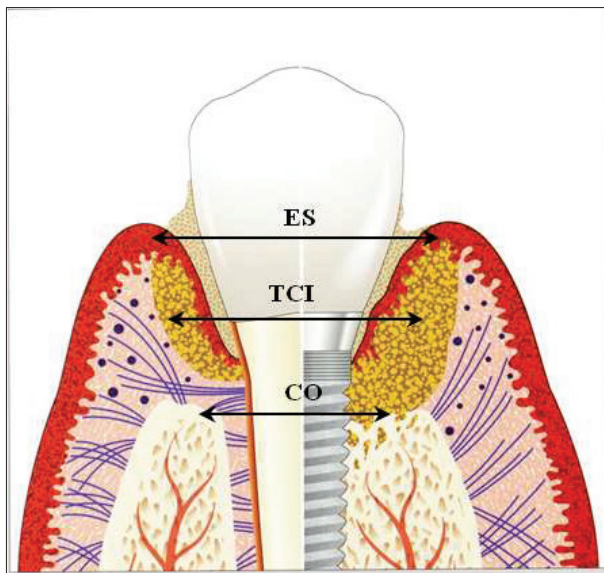


L'infection bactérienne peut entraîner deux complications inflammatoires à plus ou moins long terme, il s'agit de la mucosite et de la péri-implantite. La mucosite est une réaction inflammatoire réversible touchant les tissus mous superficiels autour de l'implant fonctionnel [36]. Elle se traduit cliniquement par des rougeurs ou un œdème au niveau de la gencive et parfois un saignement au sondage [2]. La mucosite, si elle n'est pas traitée, conduira à la seconde complication d'origine infectieuse : la péri-implantite (PI). Celle-ci correspond à un processus inflammatoire affectant l'ensemble des tissus autour de l'implant. Cette inflammation aboutit à une perte osseuse autour de l'implant et entraîne à long terme la perte de celui-ci [36, 37].

## I.2.2 La péri-implantite

### I.2.2.1 Généralité

La péri-implantite (PI) apparaît comme l'une des causes les plus fréquentes de l'échec implantaire. Elle peut être comparée à la parodontite qui correspond au même type de réaction inflammatoire mais autour d'une dent [38]. Cependant en raison des différences histologiques évoquées dans la partie I.1.2, l'infection aura d'autres conséquences (Figure I- 6). En effet, contrairement à la parodontite où l'inflammation reste localisée au niveau du tissu conjonctif, dans le cas de la péri-implantite, celle-ci se répand au niveau de l'os alvéolaire entraînant progressivement une destruction osseuse [2, 37].



**Figure I- 6 : Schéma comparatif de la différence du processus inflammatoire entre un implant et une dent ; ES =Epithélium Sulculaire ; TCI = Tissu Conjonctif Inflammatoire ; CO = Crête Osseuse (Giovannoli, 2012).**

Ainsi la péri-implantite peut être définie comme la synergie de plusieurs facteurs avec pour résultat final une inflammation et une résorption de l'os [39].

Deux types de complications peuvent être distingués chronologiquement. On parle de complications primaires dans le cas où celles-ci ont lieu lors de la phase d'ostéo-intégration et

d'échecs secondaires lorsque ceux-ci ont lieu lors de la phase de maintenance [2, 40]. Dans le cas de la phase d'ostéo-intégration, les échecs précoces peuvent être dus à la mise en place d'un implant dans une zone mal décontaminée, une technique chirurgicale inadaptée, une instabilité de l'implant, une contamination bactérienne de l'implant lors de la chirurgie ou un entretien insuffisant durant la cicatrisation [40]. On parle alors de PI précoce qui se définit par une perte osseuse d'origine infectieuse autour d'un implant présentant une bonne stabilité mécanique en phase de cicatrisation [2].

#### I.2.2.2 Prévalence et facteurs de risque

D'après l'étude de Mombelli *et al.*, la prévalence de la péri-implantite se situe aux alentours de 10 % des implants et de 20 % des patients dans l'intervalle de 5 à 10 ans suivant la pose de l'implant [41]. Il est à noter que ces valeurs peuvent différer d'une étude à l'autre en raison notamment des critères de sélection et d'exclusion des différents cas analysés. En ce qui concerne la PI précoce, il n'y a pas, à l'heure actuelle, de données types pour spécifier la prévalence de ces cas particuliers de PI [2].

La probabilité de développer une péri-implantite peut être amplifiée à cause de plusieurs facteurs de risque, que l'on peut classer en deux catégories: les facteurs locaux et les facteurs généraux résumés dans la figure ci-dessous (Figure I- 7) [2]. Les facteurs locaux concernent les conditions anatomiques et cliniques de la zone péri-implantaire étudiée qui auront une influence sur la colonisation bactérienne [42]. Les facteurs généraux concernent, quant à eux, l'état de santé général du patient (facteurs génétiques, acquis ou environnementaux) qui module la réponse de ce même patient à l'infection [42-46].

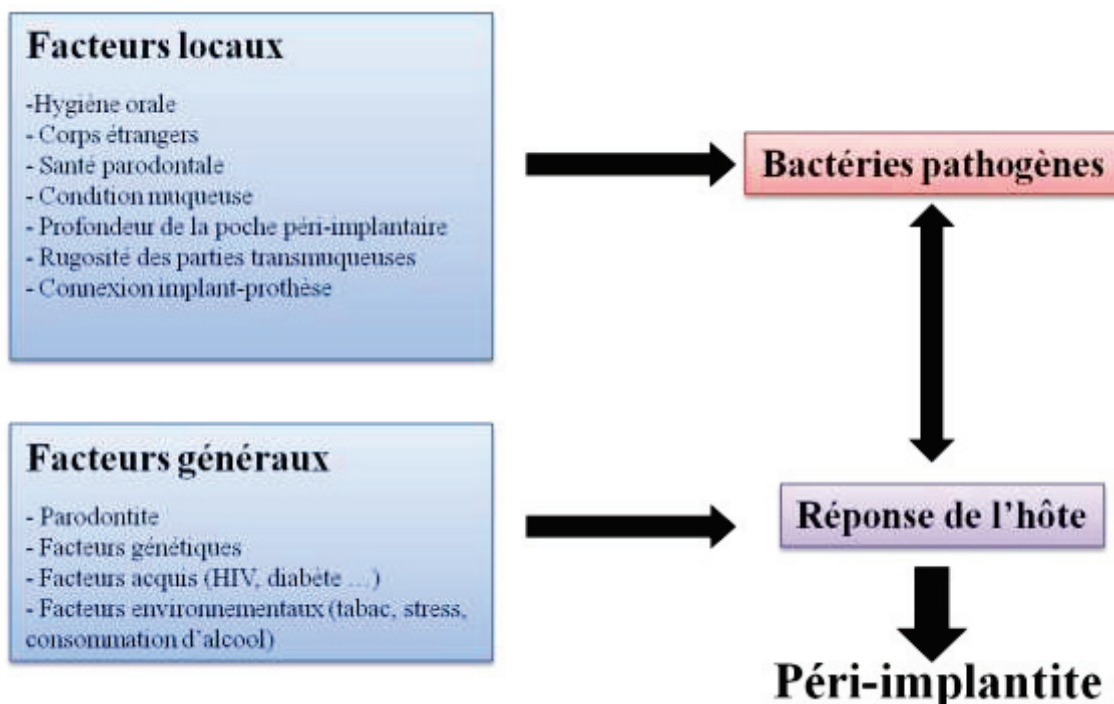


Figure I- 7 : Ensemble des facteurs de risque infectieux favorisant la mise en place de la péri-implantite (inspirée de Giovannoli, 2012).

Parmi ces différents facteurs, le rôle de certains dans l'apparition de la PI est sujet à polémique. Selon l'étude récente de Chrcanovic *et al.*, il n'a pas été mis en évidence d'impact significatif du diabète lors de l'échec de la pose d'un implant dentaire [47]. Les auteurs font, toutefois, preuve de vigilance quant à cette conclusion, en raison de l'hétérogénéité des données sélectionnées dans les différentes études menées ainsi que du nombre insuffisant de cas étudiés en accord avec les précédentes conclusions de Mombelli *et al.* [48]. Par ailleurs, d'après Giovannoli *et al.*, aucune étude ne prouve à ce jour que le taux d'échec d'un implant à court terme est plus important chez les patients atteints de parodontite chronique [2], même si la 3e conférence de consensus de l'EAO rapporte les antécédents de parodontite comme impactant la prévalence des péri-implantites [49]. Ceci nous montre que d'autres études sont encore nécessaires afin de mieux appréhender cette maladie.

#### I.2.2.3 Méthodes de diagnostic

La péri-implantite peut être détectée cliniquement par un sondage au niveau de la zone implantée et/ ou par l'analyse radiologique prise à ce niveau (Figure I - 8). Suite à ces examens, il est possible, la plupart du temps, de diagnostiquer une PI par observation d'une augmentation de la profondeur au sondage, celle d'un saignement lors du sondage et/ou d'une suppuration au niveau de l'espace péri-implantaire [36, 37, 50]. Par ailleurs, une perte de la structure osseuse autour de l'implant peut être également mise en évidence radiographiquement. La PI est souvent asymptomatique mais peut être détectée, dans certains cas, par le patient lui-même si l'implant devient mobile, signe de l'échec du traitement.

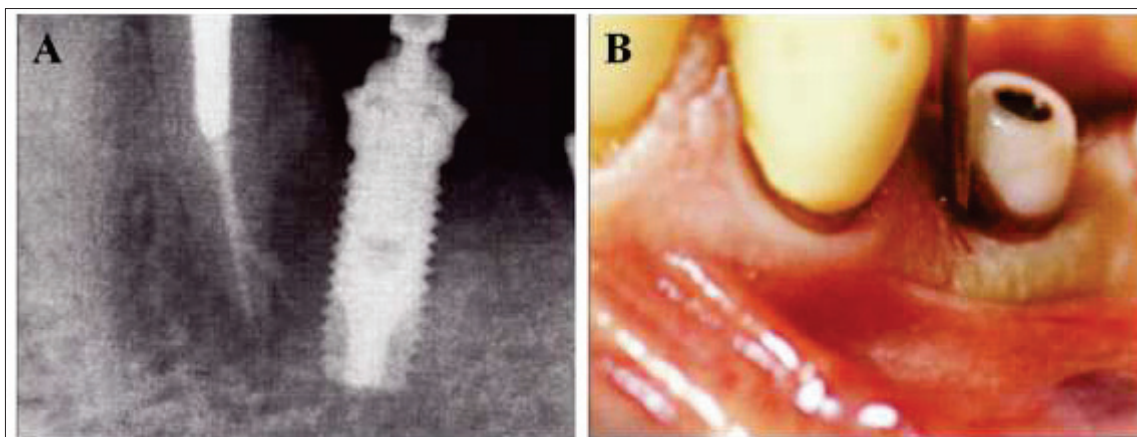


Figure I- 8 : Observation de la PI précoce radiographiquement (A) et par sondage de la zone (B) (Giovannoli, 2012)



### I.3 Les moyens de lutte contre la péri-implantite

Avant d'envisager le retrait de l'implant contaminé, plusieurs traitements peuvent être mis en place afin de lutter contre cette complication infectieuse, si toutefois l'implant est stable. Les traitements à appliquer sur les zones contaminées vont dépendre, en grande partie, du type de surface de l'implant, mais également de l'état clinique du patient. En effet, de ces paramètres dépend l'efficacité du traitement mais aussi la persistance de l'infection.

#### I.3.1 Traitements non-chirurgicaux

Les traitements non-chirurgicaux ont pour objectif principal de décontaminer la surface de l'implant. Ils peuvent être classés en deux catégories, les traitements chimiques, d'une part, et les traitements mécaniques, d'autre part [21]. Le traitement mécanique consiste en un débridement de la surface *via* l'utilisation d'instruments spécifiques, tels que les curettes en fibres de carbone ou en Téflon, et les inserts en plastiques [21]. Ce traitement peut également être effectué par traitement aux ultrasons avec des inserts de carbone et par polissage *via* l'utilisation de poudre à faible granulométrie [51]. Toutefois, il est généralement admis qu'un traitement mécanique seul ne suffit pas, il est nécessaire d'y associer un traitement chimique pour décontaminer la surface de l'implant [52, 53]. Comme évoqué par Tenenbaum *et al.*, il existe différents produits pour une administration locale tels que les gels antiseptiques (chlorhexidine) [54], les microsphères de minocycline, l'acide citrique, la bétadine, le peroxyde d'hydrogène, les tétracyclines ou plus simplement une solution saline [21].

Selon plusieurs études dont notamment celle menée par Esposito *et al.*, l'efficacité entre tous ces traitements est à ce jour équivalente [55].

#### I.3.2 Traitements chirurgicaux

Pour un nettoyage en profondeur des surfaces implantaires contaminées, il est parfois nécessaire d'employer des traitements chirurgicaux (élévation d'un lambeau). Ces traitements vont permettre un débridement mécanique de la zone infectée avec une vision directe des zones à extraire [21]. Pendant la chirurgie, le débridement mécanique est effectué avec un aéropolisseur et du bicarbonate de soude, associé parfois à du peroxyde d'hydrogène, permettant une bonne décontamination de la surface [2]. Par ailleurs, l'association d'une décontamination antiseptique à ce traitement par l'ajout de chlorhexidine notamment, permet une amélioration de son efficacité [56]. Afin de remplacer la perte des tissus osseux autour de l'implant, un comblement du défaut osseux avec un matériau régénérant les structures osseuses peut être envisagé [57].

#### I.3.3 Nouvelles perspectives dans les traitements préventifs

Le risque de péri-implantite est présent pour tous les patients, mais davantage encore pour certains patients dits « à risque » tels que les fumeurs, les diabétiques, les patients immunodéprimés comme les porteurs du virus du SIDA ou les patients de cancers [31, 43, 44, 52, 58]. Malgré les

précautions prises lors de la chirurgie et après la pose de l'implant dentaire, la probabilité de développer des pathologies des tissus péri-implantaires chez ces patients est significativement importante, raison pour laquelle ces patients sont souvent exclus de ce type de soins [44].

Chez les personnes diabétiques par exemple, l'hyperglycémie a pour conséquence i) un affaiblissement des défenses de l'hôte, le rendant vulnérable aux infections et ii) une faible capacité de cicatrisation des tissus. Toutefois, il est important de noter que dans le cas des patients diabétiques, la contre-indication de la pose d'implant peut être parfois levée si les conditions sont favorables (pas d'autres facteurs de risque, contrôle précis du taux de glycémie...). En effet, selon plusieurs études, les chances de succès du traitement chez ces patients peuvent être satisfaisantes sous réserve d'un suivi spécifique [59, 60].

Actuellement les risques d'infections postopératoires sont limités par des prescriptions médicamenteuses (antibiotique et antiseptique) et/ou des conditions opératoires stériles mais cela ne suffit pas pour les patients à risques précités. Il est alors nécessaire de proposer une solution préventive afin d'éviter les complications postopératoires pour tous les patients. Une des solutions envisagées, en recherche, est la modification de la surface du dispositif médical implanté afin de lui conférer une action antibactérienne, antiadhésive et/ou une capacité de cicatrisation sans impact sur les propriétés initiales du matériau (résistance mécanique, à la corrosion, biocompatibilité).

Le développement de revêtements implantaires aux propriétés bioactives (antibactérienne et/ou cicatrisante) apparaît donc ici comme un enjeu majeur aussi bien sociétal qu'économique.

## **II. Les revêtements implantaires antibactériens**

### **II.1 Stratégies pour l'élaboration de matériaux bioactifs**

Afin de prévenir les complications infectieuses, il paraît ainsi judicieux de se tourner vers de nouveaux matériaux capables de lutter contre l'infection. D'une manière générale, il existe deux approches pour réduire les interactions entre les bactéries et les matériaux ; inhiber l'adhésion bactérienne et/ou éliminer les bactéries présentes à la surface du matériau.

Ainsi, trois stratégies peuvent être envisagées pour élaborer un biomatériau résistant aux infections :

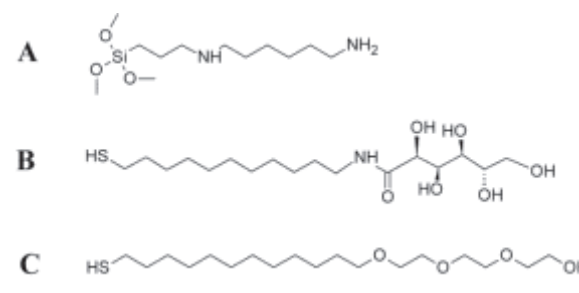
- Modification de la surface du biomatériau pour lui conférer des propriétés antiadhésives (II.2),
- Ajout de substances antimicrobiennes au sein du matériau (II.3),
- Matériau possédant à la fois des propriétés antiadhésives et antimicrobiennes [61, 62] (II.4).

## II.2 Surfaces antiadhésives

L'obtention de surfaces antiadhésives implique une modification de la surface du biomatériau initial en jouant notamment sur les propriétés de surface, telles que l'hydrophilie, la structure cristalline du matériau, sa conductivité ou encore sa rugosité [63, 64]. Pour ce dernier cas, la colonisation bactérienne sera moins importante sur un implant présentant une faible rugosité de surface par rapport à un implant de rugosité plus élevée [65, 66]. Outre la modification de l'état de surface du matériau lui-même, il existe d'autres méthodes pour obtenir des surfaces antiadhésives, comme le dépôt d'une monocouche assemblée hydrophile ou le dépôt d'un polymère lui même hydrophile.

### II.2.1 Dépôt d'une couche moléculaire antiadhésive

Il est possible, par dépôt d'une monocouche, à partir d'un précurseur moléculaire, de limiter l'adhésion bactérienne en modulant le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces implantées. En effet, plusieurs études ont prouvé que la présence de monocouches hydrophiles en surface permet une diminution significative de l'adhésion bactérienne. Ces surfaces peuvent être obtenues par exemple *via* le greffage d'un organosilane tels que le *N*-(6-aminohexyl)aminopropyltriméthoxysilane (fonctions terminales amine  $-NH_2$ ) [67], ou *via* le greffage d'un L-gulonamide avec une terminaison undecanethiol ou d'un oligoéthylène glycol (fonctions terminales  $-OH$ ) sur la surface [68].



**Figure I- 9 :** Structures de l'organosilane, le *N*-(6-aminohexyl)aminopropyltriméthoxysilane (A) (Ploux, 2007) ; des thioalcanes tels que le L--gulonamide avec une terminaison undecanethiol (B) ou d'un oligoéthylène glycol (C) (Hou, 2007).

### II.2.2 Revêtements de polymères bioactifs

Il a été montré que l'utilisation de polymères hydrophiles permet de limiter la formation du biofilm bactérien [63]. Par exemple, l'emploi de polyéthylène glycol phosphorylé sur de l'hydroxyapatite permet de réduire l'adhérence du *S. mutans* [69]. Par ailleurs, une récente étude a montré que le greffage covalent de polysaccharides d'origine marine (ulvans) sur des surfaces de titane entraîne une diminution significative de l'adhésion de la bactérie *P. aeruginosa* (de l'ordre de 90 %), ainsi qu'une réduction de la croissance bactérienne à la surface de l'implant, avec un effet antiadhésif avéré jusqu'à 24 h [70]. Enfin, les travaux de Lafarge montrent que le dépôt de nouveaux

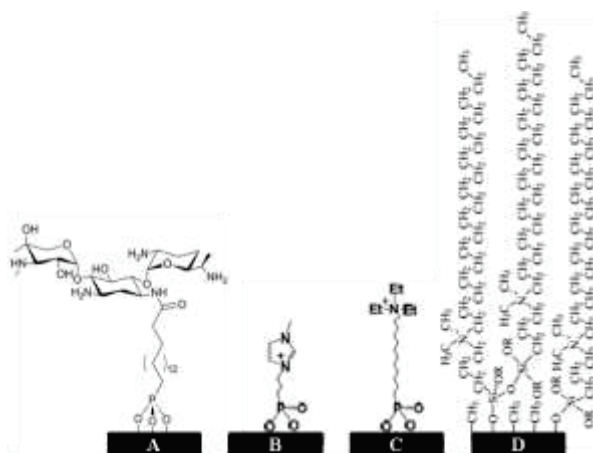
dérivés de polysaccharide et de polyéthylène glycol greffés sur des surfaces de polychlorure de vinyle (PVC) confèrent au matériau des propriétés antiadhésives [71].

## II.3 Matériau contenant des molécules antimicrobiennes

Selon Guerrero *et al.*, l'apport de molécules antibactériennes au biomatériau peut être réalisé de deux manières : par greffage irréversible d'un agent antimicrobien sur la surface ou par dépôt d'un revêtement utilisé comme vecteur d'antibiotiques [72].

### II.3.1 Surfaces antimicrobiennes irréversibles

Les surfaces antimicrobiennes irréversibles sont des surfaces sur lesquelles des agents antibactériens sont greffés *via* des liaisons covalentes pour un maintien durable. Les agents utilisés sont principalement des antibiotiques (gentamicine, vancomycine...). Ils peuvent être fixés au substrat *via* différents agents de couplage comme des organophosphorés présentés Figure I- 10 [73]. Les ammoniums quaternaires sont d'autres groupements fonctionnels antibactériens qui sont utilisés pour fonctionnaliser les surfaces conduisant ainsi à des surfaces chargées positivement présentant un effet bactéricide. Ces ammoniums quaternaires peuvent être immobilisés en positions terminales sur des organophosphonates [74] ou des organosilanes [75].



**Figure I- 10 : Utilisation de monocouches auto assemblées pour lier : antibiotiques (la gentamicine) *via* une monocouche phosphoré (A) (Kruszewski, 2013) ; ammoniums quaternaires en positions terminales d'une monocouche d'organophosphorés (B et C) (Amalric, 2008) ; ammoniums quaternaires avec une fonction terminale alkyle *via* une monocouche d'organosilanes (Gottenbos, 2002).**

He *et al.* ont étudié en particulier, la différence d'adhésion entre des fibroblastes et des bactéries communes (*E. coli* et *S. aureus*) en fonction des composés fixés sur une surface (Figure I- 11).

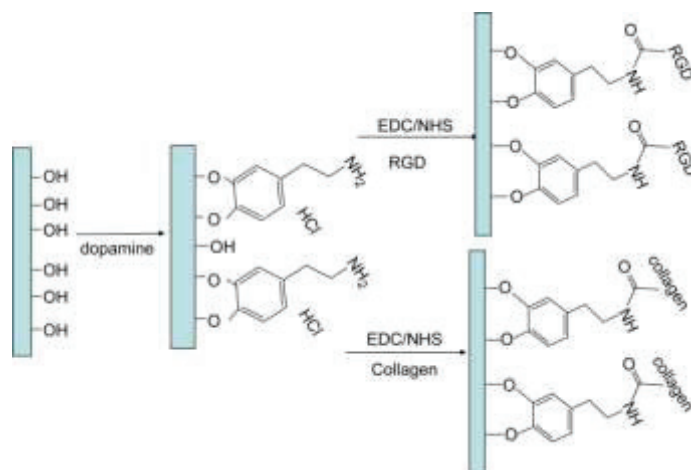


Figure I- 11 : Schéma du greffage de la dopamine, d'un peptide arginine-glycine-aspartic (RGD) et du collagène sur un substrat de verre (He, 2009).

Ces composés protéiques (collagène), peptidiques (RGD) ou sous forme de résidu d'acide aminé (dopamine), sont tous connus pour leurs propriétés antiadhésives [76]. Des différences significatives d'adhésion ont ainsi pu être mises en évidence en fonction de l'organisme et du composé étudié. Il s'est avéré que le greffage d'un peptide en surface améliore l'adhésion des fibroblastes sans effet sur l'adhésion des bactéries communes tandis que le collagène permet une augmentation de l'adhésion des fibroblastes, avec en parallèle une diminution d'*E. coli*, mais une augmentation de *S. aureus*.

### II.3.2 Revêtement utilisé comme vecteur d'antibiotiques

Il existe différents systèmes permettant de délivrer les antibiotiques dans le vivant. Ces systèmes, appelés vecteurs d'antibiotiques, sont de nature assez variée, allant d'un revêtement polymère à un revêtement céramique ou métallique ou encore à une monocouche déposée sur substrat [64]. Plus particulièrement, on peut citer l'hydroxyapatite [77] ou des polymères biodégradables tels que le poly(D,L-lactide) [78], le chitosane [79] et le polybenzyl acrylate [80].

En ce qui concerne les composés antibactériens utilisés, ils peuvent également être variés. Les principaux métaux et/ou ions métalliques employés comme agent antibactérien sont l'argent, le zinc et le cuivre. Ils peuvent être incorporés ou greffés sur les systèmes cités ci-dessus et sont couramment employés dans les traitements de la péri-implantite et de la parodontite [81]. D'autres composés, un peu moins connus, sont également reportés dans la littérature pour ces applications : le fluorure stanneux ( $\text{SnF}_2$ ), le chlorure de palladium ( $\text{PdCl}_2$ ), le bismuth ( $\text{Bi}^{3+}$ ) ou l'acide borique ( $\text{B(OH)}_3$ ) [72, 81]. De même, tous les antibiotiques classiques (gentamycine, céphalothin, carbenicilline, amoxilline, céfamandole, tobramycine et vancomycine) peuvent être chargés dans des vecteurs déposés sur implants [64]. Enfin, une dernière classe de composés antibactériens peut également être intégrée au vecteur ; les nanoparticules ( $\text{MgF}_2$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{TiO}_2$ ), toujours dans le but d'inhiber la formation du biofilm bactérien [82-84].

Un exemple plus concret concerne la chlorhexidine, antiseptique largement utilisé dans l'implantologie orale, en lien avec son large spectre d'action. Une alternative à son administration locale consiste à mettre au point un matériau contenant la molécule temporairement, pour ensuite la libérer progressivement au sein de l'organisme [79].

Une autre solution possible pour fournir au matériau ses nouvelles propriétés consiste à incorporer des particules antibactériennes dans un revêtement connu pour ses propriétés bioactives comme par exemple l'incorporation de l'argent dans un revêtement d'hydroxyapatite [85]. Dans le même ordre d'idée, l'étude récente effectuée par Chatzistavrou *et al.* a démontré qu'un matériau composite obtenu par l'incorporation d'une céramique dopée avec des particules d'argent au sein d'une matrice extracellulaire induit la prolifération des cellules dentaires tout en ayant un effet antibactérien [86].

De plus, des monocouches sur substrat peuvent être employées en tant que vecteur d'antibiotiques comme par exemple les systèmes à base de phosphonates qui permettent de délivrer des agents antibactériens tels que les ions argent et du monoxyde d'azote NO (Figure I- 12) [72].

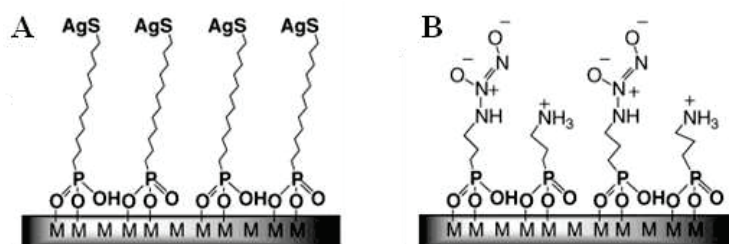


Figure I- 12 : Monocouches formées à base de phosphonates terminées par des fonctions thiolates d'argent (A) et de diazoniumdiolates (B)°(Guerrero, 2009).

Le chitosane peut être utilisé à la fois comme vecteur d'antibiotiques et comme composé biologiquement actif grâce à une fonction ammonium quaternaire. Ainsi, il peut être chargé puis incorporé par exemple, dans un polymère de type méthacrylate pour l'inhibition de la formation du biofilm bactérien [87]. Par ailleurs, il peut également être employé comme vecteur d'antimicrobiens (tétracycline). L'utilisation de ce biopolymère dégradable permet de lutter efficacement contre les infections tout en étant biocompatible en présence d'ostéoblastes et de fibroblastes [79]. Le chitosane étant le biopolymère retenu dans ce projet, une partie sera entièrement consacrée à ce composé et à ses propriétés (partie III).

## II.4 Surfaces couplant propriétés antiadhésives et antimicrobiennes

A côté des surfaces qui ne sont que antiadhésives ou antimicrobiennes, il est possible de préparer, selon différentes procédés, des surfaces mixtes couplant ces deux propriétés. Par exemple, l'utilisation de films en multicouche construits par empilement des deux polysaccharides, l'héparine et le chitosane, permet non seulement de réduire l'adhésion bactérienne mais également de détruire les bactéries adhérentes à la surface [88]. Par ailleurs, l'emploi de nanoparticules telles que les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) contenu dans les systèmes de libération de composés confère au biomatériau des propriétés antiadhésives et antimicrobiennes [89, 90]. L'emploi de peptides synthétiques antimicrobiens et antiadhésifs apparaît également comme l'une des solutions les plus pertinentes. En effet, plusieurs études ont clairement mis en évidence la double propriété de ces revêtements déposés en multicouches [91-93].

Cependant, en raison du risque de développement d'une résistance des bactéries vis-à-vis des agents antibactériens libérés dans le milieu, la commercialisation d'un implant revêtu par un procédé contenant des antibiotiques ne peut pas être envisagée [63]. Par ailleurs, la conception d'un revêtement antimicrobien qui conserve la biocompatibilité du matériau initial est un vrai challenge. En effet, toute la difficulté dans l'élaboration de tels revêtements est d'éliminer le problème des bactéries, en inhibant leur adhésion ou en les tuant une fois adhérentes, tout en permettant l'adhésion et la prolifération des cellules (fibroblastes et ostéoblastes dans la cavité orale).

Parmi les diverses solutions évoquées tout au long de cette partie pour lutter contre les complications infectieuses, nous avons choisi de développer au cours de ce projet un revêtement bioactif sur substrat de titane en employant le chitosane pour conférer au matériau les propriétés antibactériennes souhaitées.

## III. Le chitosane (CS)

### III.1 Origine du biopolymère

Le chitosane (CS) est un polysaccharide constitué d'unités *N*-acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucosamine liées en position  $\beta$  1-4, dérivé de la chitine, elle-même, un copolymère composé principalement d'unités *N*-acétyl-*D*-glucosamine. La chitine est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. On trouve la chitine chez les insectes, les arachnides, les animaux marins au niveau de l'exosquelette des crustacés et dans certains champignons et microorganismes [94]. Pour le cas plus spécifique des champignons de Paris, la chitine peut être trouvée dans l'*Agaricus bisporus* [95, 96].



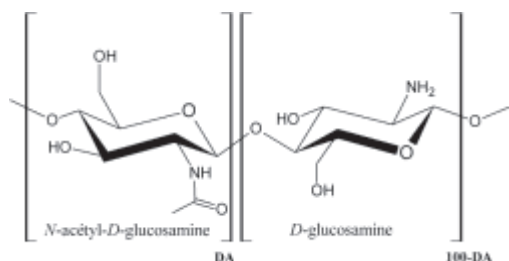


Figure I- 13 : Structure chimique du chitosane utilisé dans les applications médicales.

La chitine et le chitosane sont tous deux caractérisés par la fraction des groupements N-acétamide résiduels qui correspond au degré d'acétylation noté DA. Pour le chitosane, on parle aussi du degré de désacétylation, noté DD, dans le cas où une partie des groupements N-acétamide est retirée du polymère. Ce sont d'ailleurs les valeurs de DA et DD qui permettent de savoir si l'on parle de chitosane ou de chitine. En effet, le mot chitine est employé lorsque le biopolymère étudié présente un DA supérieur à 50 %. Par définition, la structure idéale du chitosane est composée uniquement de monomères *D*-glucosamine reliés entre eux par une liaison glycosidique (1→4). Néanmoins, en raison notamment des conditions de production à l'échelle industrielle, la structure du chitosane obtenue sera en réalité un copolymère avec une distribution aléatoire des unités glucosamines acétylées ou non (Figure I- 13). Ainsi, le terme de chitosane sera donné à tout copolymère dont la valeur limite de DA est inférieur à 50 % [95, 97-99]. En outre, la condition essentielle pour distinguer le chitosane de la chitine est la solubilité du composé dans des solutions aqueuses en milieu acide dilué [100, 101]. En effet, il est connu que la chitine est insoluble dans des solutions aqueuses acides au contraire du chitosane.

Le CS est caractérisé par une masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ), une polydispersité ( $M_w/M_n$ ) et un taux de cristallinité. Du point de vue physico-chimique, tous ces paramètres auront une influence importante sur sa solubilité et donc sur sa viscosité en solution [101].

### III.2 Méthodes d'élaboration du chitosane

En raison de l'absence de source exploitable de chitosane, la production est obtenue uniquement par traitement de la chitine. Il existe plusieurs méthodes de synthèse du chitosane, toutes basées sur les mêmes étapes principales; une phase de déprotéination suivie d'une phase de déminéralisation du matériau initial (chitine) avant une décoloration du composé par oxydation. La dernière étape qui correspond à la réaction de désacétylation contrôlée de la chitine par la soude est schématisée sur la Figure I- 14.



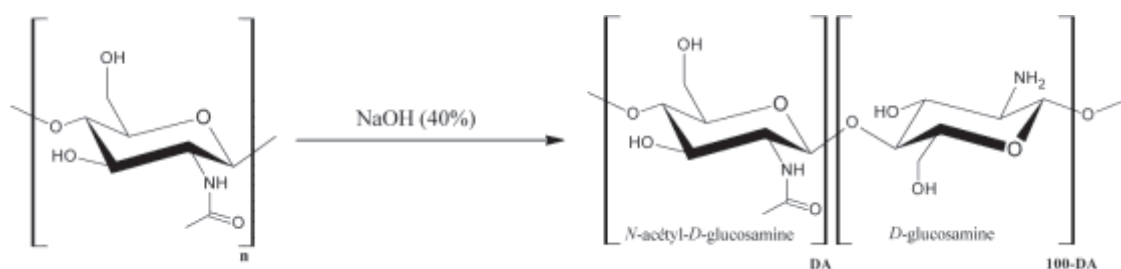


Figure I- 14 : réaction de désacétylation de la chitine en chitosane *via* l'emploi de soude.

Il est important de noter qu'en fonction de l'origine de la chitine, la méthode d'extraction du chitosane varie et donc les produits obtenus seront quelques peu différents. Par ailleurs, le chitosane peut également être observé dans la nature. Il est obtenu *via* une réaction enzymatique à partir de la chitine dans les champignons [102]. En fonction des conditions de désacétylation, le chitosane peut présenter un DA, une masse molaire et une cristallinité pouvant varier. La modification de ces paramètres engendre alors des modifications des propriétés physico-chimiques et biologiques du CS [103]. Par exemple, ils peuvent avoir une influence importante sur les conditions de dissolution du composé qui, insoluble dans la plupart des solvants, nécessite l'utilisation d'une solution aqueuse acidifiée (pH<6,5).

Le chitosane présentant des fonctions différentes (alcool, amine, acétyle) sur les cycles glucosidiques, il est alors possible de préparer de nombreux dérivés du chitosane par modification chimique, dans le but, par exemple, d'améliorer son greffage sur une surface ou de modifier ces propriétés physico-chimiques (solubilité, cristallinité, capacité à chélater des ions métalliques) [104-107].

### III.3 Propriétés du chitosane

Le chitosane est connu depuis longtemps pour être un polymère biocompatible, non toxique, biodégradable et antibactérien [96, 108]. Ces propriétés font, donc, de lui un candidat de choix dans la mise au point de biomatériaux. Comme évoqué précédemment, en fonction de ses caractéristiques physiques (DA, Mw, caractère hydrophile/hydrophobe, cristallinité), de sa méthode de production ainsi que de son origine, le CS peut présenter différentes propriétés physico-chimiques mais également différentes réponses cellulaires ou activités antibactériennes [109]. Dans la littérature il a été montré qu'en fonction de la mise en forme du chitosane (fibres électrofilées, films, éponges, nanoparticules), le mode d'action du chitosane sur les bactéries peut varier [110]. Si les paramètres déjà cités jouent un rôle prépondérant sur la réponse biologique du chitosane, elle dépend également fortement de facteurs environnementaux tels que le type de bactéries (gram – ou gram +), la force ionique, le pH, la température et le temps de mise en contact [111, 112]. Le chitosane permet également une diminution de l'adhésion bactérienne et de la viabilité du biofilm [113]. Selon l'étude d'Ikinci *et al*, l'effet antibactérien du chitosane a été mis en évidence sur une bactérie gingivale la *P. gingivalis* [114].

Il existe plusieurs mécanismes d'actions du chitosane envers les bactéries. L'un des mécanismes généralement admis par l'ensemble de la communauté scientifique consiste en l'interaction entre le chitosane chargé positivement ( $\text{NH}_3^+$ ) et la surface des bactéries chargées négativement, entraînant ainsi une altération de la paroi bactérienne, une perte des composés intracellulaires et finalement la mort des bactéries [115-118]. Selon l'étude de Rabea *et al.* portant sur le mode d'action de différents types de chitosane, il a été montré qu'une faible concentration en chitosane (0.2 mg/L) entraîne un agglutinement des bactéries alors qu'à l'inverse une forte concentration provoque la non adhésion des bactéries qui vont ainsi rester en suspension [118]. Par ailleurs, le pouvoir chélatant du chitosane lui permettrait de se lier aux métaux et d'inhiber la production d'agents antimicrobiens en modifiant notamment la perméabilité de la membrane des bactéries avec une dépolarisation de celle-ci mais également en se liant à l'ADN et empêcher ainsi l'expression des protéines [118-120].

Par ailleurs, l'utilisation ou non de dérivés du chitosane joue également un rôle dans la réponse à l'inflammation. En effet, il a été montré que certains dérivés du chitosane tels que les dérivés fonctionnalisés par un ammonium quaternaire ou un groupement carboxyle possèdent une activité antibactérienne supérieure à celle du chitosane seul [121, 122].

Les domaines d'application du chitosane sont très variés allant de la dépollution de l'eau à la cicatrisation des grands brûlés [123, 124], en passant par la cosmétique, le tanage du vin, la production de films alimentaires ou encore la diététique (aide au régime alimentaire) [95, 97, 106, 125]...

## IV. Mode de dépôt du chitosane sur substrat

Pour rappel, l'objectif du projet est de proposer un revêtement de chitosane. Dans ce contexte, la partie suivante décrit l'ensemble des techniques reportée de la littérature permettant de produire un film de chitosane.

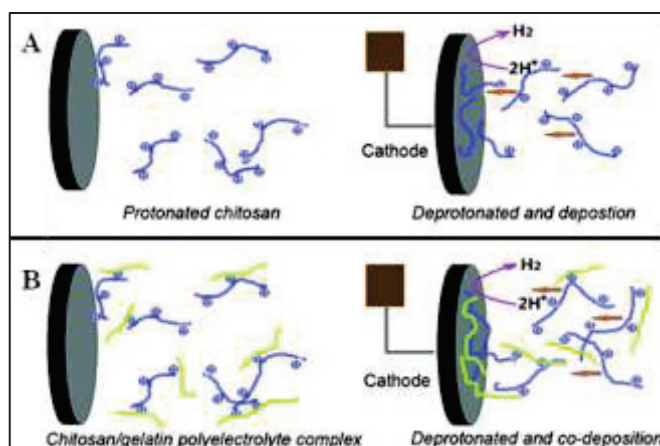
### IV.1 Dépôt de CS sous forme d'une monocouche ou d'une multicouche sans agent de couplage

La voie de dépôt la plus facile à mettre en œuvre est la méthode dite de « solvant casting » qui consiste en l'évaporation de l'excès de solvant à température ambiante à partir d'une solution de chitosane déposée sur le substrat désiré [126].

Une autre solution est la méthode d'auto-assemblage couche par couche, qui est une technique largement employée dans la littérature. Elle est basée sur l'adsorption consécutive de polyanions et de polycations *via* des interactions électrostatiques. Comme le chitosane est un polymère polycationique, il est nécessaire d'utiliser des polyanions afin de former ces assemblages multicouches. Des systèmes multiples peuvent être préparés par empilement d'autres polysaccharides tels que l'acide hyaluronique,

la cellulose, la pectine, la méthylcellulose, l'amidon, l'héparine, les alginates ou encore l'acide polylactique [95, 127]. Afin d'augmenter la stabilité de la multicouche sur une surface solide, il est envisageable de modifier l'un des polymères utilisés pour élaborer la multicouche. Dans l'étude de Zhang *et al.*, les auteurs ont ainsi fonctionnalisé l'acide hyaluronique (AH) par la dopamine *via* la formation d'une liaison peptidique entre les deux composés. Ce dérivé d'AH est ainsi greffé de manière covalente à la surface de titane et sera suivi par le dépôt successif de chitosane et du dérivé d'acide hyaluronique, ainsi de suite jusqu'à obtenir l'épaisseur désirée. Les résultats ont prouvé une augmentation de la croissance des ostéoblastes en présence de ce revêtement [128]. Une autre solution pour améliorer l'adhérence du dépôt à la surface, consiste à activer le substrat avant dépôt des polysaccharides. Ce prétraitement consiste par exemple, en l'utilisation d'un polymère de type polyéthylénime pour amorcer le dépôt [129, 130].

Une autre solution peut être employée, dans le cas d'un revêtement épais, il s'agit du dépôt de multicouches par électrodéposition [131, 132]. Dans l'étude de Jiang *et al.*, cette méthode permet de produire des surfaces de plusieurs microns, macroporeuses avec des tailles de pores allant de 50 à 200  $\mu\text{m}$ , résistantes aux contraintes mécaniques et permettant l'augmentation de la prolifération des ostéoblastes (Figure I- 15) [132].



**Figure I- 15 : Représentation schématique de l'électrodéposition du chitosane seul (A) et du mélange chitosane/gélatine (Jiang, 2010).**

Enfin, une étude effectuée par Jun *et al.* a montré que l'élaboration d'un revêtement hybride de type sol-gel /chitosane sur substrat de titane permet d'induire une précipitation rapide d'apatite dans un milieu physiologique (SBF) et donc une biocompatibilité satisfaisante en présence d'ostéoblastes [133].

## IV.2 Utilisation d'un agent de couplage

### IV.2.1 Greffage *via* des groupements catéchol

Une des méthodes couramment utilisée pour greffer de manière covalente le chitosane et d'autres biomolécules sur un substrat de titane *via* un catéchol est l'utilisation du système dopamine-glutaraldéhyde (GA) [134-136]. L'ajout de la dopamine, molécule appartenant à la famille des catécholamines, sur un substrat apporte des groupements  $-NH_2$ . Ces fonctions amine peuvent ensuite réagir avec les groupements aldéhyde du GA pour former une liaison imine. En position terminale, un second groupement aldéhyde pourra réagir avec les groupements amine du chitosane et fixer ainsi le biopolymère à la surface *via* une liaison imine (Figure I- 16). Il est à noter que la dopamine peut être employée en tant qu'agent de couplage sans nécessairement l'ajout du glutaraldéhyde, comme par exemple dans le cas d'un dépôt d'acide hyaluronique fonctionnalisé avec la dopamine [128]. Un dérivé carboxyle du chitosane peut également être greffé *via* une liaison covalente sur substrat de titane avec l'emploi de la dopamine uniquement [137].

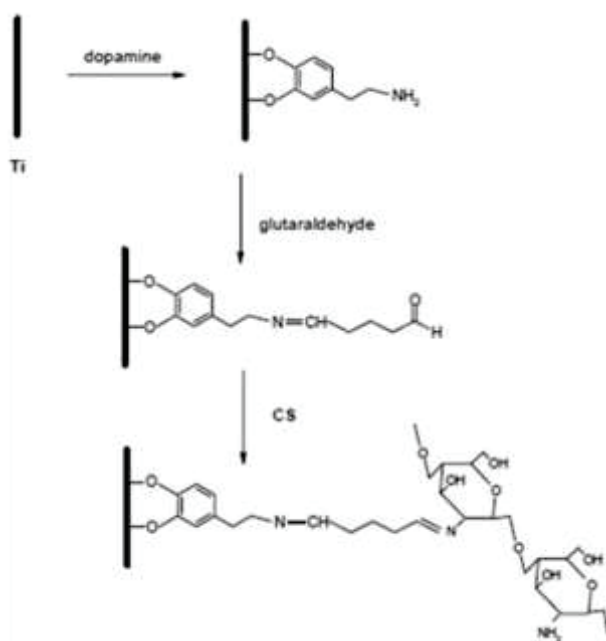


Figure I- 16 : Schéma illustrant l'immobilisation du chitosane *via* le système dopamine-glutaraldéhyde (Shi, 2008).

D'une manière générale, l'utilisation d'un groupement catéchol peut permettre la fixation du chitosane non modifié (Figure I- 17) ; sous certaines conditions, il peut également permettre la fonctionnalisation du biopolymère [138, 139].

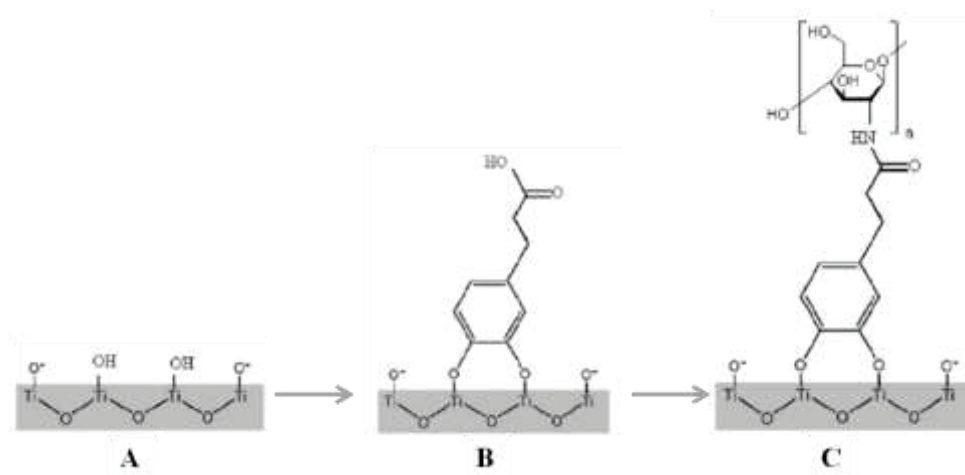


Figure I- 17 : Schéma illustrant le greffage sur titane du chitosane *via* des catéchols (Marie, 2012).

#### IV.2.2 Fixation du chitosane *via* l'emploi d'un silane

Une autre approche pour greffer de manière covalente le chitosane est d'utiliser un silane comme agent de couplage. Les silanes sont d'une manière générale, fortement utilisés dans les études de bio fonctionnalisation de surfaces implantaires [140]. Différents types d'organosilane peuvent être utilisés afin de greffer le chitosane sur différents substrats (Figure I- 18) tel que le titane ou ses alliages.

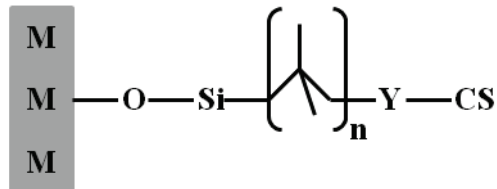


Figure I- 18 : Représentation schématique du greffage covalent du chitosane sur substrat de titane *via* un silane.

Parmi les différents silanes existants, l'utilisation d'un organosilane fonctionnalisé par un groupement aldéhyde : le TriEthoxySilylButyrAldehyde (TESBA) permet de fixer le chitosane *via* une liaison imine. La biocompatibilité et la conservation des propriétés antibactériennes de ce revêtement ont déjà été prouvées dans de précédentes études [141, 142].

Un silane avec une fonction anhydride peut également être employé afin de fixer le chitosane *via* une liaison peptidique. Il s'agit du TriEthoxySilylPropylSuccinic Anhydride (TESPSA). Une récente étude au laboratoire a permis de montrer la résistance de ce revêtement dans un milieu acide ainsi que sa biocompatibilité en présence de cellules humaines gingivales [143].

Un autre amino-silane, le 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) peut aussi être utilisé afin de greffer le chitosane. Ce silane est bien connu et souvent employé comme agent de couplage dans les applications médicales [6]. Il peut être associé au glutaraldehyde et lie le chitosane *via* une liaison imine [105, 144]. Le silane peut également être associé à un anhydride tel que l'anhydride succinique

pour greffer le chitosane sur une surface (ici par exemple du textile) *via* une liaison peptidique [145]. Dans certaines études, le greffage du chitosane peut être catalysé par l'emploi de composés de type carbodiimide. Ces composés sont notamment utilisés lors du greffage du chitosane par formation d'une liaison peptide. Ces catalyseurs sont essentiellement utilisés en biochimie lors de la mise au point de polypeptide [146, 147]. L'APTES peut ainsi être associé à un système EDC/NHS afin de former la liaison peptidique [148].

**Un récapitulatif de l'ensemble des silanes les plus couramment employés pour greffer de façon covalente le chitosane au substrat est proposé dans le Tableau I- 1.**

**Tableau I- 1 : Récapitulatif des différents silanes utilisés afin de greffer le chitosane à un substrat.**

Organosilane	Groupe fonctionnel	Type de liaison	Tests
TESBA	aldéhyde	<i>imine</i>	<p>→ Biocompatibilité en présence de cellules embryonnaire de souris NiH3T3,</p> <p>→ Antibactérien en présence de <i>P. gingivalis</i>, <i>A. naeslundii</i>,</p> <p>→ Résistance mécanique [142].</p>
TESPSA	anhydride	<i>peptidique</i>	<p>→ Biocompatibilité en présence de NiH3T3,</p> <p>→ Résistance en milieu salivaire acidifié [143].</p>
APTES	amine	<i>imine</i> (association avec le glutaraldéhyde)	<p>→ Propriété antimicrobienne conservé,</p> <p>→ Couplage possible avec un antibiotique [144].</p>
		<i>peptidique</i>	<p>→ Catalyse de la réaction via le système EDC/NHS [148],</p> <p>→ Utilisation de l'anhydride succinique [145].</p>

Il est à noter que d'autres silanes peuvent être utilisés pour greffer de manière covalente un polysaccharide sur une surface de titane, tel qu'un silane chloré pour greffer un polysaccharide sulfaté couplé à une catalyse de type NHS/EDC [70], ou le 3-chloropropyl-(triethoxy)silane (CPTES) qui est employé pour fixer d'autres composés tels que le collagène ou le poly(éthylène imine) [149].

On peut également noter que d'autres agents de couplage, autre que les organosilanes, peuvent être également utilisés pour greffer le chitosane. Les phosphonates par exemple, pour l'instant utilisés

seulement dans la synthèse de dérivés de chitosane, pourraient être employés comme agents de couplage permettant de fixer le chitosane à un substrat [150].

## **V. Stérilisation des matériaux**

### **V.1 Généralités**

Dans le cas d'un dispositif médical, une stérilisation se définit généralement par une probabilité théorique de présence d'un micro-organisme viable sur ce même dispositif inférieure ou égale à 1 pour  $10^6$  « colony forming unit » (CFU/mL). Plusieurs normes de référence ont été établies afin de mettre en place un système de contrôle strict de la stérilisation de ces dispositifs. Il existe un nombre très important de techniques de stérilisation. Dans cette dernière partie du chapitre I, seules les méthodes classiquement utilisées et validées pour la stérilisation de dispositifs implantables ou utilisées au laboratoire seront présentées.

### **V.2 Stérilisation par UV**

Cette méthode de stérilisation est largement employée dans tous les laboratoires de recherche car elle représente un intérêt considérable en termes de gain économique, de bénéfice en temps et de facilité de mise en œuvre. Son principal inconvénient, de taille, est que cette méthode n'est pas antifongique, c'est à dire qu'elle ne permet pas de tuer tous les germes. Elle consiste à placer l'échantillon à stériliser sous une lampe UV à 254 nm à une distance de 8 cm pendant 20 minutes (de chaque côté), les UV détruisant les bactéries présentes en surface.

Dans la suite de notre projet, certains des échantillons étudiés seront stérilisés en UV afin de réaliser un pré-test lors de tests de biocompatibilité. Cependant, cette méthode ne pourra pas être retenue dans le cadre de la mise sur le marché d'un dispositif médical.

### **V.3 Stérilisation par autoclave**

Ce mode de stérilisation est actuellement le plus utilisé en milieu hospitalier pour la stérilisation des instruments chirurgicaux, textiles (ISO 17665-1), pansements, verrerie, caoutchouc et certains plastiques. C'est un procédé de référence pour la stérilisation en raison notamment de sa facilité de la mise en œuvre, de son faible coût et de sa non toxicité envers l'environnement. Le principe repose sur l'utilisation de la vapeur d'eau saturée sous pression comme stérilisant. En effet, sous l'effet de la chaleur et de l'humidité, il y a une destruction des contaminants par coagulation et dénaturation protéique par hydrolyse. L'efficacité de cette stérilisation dépend donc des paramètres de stérilisation comme la durée du cycle, le couple température /pression et le pourcentage d'humidité.

Le contrôle de l'efficacité de la stérilisation peut se réaliser selon deux méthodes :

- par un test de Bowie-Dick, qui permet de vérifier l'absence d'air ou de fuite dans le stérilisateur,
- en utilisant des indicateurs de passage, qui permettent de suivre l'efficacité de la stérilisation par l'observation d'indicateurs colorés pour une stérilisation optimale.

Ce type de stérilisation ne convient pas aux matériaux thermosensibles ou hydrosensibles. Elle n'est donc applicable qu'aux matériaux polymères résistants aux hautes températures.

## V.4 Stérilisation par ionisation

La stérilisation par ionisation convient aux matériaux thermosensibles. Ces méthodes de stérilisation sont largement employées à l'échelle industrielle. Les paramètres clés sont l'activité de la source et le temps d'exposition. Elle peut se diviser en deux catégories, la stérilisation bêta et la stérilisation gamma.

### V.4.1 Stérilisation par irradiation bêta ( $\beta$ )

Cette méthode de stérilisation est employée en laboratoire pour stériliser certains matériaux, néanmoins en raison de la forte dégradation des matériaux, elle n'est quasiment pas utilisée pour la stérilisation de dispositifs médicaux.

### V.4.2 Stérilisation par rayons gamma ( $\gamma$ )

La stérilisation gamma (ISO 11137-1) est couramment utilisée dans le milieu médical mais également alimentaire. Lors de cette stérilisation un rayonnement émis par le Cobalt 60 de synthèse entraîne la destruction à la fois de l'ADN et de l'ARN des agents pathogènes, empêchant ainsi à la fois leur réplication et l'expression des gènes. La radiostérilisation du matériel médico-chirurgical par rayonnement gamma est réalisé avec une dose de l'ordre de 25 kGy et peut s'effectuer sur le matériel déjà placé dans son emballage définitif (sachet de type PA/PE) [151].

A coté de ces avantages, cette méthode présente tout de même quelques inconvénients liés au fait que certains composés peuvent être endommagés par le rayonnement gamma et que les structures chimiques peuvent ainsi être modifiées. Il est alors possible d'envisager une diminution de la puissance du rayonnement (entre 10 et 25 kGy), mais dans ces conditions, l'assurance de la destruction totale des germes pathogènes n'est pas clairement définie.



## V.5 Stérilisation par traitement chimique

### V.5.1 Stérilisation par exposition à l'oxyde d'éthylène

La stérilisation des dispositifs médicaux à l'oxyde d'éthylène est possible en suivant les recommandations de la norme ISO 11135-2. L'oxyde d'éthylène est un éther cyclique, gazeux à pression atmosphérique et à température ambiante. L'action stérilisante de ce composé est due à son pouvoir « alkylant » vis-à-vis des groupements amines des acides nucléiques des microorganismes par l'ouverture de son cycle, ce qui lui permet aussi de participer aux réactions d'hydroxy-éthylation qui favorise son action (alkylation des protéines). L'échantillon à stériliser est placé dans une atmosphère humide saturé en oxyde d'éthylène (400-1000 mg/L) pendant 4 à 10 h à une température de 50-60°C [152]. La fixation irréversible de l'oxyde d'éthylène sur les protéines, les enzymes et les acides nucléiques entraîne une destruction cellulaire. L'inconvénient de ce procédé est qu'il est toujours délicat d'avoir l'assurance d'une élimination totale du composé après la stérilisation, l'oxyde d'éthylène étant un gaz toxique pour l'homme (cancérigène et mutagène). Par ailleurs, les dérivés de l'oxyde d'éthylène potentiellement présents en surface tels que le chlorure d'éthylène et l'éthylène glycol sont également des résidus toxiques. Une désorption de l'oxyde d'éthylène et de ses résidus des surfaces stérilisées est nécessaire avant la mise sur le marché des dispositifs médicaux [153]. Les limites admissibles des résidus d'oxyde d'éthylène pour des dispositifs médicaux ont été fixées dans la norme Internationale ISO 10993-7 partie : évaluation biologique de dispositifs médicaux-résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène [154].

### V.5.2 Stérilisation par plasma

#### V.5.2.1 *Principe*

Les plasmas froids sont induits en soumettant un gaz (ou un mélange gazeux) à un champ électrique en opérant, soit à pression atmosphérique, soit à des pressions réduites de l'ordre de  $10^{-1}$  millibars. Ils ont la particularité de générer un rayonnement UV et des espèces d'oxygènes réactives (ROS et RNS pour Reactive Oxygen Species et Reactive Nitrogen Species) qui vont détruire les agents pathogènes. Le champ électromagnétique utilisé ici active un gaz ou mélange de gaz. A l'échelle industrielle, l'utilisation de la technique du plasma froid est uniquement employé pour enlever les déchets toxiques suite à la fixation de  $H_2O_2$  ; il n'y a pas d'action biocide pendant la phase plasma (Sterrad, Plazlyte avec de l'acide péracétique au lieu de l'eau oxygéné).

#### V.5.2.2 *Cas de la stérilisation $CO_2$ supercritique*

La stérilisation  $CO_2$  supercritique est une technique particulière de la stérilisation par plasma, permettant de stériliser les liquides et les matériaux solides. Les conditions opératoires à température et pression modérées permettent d'éliminer un grand nombre de bactéries *via* une acidification de l'environnement de la bactérie [155]. Le principe de cette méthode consiste à porter le  $CO_2$  à une

température et une pression supérieure à 31 °C et 74 bars afin de l'amener dans le domaine critique. On peut moduler ces effets en réglant certains paramètres tels que la température, le temps et l'alternance de pressurisation et de dépressurisation [156]. A l'heure actuelle, cette technique n'est pas disponible commercialement en raison notamment de l'addition nécessaire d'acide péracétique ou de peroxyde d'hydrogène. Cependant, celle-ci a été utilisée dans le cadre de ce travail car l'un des objectifs du projet RIBIO était de mettre au point une méthode de stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique efficace et non destructive des biomatériaux préparés.

## V.6 Cas particulier de la stérilisation des dispositifs médicaux à base de polymère dont le CS

D'une façon générale, la stérilisation de matériaux biocompatibles peut entraîner, dans certains cas, un changement de ses propriétés de surface et ainsi modifier ses propriétés mécaniques ou chimiques. Ceci est d'autant plus vrai que le biomatériau stérilisé incorpore un polysaccharide [157]. En effet, selon l'étude de Sionkowska *et al.* l'irradiation par UV entraîne des modifications des propriétés mécaniques d'un matériau constitué en partie de chitosane [158].

Par ailleurs, Politzer *et al.* montrent que l'oxyde d'éthylène peut entraîner la dépolymérisation des chaînes de chitosane par réaction du gaz avec les groupements amine de ce dernier [159]. Cependant, même si le chitosane est modifié suite à la stérilisation, d'autres études montrent que la stérilisation par exposition à l'oxyde d'éthylène (ETO) peut être employée pour stériliser les échantillons de titane revêtus avec du chitosane sans impact sur leur biocompatibilité [79, 160]. Une étude a par ailleurs prouvé que la stérilisation ETO ne modifie pas les propriétés mécaniques, la morphologie et la cytotoxicité de films de chitosane, contrairement à la stérilisation gamma [161]. Toujours dans cette étude, la méthode antiseptique (lavage alcool 70%) n'entraîne pas de modification des caractéristiques et propriétés des films de chitosane, bien que celle-ci ne soit pas applicable dans le cadre d'une industrialisation.

Dans l'étude récente menée par Zankovych *et al.*, la stérilisation par chaleur humide de multicouche de chitosane-acide hyaluronique sur alliage de titane ne modifie en rien leurs propriétés *in vivo* [162].

De la même manière, la stérilisation gamma représente selon l'étude de Li *et al.* une solution efficace pour ne pas dégrader les propriétés du film à base de chitosane, lorsque ce dernier est couplé avec un autre polysaccharide tel que le konjac glucomannane [163]. Néanmoins, les rayons gamma peuvent avoir un impact sur la rupture des chaînes du polymère et sur sa vitesse de dégradation. De plus, en fonction des caractéristiques du chitosane (masse molaire) et de sa mise en forme (solide ou en solution), la vitesse de dégradation observée est différente [164]. D'après Taskin *et al.* le degré de désacétylation du chitosane module également l'effet de la stérilisation gamma sur le polymère à l'état

solide [165]. En effet, plus le degré de désacétylation diminue, plus l'effet de l'irradiation sur le chitosane solide est marqué.

La mise en forme du biopolymère s'avère donc essentielle dans la résistance du biomatériau à la stérilisation. Comme le montre l'étude de Juan *et al.*, les hydrogels à base de chitosane ainsi que les « flocons » de chitosane dispersés dans de l'eau distillée ne sont pas modifiés par la stérilisation autoclave alors que celle-ci entraîne une importante dégradation du polymère (dépolymérisation) lorsqu'il est en solution [166].

*En conclusion, l'utilisation d'un revêtement implantaire à base de chitosane paraît être une solution prometteuse mais il reste à vérifier si un tel dispositif remplit le cahier des charges attendu pour un implant dentaire et si les verrous peuvent être levés (tels que ceux de la stérilisation et de la résistance en milieu acide).*

## Références

1. Muster D, Vouillot JL, Dubruille JH: **Biomatériaux, biomatériels et bio-ingénierie en chirurgie orale et maxillofaciale (II)**. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Stomatologie/Odontologie* 1999, **22-014-F-15**:23.
2. Giovannoli J-L, Renvert S: **Péri-implantites**; 2012.
3. Martinez H, Renault P, Renault-Georges G, Pierrisnard L, Rouach T: **Les implants : chirurgie et prothèse choix thérapeutique stratégique** Editions CDP edn; 2008.
4. Claude L, Pons-Mourreau J-M, Russon J-F: **La muqueuse péri-implantaire**. In: *Interview*. 2010.
5. Puleo DA, Nanci A: **Understanding and controlling the bone-implant interface**. *Biomaterials* 1999, **20**(23-24):2311-2321.
6. Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J: **Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces**. *Progress in Materials Science* 2013, **58**(3):261-326.
7. Mishnaevsky Jr L, Levashov E, Valiev RZ, Segurado J, Sabirov I, Enikeev N, Prokoshkin S, Solov'yov AV, Korotitskiy A, Gutmanas E *et al*: **Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development**. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2014, **81**(0):1-19.
8. Bachle M, Kohal RJ: **A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells**. *Clin Oral Implants Res* 2004, **15**(6):683-692.
9. Jorge JR, Barao VA, Delben JA, Faverani LP, Queiroz TP, Assuncao WG: **Titanium in dentistry: historical development, state of the art and future perspectives**. *J Indian Prosthodont Soc* 2013, **13**(2):71-77.
10. Marlot A: **Synthèse par pulvérisation cathodique magnetron et caracterisation de revêtements d'oxydes biocompatibles pour application aux implants dentaires en alliage de titane**. *Manuscrit de thèse*. Université de Lorraine; 2012.
11. Schwarz F, Mihatovic I, Golubovic V, Eick S, Iglhaut T, Becker J: **Experimental peri-implant mucositis at different implant surfaces**. *Journal of Clinical Periodontology* 2014, **41**(5):513-520.
12. Anchieta RB, Baldassarri M, Guastaldi F, Tovar N, Janal MN, Gottlow J, Dard M, Jimbo R, Coelho PG: **Mechanical Property Assessment of Bone Healing around a Titanium-Zirconium Alloy Dental Implant**. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013, **25**(10):12061.
13. Maya AEA, Grana DR, Hazarabedian A, Kokubu GA, Luppo MI, Vigna G: **Zr-Ti-Nb porous alloys for biomedical application**. *Materials Science and Engineering: C* 2012, **32**(2):321-329.
14. Calderon-Moreno JM, Vasilescu C, Drob SI, Ivanescu S, Osiceanu P, Drob P, Popa M, Preda S, Vasilescu E: **Microstructural and mechanical properties, surface and electrochemical characterisation of a new Ti-Zr-Nb alloy for implant applications**. *Journal of Alloys and Compounds* 2014, **612**(0):398-410.
15. Grosogeat B, Brugirard J: **Les essais de corrosion des biomatériaux : leurs usages, leurs limites, leurs fondements**. *Matériaux et techniques* 2001, **89**(5-6):15-28.
16. Jones FH: **Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials**. *Surface Science Reports* 2001, **42**(3-5):75-205.
17. Tinschert J, Natt G, Mohrbotter N, Spiekermann H, Schulze KA: **Lifetime of alumina- and zirconia ceramics used for crown and bridge restorations**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2007, **80B**(2):317-321.
18. Saadaldin SA, Dixon SJ, Costa DO, Rizkalla AS: **Synthesis of bioactive and machinable miserite glass-ceramics for dental implant applications**. *Dental Materials* 2013, **29**(6):645-655.
19. Bencherif SA, Braschler TM, Renaud P: **Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry**. *J Periodontal Implant Sci* 2013, **43**(6):251-261.

20. Lai WF, Oka K, Jung HS: **Advanced Functional Polymers for Regenerative and Therapeutic Dentistry.** *Oral Dis* 2014, **7**(10):12281.
21. Tenenbaum H: **Péri-implantites.** *EMC - Médecine buccale* 2012, **7**(6):1-7.
22. Slots J, Slots H: **Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk.** *Periodontol* 2000, **55**(1):48-69.
23. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A: **Reasons for failures of oral implants.** *Journal of Oral Rehabilitation* 2014, **41**(6):443-476.
24. Peters LB: **Desinfectie van het wortelkanaalstelsel bij de endodontische behandeling.** *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2005, **112**:467-470.
25. Sanchez MC, Llama-Palacios A, Fernandez E, Figuero E, Marin MJ, Leon R, Blanc V, Herrera D, Sanz M: **An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces.** *Dent Mater* 2014, **7**(14):00192-00194.
26. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bachle M, Follo M, Wolkewitz M, Hannig C, Hellwig E, Carvalho C, Kohal R: **Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010, **95**(1):101-109.
27. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD: **Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro.** *Clinical Oral Implants Research* 2012, **23**(3):301-307.
28. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B: **Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation.** *Microbiology* 2009, **155**(Pt 7):2116-2126.
29. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG: **Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm.** *Journal of Applied Microbiology* 2004, **97**(6):1311-1318.
30. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL: **Microbial complexes in subgingival plaque.** *Journal of Clinical Periodontology* 1998, **25**(2):134-144.
31. Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ: **A review of dental implants and infection.** *J Hosp Infect* 2009, **72**(2):104-110.
32. Holt SC, Ebersole JL: **Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis.** *Periodontol* 2000, **38**:72-122.
33. Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR: **Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants.** *Clin Oral Implants Res* 2007, **18**(4):501-508.
34. van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T: **Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients.** *Clin Oral Implants Res* 2000, **11**(6):511-520.
35. Mombelli A: **Microbiology of the dental implant.** *Adv Dent Res* 1993, **7**(2):202-206.
36. Lindhe J, Meyle J: **Peri-implant diseases:Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology.** *J Clin Periodontol* 2008, **35**(8):282-285.
37. Klinge B, Hultin M, T B: **Peri-implantitis.** *Dent Clin North Am* 2005, **49**(3):661-676.
38. Lang NP, Berglundh T: **Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology.** *J Clin Periodontol* 2011, **11**:178-181.
39. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T: **The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects.** *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2012, **14**(2):170-183.
40. Tonetti MS: **La péri-implantite: considérations biologiques.** *Journal de parodontologie et d'implantologie orale* 1995, **15**(3):269-284.
41. Mombelli A, Müller N, Cionca N: **The epidemiology of peri-implantitis.** *Clinical Oral Implants Research* 2012, **23**:67-76.
42. Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO: **Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects.** *J Clin Periodontol* 2006, **33**(12):929-935.



43. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I: **Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis.** *J Clin Periodontol* 2007, **34**(6):523-544.
44. Heitz-Mayfield LJ: **Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators.** *J Clin Periodontol* 2008, **35**(8 Suppl):292-304.
45. Dubey RK, Gupta DK, Singh AK: **Dental implant survival in diabetic patients; review and recommendations.** *Natl J Maxillofac Surg* 2013, **4**(2):142-150.
46. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM: **The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses.** *J Clin Periodontol* 2011, **38**(3):285-292.
47. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A: **Diabetes and Oral Implant Failure: A Systematic Review:** *J Dent Res.* 2014 Sep;93(9):859-867. Epub 2014 Jun 13.; 2014.
48. Mombelli A, Cionca N: **Systemic diseases affecting osseointegration therapy.** *Clinical Oral Implants Research* 2006, **17**(S2):97-103.
49. Klinge B, Meyle J: **Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012.** *Clin Oral Implants Res* 2012, **6**:108-110.
50. Fransson C, Wennström J, Berglundh T: **Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss.** *Clinical Oral Implants Research* 2008, **19**(2):142-147.
51. Sixou M, Monsarrat P: **Péri-implantites : étiologie et thérapeutiques.** *Journal de parodontologie et d'implantologie orale* 2013, **33**(1):53-57.
52. Algraft H, Borumandi F, Cascarini L: **Peri-implantitis.** *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012, **50**(8):689-694.
53. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T: **Treatment of peri-implantitis by the Vector system.** *Clin Oral Implants Res* 2005, **16**(3):288-293.
54. AEGIS P: **THERAPEUTIC MOUTHRINSES : Reaching Beyond Mechanical Plaque Control for Reduction in Dental Plaque and Gingivitis.** *Inside Dentistry* 2011, **7**.
55. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV: **Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review.** *Eur J Oral Implantol* 2012, **5**(41):S21-41.
56. Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH: **Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases.** *J Periodontol* 2009, **80**(2):234-243.
57. Schou S, Berglundh T, Lang NP: **Surgical treatment of peri-implantitis.** *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004, **19**:140-149.
58. Sixou JL, de Medeiros-Batista O, Bonnaure-Mallet M: **Modifications of the microflora of the oral cavity arising during immunosuppressive chemotherapy.** *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 1996, **32**(5):306-310.
59. Marchand F, Raskin A, Dionnes-Hornes A, Barry T, Dubois N, Valero R, Vialettes B: **Dental implants and diabetes: conditions for success.** *Diabetes Metab* 2012, **38**(1):14-19.
60. Michaeli E, Weinberg I, Nahlieli O: **Dental implants in the diabetic patient: systemic and rehabilitative considerations.** *Quintessence Int* 2009, **40**(8):639-645.
61. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M: **Dental materials with antibiofilm properties.** *Dental Materials* 2014, **30**(2):e1-e16.
62. Norowski PA, Bumgardner JD: **Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: A review.** *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009, **88B**(2):530-543.
63. Casimiro J: **Modifications de surfaces de matériaux polymères pour des visées antibactériennes.** Université Paris-Sud; 2011.
64. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z: **Antibacterial coatings on titanium implants.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009, **91**(1):470-480.
65. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M: **In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces.** *Clinical Oral Implants Research* 2010, **21**(2):156-164.

66. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M: **Effect of Surface Roughness and Materials Composition**. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2012, **3**:541-546.
67. Ploux L, Beckendorff S, Nardin M, Neunlist S: **Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers**. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, **57**(2):174-181.
68. Hou S, Burton EA, Simon KA, Blodgett D, Luk YY, Ren D: **Inhibition of Escherichia coli biofilm formation by self-assembled monolayers of functional alkanethiols on gold**. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(13):4300-4307.
69. Shimotoyodome A, Koudate T, Kobayashi H, Nakamura J, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, Takaesu Y: **Reduction of Streptococcus mutans Adherence and Dental Biofilm Formation by Surface Treatment with Phosphorylated Polyethylene Glycol**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, **51**(10):3634-3641.
70. Gadenne V, Lebrun L, Jouenne T, Thebault P: **Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface**. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013, **112**:229-236.
71. Lafarge J: **Greffage de copolymères antibactériens sur des surfaces PVC par chimie click**. *Manuscrit de thèse INSA de Rouen*; 2012.
72. Guerrero G, Amalric J, Mutin PH, Sotto A, Lavigne JP: **Inhibition de l'adhésion bactérienne et prévention de la formation d'un biofilm : utilisation de monocouches autoassemblées organiques sur des surfaces inorganiques**. *Pathologie Biologie* 2009, **57**(1):36-43.
73. Kruszewski KM, Nistico L, Longwell MJ, Hynes MJ, Maurer JA, Hall-Stoodley L, Gawalt ES: **Reducing Staphylococcus aureus biofilm formation on stainless steel 316L using functionalized self-assembled monolayers**. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013, **33**(4):2059-2069.
74. Amalric J: **Revêtements antibactériens sur titane et acier inoxydable à base de monocouches de phosphonates fonctionnelles**. Université Montpellier II; 2008.
75. Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ: **In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber**. *Biomaterials* 2002, **23**(6):1417-1423.
76. He T, Shi ZL, Fang N, Neoh KG, Kang ET, Chan V: **The effect of adhesive ligands on bacterial and fibroblast adhesions to surfaces**. *Biomaterials* 2009, **30**(3):317-326.
77. Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM: **Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin**. *Biomaterials* 1997, **18**(11):777-782.
78. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M: **Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats**. *Bone* 2003, **32**(5):521-531.
79. Norowski PA, Courtney HS, Babu J, Haggard WO, Bumgardner JD: **Chitosan coatings deliver antimicrobials from titanium implants: a preliminary study**. *Implant Dent* 2011, **20**(1):56-67.
80. Cortizo MC, Oberti TG, Cortizo MS, Cortizo AM, Fernández Lorenzo de Mele MA: **Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: Evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion**. *Journal of Dentistry* 2012, **40**(4):329-337.
81. Goudouri O-M, Kontonasaki E, Lohbauer U, Boccaccini AR: **Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy**. *Acta Biomaterialia* 2014, **10**(8):3795-3810.
82. Lellouche J, Kahana E, Elias S, Gedanken A, Banin E: **Antibiofilm activity of nanosized magnesium fluoride**. *Biomaterials* 2009, **30**(30):5969-5978.
83. Zanna S, Saulou C, Mercier-Bonin M, Despax B, Raynaud P, Seyeux A, Marcus P: **Ageing of plasma-mediated coatings with embedded silver nanoparticles on stainless steel: An XPS and ToF-SIMS investigation**. *Applied Surface Science* 2010, **256**(22):6499-6505.
84. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW: **Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials**. *Biomaterials* 2012, **33**(26):5967-5982.

85. Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, Ong JL: **In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating.** *Biomaterials* 2006, **27**(32):5512-5517.
86. Chatzistavrou X, Fenno JC, Faulk D, Badylak S, Kasuga T, Boccaccini AR, Papagerakis P: **Fabrication and characterization of bioactive and antibacterial composites for dental applications.** *Acta Biomaterialia* 2014, **10**(8):3723-3732.
87. Tan H, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S, Tang T: **The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus.** *Biomaterials* 2012, **33**(2):365-377.
88. Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J: **Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan.** *Biomaterials* 2005, **26**(33):6684-6692.
89. Allaker RP: **Chapter 10 - Nanoparticles and the Control of Oral Biofilms.** In: *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*. Edited by Hartsfield KSAK: William Andrew Publishing; 2013: 203-227.
90. Allaker RP, Memarzadeh K: **Nanoparticles and the control of oral infections.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014, **43**(2):95-104.
91. Holmberg KV, Abdolhosseini M, Li Y, Chen X, Gorr S-U, Aparicio C: **Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications.** *Acta Biomaterialia* 2013, **9**(9):8224-8231.
92. Kazemzadeh-Narbat M, Lai BFL, Ding C, Kizhakkedathu JN, Hancock REW, Wang R: **Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections.** *Biomaterials* 2013, **34**(24):5969-5977.
93. Gao G, Lange D, Hilpert K, Kindrachuk J, Zou Y, Cheng JTJ, Kazemzadeh-Narbat M, Yu K, Wang R, Straus SK *et al*: **The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides.** *Biomaterials* 2011, **32**(16):3899-3909.
94. Vázquez J, Rodríguez-Amado I, Montemayor M, Fraguas J, González M, Murado M: **Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review.** *Marine Drugs* 2013, **11**(3):747-774.
95. Crini G, Badot PM, Guibal É: **Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application:** Presses universitaires de Franche-Comté; 2009.
96. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: **Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications.** *Progress in Polymer Science* 2011, **36**(8):981-1014.
97. Khor E, Lim LY: **Implantable applications of chitin and chitosan.** *Biomaterials* 2003, **24**(13):2339-2349.
98. Lamarque G, Cretenet M, Viton C, Domard A: **New Route of Deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chitins by Means of Freeze-Pump Out-Thaw Cycles.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(3):1380-1388.
99. Lamarque G, Viton C, Domard A: **Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process.** *Biomacromolecules* 2004, **5**(3):992-1001.
100. Domard A: **Physicochemical properties of chitinous materials.** In: *Advances in Chitin Sciences*. Edited by JacquesAndré L; 1998: 24.
101. Medina Becerra JA: **Films mixtes Chitosane/Protéines : Interactions, morphologie et propriétés macroscopiques.** université Claude Bernard Lyon 1; 2012.
102. Rivas Araiza RN: **Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macrofibres creuses et multi-membranaires : Mise en oeuvre et étude microstructurale.** Université Claude Bernard Lyon 1; 2013.
103. Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P: **Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation.** *Polymers* 2011, **3**(4):1875-1901.



104. Abdelaal MY, Sobahi TR, Al-Shareef HF: **Modification of chitosan derivatives of environmental and biological interest: A green chemistry approach.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2013, **55**(0):231-239.
105. Xu X, Wang L, Guo S, Lei L, Tang T: **Surface chemical study on the covalent attachment of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan to titanium surfaces.** *Applied Surface Science* 2011, **257**(24):10520-10528.
106. Ravi Kumar MNV: **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive and Functional Polymers* 2000, **46**(1):1-27.
107. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP: **The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications.** *Journal of Controlled Release* 2014, **186**(0):54-87.
108. Jiang T, James R, Kumbar SG, Laurencin CT: **Chapter 5 - Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery.** In: *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Edited by Deng SGKTL. Oxford: Elsevier; 2014: 91-113.
109. Raafat D, Sahl HG: **Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey.** *Microb Biotechnol* 2009, **2**(2):186-201.
110. Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Filée P, Garbacki N, Vanhootehem O, Deroanne C, Noël As, Jérôme C, Nusgens B *et al*: **Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration.** *Biomacromolecules* 2011, **12**(9):3194-3204.
111. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ: **Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review.** *Int J Food Microbiol* 2010, **144**(1):51-63.
112. No HK, Young Park N, Ho Lee S, Meyers SP: **Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights.** *International Journal of Food Microbiology* 2002, **74**(1–2):65-72.
113. Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJ, van der Mei HC: **Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth in vitro.** *Eur J Oral Sci* 2008, **116**(5):493-495.
114. Ikinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, Hincal AA: **Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.** *Int J Pharm* 2002, **235**(1-2):121-127.
115. Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE: **Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan.** *Antimicrob Agents Chemother* 1990, **34**(10):2019-2023.
116. Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S: **Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria.** *International Journal of Food Microbiology* 2001, **71**(2–3):235-244.
117. Je JY, Kim SK: **Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane.** *J Agric Food Chem* 2006, **54**(18):6629-6633.
118. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W: **Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action.** *Biomacromolecules* 2003, **4**(6):1457-1465.
119. Raafat D, von Bargaen K, Haas A, Sahl HG: **Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(12):3764-3773.
120. Neoh KG, Kang ET: **Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2011, **3**(8):2808-2819.
121. Jia Z, shen D, Xu W: **Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan.** *Carbohydrate Research* 2001, **333**(1):1-6.
122. Neoh KG, Hu X, Zheng D, Kang ET: **Balancing osteoblast functions and bacterial adhesion on functionalized titanium surfaces.** *Biomaterials* 2012, **33**(10):2813-2822.
123. Dupasquier F: **Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré.** Université de Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1; 2011.
124. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H: **Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.** *Biotechnology Advances* 2011, **29**(3):322-337.

125. Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, Tsurkan M, Jayakumar R: **Chitin and chitosan in selected biomedical applications**. *Progress in Polymer Science* 2014, **39**(9):1644-1667.
126. Lopez-Lacomba JL, Garcia-Cantalejo JM, Sanz Casado JV, Abarrategi A, Correias Magana V, Ramos V: **Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration**. *Biomacromolecules* 2006, **7**(3):792-798.
127. Tang X, Thankappan SK, Lee P, Fard SE, Harmon MD, Tran K, Yu X: **Chapter 21 - Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. In: *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Edited by Deng SGKTL. Oxford: Elsevier; 2014: 351-371.
128. Zhang X, Li Z, Yuan X, Cui Z, Yang X: **Fabrication of dopamine-modified hyaluronic acid/chitosan multilayers on titanium alloy by layer-by-layer self-assembly for promoting osteoblast growth**. *Applied Surface Science* 2013, **284**(0):732-737.
129. Chua P-H, Neoh K-G, Kang E-T, Wang W: **Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion**. *Biomaterials* 2008, **29**(10):1412-1421.
130. Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD: **Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects**. *Biomaterials* 2005, **26**(30):5960-5971.
131. Wang Z, Zhang X, Gu J, Yang H, Nie J, Ma G: **Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates**. *Carbohydrate Polymers* 2014, **103**(0):38-45.
132. Jiang T, Zhang Z, Zhou Y, Liu Y, Wang Z, Tong H, Shen X, Wang Y: **Surface Functionalization of Titanium with Chitosan/Gelatin via Electrophoretic Deposition: Characterization and Cell Behavior**. *Biomacromolecules* 2010, **11**(5):1254-1260.
133. Jun S-H, Lee E-J, Yook S-W, Kim H-E, Kim H-W, Koh Y-H: **A bioactive coating of a silica xerogel/chitosan hybrid on titanium by a room temperature sol-gel process**. *Acta Biomaterialia* 2010, **6**(1):302-307.
134. Ghimire N, Luo J, Tang R, Sun Y, Deng Y: **Novel anti-infective activities of chitosan immobilized titanium surface with enhanced osteogenic properties**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014, **122**(0):126-133.
135. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W: **Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide**. *J Biomed Mater Res A* 2008, **86**(4):865-872.
136. Yuan S, Yin J, Jiang W, Liang B, Pehkonen SO, Choong C: **Enhancing antibacterial activity of surface-grafted chitosan with immobilized lysozyme on bioinspired stainless steel substrates**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, **106**(0):11-21.
137. Hu X, Neoh K-G, Shi Z, Kang E-T, Poh C, Wang W: **An in vitro assessment of titanium functionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial growth factor for enhanced osseointegration and inhibition of bacterial adhesion**. *Biomaterials* 2010, **31**(34):8854-8863.
138. Marie H, Barrere A, Schoenstein F, Chavanne MH, Grosogeat B, Mora L: **PEM anchorage on titanium using catechol grafting**. *PLoS One* 2012, **7**(11):30.
139. Faure E, Falentin-Daudré C, Jérôme C, Lyskawa J, Fournier D, Woisel P, Detrembleur C: **Catechols as versatile platforms in polymer chemistry**. *Progress in Polymer Science* 2013, **38**(1):236-270.
140. Matinlinna JP, Tsoi JK, de Vries J, Busscher HJ: **Characterization of novel silane coatings on titanium implant surfaces**. *Clin Oral Implants Res* 2013, **24**(6):688-697.
141. Martin HJ, Schulz KH, Bumgardner JD, Walters KB: **An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan**. *Applied Surface Science* 2008, **254**(15):4599-4605.
142. Renoud P, Toury B, Benayoun S, Attik G, Grosogeat B: **Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances**. *PLoS One* 2012, **7**(7):31.

143. Campos D, Toury B, D'Almeida M, Attik G, Ferrand A, Renoud P, Grosogeat B: **Acidic pH resistance of grafted chitosan on dental implant.** *Odontology* 2014;1-8.
144. Swanson TE, Cheng X, Friedrich C: **Development of chitosan-vancomycin antimicrobial coatings on titanium implants.** *J Biomed Mater Res A* 2011, **97**(2):167-176.
145. Ranjbar-Mohammadi M, Arami M, Bahrami H, Mazaheri F, Mahmoodi NM: **Grafting of chitosan as a biopolymer onto wool fabric using anhydride bridge and its antibacterial property.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, **76**(2):397-403.
146. Yang WJ, Cai T, Neoh KG, Kang ET, Dickinson GH, Teo SL, Rittschof D: **Biomimetic anchors for antifouling and antibacterial polymer brushes on stainless steel.** *Langmuir* 2011, **27**(11):7065-7076.
147. Yang Z, Chevolot Y, Géhin T, Dugas V, Xanthopoulos N, Laporte V, Delair T, Ataman-Önal Y, Choquet-Kastylevsky G, Souteyrand E *et al*: **Characterization of Three Amino-Functionalized Surfaces and Evaluation of Antibody Immobilization for the Multiplex Detection of Tumor Markers Involved in Colorectal Cancer.** *Langmuir* 2013, **29**(5):1498-1509.
148. Yoon I-K, Hwang J-Y, Jang W-C, Kim H-W, Shin US: **Natural bone-like biomimetic surface modification of titanium.** *Applied Surface Science* 2014, **301**(0):401-409.
149. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E: **Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates.** *J Mater Sci: Mater Med* 2011, **22**(1):85-96.
150. Shen F, Hu Y, Guan P, Ren X: **Facile preparation of titanium phosphate-modified chitosan for selective capture of phosphopeptides.** *J Sep Sci* 2013, **36**(3):540-547.
151. Bhatti IA, Ashraf S, Shahid M, Asi MR, Mehboob S: **Quality index of oils extracted from  $\gamma$ -irradiated peanuts (*Arachis hypogaea* L.) of the golden and bari varieties.** *Applied Radiation and Isotopes* 2010, **68**(12):2197-2201.
152. Kroeze RJ, Helder MN, Roos WH, Wuite GJL, Bank RA, Smit TH: **The effect of ethylene oxide, glow discharge and electron beam on the surface characteristics of poly(L-lactide-co-caprolactone) and the corresponding cellular response of adipose stem cells.** *Acta Biomaterialia* 2010, **6**(6):2060-2065.
153. Mendes GCC, Brandão TRS, Silva CLM: **Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review.** *American Journal of Infection Control* 2007, **35**(9):574-581.
154. ISO10993-7: **Évaluation biologique des dispositifs médicaux -- Partie 7: Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène.** In.; 2007: 97.
155. Dillow AK, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R: **Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, **96**(18):10344-10348.
156. Le meur A-C: **Développement de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage contrôlé de principe actifs.** Université Bordeaux 1; 2011.
157. Munarin F, Bozzini S, Visai L, Tanzi MC, Petrini P: **Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin.** *Food Hydrocolloids* 2013, **31**(1):74-84.
158. Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J, Planecka A, Kozłowska J: **The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin.** *Polymer Degradation and Stability* 2010, **95**(12):2486-2491.
159. Politzer P, Daiker KC, Estes VM, Baughman M: **Epoxide—Nucleophile interactions: Acid-catalyzed reaction of ethylene oxide with water.** *International Journal of Quantum Chemistry* 1978, **14**(S5):291-299.
160. Hamilton V, Yuan Y, Rigney DA, Puckett AD, Ong JL, Yang Y, Elder SH, Bumgardner JD: **Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation.** *J Mater Sci Mater Med* 2006, **17**(12):1373-1381.
161. Marreco PR, da Luz Moreira P, Genari SC, Moraes AM: **Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004, **71**(2):268-277.

162. Zankovych S, Diefenbeck M, Bossert J, Mückley T, Schrader C, Schmidt J, Schubert H, Bischoff S, Faucon M, Finger U *et al*: **The effect of polyelectrolyte multilayer coated titanium alloy surfaces on implant anchorage in rats.** *Acta Biomaterialia* 2013, **9**(1):4926-4934.
163. Li B, Li J, Xia J, Kennedy JF, Yie X, Liu TG: **Effect of gamma irradiation on the condensed state structure and mechanical properties of konjac glucomannan/chitosan blend films.** *Carbohydrate Polymers* 2011, **83**(1):44-51.
164. Tahtat D, Mahlous M, Benamer S, Nacer Khodja A, Larbi Youcef S: **Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of  $\gamma$ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution.** *Radiation Physics and Chemistry* 2012, **81**(6):659-665.
165. Taskin P, Canisag H, Sen M: **The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan.** *Radiation Physics and Chemistry* 2014, **94**:236-239.
166. Juan AS, Montembault A, Gillet D, Say JP, Rouif S, Bouet T, Royaud I, David L: **Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments.** *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2012, **31**(1):012007.



# **Chapitre II**

## **Elaboration des revêtements de chitosane**

# SOMMAIRE

<b>I.</b>	<b>LES SUBSTRATS UTILISES .....</b>	<b>60</b>
<i>I.1</i>	<i>Etudes morphologiques et topographiques des substrats .....</i>	<i>62</i>
<i>I.1.1</i>	<i>Observations des surfaces par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) .....</i>	<i>62</i>
<i>I.1.2</i>	<i>Topographie par mesure de la rugosité .....</i>	<i>65</i>
<i>I.2</i>	<i>Mouillabilité de surface .....</i>	<i>70</i>
<b>II.</b>	<b>LE CHITOSANE COMME BIOPOLYMERE.....</b>	<b>72</b>
<i>II.1</i>	<i>Choix des chitosanes pour le projet.....</i>	<i>72</i>
<i>II.2</i>	<i>Caractérisations des deux types de chitosane .....</i>	<i>73</i>
<i>II.2.1</i>	<i>Caractérisation des chitosanes par IR-ATR .....</i>	<i>74</i>
<i>II.2.2</i>	<i>Détermination du degré d'acétylation (DA).....</i>	<i>74</i>
<i>II.2.3</i>	<i>Détermination de la masse molaire des chitosanes .....</i>	<i>76</i>
<i>II.2.4</i>	<i>Détermination de la structure cristalline des chitosanes.....</i>	<i>79</i>
<i>II.3</i>	<i>Influence de la mise en forme des chitosanes sur leurs caractéristiques.....</i>	<i>82</i>
<i>II.3.1</i>	<i>Comparaison des viscosités des chitosanes.....</i>	<i>82</i>
<i>II.3.2</i>	<i>Comparaison des films de chitosane .....</i>	<i>83</i>
<b>III.</b>	<b>ETUDE DU SIMPLE DEPOT DU CHITOSANE SUR UNE SURFACE DE TITANE .....</b>	<b>86</b>
<b>IV.</b>	<b>GREFFAGE COVALENT DE CHITOSANE.....</b>	<b>87</b>
<i>IV.1</i>	<i>Protocole de validation du revêtement de chitosane .....</i>	<i>88</i>
<i>IV.2</i>	<i>Méthode générale du greffage de chitosane .....</i>	<i>90</i>
<i>IV.3</i>	<i>Greffage covalent via la voie A.....</i>	<i>91</i>
<i>IV.3.1</i>	<i>Présentation du greffage .....</i>	<i>91</i>
<i>IV.3.2</i>	<i>Mise au point des conditions expérimentales.....</i>	<i>92</i>
<i>IV.4</i>	<i>Greffage covalent via la voie B.....</i>	<i>93</i>
<i>IV.4.1</i>	<i>Présentation du greffage .....</i>	<i>93</i>
<i>IV.4.2</i>	<i>Mise au point des conditions expérimentales.....</i>	<i>93</i>
<b>V.</b>	<b>LES COUPLES SUBSTRAT/GREFFAGE ETUDIES .....</b>	<b>95</b>
<i>V.1</i>	<i>Caractérisation des étapes de la synthèse d'un échantillon obtenu par la voie de greffage A sur Ti brut (T40) (résumé) .....</i>	<i>95</i>
<i>V.2</i>	<i>Caractérisation des étapes de la synthèse d'un échantillon obtenu par la voie de greffage A sur T<sub>A6V poli</sub> 98 .....</i>	<i>98</i>
<i>V.2.1</i>	<i>Fragments caractéristiques de l'APTES en ToF-SIMS.....</i>	<i>98</i>
<i>V.2.2</i>	<i>Caractérisation des étapes de greffage .....</i>	<i>99</i>
<i>V.2.3</i>	<i>Contrôle du revêtement biopolymère et étude de la résistance salivaire .....</i>	<i>103</i>
<i>V.3</i>	<i>Etude de la voie de greffage B sur une surface brillantée .....</i>	<i>108</i>
<b>VI.</b>	<b>APPLICATION DE LA VOIE SELECTIONNEE A LA FABRICATION D'UN PROTOTYPE... 113</b>	
<i>VI.1</i>	<i>Application de la voie sélectionnée .....</i>	<i>114</i>
<i>VI.1.1</i>	<i>Adaptation du protocole expérimental.....</i>	<i>114</i>
<i>VI.1.2</i>	<i>Caractérisations des échantillons .....</i>	<i>115</i>
<i>VI.2</i>	<i>Caractérisation après immersion dans un milieu tampon .....</i>	<i>118</i>

VI.2.1	Conditions expérimentales.....	118
VI.2.2	Caractérisations des échantillons .....	118



Ce premier chapitre expérimental est composé de deux parties. La première présente les matériaux utilisés pour le projet (substrat et chitosane) ainsi que les différentes voies de synthèse envisagées pour greffer de façon covalente le polymère au substrat métallique. Dans un deuxième temps, toutes les étapes intervenant dans le greffage pour différents couples « substrat/voie de greffage) ont été caractérisées par des techniques d'analyse fines de surface.

## I. Les substrats utilisés

En lien avec le contexte applicatif de ce projet, les substrats utilisés tout au long de ce travail ont été fournis par Global D, industriel leader du consortium. Il s'agit de substrat en titane (T40) et alliage de titane (TA6V) de différentes formes et surtout présentant différents états de surface en relation directe avec les biomatériaux utilisés en production. En effet, en fonction des applications visées, il existe différents traitements de surface [1]. Le détail des procédés de polissage, brillantage et anodisation utilisés sur les substrats est donné en annexe A1.

Les caractéristiques des matériaux fournis, en termes de composition, format et traitement de surface sont reportés dans le Tableau II- 1.

**Tableau II- 1 : Description des substrats utilisés au cours du projet**

	Nature du substrat	Format des substrats	Traitement de surface
Ti	Titane commercial pur de grade 2 (T40)	pastille Ø 18 mm	-
T <sub>A6V</sub>	Alliage de titane Ti 6Al 4V (TA6V)	pastille Ø 18 mm	-
T <sub>A6V</sub> poli	Alliage de titane Ti 6Al 4V (TA6V)	pastille Ø 18 mm	Polissage de la surface
T <sub>A6V</sub> anod	Alliage de titane Ti 6Al 4V (TA6V)	pastille Ø 18 mm	Anodisation de la surface
T <sub>A6V</sub> brill	Alliage de titane Ti 6Al 4V (TA6V)	pastille Ø 18 mm plaque 5*5cm	Polissage de la surface par brillantage

Si les compositions chimiques sont bien définies par l'industriel, la morphologie des substrats, en fonction du traitement de surface appliqué, n'est pas bien connue. Dans ce contexte, une caractérisation précise de nos matériaux s'avère indispensable pour, d'une part, comprendre les

phénomènes d'adhésion entre substrat et revêtement, et d'autre part, pour expliquer, l'adhésion cellulaire et les propriétés antibactériennes des futurs revêtements.

Afin d'éviter toute redondance, les analyses chimiques par XPS et ToF-SIMS des différentes surfaces seront développées dans la partie IV de ce chapitre « étude des couples substrat/greffage » car les résultats servent de référence à la compréhension des différentes étapes de préparation des revêtements à base de chitosane.

Différentes méthodes ont été utilisées dans ce travail pour réaliser ces caractérisations. La plupart de ces méthodes sont aussi celles utilisées dans l'article d'Ehrenfest *et al.* qui propose plusieurs techniques de caractérisation de surface afin de produire une fiche technique décrivant précisément des implants commerciaux en termes de chimie et de morphologie de surface [2]. Ainsi, les auteurs utilisent des techniques d'analyse de chimie de surface telles que la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy XPS) et la spectroscopie d'électrons Auger ainsi que des analyses de morphologie de surface telles que la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et la profilométrie optique.

Dans cette partie, des efforts ont donc été consentis pour caractériser assez finement la chimie et la morphologie des différentes surfaces reportées dans le Tableau II- 1.

## I.1 Etudes morphologiques et topographiques des substrats

### I.1.1 Observations des surfaces par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Des images de microscopie électronique à balayage (MEB, cf principe et conditions d'observation en annexe A3) ont été enregistrées sur les quatre échantillons de  $T_{A6V}$  (sans traitement, poli, brillanté et anodisé) (Figure II- 1). Sur chacune des images présentées, une photo macroscopique de l'échantillon correspondant a été insérée.

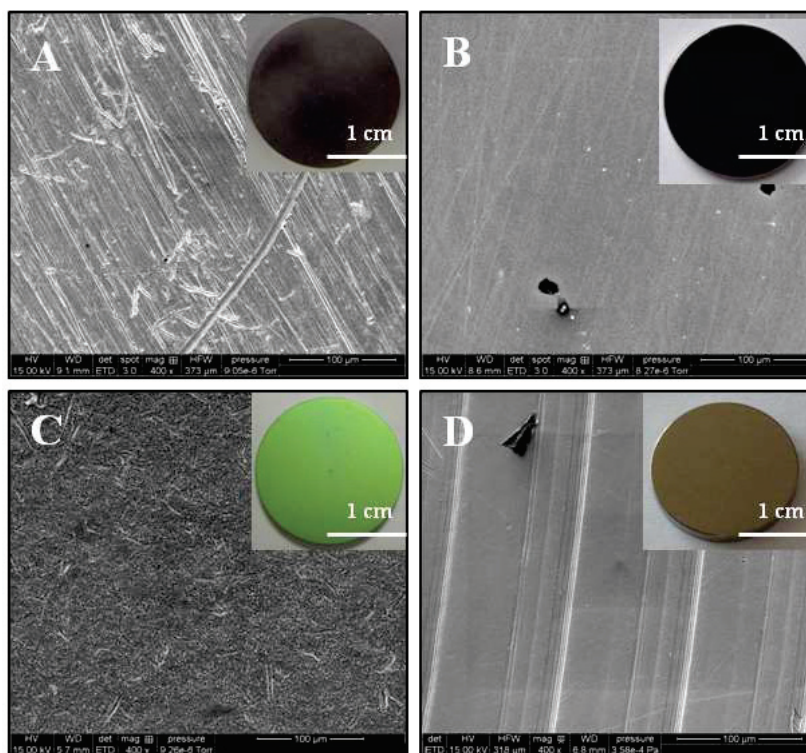


Figure II- 1 : Images MEB en mode électrons secondaires des échantillons  $T_{A6V}$  (A),  $T_{A6V}$  poli (B),  $T_{A6V}$  anod (C) et  $T_{A6V}$  brill (D).

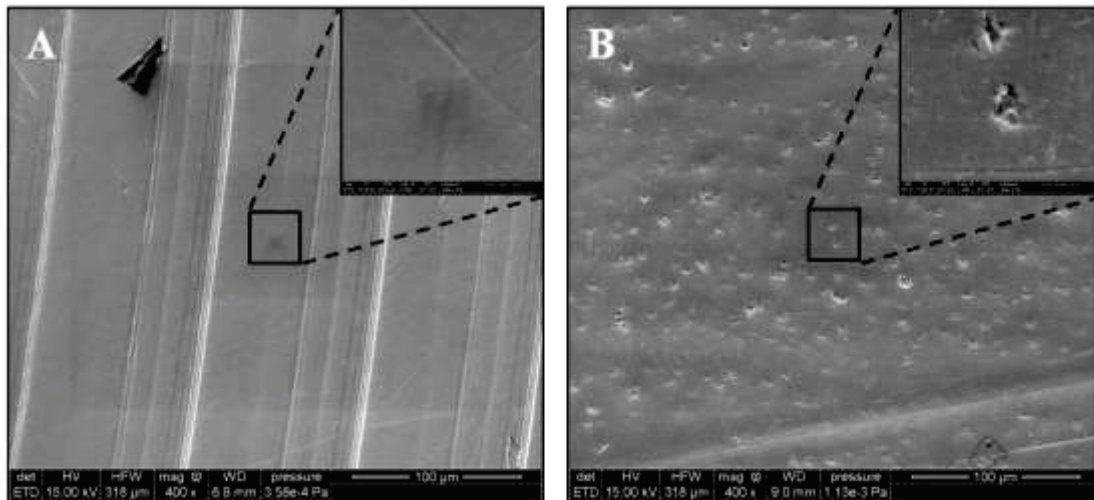
Les clichés réalisés mettent en évidence une différence de morphologie très importante pour tous les échantillons. La surface  $T_{A6V}$  non traitée présente des sillons marqués dont la largeur peut atteindre plusieurs microns (Figure II- 1 A). Il s'agit vraisemblablement des traces d'usinage et d'ébavurage. En comparaison, la surface  $T_{A6V}$  poli apparaît beaucoup plus lisse, avec quelques traces résiduelles dues au polissage de la pastille (Figure II- 1 B). La surface préparée par brillantage ( $T_{A6V}$  brill), est globalement peu marquée et très lisse en dehors des sillons dus à l'usinage. Le brillantage tend à lisser la surface mais il n'est pas suffisant pour aplanir totalement les défauts les plus marqués (sillons d'usinage) (Figure II- 1 D). La surface anodisée, quant à elle, présente une morphologie très différente. Les sillons d'usinage ne sont plus visibles. Par contre, il apparaît une structuration de surface à l'échelle microscopique. Cette structuration (due à l'épaisseur de la couche de  $TiO_2$  en surface) provoque d'ailleurs des interférences de la lumière et donne une coloration verte à la pastille (Figure II- 1 C).

*Remarque : Les deux surfaces de titane commercialement pur (T40) et d'alliage de titane ( $T_{A6V}$ ) présentent des morphologies identiques. Il a donc été choisi de ne présenter que celle de  $T_{A6V}$ .*

#### 1.1.1.1 Cas particulier des échantillons $T_{A6V\text{ brill}}$

##### - Comparaison des deux formats utilisés

Certaines expériences, notamment lors de l'évaluation des propriétés antibactériennes des revêtements à base de chitosane (chapitre IV) nécessitent l'utilisation de surface de dimension spécifique de façon à satisfaire la norme sélectionnée. Dans ces conditions, les substrats de  $T_{A6V\text{ brill}}$  ont été fournis sous deux formats (pastille de Ø 18 mm et plaque carrée de 5x5cm<sup>2</sup>). Bien que ces formats soient qualifiés de surfaces brillantées, leur méthode de production (avant la dernière étape de brillantage) est différente et peut amener à des différences de morphologie. Les plaques carrées sont en effet produites par laminage à chaud d'alliage de titane. Une fois découpés, les échantillons sont ensuite brillantés (protocole de brillantage décrit en annexe A1). Les pastilles, quant à elles, sont obtenues à partir d'une tige métallique de 18 mm diamètre, en rotation constante et découpée à l'aide d'une pointe (d'où les marques d'usinage circulaires observées précédemment), puis traitées selon le protocole de brillantage. Les plaques et les pastilles  $T_{A6V\text{ brill}}$  ont été observées en MEB et comparées (Figure II- 2).



**Figure II- 2 : Images MEB en mode électrons secondaires des échantillons  $T_{A6V\text{ brill}}$  en format pastille (A) et en format plaque (B).**

L'analyse des clichés MEB montre que les deux échantillons présentent des morphologies très différentes. Sur la plaque de  $T_{A6V\text{ brill}}$ , des cavités en surface de quelques microns de côté peuvent être observées (Figure II- 2 B). La pastille  $T_{A6V\text{ brill}}$ , quant à elle, présente toujours une surface assez lisse (bien visible sur le grandissement en encart de l'image Figure II- 2 A) à côté des marques dues à son usinage sous rotation. A nouveau, ces constatations montrent que les morphologies sont très différentes et que des précautions devront être prises afin de vérifier que le procédé mis au point est transférable d'un format à l'autre.



- Analyse des deux lots de pastilles de  $T_{A6V}$  brill

L'ensemble du projet a nécessité un très grand nombre de substrats et nous avons dû travailler à partir de deux lots de pastilles d'alliage de titane brillantées (production par lot de 1000). La reproductibilité des surfaces a été analysée. Des échantillons de chaque lot après les étapes de découpe et de brillantage ont été caractérisés par Microscopie Optique (MO) et par MEB et comparés. Les images MO montrent une certaine similitude entre les deux lots de pastilles, avec notamment les sillons dus à l'usinage présents en surface des deux échantillons (Figure II- 3).

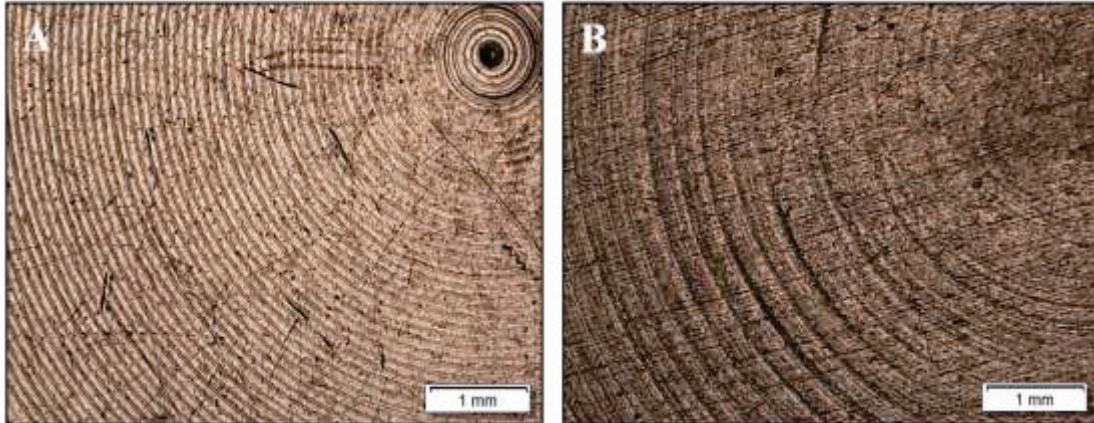


Figure II- 3 : Images en microscopie optique des échantillons  $T_{A6V}$  brill du premier (A) et du second lot (B).

Les images obtenues en MEB sont présentées sur la Figure II- 4.

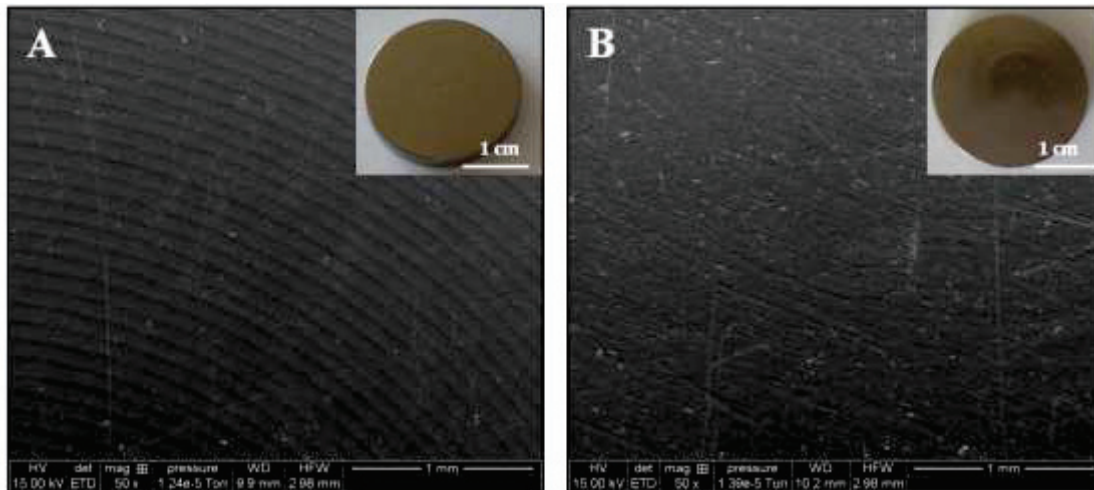


Figure II- 4 : Images MEB en mode électrons secondaires des échantillons  $T_{A6V}$  brill du premier (A) et du second lot (B).

Bien que l'aspect macroscopique (en encart) semble assez proche, on peut voir sur les clichés MEB que les morphologies de surface sont bien différentes. En effet, les échantillons du premier lot présentent en surface des traces nettes d'usinage circulaires dues à la méthode de découpe des tiges (Figure II- 4 A). Le deuxième lot présente aussi des traces d'usinage mais ces dernières semblent moins profondes avec, en plus, de nombreuses rayures en surface (Figure II- 4 B). Ces différences

peuvent être expliquées par un changement de programme de découpe des échantillons avant l'étape finale de brillantage.

Après discussion avec l'industriel qui nous fournit les échantillons, il a été décidé de mener les expériences avec les deux lots en les considérant comme similaires. Cette décision est basée sur le constat industriel suivant : en production, il n'est pas rare que les implants commercialisés ne soient pas toujours strictement identiques, les différences proviennent essentiellement des conditions de découpe des tiges d'alliage de titane (vitesse de découpe, usure de la pointe...) et des traitements de surface post découpe. Cependant, même dans ces conditions, aucune différence n'a été constatée au niveau de l'intégration des implants chez le patient.

*Remarque : Dans la suite de cette partie, seules les pastilles du 1<sup>er</sup> lot de pastille brillantée seront discutées dans cette étude.*

### I.1.2 Topographie par mesure de la rugosité

En plus de la morphologie de surface, il est essentiel de caractériser la rugosité des substrats. Cette dernière peut être exprimée en terme de rugosité arithmétique moyenne ( $R_a$ ) et/ou de rugosité quadratique moyenne ( $R_q$ ) (équation II.1 et II.2).

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad \text{équation II.1}$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad \text{équation II.2}$$

$y_i$  : variation de la hauteur

Dans le cas d'une surface, on parle de  $S_a$  (équivalent de  $R_a$ ) et de  $S_q$  (équivalent de  $R_q$ ). Il existe plusieurs techniques pour mesurer la rugosité d'une surface : par microscopie à force atomique (AFM), par profilométrie de contact et par interférométrie. Dans ce projet, nous avons utilisé ces trois techniques pour caractériser au mieux les échantillons, chacune présentant des points forts et des points faibles, qui ont été discutés dans le cadre de la caractérisation des échantillons.

#### I.1.2.1 *Microscope à force atomique (AFM)*

Des mesures AFM (principe rappelé en annexe A3) ont été effectuées sur l'ensemble des substrats présentés dans le Tableau II- 1 après nettoyage aux ultrasons 10 min dans une solution d'éthanol/acétone (50/50). La Figure II- 5 illustre les topographies obtenues pour les substrats pour une taille d'image ( $94 \times 94 \mu\text{m}^2$ ).

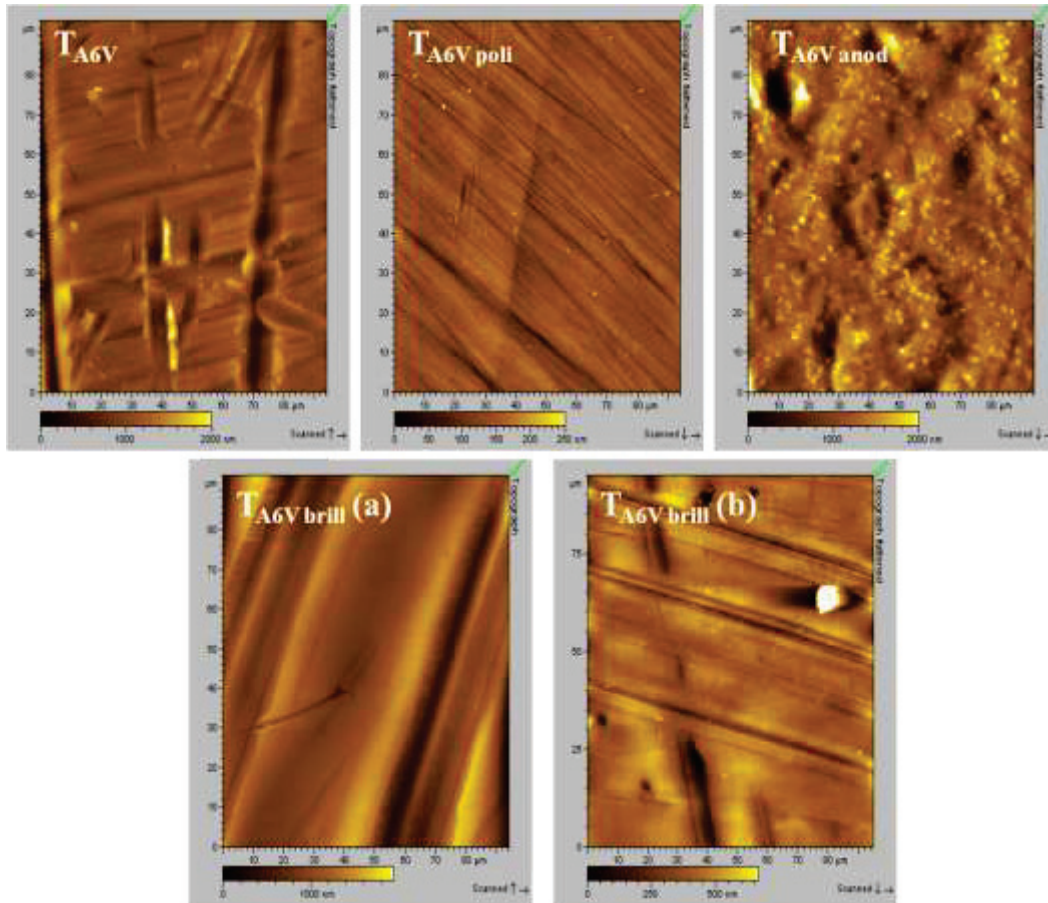


Figure II- 5 : Images AFM des substrats utilisés pour une taille d'image (94x94  $\mu\text{m}^2$ ) avec T<sub>A6V</sub> brill (a) : pastille brillantée et T<sub>A6V</sub> brill (b) : plaque brillantée.

On peut voir que les échantillons présentent des topographies assez différentes. Le traitement de ces images sous logiciel permet, alors, de quantifier les rugosités. Ainsi, le Tableau II- 2 récapitule l'ensemble des valeurs (Sa et Sq) données pour deux tailles d'image (94x94  $\mu\text{m}^2$  et 50x50  $\mu\text{m}^2$ ), celles obtenues avec des dimensions plus faibles étant moins représentatives de l'échantillon.

Tableau II- 2 : Valeurs de rugosité (Sa et Sq) obtenues en AFM (94x94  $\mu\text{m}^2$  et 50x50  $\mu\text{m}^2$ ).

	Sa (nm)		Sq (nm)	
	94 x 94 $\mu\text{m}^2$	50 x 50 $\mu\text{m}^2$	94 x 94 $\mu\text{m}^2$	50 x 50 $\mu\text{m}^2$
T <sub>A6V</sub>	143	109	193	152
T <sub>A6V</sub> poli	14	13	21	17
T <sub>A6V</sub> anod	240	185	310	229
T <sub>A6V</sub> brill	27	17	54	35
T <sub>A6V</sub> brill plaque	64	31	94	44

A la lecture du tableau, on constate une diminution de la valeur de rugosité pour une taille d'image de 94x94  $\mu\text{m}^2$  par rapport à une taille de 50x50  $\mu\text{m}^2$ . En effet, il est logique d'avoir une valeur de rugosité plus faible lorsque la taille de la surface analysée diminue (moins de défauts

présents par unité de surface). Par ailleurs, de par la méthode de calcul (équation II.1 et II.2), il est également logique que les valeurs de  $S_q$  soient supérieures à celles de  $S_a$ .

En résumé, la surface anodisée présente ainsi la plus forte rugosité, suivie par l'échantillon brut et les échantillons brillantés (pastille et plaque confondues). Les valeurs de rugosité mesurées sur les surfaces brutes et anodisées sont du même ordre de grandeur que celles relevées dans la littérature [3]. La surface polie est celle qui présente les valeurs de  $S_q$  et  $S_a$  les plus faibles. Ces résultats sont bien en accord avec les observations de microscopie.

*Remarque :*

- En raison du temps de la mesure, seule une mesure a pu être effectuée sur chaque échantillon d'où l'absence d'écart type.
- L'inconvénient de cette technique est que la surface maximale pouvant être analysée est relativement faible ( $94 \times 94 \mu\text{m}^2$ ). Elle ne convient donc pas pour l'analyse de surfaces accidentées comme par exemple pour les échantillons  $T_{A6V \text{ brill}}$ .

#### 1.1.2.2 Profilométrie 3D

Il existe globalement deux techniques pour réaliser le profil 3D d'une surface : la profilométrie de contact ou à pointe et la profilométrie optique, également appelée interférométrie.

##### - Profilomètre de contact

Après nettoyage, l'ensemble des substrats est caractérisé par profilométrie à pointe. Le principe de cette technique est rappelé en annexe A3. La Figure II- 6 présente les images 3D de la surface des substrats mesurées *via* cette technique.

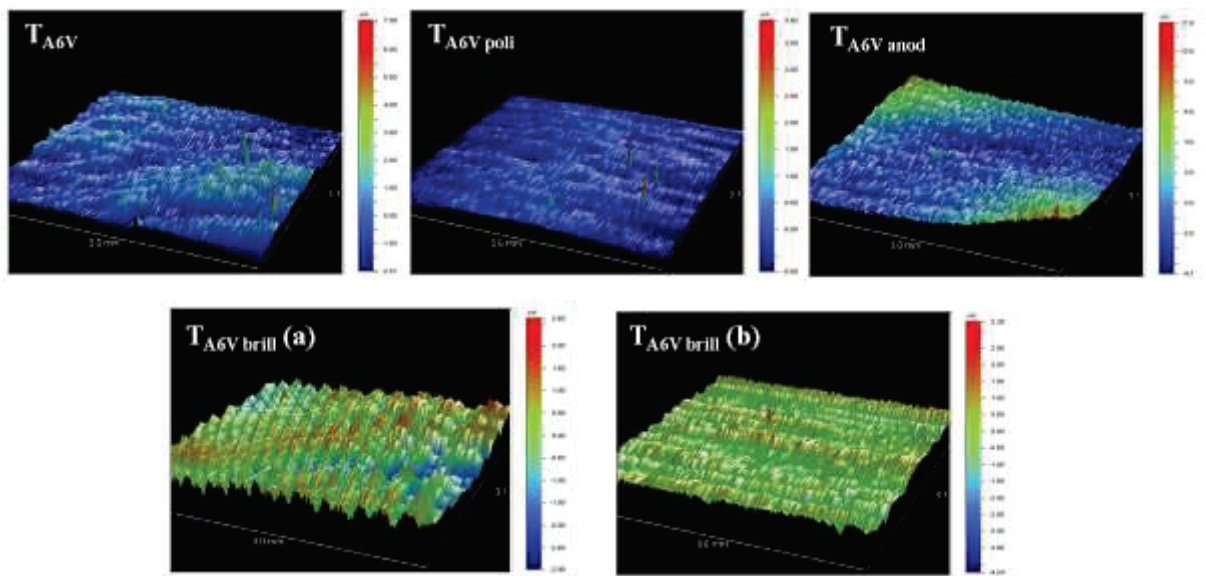


Figure II- 6 : Image 3D des substrats utilisés pour une taille d'image ( $3 \times 3 \text{ mm}^2$ ) avec  $T_{A6V \text{ brill}}$  (a) : pastille brillantée et  $T_{A6V \text{ brill}}$  (b) : plaque brillantée.



Le Tableau II- 3 récapitule les valeurs de rugosité (Sa et Sq) mesurées sur les échantillons, données pour une taille d'image de 3x3 mm<sup>2</sup>. Comme pour l'analyse en AFM, une seule mesure a été effectuée sur chaque échantillon d'où l'absence d'écart type.

**Tableau II- 3 : Valeurs de rugosité (Sa et Sq) obtenues en profilométrie 3D à pointe**

	Sa (nm)	Sq (nm)
T <sub>A6V</sub>	502	644
T <sub>A6V poli</sub>	150	191
T <sub>A6V anod</sub>	1 630	2 120
T <sub>A6V brill</sub>	582	725
T <sub>A6V brill plaque</sub>	440	550

A la lecture du tableau, on remarque que la surface anodisée présente la plus forte rugosité suivie par les échantillons brillantés et brut, qui présentent des valeurs équivalentes. La surface polie étant celle où les valeurs de Sa et Sq sont les plus faibles. Il est intéressant de noter que les valeurs, en fonction des surfaces, suivent la même évolution selon les deux techniques (AFM et profilométrie à pointe). Par contre les ordres de grandeur de ces valeurs sont assez différents, ce constat s'explique aisément par la taille de la surface analysée (3x3 mm<sup>2</sup> contre 94 x 94 µm<sup>2</sup>). Il sera donc toujours utile de préciser la technique utilisée lorsque des valeurs de rugosité seront discutées.

*Remarque : Le défaut de cette technique est que le temps d'analyse est relativement long (45 min pour une analyse de dimension 3 mm sur 3 mm). Cette technique est, par ailleurs, difficile à adapter aux substrats qui ne présentent pas une planéité parfaite.*

#### - Profilomètre optique

Les valeurs de rugosité (Sa et Sq) mesurées par interférométrie sont répertoriées dans le Tableau II- 4. Le principe de cette technique est rappelé en annexe A3.

**Tableau II- 4 : Valeurs de rugosité (Sa et Sq) obtenues en profilométrie 3D optique.**

	Sa (nm)		Sq (nm)	
	x 10	x 50	x 10	x 50
T <sub>A6V</sub>	252	192	313	248
T <sub>A6V poli</sub>	63	17	76	22
T <sub>A6V anod</sub>	423	444	553	590
T <sub>A6V brill</sub>	547	394	668	471
T <sub>A6V brill plaque</sub>	446	309	597	421

On remarque que les surfaces brillantées (pastille et plaque) ont la plus forte rugosité en désaccord avec les deux méthodes précédentes, suivie par la surface anodisée, et le T<sub>A6V</sub> brut. La surface polie étant toujours celle pour laquelle les valeurs de Sa et Sq sont les plus faibles.

Ce résultat contradictoire observé sur les surfaces brillantées démontre que ces échantillons sont très inhomogènes en fonction des zones analysées. Pour en rendre compte, la Figure II- 7 donne une image reconstruite de la pastille brillantée réalisée lors de l'analyse d'interférométrie (image à partir de laquelle les valeurs du tableau ont été calculées).

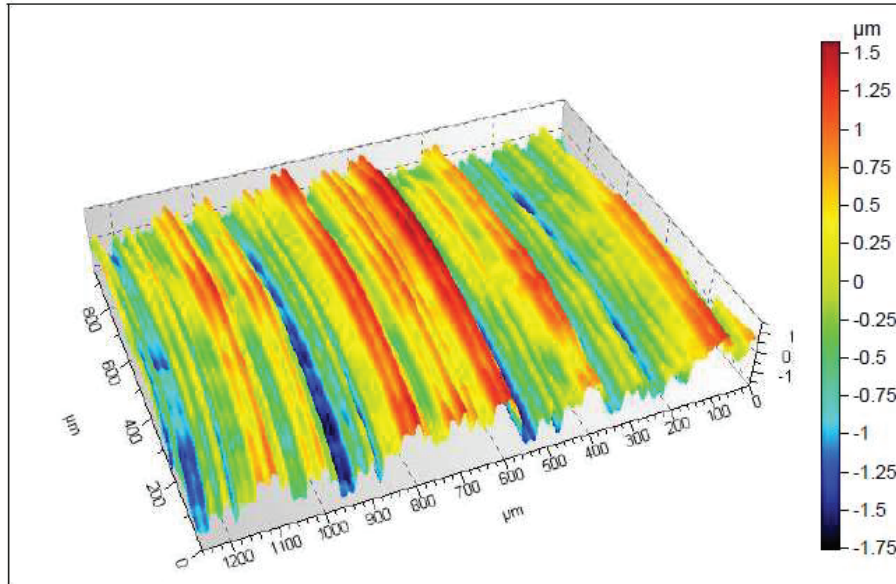


Figure II- 7 : Image 3D de l'échantillon T<sub>A6V brill</sub> obtenue par profilométrie optique (taille de l'image 1273x955 μm).

On peut voir sur cette image deux « hétérogénéités » de surface. La première concerne la présence des sillons circulaires très marqués et déjà longuement observés précédemment et la seconde un peu moins visible mais bien présente est liée à la surface qui apparaît bombée au centre de l'image.

En réalité les pastilles ne sont pas planes sur toute leur surface. Une schématisation peut être donnée sur la Figure II- 8. Cet aspect est assurément lié à la technique de découpe de la tige.

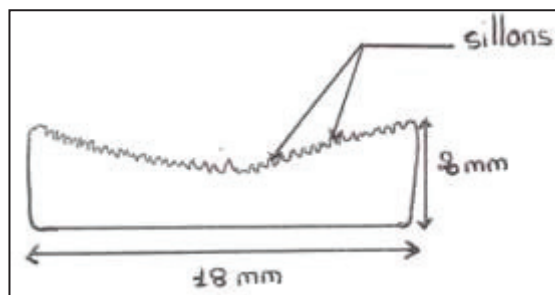


Figure II- 8 : Schéma d'une pastille brillantée (vue en coupe).

L'étude de Bigerelle *et al.*, a par ailleurs montré que la méthode de préparation des pastilles de titane est essentielle pour l'aspect des surfaces de titane. En effet, en fonction de la vitesse de rotation de l'outil permettant de couper la tige de titane, la largeur et la profondeur des sillons peuvent varier [4]. Enfin on peut ajouter que les ordres de grandeur des valeurs de rugosité se

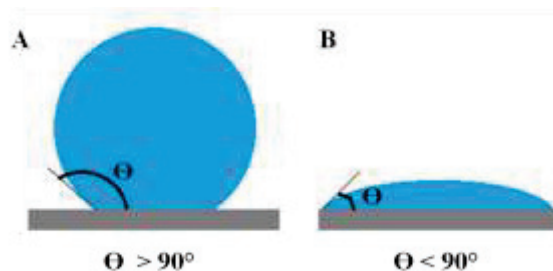
situent entre celles mesurées par AFM et celles mesurées par profilométrie à pointe. Ce constat semble logique puisque ici la dimension de la zone analysée est intermédiaire entre les  $3 \times 3 \text{ mm}^2$  et  $94 \times 94 \text{ }\mu\text{m}^2$  analysées précédemment.

L'interférométrie est, ainsi, la technique qui permet de rendre compte le plus fidèlement de l'état de surface des échantillons brillants, ceux-ci présentant une topographie très hétérogène qui peut fausser les valeurs de rugosité obtenues avec les autres techniques. Ce constat est confirmé par l'étude de Wenneberg *et al.*, qui répertorie les différentes méthodes employées pour caractériser les surfaces d'implants dentaires et qui conclue que les méthodes les plus pertinentes dans l'évaluation de la topographie de surface d'implants est le profilomètre à confocal laser et l'interféromètre. En effet, avec les autres méthodes, les valeurs de rugosité peuvent parfois ne pas rendre compte de la surface réelle [5].

*Remarque : L'avantage de cette technique est un gain de temps (moins de 5 min avoir un résultat) mais l'appareil n'était pas accessible pour des mesures de routine.*

## I.2 Mouillabilité de surface

Un autre paramètre essentiel de caractérisation d'une surface, surtout lorsque cette dernière est recouverte par une solution aqueuse est évidemment sa mouillabilité. La technique la plus utilisée pour accéder à cette caractéristique est la technique de la goutte posée. Elle consiste à déposer sur la surface du substrat une goutte d'un liquide mouillant. En fonction de l'angle que forme la goutte avec la surface, on peut définir une surface hydrophobe ( $\Theta > 90^\circ$ ) ou hydrophile ( $\Theta < 90^\circ$ ) (Figure II- 9).



**Figure II- 9 : Schémas des angles de contact obtenus dans le cas d'une surface hydrophobe (A) et hydrophile (B).**

Le graphe proposé sur la Figure II- 10 récapitule les valeurs moyennes d'angles de contact mesurées pour chaque type d'échantillons.

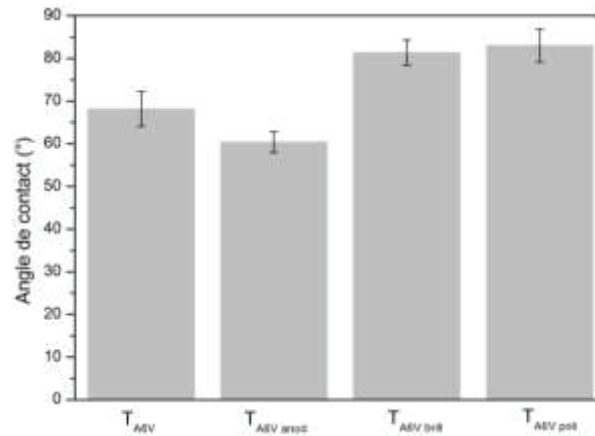


Figure II- 10 : Valeurs d'angles de contact moyennes pour l'ensemble des substrats (pastilles) étudiés.

On peut remarquer que toutes ces surfaces peuvent être qualifiées d'hydrophiles. Ainsi la surface T<sub>A6V anod</sub> est la surface la plus hydrophile, suivie par la surface brute, la surface polie et la surface brillantée présentent une hydrophilie équivalente. La mouillabilité des substrats sera à prendre en considération lors de l'application des solutions de chitosane.

*D'après l'ensemble de ces caractérisations, on note bien que les échantillons présentent différentes morphologies et rugosités de surface.*

*La surface la plus rugueuse est la surface anodisée alors que la surface la plus lisse est l'échantillon poli. Ensuite, il est assez difficile de faire un classement entre les surfaces brillantées (pastille ou plaque) et la surface brute. Il est attendu une rugosité un peu plus faible après traitement de brillantage mais les mesures ne confirment pas toujours cette attente. En effet, en fonction de la technique utilisée, de la zone analysée, de la surface d'analyse mais aussi de l'échantillonnage (choix arbitraire des pastilles dans chaque lot) les résultats ne sont pas toujours identiques, ce qui met en lumière les difficultés et les limites de ce type d'analyse et surtout les problèmes de reproductibilité dans la fabrication des échantillons.*

*La surface anodisée est la plus hydrophile, suivie par la surface brute puis par la surface polie et brillantée.*

## II. Le chitosane comme biopolymère

### II.1 Choix des chitosanes pour le projet

Comme cela a déjà été évoqué dans le chapitre I, le terme « chitosane » désigne un polysaccharide composé d'une succession de monomères *D*-glucosamine acétylés ou non et dans ce sens, l'appellation chitosane est donnée à l'ensemble des dérivés de la chitine qui présentent, à la fois, une valeur limite du Degré d'Acétylation (DA) (inférieur à 40-60 %) [6, 7] et une solubilité en solution aqueuse acide [8].

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à deux types de chitosane commercial. Le premier est disponible chez Sigma Aldrich ( $C_{sig}$ ), il s'agit d'un chitosane « classique », issu de chitine de crustacés, présentant une valeur de DA comprise entre 15 et 25% et une masse molaire non fournie (qualifié de chitosane à faible masse moléculaire). Le second chitosane, certifié grade médical, provient de la société Kitozyme ( $C_{kit}$ ). Il présente un DA de 30,6% et une masse molaire moyenne de  $159\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La certification grade médical correspond à un niveau de pureté du composé pour lequel la microbiologie est parfaitement connue et ne dépasse pas un certain seuil. Ainsi, la validation d'un composé grade médical doit être attestée par trois évaluations : (i) le dénombrement des bactéries aérobies viables, qui doivent être inférieures ou égales à 100 Unité Formant une Colonie par gramme (UFC/g), (ii) le dénombrement des levures et moisissures présentes au sein de l'échantillon, qui doivent être inférieures ou égales à 10 UFC/g et (iii) la quantité d'Unité d'Endotoxines (UE) bactériennes, devant être inférieure à 10 UE/g.

Dans le contexte d'une application biomédicale, il nous a semblé pertinent de travailler un produit certifié grade médical afin de faciliter la future mise sur le marché d'un implant bioactif. Cependant, ce produit étant très cher et assez peu disponible, il a été fait le choix d'utiliser du chitosane sigma  $C_{sig}$ , moins onéreux et abondant, pour établir et valider le procédé de fabrication dans un premier temps.

La structure chimique des deux biopolymères sélectionnés est quasi-équivalente, avec des unités *N*-glucosamines portant des groupements  $R = H$  ou  $COCH_3$  pour le chitosane sigma et des groupements  $R = H$ ,  $COCH_3$  ou  $CH_2CH_2OH$  pour le chitosane kitozyme (Figure II- 11).

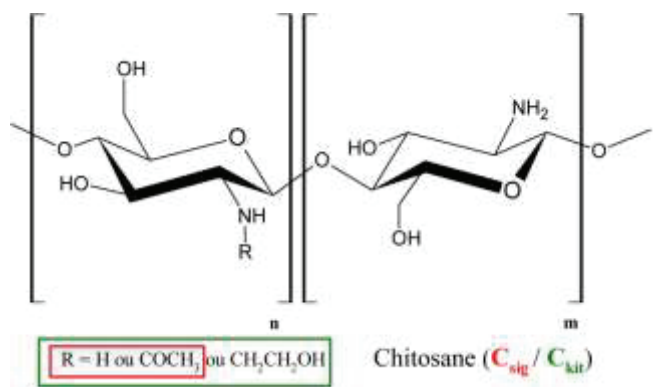


Figure II- 11 : Structure chimique des chitosanes utilisés dans le cadre du projet (deux sources crustacés et champignons).

La présence d'unités *N*-hydroxyethyl-glucosamines dans le chitosane kitozyme est liée à sa purification par stérilisation à l'oxyde d'éthylène. D'après le fournisseur, le  $C_{kit}$ , présente 69,4 % de *D*-glucosamine, 24,0% de *N*-acetyl-*D*-glucosamine et 6,6% de *N*-hydroxyethyl-*D*-glucosamine. On peut légitimement penser que la présence de ce type de groupement supplémentaire a une influence sur les propriétés du biopolymère en solution (viscosité, solubilité..).

Les deux chitosanes sélectionnés sont par ailleurs synthétisés à partir de chitine de différentes origines. En effet, le  $C_{sig}$  est obtenu par désacétylation partielle de chitine provenant de l'exosquelette de crustacés, alors que le  $C_{kit}$  est produit par réaction de désacétylation enzymatique (*chitine-désacétylase*) de la chitine-glucane contenu dans la paroi cellulaire des champignons blancs *Agaricus bisporus* ou champignons de Paris. C'est d'ailleurs, l'origine non-animale du  $C_{kit}$  qui a été déterminant dans le choix du chitosane grade médical.

## II.2 Caractérisations des deux types de chitosane

Des études de la littérature sur le chitosane montrent que les différences de structure chimique, de DA et de masse molaire peuvent jouer un rôle important sur les propriétés physiques, physico-chimiques et biologiques des polymères [9-13], c'est la raison pour laquelle il est nécessaire de caractériser précisément les deux chitosanes utilisés dans le projet.

De plus, la détermination expérimentale des paramètres structuraux des biopolymères, tels que par exemple, le degré d'acétylation (DA), la masse molaire moyenne (MM), l'indice de polymolécularité ( $\bar{D}$ ) ou le taux de cristallinité doit nous permettre (i) de valider les informations fournisseurs et (ii) de bien contrôler les propriétés des biopolymères. Dans cette partie, sont présentés les résultats obtenus pour caractériser et comparer les deux types de chitosane ( $C_{sig}$  et  $C_{kit}$ ).

### II.2.1 Caractérisation des chitosanes par IR-ATR

Les spectres IR enregistrés sur les deux chitosanes  $C_{sig}$  et  $C_{kit}$ , présentés à la Figure II- 12, montrent pour les deux composés une signature équivalente.

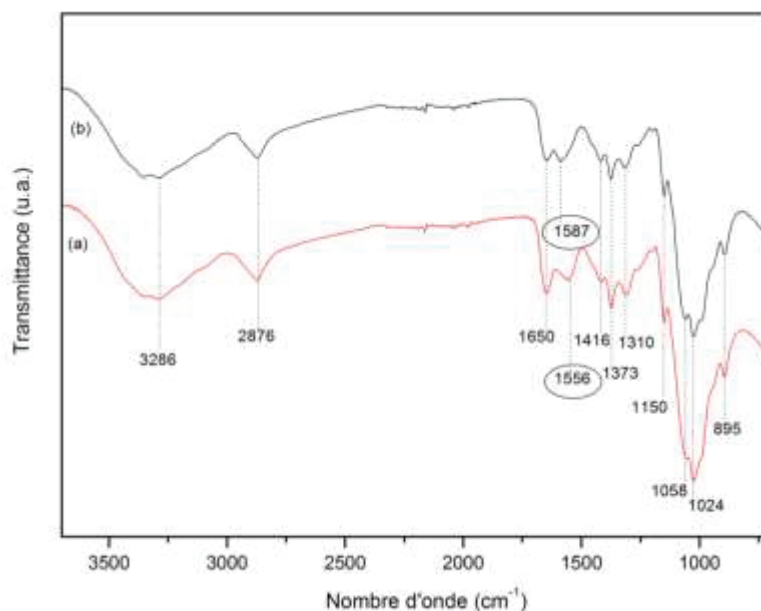


Figure II- 12 : Spectres FTIR-ATR des poudres de  $C_{kit}$  (a) et  $C_{sig}$  (b).

Les bandes superposées attribuables aux vibrations d'élongation des liaisons N-H et O-H sont détectées aux alentours de  $3286\text{ cm}^{-1}$ , prouvant la présence de groupements hydroxyle et amine [14]. L'intensité moyenne des bandes observées à  $1415\text{ cm}^{-1}$  confirme la présence du groupement fonctionnel -OH. De plus, le faible signal observé vers  $2876\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation des liaisons (-CH<sub>2</sub>), tandis que les bandes détectées vers  $1650\text{ cm}^{-1}$ ,  $1556\text{--}1587\text{ cm}^{-1}$ ,  $1375\text{ cm}^{-1}$  and  $1315\text{ cm}^{-1}$  sont attribués au C=O de l'amide, à la vibration d'élongation de la liaison -NH, -NHCO de l'amide et -C-N, respectivement [15, 16]. En ce qui concerne les bandes détectées à  $1150$ ,  $1070$ ,  $1019$  et  $893\text{ cm}^{-1}$ , elles sont caractéristiques de la structure glucosidique du composé [15-17].

Toutefois la juxtaposition des deux spectres n'est pas parfaite. En effet, une différence est notée sur la bande caractéristique de la liaison N-H qui apparaît à  $1587\text{ cm}^{-1}$  pour le  $C_{sig}$  et à  $1556\text{ cm}^{-1}$  pour le  $C_{kit}$ . Ce décalage peut être dû aux valeurs de DA différentes dans chacun des composés, ainsi qu'à la présence de groupements *N*-hydroxyethoxy chez le  $C_{kit}$  qui peut entraîner un décalage du signal du NH en interaction avec ces groupements.

### II.2.2 Détermination du degré d'acétylation (DA)

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le DA du chitosane ; la potentiométrie [18], la conductimétrie [19], la spectroscopie UV et infrarouge [20-22], la spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H) [23] et la spectrométrie de masse [24].

Parmi celles-ci, nous avons choisi d'utiliser la spectrométrie RMN du proton qui présente l'avantage de ne pas nécessiter d'étalonnage préalable et permet d'obtenir des résultats précis avec de faibles quantités de matière. Une fois le spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré (exemple donné sur la Figure II- 13), il suffit d'intégrer (mesure de l'aire sous pic) les signaux relatifs, d'une part, aux protons des groupements méthyles des acétamides des résidus *N*-acetyl-*D*-glucosamine (3 protons à  $\delta \sim 2$  ppm) et d'autre part, des protons des groupements glucopyranose (6 protons à  $\delta \sim 3 - 4$  ppm).

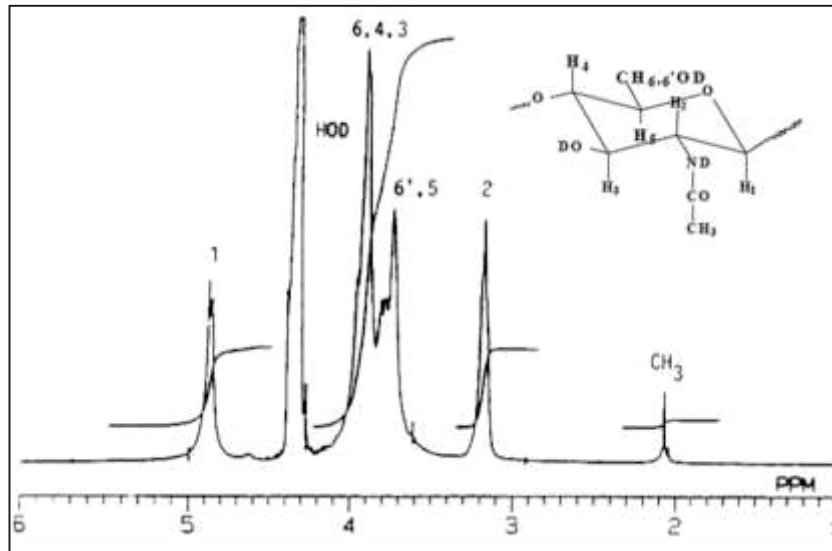


Figure II- 13 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un chitosane à 400 MHz (Hirai, 1991).

Le DA peut alors être calculé selon la méthode de Hirai et *al.* [23] qui propose l'équation II.3 :

$$\%DA = \left( \frac{\frac{1}{3} \cdot \text{Aire } \text{CH}_3}{\frac{1}{6} \cdot \text{Aire } \text{H}_{2-6}} \right) * 100 \text{ (équation II.3)}$$

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  permet également de qualifier la distribution des unités acétylées le long de la chaîne du polymère. En effet, Varum *et al.* ont démontré que le déplacement chimique du proton  $\text{H}_1$  du groupement acétyle est très sensible à son environnement (nature de l'unité voisine monomère acétylée ou non) [25].

Ainsi, des analyses par RMN du proton ont été effectuées par **Agnès Crépet** du Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères (conditions opératoires en annexe A4).

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  enregistrés sur les deux biopolymères sont présentés Figure II- 14.



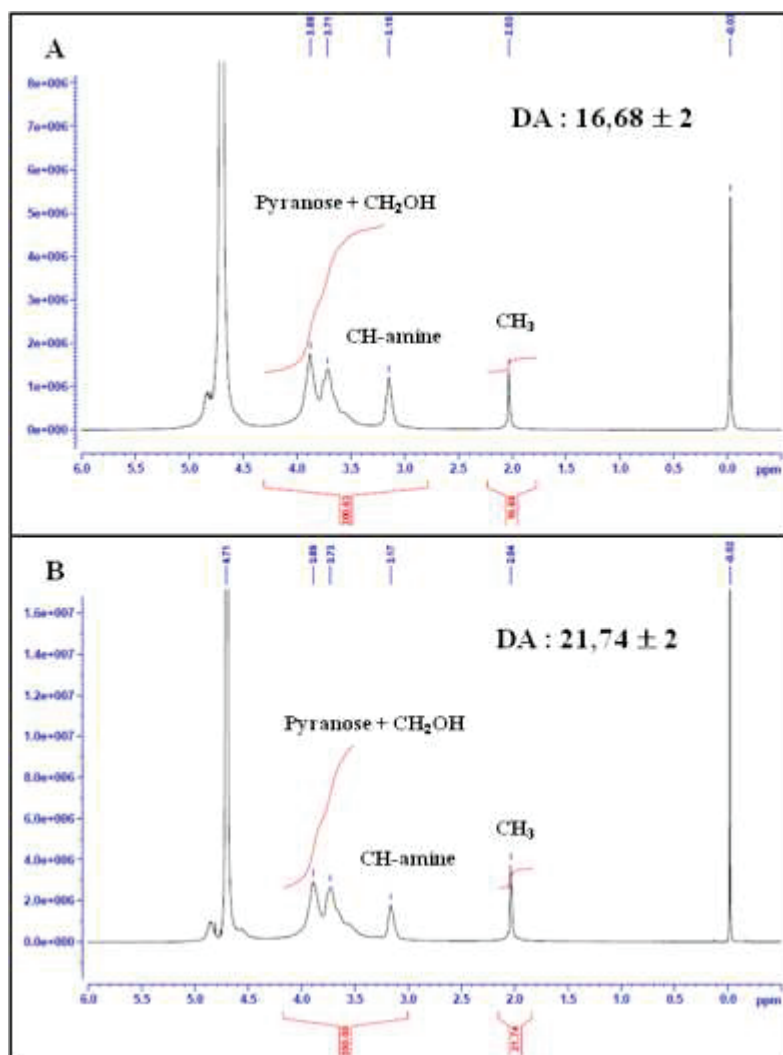


Figure II- 14 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des chitosanes  $\text{C}_{\text{sig}}$  (A) et  $\text{C}_{\text{kit}}$  (B) à 400 MHz.

Chaque signal a pu être attribué à une espèce de proton, les attributions sont reportées directement sur les spectres. Après intégration des différents signaux et application de l'équation II.3, on obtient pour le  $\text{C}_{\text{sig}}$  un DA de 16,7% et pour le  $\text{C}_{\text{kit}}$ , un DA de 21,7%, soit une différence de 5% entre les deux composés. Il est à noter que la valeur expérimentale du  $\text{C}_{\text{kit}}$  diffère de celle donnée par le fournisseur ( $\sim 8\%$ ). Enfin, en comparant les déplacements chimiques des protons de chaque groupement, on constate un léger décalage, qui permet de conclure à une répartition des blocs des unités acétylées et non acétylées différente dans les deux composés.

### II.2.3 Détermination de la masse molaire des chitosanes

Un autre critère essentiel pour caractériser le chitosane est sa masse molaire moyenne. On peut trouver la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ), en masse ( $M_w$ ), ou viscosimétrique ( $M_v$ ). On peut également obtenir la masse molaire maximale ou masse au pic ( $M_p$ ) dans le cas où le polymère présente des agrégats non séparables (c'est le cas lors d'une mauvaise solubilisation du polymère). Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la masse molaire moyenne d'un polymère :

la viscosimétrie capillaire *via* l'équation de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) [26], la diffusion de la lumière en conditions statiques et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la diffusion de la lumière.

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad \text{équation MHKS}$$

Dans cette partie, nous avons choisi d'utiliser la SEC couplée à la diffusion de la lumière car c'est une méthode très bien maîtrisée par notre laboratoire partenaire (IMP) et assez facile à mettre en œuvre. Par ailleurs, cette méthode permet d'accéder à une donnée supplémentaire qui est l'indice de polymolécularité ou polydispersité ( $\mathcal{D}$ ), qui caractérise l'hétérogénéité du polymère en donnant la dispersion de sa masse molaire. La masse molaire moyenne en masse du biopolymère est déterminée à partir de la valeur de l'indice de réfraction ( $dn/dc$ ), qui dépend du solvant utilisé, de la force ionique de la solution et du DA [26]. Il est à noter que l'analyse des polycations peut présenter des difficultés dues aux effets de charges entre le polycation, l'éluant et la phase stationnaire. Dans ce contexte, il est nécessaire de bien définir les conditions expérimentales, en termes de solvant, pH et force ionique, afin d'éviter les interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire et ainsi limiter les interactions électrostatiques induites par le polyélectrolyte. Pour le chitosane, l'utilisation d'un tampon 0,2 M acide acétique / 0,15 M acétate d'ammonium (pH 4,5) comme éluant permet de limiter la formation de liaisons hydrogène entre le polymère et la phase stationnaire et de favoriser l'écrantage des charges du chitosane pour une analyse optimale.

Le Tableau II- 5 récapitule l'ensemble des résultats obtenus après interprétation des chromatogrammes enregistrés (Figure II- 15) sur les deux types de chitosane  $C_{kit}$  et  $C_{sig}$  (conditions d'analyses en annexe A4).

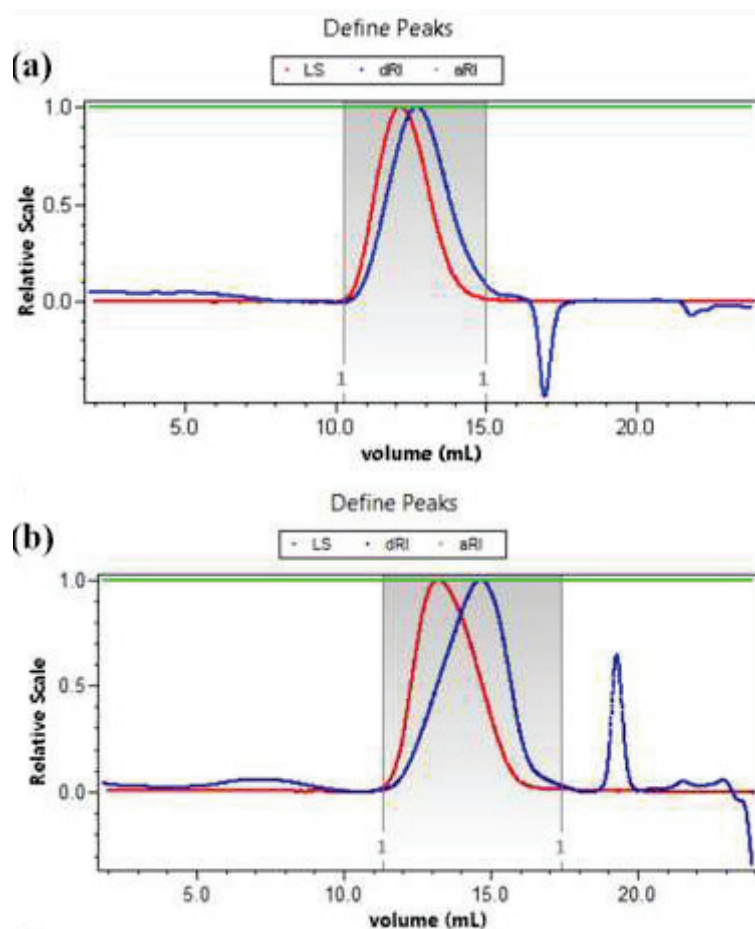


Figure II- 15 : Chromatogrammes enregistrés sur les échantillons  $C_{kit}$  (a) et  $C_{sig}$  (b).

Tableau II- 5 : Valeurs des masses molaires moyennes ( $M_w$ ,  $M_p$ ,  $M_n$ ) et valeurs de polydispersité des biopolymères  $C_{sig}$  et  $C_{kit}$ .

	$C_{sig}$	$C_{kit}$
$M_n$ (g/mol)	57 990 ( $\pm 0,37$ %)	127 500 ( $\pm 3,19$ %)
$M_p$ (g/mol)	73 440 ( $\pm 0,25$ %)	184 100 ( $\pm 0,37$ %)
$M_w$ (g/mol)	161 000 ( $\pm 0,20$ %)	221 900 ( $\pm 5,16$ %)
$\bar{D}$ ( $M_w/M_n$ )	2,76 ( $\pm 0,42$ %)	1,74 ( $\pm 3,32$ %)

La lecture du tableau met en évidence que le biopolymère  $C_{sig}$  présente des masses molaires moyennes globalement plus faibles que le  $C_{kit}$ . En revanche, l'indice de polymolécularité est plus important pour le  $C_{sig}$ , indiquant une hétérogénéité plus marquée de la distribution des masses molaires, pour ce polymère. Nous n'avons pas été en mesure de comparer les valeurs mesurées sur le  $C_{kit}$  aux valeurs données par le fournisseur parce qu'elles ne sont pas exprimées sous la même forme ( $M_v$  (fournisseur) vs  $M_n$  et  $M_w$  (laboratoire)). Par ailleurs aucune valeur n'est reportée pour le  $C_{sig}$ .

#### II.2.4 Détermination de la structure cristalline des chitosanes

Le chitosane est un polymère semi-cristallin qui présente plusieurs allomorphes (allomorphes anhydre et hydraté). La structure cristalline du chitosane est souvent liée à ses conditions de préparation et à son état d'hydratation. De façon à caractériser, au mieux, les produits utilisés, il nous a semblé pertinent de regarder la structure cristalline des deux produits sélectionnés. Ainsi, des analyses par diffraction des rayons X (DRX) ont été menées sur les deux chitosanes  $C_{kit}$  et  $C_{sig}$ . Les diffractogrammes enregistrés sur les deux composés sont proposés sur la Figure II- 16.

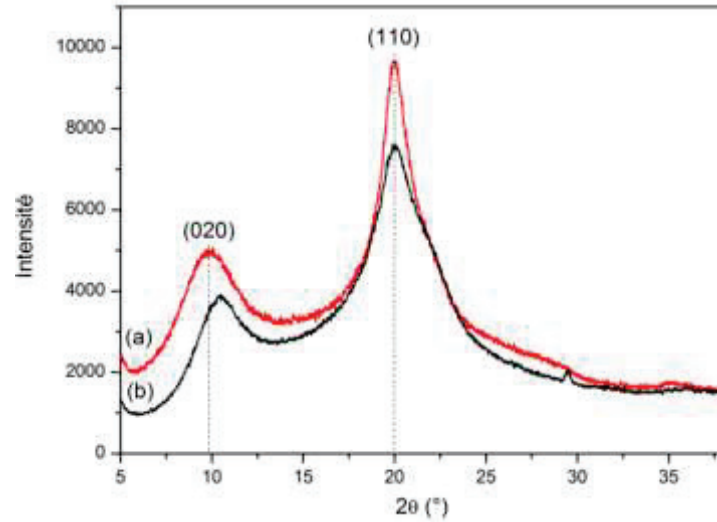


Figure II- 16 : Diffractogrammes enregistrés sur les chitosanes solides  $C_{kit}$  (a) et  $C_{sig}$  (b).

Tous deux présentent des signaux assez larges, caractéristiques de l'état semi cristallin des composés. Les deux signaux visibles à 10° et 20° (2θ) correspondent aux plans (020) et (110) respectivement, en accord avec la littérature [27-30].

Par ailleurs, selon Zhang et *al.*, il est possible d'exprimer un indice de cristallinité en lien avec l'intensité relative des pics observés [31]. Les équations permettant de déterminer les indices de cristallinité  $CrI_{110}$  et  $CrI_{020}$  sont donnés par les relations suivantes (équation II.4 et II.5) :

$$C_r I = \frac{(I_{110} - I_{am})}{I_{110}} * 100 \quad (\text{équation II.4})$$

$$C_r I = \frac{(I_{020} - I_{am})}{I_{110}} * 100 \quad (\text{équation II.5})$$

$I_{110}$  (u.a.): maximum d'intensité du plan (110) à  $2\theta = 20^\circ$

$I_{020}$  (u.a.): maximum d'intensité du plan (020) à  $2\theta \approx 10^\circ$

$I_{am}$  (u.a.) : intensité de la phase de diffraction amorphe à  $2\theta = 16^\circ$

Les valeurs calculées à partir des équations précédentes sont données dans le Tableau II- 6.

**Tableau II- 6 : Valeurs des indices de cristallinité  $C_{rI_{110}}$  et  $C_{rI_{020}}$  pour les deux chitosanes ( $C_{sig}$  et  $C_{kit}$ ).**

	$C_{sig}$	$C_{kit}$
$C_{rI_{110}}$	0,58	0,64
$C_{rI_{020}}$	0,09	0,15

Les indices de cristallinité observés sont plus importants dans le cas du chitosane kitozyme.

Cette partie caractérisation des chitosanes a mis en évidence des différences non négligeables entre les deux polymères sélectionnés, en termes de structure chimique, de DA, de masse molaire moyenne et de structure cristalline. Il est alors attendu que les deux polymères présentent des comportements différents en solution (solubilisation, viscosité) et que les propriétés physico-chimiques et biologiques soient également dépendantes du polymère utilisé.

*Pour conclure, les résultats exposés précédemment montrent de réelles différences dans les caractéristiques physico-chimiques des deux polymères sélectionnés. Premièrement, d'un point de vue de la composition chimique, il a été montré que le  $C_{kit}$  présente des fonctions supplémentaires par rapport au  $C_{sig}$ . Par ailleurs, les DA sont sensiblement différents entre les deux chitosanes et surtout assez éloignés des valeurs reportées par les fournisseurs. De même, les masses molaires moyennes précisées par les analyses SEC montrent des différences significatives entre les biopolymères et à nouveau avec les références fournisseurs (Tableau II-7). Enfin, des différences dans les indices de cristallinité ont été mises en évidence.*

**Tableau II- 7 : Récapitulatifs des différences constatées entre les données fournisseurs et la détermination en laboratoire**

	Données fournies lors de l'achat des produits		Données déterminées au laboratoire	
	$C_{sig}$	$C_{kit}$	$C_{sig}$	$C_{kit}$
DA (%)	15 - 25	30,6	$16,7 \pm 2$	$21,7 \pm 2$
Mn (g/mol)	-	-	$57\,990 (\pm 0,37 \%)$	$127\,500 (\pm 3,19 \%)$
Mp (g/mol)	-	-	$73\,440 (\pm 0,25 \%)$	$184\,100 (\pm 0,37 \%)$
Mw (g/mol)	-	-	$161\,000 (\pm 0,20 \%)$	$221\,900 (\pm 5,16 \%)$
$\bar{D}$ (Mw/Mn)	-	-	$2,76 (\pm 0,42 \%)$	$1,74 (\pm 3,32 \%)$
$C_r I_{110}$	-	-	0,58	0,64
$C_r I_{020}$	-	-	0,09	0,15

*Deux points importants sont à retenir pour la suite. Les données fournisseurs ne sont pas fiables et il est nécessaire de caractériser tous les produits pour bien les connaître et deuxièmement on peut s'attendre logiquement à des différences importantes dans les propriétés physico-chimiques, et biologiques des chitosanes. Comme l'indique la revue de Kurmiska et al., qui présente un récapitulatif de l'évolution des propriétés physico-chimiques et biologiques en fonction du DA et de la masse molaire Mw, les propriétés des chitosanes dépendent en grande partie de ces caractéristiques, d'où la nécessité de les connaître précisément [9].*

## II.3 Influence de la mise en forme des chitosanes sur leurs caractéristiques

La littérature reporte des études qui montrent que la mise en forme du chitosane (poudre, film, aérogel...) peut, dans certains cas, avoir une influence significative sur ses caractéristiques en termes, notamment, de masse molaire et indice de cristallinité, et par conséquent sur les propriétés finales du produit. En effet, l'étape de mise en forme passe, le plus souvent, par une solubilisation du chitosane qui peut, logiquement, entraîner une modification de ses caractéristiques intrinsèques.

Le chitosane est insoluble dans l'eau à pH neutre. Toutefois, sa dissolution est possible en solution aqueuse acidifiée ( $\text{pH} < 6$ ), grâce à la protonation des fonctions amines. En solution aqueuse acide, le chitosane prend donc la forme d'un polyélectrolyte cationique ( $-\text{NH}_3^+$ ).

La solubilité du chitosane en solution aqueuse acide dépend, en grande partie, de son DA. Avec un  $\text{DA} < 28\%$ , on assistera à l'ionisation totale du chitosane, la chaîne étant fortement chargée, elle présente un comportement électrolytique. La chaîne est dans une conformation très étendue à cause d'un effet de volume exclu électrostatique important, le polyélectrolyte est ainsi plutôt hydrophile [26]. Sachant que l'un des paramètres influant la solubilité du chitosane est la quantité de groupements amines à protoner (directement lié au DA), il est important de noter que la présence des groupements *N*-hydroxyethyl (présent dans le  $\text{C}_{\text{kit}}$ ) peut moduler sa solubilité ainsi que sa viscosité en solution.

### II.3.1 Comparaison des viscosités des chitosanes

La viscosité est un paramètre important lors de l'étape de mise en forme de film. Une viscosité trop faible amènera à un film trop fin et, à l'inverse, une viscosité trop importante conduira à un film trop épais et souvent inhomogène. Il faut donc trouver un compromis entre épaisseur (que l'on souhaite supérieure au micron, pour une quantité suffisante de chitosane) et homogénéité de l'épaisseur et de la surface. Dans ce contexte, une étude de la viscosité semble pertinente pour assurer la préparation de films corrects.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la viscosité d'une solution polymère comme la viscosimétrie capillaire ou la mesure de la viscosité par chute de bille. Dans les fiches techniques fournies lors de l'achat des biopolymères, les viscosités apparentes des chitosanes dissous à 1% en masse dans un 1% d'acide acétique sont de  $\nu_{\text{kit}} = 76 \text{ mPa.s}$  et  $\nu_{\text{sig}} = 20\text{-}300 \text{ mPa.s}$ . Cependant, comme cela a été montré précédemment les données fournisseurs ne sont pas toujours très fiables, nous avons donc préféré faire nos propres mesures de viscosité. Par ailleurs, pour le  $\text{C}_{\text{sig}}$ , la gamme reportée manque de précision.

Pour ces mesures, nous avons utilisé un appareil simple qu'est le viscosimètre à chute de bille. Le détail des conditions expérimentales est donné en annexe.

Plusieurs solutions ont été préparées, à 2 % ou 4 % en masse de chitosane, dans une solution à 3% d'acide acétique. Les valeurs de viscosité mesurées sur ces 4 solutions sont données dans le Tableau II- 8.

**Tableau II- 8 : Valeur de viscosité mesurée pour les deux chitosanes à deux concentrations différentes.**

	$\nu_{\text{sig}}$ (mPa.s)	$\nu_{\text{kit}}$ (mPa.s)
2 % en masse	48 $\pm$ 1	382 $\pm$ 4
4 % en masse	558 $\pm$ 3	6 234 $\pm$ 46

La lecture du tableau montre deux choses. Premièrement, les viscosités des solutions concentrées sont nettement supérieures à celles des solutions plus diluées, facteur 12 pour le  $C_{\text{sig}}$  et facteur 15 pour le  $C_{\text{kit}}$ . Deuxièmement, on note une grande différence de viscosité entre les deux qualités de chitosane, le chitosane sigma présente une viscosité beaucoup plus faible, presque dix fois inférieure à celle du chitosane kitozyme. Les différences de caractéristiques mises en évidence précédemment ont bien une influence considérable sur la viscosité des produits en solution. Dans ce contexte, il a été décidé de travailler avec des concentrations différentes en fonction du chitosane utilisé, de façon à avoir une viscosité de la solution à peu près identique et donc un film d'épaisseur équivalente. Dans nos études, il a été choisi de travailler avec une concentration de 2% pour le  $C_{\text{kit}}$  et de 4% pour  $C_{\text{sig}}$ .

### II.3.2 Comparaison des films de chitosane

De façon à mettre en évidence une éventuelle influence de la mise en forme des deux produits, sur le DA, la masse molaire et l'indice de cristallinité. Il a été décidé de reprendre toutes les caractérisations, cette fois sur les films.

Ainsi, des films de chitosane ( $C_{\text{kit}}$  et  $C_{\text{sig}}$ ), à partir de solution à 2 % et 4 % en masse, respectivement, ont été déposés sur un support aluminium puis laisser dans une étuve 24 h à 80 °C. Les films autosupportés ont été ensuite caractérisés par IR-ATR, RMN et SEC afin de déterminer l'impact de la mise en forme sur ces paramètres.

#### II.3.2.1 *Caractérisation par IR-ATR des films de chitosane*

Les spectres enregistrés sur les deux films, présentés sur la Figure II- 17, montrent pour les deux spectres une signature équivalente, à celle du  $C_{\text{sig}}$ , quelle que soit la qualité du chitosane.



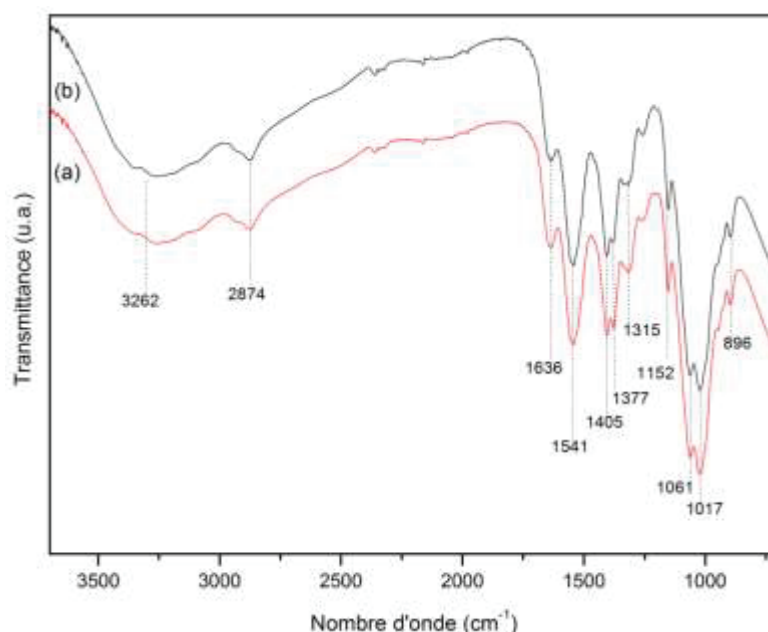


Figure II- 17 : Spectres FTIR-ATR de films autosupportés de C<sub>kit</sub> (a) et C<sub>sig</sub> (b).

Ce résultat peut paraître surprenant étant donné qu'une différence a été observée au niveau des groupements N-H en comparant des poudres (cf paragraphe II.2.1). Une explication peut provenir du fait que la solubilisation a lieu en milieu acétique. Ce composé ajouté en excès peut peut-être entraîner l'hydrolyse de la liaison N-hydroxyéthoxy et/ou de la liaison amide du C<sub>kit</sub> (possible en milieu acide).

### II.3.2.2 Caractérisations SEC et RMN <sup>1</sup>H des films de chitosane

Les films ont, également, été caractérisés par SEC et RMN du proton pour déterminer, les masses molaires moyennes et le DA des deux composés mis en forme. Les chromatogrammes et les spectres ne sont pas proposés ici mais le même type d'analyse que précédemment a été réalisé. L'ensemble des résultats est regroupé dans le Tableau II- 9.

Tableau II- 9 : Valeurs des masses molaires moyennes (M<sub>w</sub>, M<sub>p</sub>, M<sub>n</sub>) et des indices de polydispersité des biopolymères C<sub>sig</sub> et C<sub>kit</sub> mis en forme (les flèches indiquent l'évolution observée par rapport aux valeurs mesurées sur les chitosanes poudres).

	C <sub>sig</sub>	C <sub>kit</sub>
DA	↓ 14,21 ± 2	↓ 17,88 ± 2
M <sub>n</sub> (g/mol)	↓ 42 070 (± 1,46 %)	↑ 182 200 (± 2,23 %)
M <sub>p</sub> (g/mol)	↓ 35 450 (± 0,88 %)	↓ 162 500 (± 1,19 %)
M <sub>w</sub> (g/mol)	↓ 137 800 (± 0,77 %)	↑ 502 600 (± 1,27 %)
Đ (M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> )	↑ 3,28 (± 1,66 %)	↑ 2,76 (± 2,60 %)

En comparaison avec les résultats obtenus pour les polymères poudres, on note bien une différence en termes de DA avec une perte d'environ 3-4 % suite à la mise en forme du chitosane et cela quelle que soit son origine. Cependant, comme l'erreur (environ 2 %) sur la mesure est assez

proche de la différence observée, il est assez difficile de conclure sur le réel effet de la mise en forme du polymère sur son DA. Dans ce contexte, on considéra que le DA est peu affecté par la solubilisation et par la mise en forme des deux composés.

Concernant les masses molaires des films, on observe des évolutions différentes en fonction du film de chitosane évalué. Pour  $C_{sig}$ , les valeurs de  $M_n$ ,  $M_p$  et  $M_w$  ainsi que l'indice de polydispersité ( $\bar{D}$ ) diminuent suite à la mise en forme du polymère, traduisant ainsi une modification de la longueur des chaînes polymères et donc une dégradation du polymère. Ce résultat semble assez logique car la solubilisation en milieu acide peut expliquer cette conclusion. De façon plus surprenante, des résultats contraires sont observés pour le  $C_{kit}$ . En effet, les valeurs de  $M_w$ ,  $M_n$  et  $\bar{D}$  augmentent alors que le  $M_p$  diminue. Un tel résultat peut être expliqué par la présence d'agrégats lors de la solubilisation du film pour analyse SEC. Les masses molaires obtenues seront ainsi plus élevées que le chitosane de départ. Le traitement de mise en forme du chitosane entraîne ainsi une modification des polymères *via* notamment la formation d'agrégats.

#### II.3.2.3 Caractérisation des films de chitosane par ToF-SIMS

Cette dernière analyse, un peu annexe par rapport aux précédentes a été réalisée de façon à établir une base de données qui sera utile pour la suite des études. En effet, la spectrométrie de masse des ions secondaires en mode statique (ToF-SIMS) (principe général de cette technique est détaillé en annexe) est une technique d'analyse de surface très sensible permettant de déterminer les structures chimiques *via* la séparation en phase gazeuse d'ions atomiques et moléculaires en fonction de leur rapport masse/charge. Ainsi cette technique extrêmement performante et fiable sera très utile pour suivre les modifications (dégradation, contamination...) du chitosane. C'est également un outil tout à fait adapté à la caractérisation de composé sous forme de film car elle permet une analyse à l'extrême surface des matériaux, la profondeur correspondant à la première monocouche moléculaire. Par conséquent, l'utilisation de cette technique pour comparer les échantillons revêtus avec du chitosane et pour caractériser les composés chimiques présents en surface des différents échantillons au cours des étapes de synthèse nécessite, au préalable, la détermination des fragments caractéristiques de chaque polymère. L'analyse des deux films, n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les fragments caractéristiques de chacun des deux biopolymères, leurs signatures sont, ici, équivalentes. On a pu, ainsi, établir le tableau des fragments caractéristiques des deux chitosanes utilisés,  $C_{kit}$  et  $C_{sig}$  (Tableau II- 10).

Tableau II- 10 : Fragments négatifs et positifs caractéristiques des deux chitosanes.

	Ions négatifs	m/z mesuré	Ions positifs	m/z mesuré
Chitosane	$\text{CHO}_2^-$	44.998	$\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}^+$	60.043
$\text{C}_{\text{sig}}$ et $\text{C}_{\text{kit}}$	$\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}^-$	58.034	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$	61.027
	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$	59.015	$\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}^+$	96.049
	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^-$	71.016	$\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2^+$	97.029
	$\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}_2^-$	86.025	$\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2^+$	100.041
	$\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2^-$	100.045	$\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_2^+$	112.039
			$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$	144.065

*En conclusion, nous avons mis en évidence un impact de la mise en forme du chitosane sur ses caractéristiques, en lien avec l'étape de solubilisation. S'il est difficile de conclure sur l'évolution des DA, la structure chimique du  $\text{C}_{\text{kit}}$  et les masses molaires moyennes des deux composés ont sensiblement été modifiées.*

### III. Etude du simple dépôt du chitosane sur une surface de titane

Le recouvrement d'un substrat de titane par du  $\text{C}_{\text{sig}}$ , par « simple dépôt » a été étudié en tant que témoin négatif. Un test d'adhérence par *peel-test* (test de quadrillage de la surface à l'aide d'un peigne et application d'un scotch normé), a été réalisé afin de d'évaluer l'adhérence du chitosane au substrat titane. Après marquage de la surface, application du scotch puis retrait de ce dernier avec un angle de  $90^\circ$ , on remarque sur l'image de la surface enregistrée après test, que l'ensemble du revêtement est parti (Figure II- 18). L'absence de chitosane a été confirmée par IR. Ce résultat démontre l'absence d'adhérence du chitosane au titane.

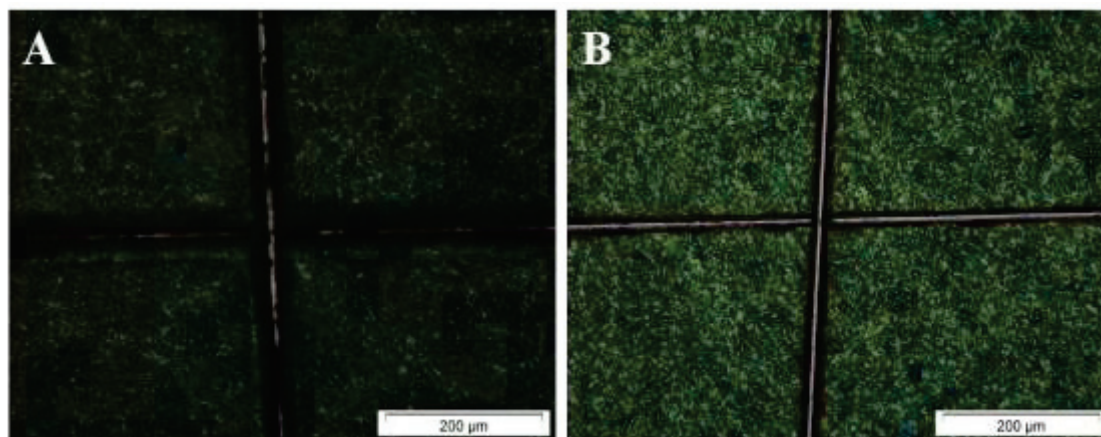


Figure II- 18 : Images optiques d'un échantillon simple dépôt avant (A) et après test d'adhésion par *peel test* (B).

Un second a été réalisé, pour évaluer la tenue de ce revêtement simplement déposé en milieu acide. Des échantillons ont été laissés 24 h dans deux solutions aqueuses acidifiées à pH 5 et à pH 3. Après retrait des échantillons, on observe l'absence totale de polymère à la surface du substrat (cette absence est confirmée par une analyse IR qui ne montre plus aucun signal caractéristique du CS). Ainsi, la dissolution du film de chitosane est complète à pH 3 et à pH 5.

*Aux vues de ces deux résultats préliminaires, il s'avère donc nécessaire de lier plus fortement le biopolymère au substrat. La solution proposée dans ce projet est la formation d'une liaison covalente entre biopolymère et substrat. Cependant, deux difficultés devront être contournées : le maintien du revêtement pendant 8 à 15 jours (durée de la phase de cicatrisation faisant suite à la pose d'un implant) et sa résistance en milieu acide pour supporter efficacement les variations de pH existantes dans la cavité buccale d'un patient.*

## IV. Greffage covalent de chitosane

De façon à améliorer la durabilité du revêtement de chitosane sur le substrat, la stratégie mise en œuvre consiste à greffer de façon covalente les chaînes de polymère à la surface du substrat métallique à base de titane. Comme décrit dans le chapitre I, il existe une bibliographie assez abondante sur le sujet et rapportant que plusieurs voies peuvent être envisagées.

Pour ce projet, un intérêt particulier a été porté à la formation d'une liaison amide connue pour sa bonne stabilité. La liaison amide (ou peptidique) s'établit entre une fonction amine apportée par le polymère et une fonction acide carboxylique. L'utilisation d'un organoalcoxysilane comme

agent de couplage a été retenu, étant donné que le greffage d'un alcoxysilane sur des surfaces de  $\text{TiO}_2$  a déjà été largement reporté. La formation d'une liaison peptidique impose, alors, la présence d'un groupement  $-\text{COOH}$  du côté de l'agent de couplage, présent directement sur le silane, ou apporté par un second composé de type acide. Ainsi nous avons choisi de travailler avec deux silanes, l'un portant une amine (APTES), il sera associé à l'anhydride succinique, et l'autre une fonction anhydride acide (TESPSA), ce dernier pouvant s'hydrolyser en acide carboxylique.

#### IV.1 Protocole de validation du revêtement de chitosane

Le cahier des charges imposé pour l'application visée porte sur plusieurs points. Le caractère antibactérien du revêtement, sa biocompatibilité et sa non toxicité sont les propriétés majeures attendues. Cependant, avant d'étudier ces propriétés, il faut s'assurer que le revêtement est homogène en surface et en épaisseur et adhérent. Un autre point clé à valider rapidement dans le processus de synthèse est la tenue du revêtement en conditions salivaires acides. En effet, le revêtement doit être maintenu dans la cavité buccale pendant la phase de cicatrisation, soit 8-15 jours et cela quelles que soient les conditions de pH. Il est connu que lors d'une infection bactérienne, comme lors de la péri-implantite, le pH à l'intérieur de la cavité buccale diminue fortement. Dans ce contexte, la tenue du revêtement en milieu acide sera systématiquement étudiée et considérée comme un jalon indispensable à la poursuite des caractérisations. En d'autres termes, si la tenue en milieu salivaire artificielle acide n'est pas validée, la voie devra être abandonnée. Ainsi, un protocole de caractérisation a été mis en place de façon à valider ou non la synthèse d'un revêtement (Figure II- 19).

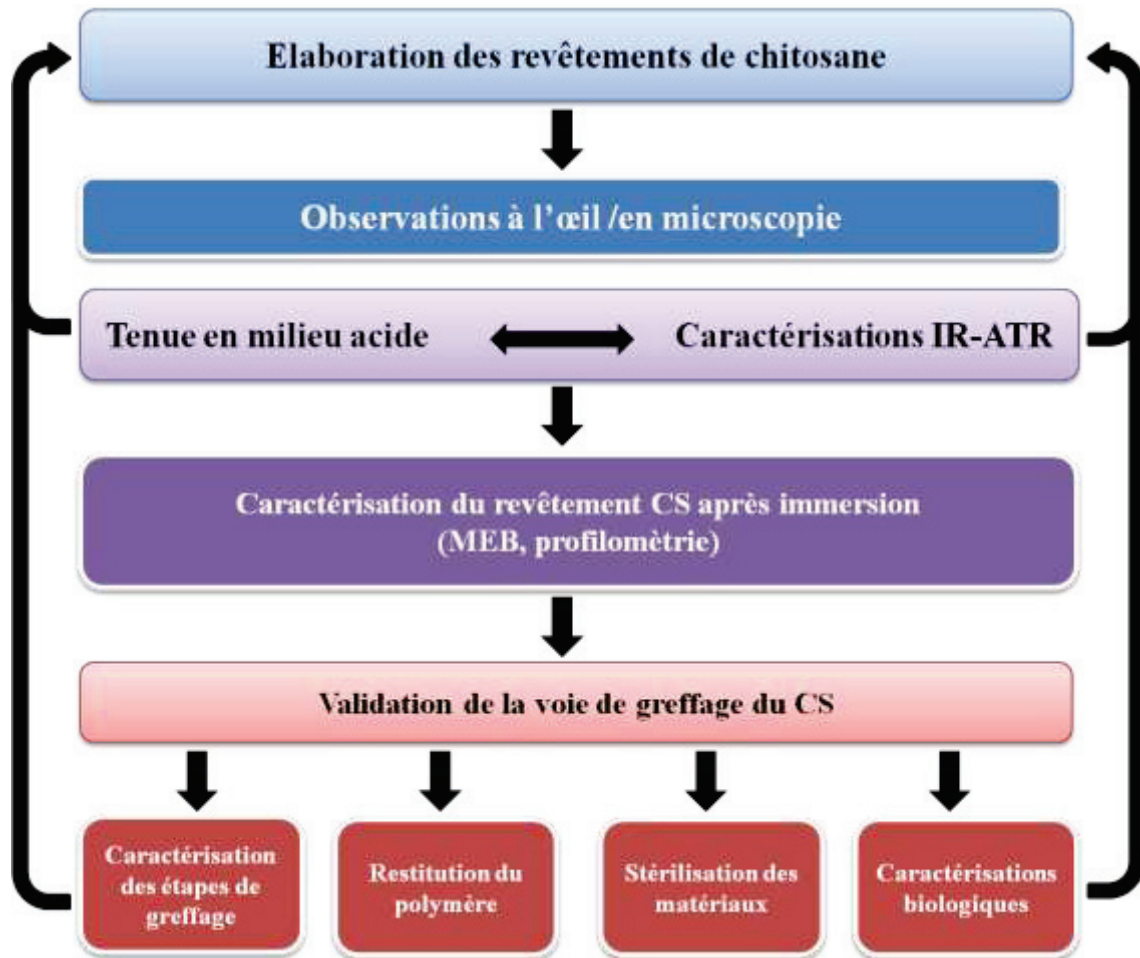


Figure II- 19 : Protocole de validation d'une voie de greffage.

Après sa synthèse, le revêtement est observé à l'œil pour détecter d'éventuels défauts macroscopiques. Une observation en microscopie optique permet ensuite de vérifier l'absence de défauts visibles à cette échelle et de confirmer l'homogénéité du revêtement. Ensuite, une analyse IR doit confirmer la présence du CS. A partir de là, une étude de tenue en milieu salivaire acide à deux valeurs de pH 3 et 5 est réalisée. Si le revêtement est toujours détecté par IR après immersion et rinçage, des observations MEB et des mesures en profilométrie sont alors réalisées pour évaluer la morphologie et l'épaisseur du revêtement. Si les caractérisations intermédiaires ne sont pas validées, la voie de synthèse sera reprise et modifiée. En revanche, si l'ensemble de ces caractérisations est approuvé alors la synthèse est considérée comme valide et des essais de reproductibilités sont menés. Avec l'étape de production à plus grande échelle validée, viennent ensuite, (i) l'étude de toutes les étapes du greffage par des techniques de caractérisation de surface, (ii) l'étude de la stérilisation car plusieurs techniques sont disponibles, (iii) l'étude de la restitution du biopolymère dans un milieu tampon, celle-ci devant être lente et contrôlée et (iii) l'évaluation biologique des revêtements qui comprend à la fois les propriétés biologiques et antibactériennes.

Concernant l'étude de la tenue du revêtement en milieu salivaire acide, dont le protocole est détaillé en annexe A4, le milieu choisi est un milieu salivaire artificiel auquel est ajouté une quantité d'acide acétique en fonction du pH expérimental choisi [32]. A noter que dans la cavité orale, le pH n'est pas le seul paramètre variant de façon significative, il y a également la température, les forces de frottement...

## IV.2 Méthode générale du greffage de chitosane

Comme annoncé en introduction de cette partie, deux organoalcoxysilanes ont été utilisés à la base de deux voies de greffage. La première (voie A) concerne l'utilisation successive du 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) et de l'Anhydride Succinique (AS) pour former l'agent de couplage qui doit réagir avec le CS. La seconde (voie B) utilise le TriEthoxySilylPropylSuccinic Anhydride (TESPSA) comme agent de couplage (Figure II- 20). Ces deux voies ont été étudiées en parallèle tout au long du projet.

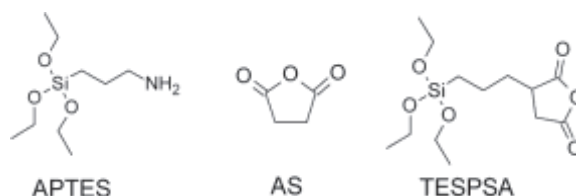


Figure II- 20 : Structures chimiques des agents de couplage utilisés.

Quelle que soit la voie de greffage mise en jeu, le mode opératoire général reste identique. Il est schématisé sur la Figure II- 21 et comprend cinq étapes :

- Prétraitement de la surface de titane : par lavage (mélange éthanol-acétone).
- Activation de la surface : cette étape permet la formation de sites Ti-OH en surface, nécessaire pour un greffage optimal du silane. Les substrats sont immergés dans une solution d'eau piranha, correspondant à un mélange d'acide sulfurique concentré et d'eau oxygénée (30 wt%) (v/v, 7/3).

*Remarque : Il est à noter qu'il existe d'autres méthodes d'activation d'une surface, comme par exemple l'immersion dans une solution alcaline, ou la passivation [33, 34]. Dans le cadre de ce projet, nous allons uniquement nous intéresser à l'activation par l'eau piranha.*

- Greffage covalent du silane: une solution d'alcoxysilane en milieu organique est préparée pour recouvrir le substrat activé afin de former des liaisons Ti-O-Si, et de fonctionnaliser ainsi la surface avec le groupement souhaité (NH<sub>2</sub> ou anhydride succinique). Avec la voie A, une étape supplémentaire permettant de lier un second composé est réalisée.
- Dépôt du biopolymère : le dépôt du biopolymère est réalisé par la méthode du *dip coating* (annexe).
- Séchage du revêtement : le dépôt est séché à l'étuve selon une durée et une température fixées.



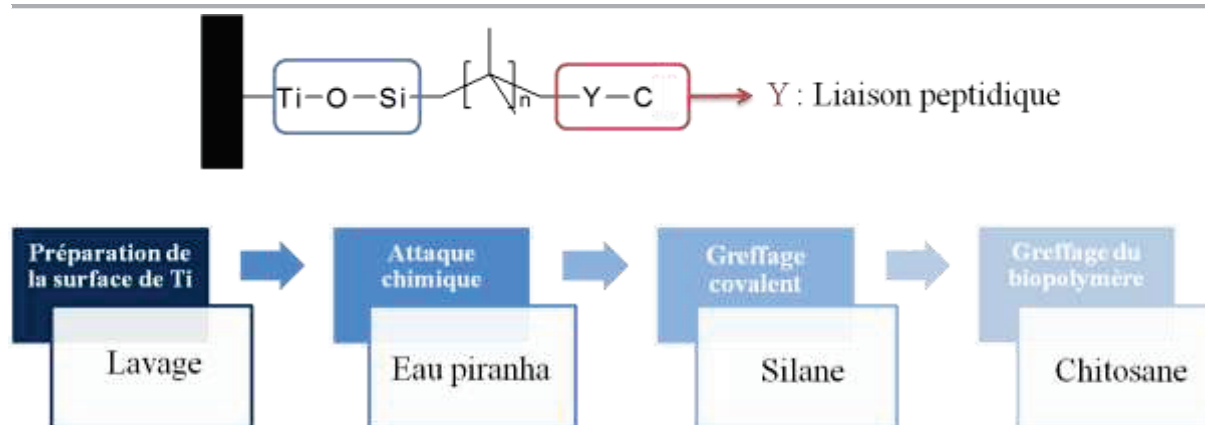


Figure II- 21 : Schéma des principales étapes du greffage du chitosane sur le substrat de titane.

### IV.3 Greffage covalent *via* la voie A

#### IV.3.1 Présentation du greffage

Parmi tous les amino-silanes existant, le 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES), est, souvent utilisé pour fonctionnaliser des surfaces en vue d'applications biologiques [35-37]. En effet, sa capacité à augmenter l'adhésion cellulaire et sa non-toxicité font de ce composé un produit intéressant dans l'élaboration de biomatériaux [38-40]. Cet organosilane est aussi employé pour fonctionnaliser des nanoparticules magnétiques, utilisées dans la détection de pesticides [41]. Il peut être utilisé seul, greffé à la surface à modifier, ou en association avec d'autres composés, tel que le glutaraldéhyde, afin de greffer des biomolécules comme des protéines [42] ou le chitosane *via* la formation d'une double liaison imine [43-45].

Dans le cadre de ce projet, l'APTES est associé à un composé organique : l'anhydride succinique (AS). Dans la littérature, ce dernier est utilisé pour fonctionnaliser des surfaces de silice, des nanoparticules, ou des molécules *via* des groupements carboxylique [46]. L'AS peut également être utilisé pour modifier le chitosane en lui apportant des groupements acide carboxylique par réaction avec les groupements amine du biopolymère [15, 47]. L'association APTES-AS est reportée dans la littérature pour fonctionnaliser des nanoparticules [48, 49], ainsi que des biocapteurs [50]. Par ailleurs, l'utilisation d'AS est reportée pour le greffage du chitosane sur une surface riche en groupements amine pour fonctionnaliser une surface textile [51]. C'est à partir de l'étude de ces différents travaux que nous avons proposé le procédé de greffage du chitosane *via* le système APTES- AS illustré dans la Figure II- 22 suivante :



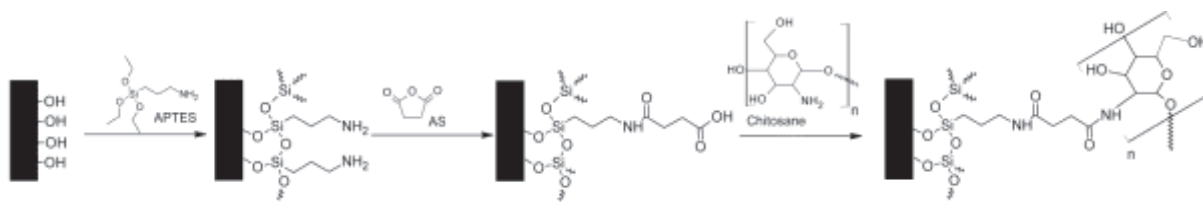


Figure II- 22 : Schéma de l'immobilisation du chitosane sur un substrat de titane via la méthode de greffage APTES-AS.

En résumé, la voie A conduit à la formation de deux liaisons amide en trois étapes.

#### IV.3.2 Mise au point des conditions expérimentales

Le succès du greffage d'un silane sur une surface dépend de nombreux paramètres (concentration, température, solvant, conditions d'hydrolyse...) et l'homogénéité et la reproductibilité de la couche ne sont pas toujours assurées. Afin d'optimiser l'étape du dépôt du silane, dont dépendra évidemment l'homogénéité et la reproductibilité du dépôt de chitosane, nous avons choisi avec soin les paramètres de synthèse.

Le solvant a été choisi en rapport avec la littérature, le toluène étant le solvant le plus couramment utilisé pour cette étape [34, 39, 40]. A partir de travaux antérieurs menés au laboratoire [52, 53], la fonctionnalisation des surfaces de titane a été réalisée, dans un premier temps, sous air et à température ambiante. La concentration en APTES est fixée à 3 % en volume dans le toluène anhydre. Les échantillons sont immergés 24 h dans la solution de silane. Puis le dépôt du SA est réalisé par immersion des échantillons dans une solution d'AS à 0,1 M dans du DiMéthyl Formamide (DMF) [48]. Une fois le chitosane déposé et le revêtement séché par traitement à 80°C pendant 24h, la validation du revêtement a été effectuée par test de tenue en condition acide. Le protocole expérimental détaillé est donné en annexe A4.

Cette voie de greffage dans les conditions opératoires exposées ci-dessus a été utilisée pour réaliser des échantillons qui ont été utilisés pour des tests antibactériens (chapitre III) et pour des caractérisations de surface d'échantillons (partie V de ce chapitre).

Cependant, un peu plus tard au cours de la thèse, lorsque nous avons envisagé de reproduire à nouveau ce mode opératoire pour la production de plus d'échantillons, nous avons été confrontés à un problème important de reproductibilité (essentiellement sur la tenue en milieu acide pH 3, qui n'était plus validée). Malheureusement, au jour d'aujourd'hui nous n'avons pas encore d'explication bien claire à fournir pour expliquer ce problème. Peut-être les réactifs ou solvants (pourtant commandés sous des références identiques) ne provenaient-ils pas exactement des mêmes lots ? Les paramètres d'hydrométrie ou de température étaient-elles différentes ? Dans tous les cas, nous n'avons pas été en mesure de reproduire ces revêtements en appliquant strictement le même protocole.

Dans ce contexte, les conditions de synthèse ont été réévaluées. Ainsi, de nombreuses expériences ont été menées en modifiant la température (20°C, 40°C), l'atmosphère (sous air, sous gaz inerte) et l'utilisation ou non de catalyseur (de type corbodiimide). Des résultats encourageants ont alors été obtenus, en terme de tenue en milieu salivaire acide, cependant la voie B, développée alors en parallèle, assurant une grande reproductibilité, il a été décidé de privilégier cette seconde voie.

## IV.4 Greffage covalent *via* la voie B

### IV.4.1 Présentation du greffage

La seconde voie étudiée dans ce projet concerne la formation d'une liaison amide simple en deux étapes seulement par l'intermédiaire du TriEthoxySilylPropylSuccinic Anhydride (TESPSA) qui apporte une fonction anhydride succinique à la surface du substrat. Dans la littérature, on reporte son utilisation pour différentes applications, telles que la fonctionnalisation de nanoparticules [54, 55] ou de surface pour des études d'adhésion cellulaire [56], ou en tant qu'agent de couplage pour la fixation de biomolécules [57, 58]. Eichler et *al.*, ont aussi utilisé ce silane pour greffer avec succès des polyamidoamine (PAMAM) NH<sub>2</sub>, pour lutter contre l'adhésion bactérienne [46].

Le schéma réactionnel du greffage de chitosane sur substrat de titane avec cet agent de couplage est le suivant :

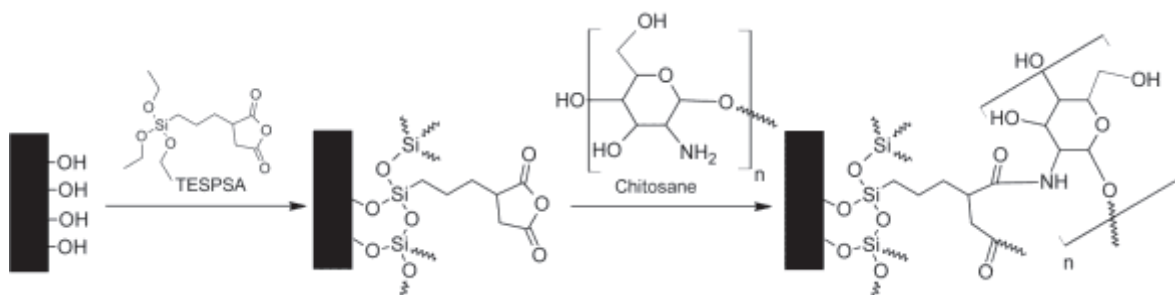


Figure II- 23 : Schéma de l'immobilisation du chitosane sur un substrat de titane *via* la méthode de greffage TESPSA.

### IV.4.2 Mise au point des conditions expérimentales

Plusieurs conditions opératoires ont été envisagées pour cette voie de greffage, avec modification du solvant (toluène, pentane), de la concentration en silane en solution (0,1 à 10%) et de la température de séchage des substrats après l'activation piranha. Deux protocoles expérimentaux permettent de préparer des échantillons qui résistent en pH salivaire acide (pH 5 et pH 3). Le Tableau II- 11 récapitule les paramètres dans les deux cas et les protocoles détaillés sont donnés en annexe A4.

Tableau II- 11 : Conditions opératoires pour les expériences réalisées avec la voie de greffage B.

	Sous air	Sous gaz inerte
Solvant	toluène	pentane
Température de séchage après activation à l'eau piranha	ambiante	150 °C
Quantité de silane	10 %	0,1 %
Température	ambiante	150 °C

Le premier protocole est basé sur des études antérieures au projet, menées au laboratoire [59]. Il consiste à immerger pendant 24 h, sous air, le substrat préalablement traité à l'eau piranha, dans une solution de TESPSA dans du toluène à 10% en volume [60]. Après lavage sous ultrasons, les échantillons sont recouvert de chitosane par *dip coating* et laisser sécher 24h à l'étuve. En lien avec des résultats de la littérature, nous avons cherché à optimiser ce protocole en travaillant sous gaz inerte pendant presque toute la durée du greffage et de diminuer la concentration de TESPSA à 0,1 % en volume dans du pentane [61]. Le fait de travailler sous atmosphère inerte augmente certes la difficulté d'une telle synthèse mais nous permet d'obtenir d'excellents résultats. Ainsi, le greffage selon la voie B sous atmosphère inerte est une solution fiable qui valide toutes les étapes du protocole de caractérisation (revêtement homogène, tenue en milieu salivaire acide, reproductibilité...). Elle représente, pour nous, la solution la plus pertinente.

*Remarque : Il a été testé l'ajout d'un catalyseur de type carbodiimide pour la formation de la liaison amide. Cependant, cette catalyse n'a pas permis d'améliorer sensiblement la tenue en milieu salivaire acide du revêtement.*

*Dans cette partie chimie de synthèse du revêtement de chitosane via l'établissement d'une liaison amide par greffage covalent, il a pu être mis au point plusieurs protocoles opératoires de synthèse permettant l'élaboration de revêtement répondant aux premières étapes du cahier des charges. Dans la suite du manuscrit (IV-couple substrat/greffage), des analyses de surface ont été réalisées pour améliorer la compréhension et la connaissance des différents systèmes. Dans ce contexte, plusieurs lots d'échantillons ont été préparés avec les méthodes de greffage A et B et ont été utilisés pour la suite des études.*

## V. Les couples substrat/greffage étudiés

Dans cette partie, les deux voies de greffage A et B ont été testées sur des substrats de différente nature et/ou présentant différents états de surface. De façon systématique, la surface de l'échantillon a été caractérisée après chacune des étapes du procédé de greffage. De même, l'évolution du revêtement au cours de son immersion en solution salivare acide en fonction de la voie de greffage et du substrat utilisé a été suivie.

Ainsi plusieurs échantillons provenant de différents couples « substrat/voie de greffage » ont été entièrement caractérisés. Le Tableau II- 12 reprend ces échantillons :

Tableau II- 12 : Couples « substrat/voie de greffage » étudiés dans le cadre de ce projet.

		Emplacement dans le manuscrit
Voie A	Voie de greffage A sur titane brut (Ti)	Annexe (A5)+résumé (V.1)
	Voie de greffage A sur un alliage de titane anodisé ( $T_{A6V \text{ anod}}$ )	Annexe (A5)
	<b>Voie de greffage A sur un alliage de titane poli (<math>T_{A6V \text{ poli}}</math>)</b>	Manuscrit (V.2)
Voie B	Voie de greffage B sur titane brut (Ti)	Annexe (A5)
	Voie de greffage B sur un alliage de titane anodisé ( $T_{A6V \text{ anod}}$ )	Annexe (A5)
	<b>Voie de greffage B sur un alliage de titane brillanté (<math>T_{A6V \text{ brill}}</math>)</b>	Manuscrit (V.3)

De manière à simplifier la lecture de cette partie, il a été fait le choix de présenter dans le corps du manuscrit uniquement les échantillons qui ont été utilisés pour les études bactériologiques ou de biocompatibilité (échantillons en gras). Cependant, l'ensemble des études représentant un travail conséquent et d'intérêt, il est détaillé en annexe et résumé ici au besoin.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec les docteurs **Julien Amalric** et **Céline Brunon**, tous deux appartenant à Science et Surface, société partenaire du projet.

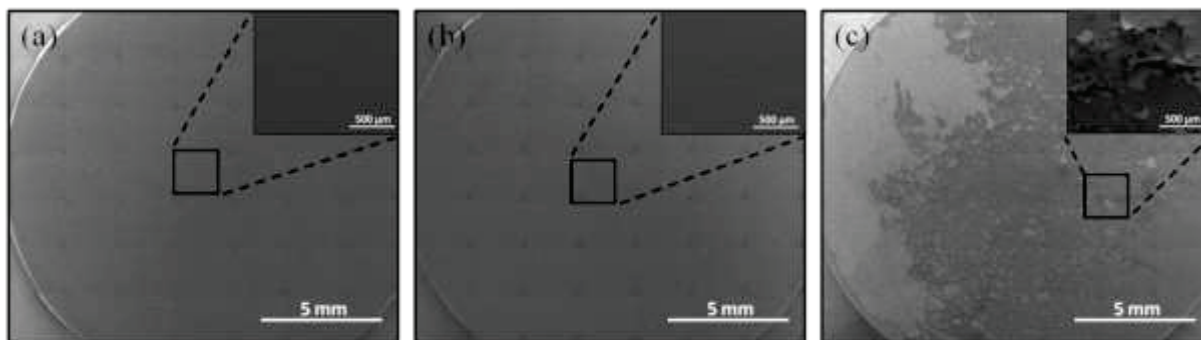
### V.1 Caractérisation des étapes de la synthèse d'un échantillon obtenu par la voie de greffage A sur Ti brut (T40) (résumé)

Ce travail exposé en annexe A5 a fait l'objet d'une publication soumise dans *Applied Surface Science* qui s'intitule « **Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance** ». L'objectif de cet article est double ; premièrement, il vise à évaluer précisément la chimie de surface au cours du greffage covalent de chitosane ( $C_{sig}$ ) sur un substrat en titane pur (Ti) et deuxièmement, il vise à étudier la résistance de ce revêtement polymère en milieu salivare acidifié. L'ensemble de l'étude a permis de dresser les conclusions résumées ci-après.

Toutes les étapes du greffage des deux agents de couplage (APTES et AS) ont été suivies et validées par XPS et ToF SIMS.

L'étape de silanation permet de recouvrir la surface de titane d'un dépôt de silane homogène et épais. L'ajout d'anhydride succinique entraîne une modification du revêtement silane (mise en évidence par imagerie ionique). Celle-ci se localisant essentiellement en périphérie de l'échantillon. La réaction entre l'anhydride succinique et l'APTES a pu être mise en évidence par l'analyse ToF-SIMS.

Le dépôt de chitosane sur le substrat est ensuite, clairement, mis en évidence par XPS, ToF-SIMS et IR-ATR. L'évolution du revêtement polymère avant et après immersion en milieu acide (pH 3 et pH 5) a été observée dans un premier temps par MEB. Les clichés MEB illustrent l'effet des traitements acide sur le revêtement polymère (Figure II- 24).



**Figure II- 24 : Images MEB en mode électrons secondaires des échantillons C<sub>sig</sub>SAPiTi (A), C<sub>sig</sub>SAPiTi – pH 5 (B) et C<sub>sig</sub>SAPiTi – pH 3 (C).**

Aucun changement en termes de contraste morphologique n'a été observé sur les échantillons C<sub>sig</sub>SAPiTi et C<sub>sig</sub>SAPiTi – pH 5. En revanche, suite à l'immersion à pH 3, un décrochement partiel du biopolymère a clairement été mis en évidence.

Les surfaces revêtues, immergées ou non en milieu acide, ont également été suivies par DSIMS, profilométrie 3D et spectroscopie infrarouge (IR-ATR). Les analyses DSIMS, associées avec les mesures d'épaisseur obtenues en profilométrie 3D, ont permis de suivre l'évolution de l'épaisseur du film du chitosane ainsi que de la composition en profondeur des revêtements. Les fragments suivis C<sup>+</sup>, Si<sup>+</sup>, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, CH<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, <sup>46</sup>Ti<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> sont présentés Figure II- 25.

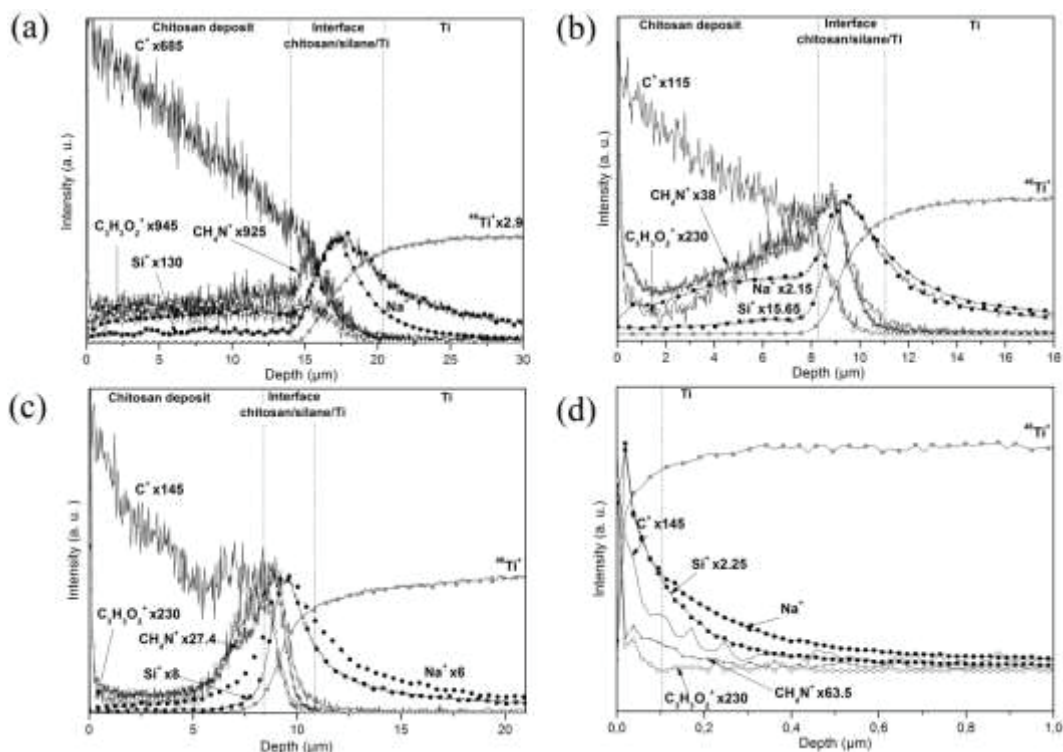


Figure II- 25 : Profils en profondeur par ToF-SIMS des fragments positifs et négatifs enregistrés sur CSAPiTi (a), CSAPiTi - pH 5 (b), et CSAPiTi - pH 3 en deux zones d'intérêt différents (c et d).

Trois zones ont ainsi pu être définies sur l'échantillon référence (Figure II- 25 a) : (i) une couche organique attribuable au chitosane et riche en ions  $C^+$ ,  $C_3H_3O_2^+$  et  $CH_4N^+$ , (ii) une zone d'interface entre le chitosane/agent de couplage/substrat Ti et (iii) et le substrat titane. L'évolution de l'intensité des ions  $CH_4N^+$  au niveau de l'interface, qui augmente à ce niveau puis diminue juste avant le maximum de détection du silicium est en accord avec l'hypothèse de la liaison entre les groupements amine du CS et le système APTES-AS.

Après immersion dans une solution à pH 5, les uniques changements observés pour le revêtement polymère sont une diminution de l'épaisseur et de la rugosité de surface (*cf* profilométrie 3D). Suite à l'immersion à pH 3, une hétérogénéité de surface a pu être mise en évidence avec pratiquement plus de traces du chitosane dans les zones détériorées mais toutefois la détection du silane à ces endroits (Figure II- 25 c et d).

Cette étude a également permis d'illustrer l'importance de la combinaison des méthodes de caractérisations plus couramment utilisées (IR-ATR, MEB, EDS et profilométrie 3D) à des méthodes fines d'analyses d'extrêmes surfaces comme l'XPS, le DSIMS et le ToF-SIMS pour caractériser précisément les étapes d'élaboration d'un revêtement polymère mais également son évolution en milieu tampon. Il est important de souligner que cette étude a permis également de fournir des fragments références pour les produits utilisés dans la suite de l'étude (chitosane  $C_{sig}$  et APTES).

## V.2 Caractérisation des étapes de la synthèse d'un échantillon obtenu par la voie de greffage A sur $T_{A6V \text{ poli}}$

Cette étude vise, d'une part, l'évaluation précise de la chimie de surface au cours du greffage covalent de chitosane selon la voie de greffage A sur un substrat en alliage de titane poli ( $T_{A6V \text{ poli}}$  à  $C_{sig}SAPi T_{A6V \text{ poli}}$ ) et d'autre part, le suivi de la résistance du revêtement polymère en milieu salivaire acidifié. Un autre objectif est de comparer la tenue du CS en termes d'épaisseur et de répartition sur la surface. Les échantillons étudiés ici sont indiqués dans le Tableau II- 13.

**Tableau II- 13 : Echantillons caractérisés au cours de cette étude.**

Substrats $T_{A6V \text{ poli}}$	Etape de la production du revêtement
$T_{A6V \text{ poli}}$	Surface initiale
$PiT_{A6V \text{ poli}}$	Traitement à l'eau piranha de la surface $T_{A6V \text{ poli}}$
$APiT_{A6V \text{ poli}}$	Dépôt de l'APTES sur la surface $PiT_{A6V \text{ poli}}$
$SAPiT_{A6V \text{ poli}}$	Réaction avec l'anhydride succinique sur la surface $APiT_{A6V \text{ poli}}$
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ poli}}$	Dépôt du chitosane sur la surface greffée $SAPiT_{A6V \text{ poli}}$
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ poli}}-pH \ 5$	Immersion du revêtement polymère à pH 5
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ poli}}-pH \ 3$	Immersion du revêtement polymère à pH 3

### V.2.1 Fragments caractéristiques de l'APTES en ToF-SIMS

L'analyse du silane seul par ToF-SIMS est réalisé pour mettre en évidence les fragments caractéristiques de l'APTES (Tableau II- 14), dont certains ont été sélectionnés, de façon à suivre l'évolution de ce composé au cours des différentes étapes du greffage.

**Tableau II- 14 : Fragments négatifs et positifs caractéristiques de l'APTES.**

	Ions négatifs	m/z mesuré	Ions positifs	m/z mesuré
APTES	$CN^-$	26.004	$Si^+$	27.975
	$SiO_2^-$	59.967	$SiHO^+$	44.979
	$SiHO_2^-$	60.975	$SiH_3O_2^+$	62.988
	$SiHO_3^-$	76.968	$SiH_3O_3^+$	78.984

Une analyse supplémentaire réalisée sur un film autosupporté du système APTES-AS a permis de démontrer que la réaction entre les groupements amine du silane et l'anhydride succinique a bien lieu. Ainsi, les fragments négatifs et positifs ( $C_4H_5O_3^+$ ,  $C_3H_3O^-$ ,  $C_5H_6NO_2^-$  et  $C_4H_3O_3^-$ ), attribuables à l'anhydride succinique et à la liaison amide attendue, ont pu être identifiés. La Figure II- 26 donne les intensités moyennes normalisées de chacun d'eux. Ces fragments ont été



suivis sur les échantillons avant et après la réaction avec l'anhydride succinique afin de contrôler l'efficacité de la réaction.

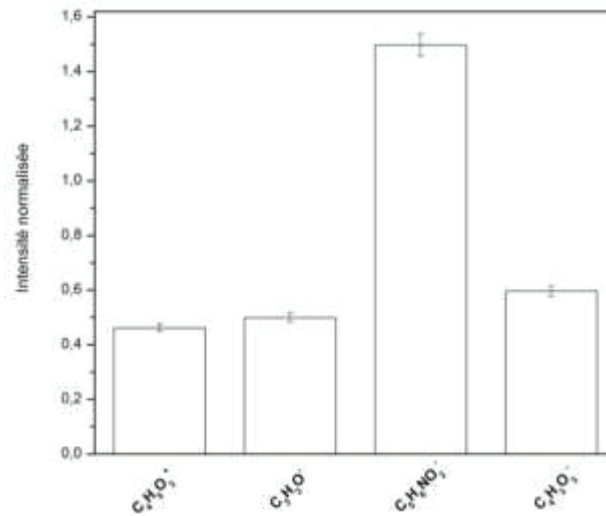


Figure II- 26 : Intensités normalisées moyennes des fragments négatifs et positifs de la réaction APTES +AS dans l'éthanol.

## V.2.2 Caractérisation des étapes de greffage

### V.2.2.1 Contrôle du dépôt de silane sur la surface traitée

Les étapes de greffage des agents de couplage (APTES et AS) ont été suivies par ToF-SIMS. La Figure II- 27 donne les intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs relevés pour les échantillons  $T_{A6V}$  poli,  $PiT_{A6V}$  poli,  $APiT_{A6V}$  poli.

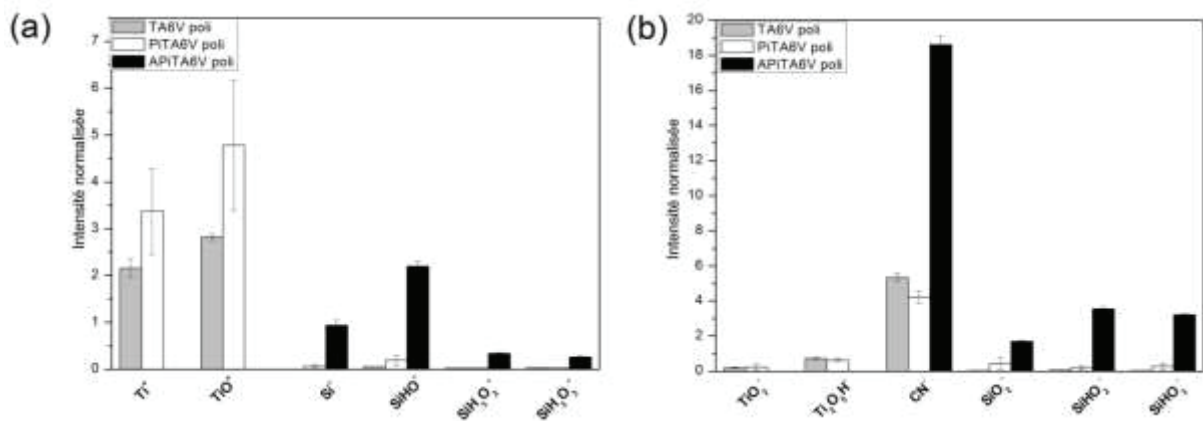


Figure II- 27 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs de  $T_{A6V}$  poli,  $PiT_{A6V}$  poli,  $APiT_{A6V}$  poli (a et b).

En comparant les résultats obtenus sur le substrat non traité et sur le substrat traité piranha, il apparaît une contamination du premier ( $T_{A6V}$  poli). En effet, les fragments avec du silicium, tels que  $Si^+$ ,  $SiO_2^-$  et  $SiHO_2^-$ , sont détectés et pourraient être attribués à des traces de PolyDiMethylSiloxane (PDMS).

Suite au traitement piranha, les pics caractéristiques du substrat, comme  $\text{Ti}^+$  et  $\text{TiO}_2^-$ , sont davantage détectés. Ce constat est associé à une diminution significative des pics attribuables à la contamination au PDMS. Par ailleurs, l'augmentation du ratio  $\text{TiO}^+/\text{Ti}^+$  est en accord avec une légère oxydation chimique de la surface et une présence de sites  $\text{Ti-OH}$ . Cependant lors des analyses, une hétérogénéité de surface a pu être mise en évidence, due à des zones plus ou moins oxydées sur l'échantillon (ainsi plus moins sensibles aux différentes pollutions).

L'étape de silanation a été suivie sur la surface polie par deux méthodes d'analyses ToF-SIMS, à la fois par spectroscopie de surface et de l'imagerie ionique de surface (Figure II- 27 et Figure II- 28).

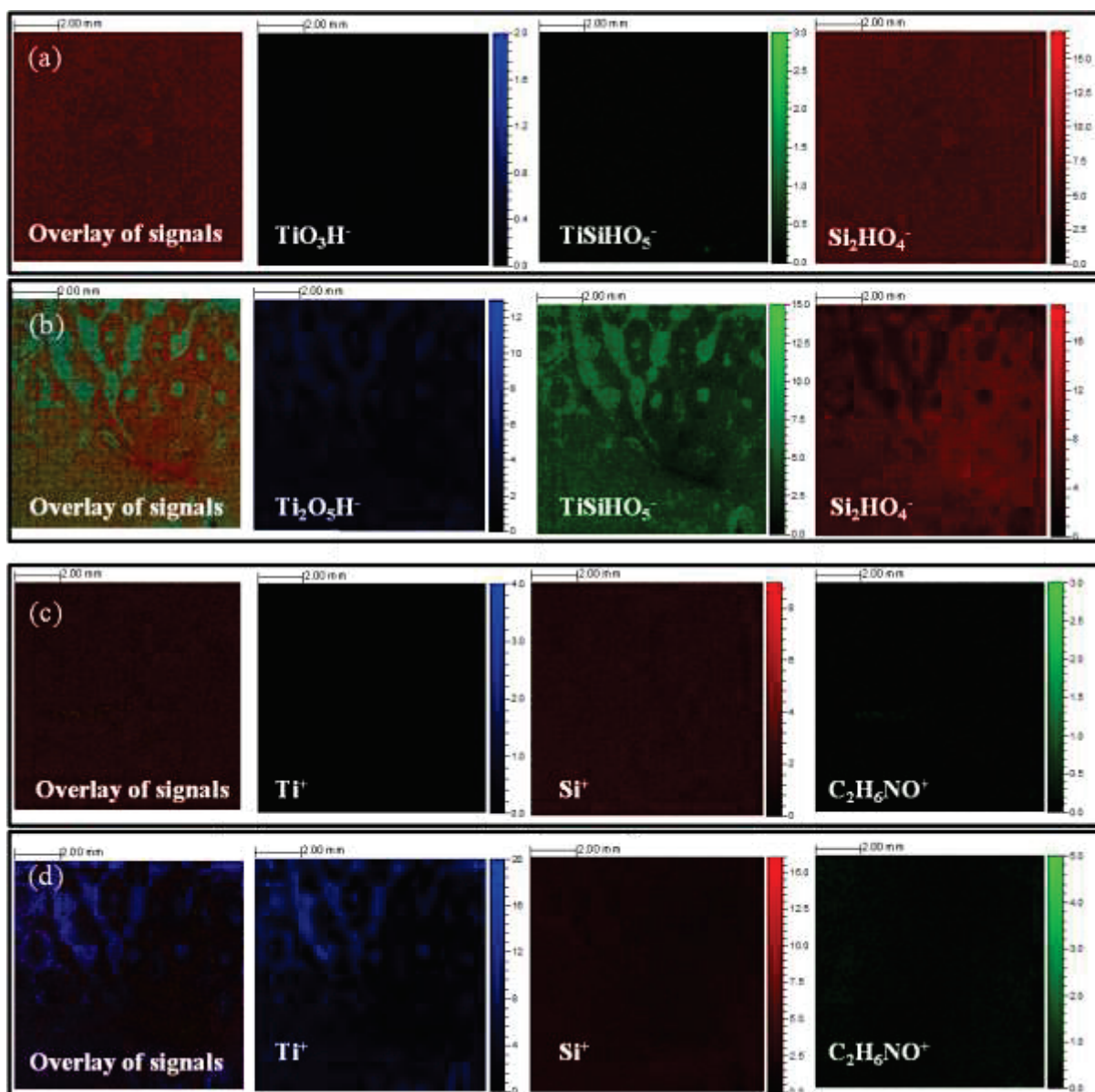


Figure II- 28 : Imagerie ionique des fragments positifs et négatifs de APiTA6V poli (a et c), SAPiTA6V poli (b et d).

Ces analyses permettent de détecter les fragments caractéristiques de l'APTES sélectionnés précédemment. Sur la surface polie, une augmentation significative des fragments caractéristiques de l'APTES a ainsi pu être mise en évidence (Figure II- 27). L'imagerie ionique confirme également ce résultat, avec une bonne homogénéité de la couche de silane observée *via* la détection d'une répartition homogène de l'ion  $\text{Si}^+$  (Figure II- 28 c). De même, les suivis des ions  $\text{Ti}^+$  et  $\text{TiSiHO}_5^-$ , ce dernier caractérisant la liaison entre le silane et le substrat, suggèrent par endroit au moins une monocouche, même si sa détection par endroit va dans le sens d'une épaisseur moindre sur certaines zones de l'échantillon (Figure II- 28 a).

De plus, l'absence des fragments  $\text{SiC}_3\text{H}_{12}\text{NO}^+$  et  $\text{SiC}_7\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$ , proches de l'ion moléculaire de l'APTES seul, est en accord avec la réaction du silane avec le substrat et vraisemblablement la formation des liaisons Si-O-Si. Par ailleurs, la répartition homogène des ions  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$  observés en imagerie ionique (Figure II- 28 a), permet de conclure qu'une réaction de cross-polymérisation des silanes serait bien répartie en surface.

***En lien avec les analyses présentées en annexe de ce manuscrit, les étapes de greffage du silane ne semblent pas dépendantes du type de substrat utilisé dans le cadre de cette thèse. Par ailleurs, la détection importante de groupements azotés, caractéristiques de la fonction terminale amine de l'APTES, à l'extrême surface peut être interprétée comme une orientation préférentielle des groupements  $\text{NH}_2$  de coté de l'interface silane/air.***

#### V.2.2.2 Contrôle de l'état de surface suite à la réaction avec l'AS

Lors de l'étape de réaction avec l'anhydride succinique, une modification significative de la surface a été observée sur l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V}} \text{ poli}$  par imagerie ionique (Figure II- 28). L'observation de l'intensité des ions  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_5\text{H}^-$  et  $\text{Ti}^+$  sur l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V}} \text{ poli}$  a clairement mise en évidence une réduction de l'épaisseur (peut-être même en densité) de la couche d'APTES greffée partout sur la surface (Figure II- 28 b-d). Celle-ci est néanmoins toujours détectée. L'évolution du fragment  $\text{TiSiHO}_5^-$  est en accord avec une réduction de l'épaisseur du revêtement jusqu'à la monocouche et/ou mise à nu du substrat.

*Remarque : Au cours des analyses ToF-SIMS en imagerie ionique pour l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V}} \text{ poli}$ , une interférence non identifiée a perturbé le suivi de l'ion  $\text{TiO}_3\text{H}$ , nous avons donc décidé de suivre plutôt l'ion  $\text{Ti}_2\text{O}_5\text{H}$  qui, malgré une intensité de signal légèrement différente, donne des images équivalentes à celles obtenues avec  $\text{TiO}_3\text{H}$ .*

La réaction avec l'AS conduit alors à deux types de zones aléatoirement réparties sur la surface, une zone où les fragments caractéristiques de l'APTES sont faiblement détectés et une seconde zone où au contraire, ces fragments sont plus intenses, traduisant une couche plus épaisse et/ou plus dense.

Dans ce contexte, il est assez difficile de mettre en évidence la réaction avec l'anhydride succinique. Malgré un signal faible, les fragments considérés comme caractéristique de la liaison amide entre l'APTES et AS (cf partie V.2.2), ont été détectés sur SAPiT<sub>A6V</sub> poli en comparaison avec APiT<sub>A6V</sub> poli (Figure II- 29). Après réaction avec l'AS, on remarque une augmentation significative de ces fragments caractéristiques, ce qui confirme la réaction entre l'AS et l'APTES pour former une liaison amide en surface.

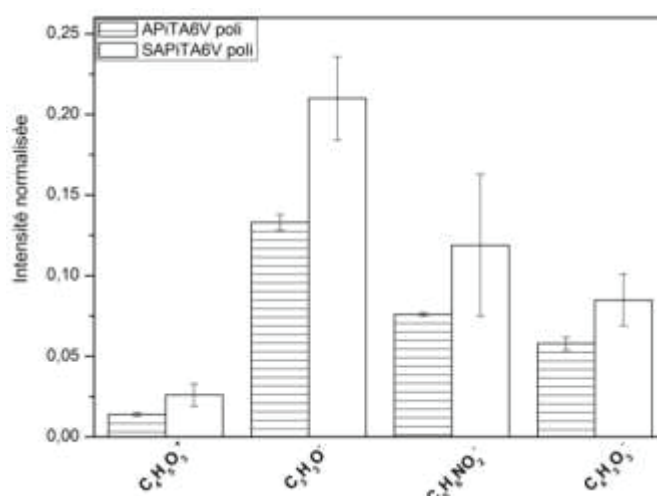


Figure II- 29 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs des échantillons APiT<sub>A6V</sub> poli et SAPiT<sub>A6V</sub> poli.

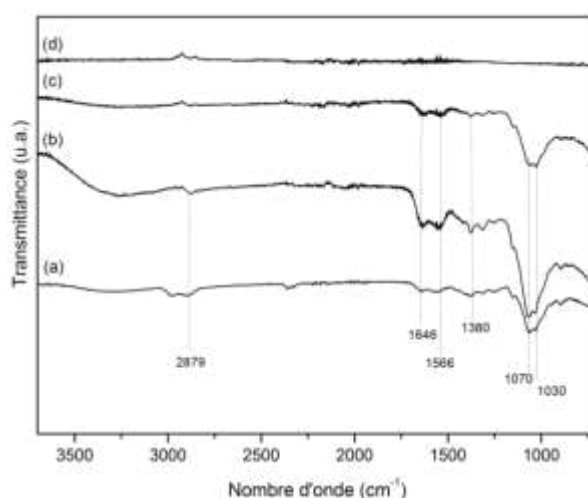
Remarque : L'ion  $C_3H_3O^+$  n'est pas uniquement attribué à la liaison anhydride, en effet, d'autres espèces oxygénées présentes à l'extrême surface peuvent libérer ce type d'ions, d'où l'observation ici d'une intensité plus élevée de cet ion par rapport aux autres fragments.

*En conclusion de ces analyses, les changements de composition de surface lors des étapes de greffage des agents de couplage sont équivalents pour les trois types de substrat étudiés (cf résultats en annexe A5 pour les surfaces alliage de titane anodisée et titane brut). Il n'y a pas d'influence de l'état de surface initiale sur les étapes de greffage, excepté en ce qui concerne la présence de contaminations (surface polie la plus contaminée).*

### V.2.3 Contrôle du revêtement biopolymère et étude de la résistance salivaire

#### V.2.3.1 *Suivi du revêtement chitosane par IR-ATR*

L'analyse des échantillons par infrarouge en mode ATR, permet de vérifier la présence du chitosane sur les échantillons. Cependant, ces analyses ne sont pas considérées comme quantitatives en raison, (i) de l'hétérogénéité des surfaces de dépôt et (ii) et de la différence d'épaisseur du dépôt de chitosane. Les spectres enregistrés sur les échantillons CSAPiT<sub>A6V poli</sub> avant et après immersion sont donnés sur la Figure II- 30.



**Figure II- 30 : Spectres infrarouge des échantillons C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V poli</sub> (a), C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V poli</sub> – pH 5 (b et c), et C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V poli</sub> – pH 3 (d).**

Suite à l'immersion des échantillons revêtus dans une solution acide à pH 5, le chitosane est toujours bien détecté. Par contre, après immersion à pH 3, plus aucun signal relatif au chitosane n'a pu être mis en évidence et ce, quelle que soit la zone analysée. Le traitement à pH 3 entraîne le décrochement de tout le chitosane présent.

#### V.2.3.2 *Contrôle du dépôt CS par ToF-SIMS*

Pour confirmer ces premières conclusions, des analyses par ToF-SIMS en mode spectroscopie et en imagerie ionique ont été réalisées sur les mêmes échantillons et les fragments caractéristiques du chitosane ont été suivis (Figure II- 31).

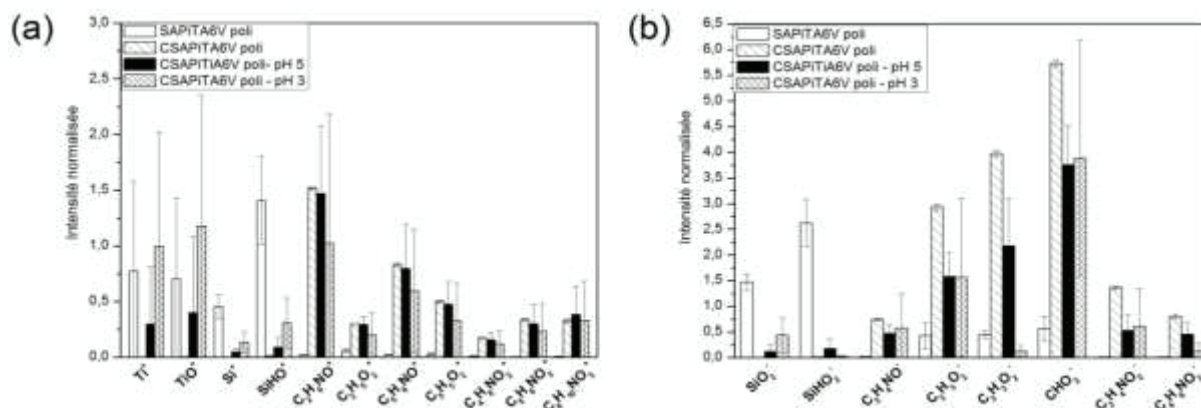


Figure II- 31 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs de SAPiT<sub>A6V</sub> poli, C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V</sub> poli, C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V</sub> poli – pH 5 et C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V</sub> poli – pH 3 (a et b).

Le chitosane est logiquement bien visible sur C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V</sub> poli et la diminution de l'intensité des fragments caractéristiques à la fois du silane et du substrat va dans le sens d'un dépôt épais du biopolymère.

Après traitement en milieu acide à pH 3 et à pH 5, le dépôt du chitosane apparaît détérioré, voir plus détecté par endroit (Figure II- 31). Cependant, alors que le CS n'est plus détecté par IR (profondeur sondée de plusieurs microns), il est tout de même mis en évidence par ToF-SIMS (profondeur sondée = 1 nm). L'imagerie ionique confirme ces résultats (donné en annexe). On ne peut pas conclure, ici, sur la localisation de la rupture entre le chitosane et le substrat (au niveau de la liaison APTES-AS et chitosane, ou au niveau de la liaison du silane au substrat).

D'autres analyses ont donc été réalisées pour déterminer précisément l'impact de l'immersion acide sur les revêtements polymères (en termes de perte d'épaisseur, d'évolution de la composition de la matrice).

### V.2.3.3 Etude de l'épaisseur des films de CS par DSIMS

L'analyse en spectrométrie de masse des ions secondaires en mode dynamique (DSIMS) permet d'obtenir un profil de répartition en profondeur en ions positifs des éléments majeurs et de toutes les espèces ioniques. Cette analyse permet de comparer l'épaisseur du revêtement des échantillons revêtus chitosane avant et après immersion en milieu acide. La localisation de la couche de silane intermédiaire *via* cette technique, permet ainsi d'avoir des informations sur la couche de chitosane déposée ainsi que sur la présence de silane dans les zones de décrochement. La Figure II- 32 récapitule l'ensemble des profils obtenus sur les échantillons. L'épaisseur du revêtement organique (chitosane) peut être mesurée à partir du temps d'érosion ionique nécessaire pour éliminer la couche.



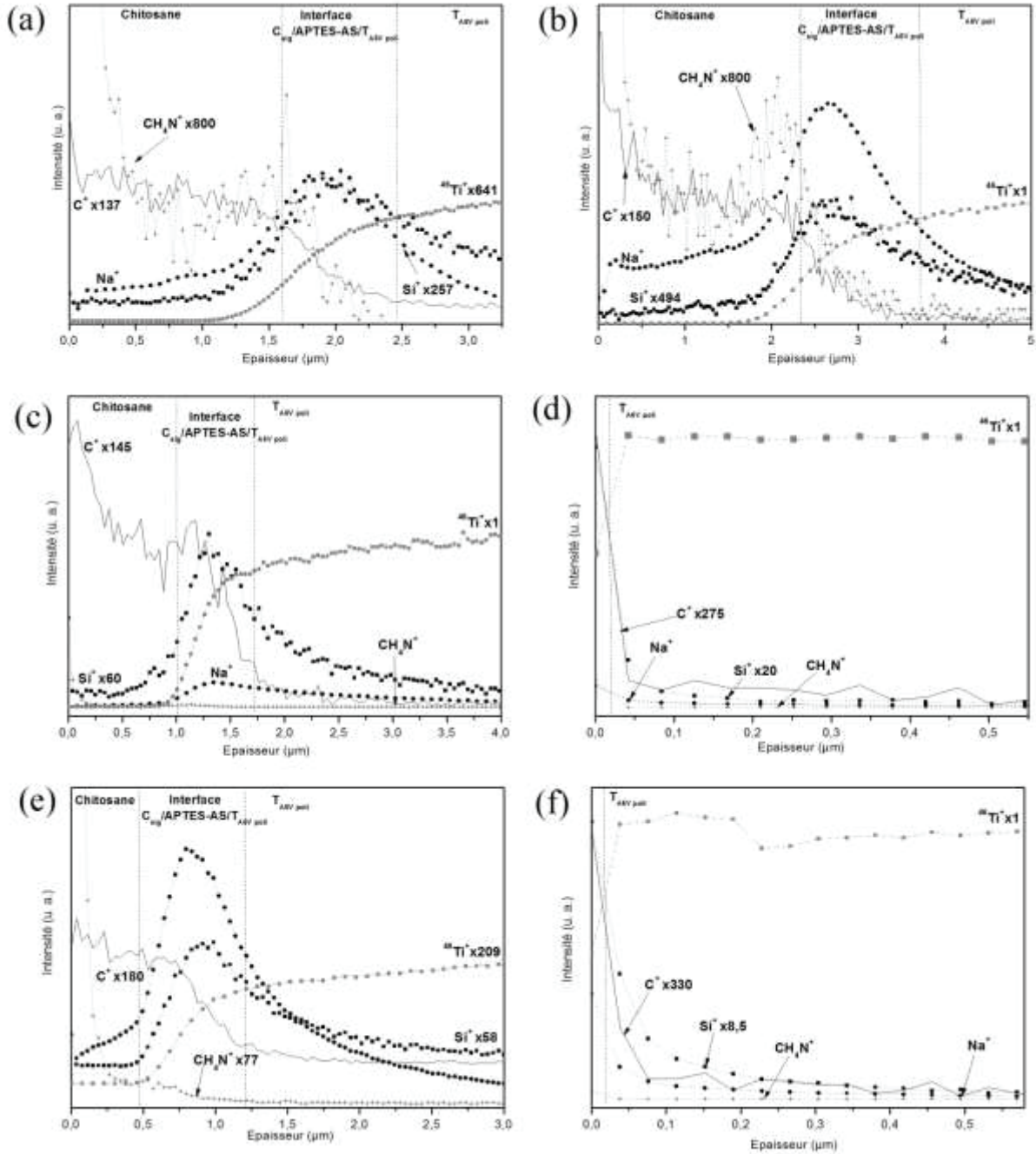


Figure II-32 : Profils en profondeur par ToF-SIMS des fragments positifs mesurés sur  $\text{C}_{\text{sig}}\text{SAPiT}_{\text{A6V poli}}$  (a et b),  $\text{C}_{\text{sig}}\text{SAPiT}_{\text{A6V poli}} - \text{pH } 5$  (c et d) et  $\text{C}_{\text{sig}}\text{SAPiT}_{\text{A6V poli}} - \text{pH } 3$  en deux zones d'intérêt différents (e et f).

Remarque :

- Les profils sont présentés en échelle linéaire, ce qui implique l'utilisation de facteurs multiplicatifs permettant de s'affranchir des différences de sensibilité pour mieux distinguer les couches et mieux localiser les espèces dans l'empilement. On considère que la couche de chitosane est éliminée lorsque l'intensité de  $\text{C}^+$  avant l'interface a diminué de 50 % ou bien lorsque l'intensité de  $^{46}\text{Ti}^+$  a atteint 50 % de sa valeur après l'interface. Contrairement à la première étude, nous avons choisi de ne pas présenter ici le suivi de l'intensité des ions



$C_3H_3O_2^+$  (fragment caractéristique du CS), en raison de la faible détection de ces fragments en fonction des échantillons analysés.

- Grâce aux vitesses d'abrasion des couches de chitosane obtenues précédemment, nous pouvons déterminer l'épaisseur des films de chitosane avant et après traitement acide.

L'échantillon CSAPiT<sub>A6V poli</sub> peut être divisé en trois zones (Figure II- 32 a et b). La première correspond au film de chitosane C<sub>sig</sub> (détection des fragments C<sup>+</sup> et CH<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), celle-ci diminue progressivement jusqu'à la seconde zone attribuée à la transition C<sub>sig</sub>/APTES-AS/T<sub>A6V poli</sub>. Cette seconde zone se caractérise par une augmentation puis une diminution de l'intensité de l'ion Si<sup>+</sup>, attribuée à la couche de silane. De la même façon, toujours sur cette seconde zone, on observe l'augmentation puis la diminution de l'intensité des ions CH<sub>4</sub>N<sup>+</sup> qui sont localisés à l'interface entre le substrat et la couche organique, juste avant la détection du maximum de l'ion silicium. Ces résultats sont en accord avec une liaison amide entre les groupements amine du chitosane et le système de couplage APTES/AS (cf V.1). La dernière zone correspond à la détection du support (augmentation de l'intensité des ions isotopes <sup>46</sup>Ti<sup>+</sup>).

Quel que soit l'échantillon (CSAPiT<sub>A6V poli</sub>, CSAPiT<sub>A6V poli</sub>-pH5 et CSAPiT<sub>A6V poli</sub>-PH3), une différence significative de l'épaisseur du chitosane peut être observée à différents endroits d'un même échantillon. Les deux traitements acides présentes deux types de zones, une zone où il reste du chitosane et une autre zone où le chitosane a été fortement dégradé (Figure II- 32 c, d, e et f). Au niveau des zones de décrochement, on remarque que les fragments caractéristiques de la couche organique (C<sup>+</sup> et CH<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) ainsi que les ions Si<sup>+</sup> sont rapidement éliminés lors de l'abrasion par DSIMS, signe de la détérioration quasi-totale du film de chitosane mais également du silane.

De façon générale, les dépôts de chitosane sur substrat T<sub>A6V poli</sub> résistent peu en milieu salivaire à pH 3 et à pH 5.

Un récapitulatif des épaisseurs du revêtement chitosane avant et après traitement en milieu acide pour les surfaces polies a été réalisé dans le Tableau II- 15.

**Tableau II- 15 : Evolution de l'épaisseur du revêtement CS sur T<sub>A6V poli</sub> avant et après immersion en milieu acide pH 3 et pH 5.**

Epaisseur du revêtement (μm)		
C <sub>sig</sub> SAPiT <sub>A6V poli</sub>	1,87 ± 0,61	
	Mesure au point 1	Mesure au point 2
C <sub>sig</sub> SAPiT <sub>A6V poli</sub> -pH 5	0	1,39
C <sub>sig</sub> SAPiT <sub>A6V poli</sub> -pH 3	0	0,87

D'une manière générale, les valeurs reportées dans le tableau montrent bien une hétérogénéité de l'épaisseur de chitosane déposé sur la surface. Cette épaisseur peut varier du simple au double selon la zone.

Après traitement en milieu acide à pH 5, la perte d'épaisseur pour la surface polie est faible mais des zones de décrochement complet du chitosane sont observées. Après immersion à pH 3, l'épaisseur du revêtement chitosane a fortement diminuée avec également des zones de décrochement complet du chitosane par endroit.

*En résumé des résultats de l'ensemble des caractérisations réalisées sur le greffage A sur différents états de surface (annexe et manuscrit), on peut conclure que les étapes de greffages sont équivalentes quels que soient la nature chimique du substrat (Ti ou TA6V) ou l'état de surface (brute, anodisée ou polie). Par contre, des observations différentes ont été réalisées sur le comportement de la couche de chitosane lorsqu'elle est immergée en solution acide. Le Tableau II- 16 reprend les valeurs importantes des caractérisations de l'évolution de la couche de chitosane.*

**Tableau II- 16 : Récapitulatifs des résultats obtenus pour la voie A sur les trois types de surface étudiées.**

	Surface Ti	Surface T <sub>A6V</sub> anod			Surface T <sub>A6V</sub> poli	
	Annexe A5+ <i>résumé</i> (V.1)	Annexe A5			Manuscrit (V.2)	
Etapes de greffage	Changement de composition de surface comparable lors des étapes du procédé					
Epaisseur du C <sub>sig</sub>	15,95 ± 1,13 µm	7,04* µm			1,87 ± 0,61 µm	
Dégradation à pH 5	Perte d'épaisseur	Perte d'épaisseur			Perte d'épaisseur + décrochement du C <sub>sig</sub>	
Epaisseur du C <sub>sig</sub> après pH 5	9,56 ± 0,11 µm	5,33* µm			0	1,39 µm
Dégradation à pH 3	Perte d'épaisseur + décrochement du C <sub>sig</sub>	Perte d'épaisseur + décrochement du C <sub>sig</sub>			Perte d'épaisseur + décrochement du C <sub>sig</sub>	
Epaisseur du C <sub>sig</sub> après pH 3	11,40 ± 2,90 µm	0,76 µm	0,42 µm	0	0	0,87 µm

\* en raison de l'homogénéité des surfaces, une seule mesure d'épaisseur a été effectuée par DSIMS.

Après traitement en milieu acide à pH 5, tous les échantillons présentent une perte d'épaisseur plus ou moins marquée. Le substrat T<sub>A6V</sub> anod est ainsi le support où la perte d'épaisseur par rapport à la surface initiale est la moins importante. Dans le cas de la surface polie, cette perte d'épaisseur s'accompagne d'un détachement complet du chitosane par endroit.

Suite à l'immersion en milieu acide à pH 3, tous les échantillons présentent à la fois une perte d'épaisseur et un détachement partiel du chitosane déposé. Dans les cas des surfaces anodisée et polie, l'épaisseur de chitosane restante est similaire. Le dépôt résiste mieux au traitement à pH 3 en

termes d'épaisseur pour l'échantillon Ti. Cependant en termes de superficie recouverte par le chitosane, la surface la plus performante est la surface anodisée.

***Bien que la voie de greffage A permette une certaine tenue du revêtement de CS en milieu acide (pH 5), l'épaisseur de la couche diminue significativement suite à l'immersion à pH 3.***

On remarque que l'étape d'ajout de l'anhydride succinique peut être problématique. En effet, les caractérisations de surface mettent en avant la modification de la couche de silane suite à cette étape (diminution et endommagement). Dans le même sens, même si les fragments permettant de suivre la liaison amide ont été détectés, leurs intensités restent faibles et laissent supposer que le rendement de cette réaction est faible.

### V.3 Etude de la voie de greffage B sur une surface brillantée

Cette dernière étude a été réalisée avec le procédé de greffage que nous avons considéré comme le plus pertinent dans la partie élaboration. Il s'agit du greffage selon la voie B sous atmosphère inerte sur une surface en alliage de titane brillantée et utilisant du chitosane de grade médical. Les échantillons étudiés sont récapitulés dans le Tableau II- 17.

**Tableau II- 17 : Résumé des échantillons analysés dans cette étude.**

Substrats T <sub>A6V brill</sub>	Etape de la production du revêtement
T <sub>A6V brill</sub>	Surface initiale
PiT <sub>A6V brill</sub>	Traitement à l'eau piranha
TPiT <sub>A6V brill</sub>	Dépôt du TESPSA sur la surface activée par le traitement piranha
C <sub>sig</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub>	Dépôt du chitosane sur la surface greffée TESPSA
C <sub>sig</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> –pH 5	Immersion du revêtement polymère à pH 5
C <sub>sig</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> –pH 3	Immersion du revêtement polymère à pH 3

#### V.3.1.1 Fragments caractéristiques du TESPSA en ToF-SIMS

De la même manière que précédemment, pour suivre précisément le greffage de tous les intermédiaires et en particulier du silane (TESPSA) par ToF-SIMS, il est nécessaire de connaître les fragments caractéristiques de la signature du TESPSA. Ceux sélectionnés à partir du spectre de référence sont donnés dans le Tableau II- 18. Il est logique de constater plusieurs fragments

similaires entre APTES et TESPSA, ces deux organosilanes ne se différenciant que par leurs groupements fonctionnels.

**Tableau II- 18 : Fragments négatifs et positifs caractéristiques du TESPSA**

	Ions négatifs	m/z mesuré	Ions positifs	m/z mesuré
TESPSA	SiO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	59.967	Si <sup>+</sup>	27.975
	SiHO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	60.975	SiHO <sup>+</sup>	44.979
	SiHO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	76.968	SiH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	62.991
	CHO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	44.999	SiH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	78.984
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sup>-</sup>	45.034	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	55.019

### V.3.1.2 Contrôle des étapes du greffage du TESPSA

#### - Caractérisation de la chimie de surface par X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Les analyses XPS ont été effectuées sur les échantillons T<sub>A6V brill</sub>, PiT<sub>A6V brill</sub> et TPiT<sub>A6V brill</sub>. Les compositions des éléments atomiques sont données dans le Tableau II- 19. Les mesures sont réalisées en deux zones d'intérêts différents.

**Tableau II- 19 : Compositions en éléments atomiques exprimés en pourcentage sur les échantillons T<sub>A6V brill</sub> déterminées by XPS. Autres = contaminations en surface comme S, Ca, Zn.**

% atomique	T <sub>A6V brill</sub>	PiT <sub>A6V brill</sub>	TPiT <sub>A6V brill</sub>
C1s (%)	34,8 ± 0,9	30,7 ± 0,4	54,1 ± 0,3
N1s (%)	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,7	2,8 ± 0,3
O1s (%)	46,9 ± 0,6	49,6 ± 0,3	32,2 ± 0,3
Ti2p (%)	13,3 ± 0,3	12,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Si2p (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,9 ± 0,7
Al2p (%)	2,6 ± 0,1	4,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Autres (%)	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,7	0,0 ± 0,0

Premièrement, à la vue des résultats, on peut conclure que tous les échantillons sont pollués par des composés organiques et azotés (contamination industriel). Suite au traitement piranha, le pourcentage de carbone diminue, même s'il est toujours détecté à la surface de titane PiT<sub>A6V brill</sub> (impossible de s'affranchir complètement de cette contamination). Le pourcentage d'oxygène augmente, avec en parallèle une augmentation des contaminations qui masquent partiellement la surface.

Suite à l'étape de greffage du silane, on observe comme attendu une augmentation des intensités des signaux relatifs au carbone et au silane tandis que le substrat titane n'est plus détecté (épaisseur de la couche de silane supérieur à 10 nm). Le dépôt de silane déposé est ainsi bien homogène sur le substrat de titane T<sub>A6V brill</sub>. Par ailleurs, la déconvolution du signal relatif à

l'élément carbone C1s (en annexe) des deux échantillons  $\text{PiT}_{\text{A6V brill}}$  et  $\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$ , permet de distinguer une augmentation de la teneur en liaisons  $\text{O}=\text{C}-\text{O}$  pour l'échantillon  $\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$  (à 289 eV). En comparaison avec les valeurs obtenus sur le TESPAS seul, on peut supposer que le dépôt riche en silicium et en liaison  $\text{O}=\text{C}-\text{O}$  correspond bien au greffage avec succès du silane sur la surface  $\text{T}_{\text{A6V brill}}$ .

### - Contrôle du dépôt de silane par ToF-SIMS

Les échantillons ont été analysés par ToF-SIMS avant et après dépôt du TESPAS (Figure II-33). Suite au dépôt de silane, on observe un masquage complet du substrat, ainsi qu'une augmentation significative des fragments caractéristiques du silane. Par ailleurs, l'absence des fragments moléculaires  $\text{SiC}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_6^+$  et  $\text{SiC}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_7^-$  sur la surface  $\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$  va dans le sens d'une réaction effective entre la surface et le silane et probablement également à une réaction de cross-polymérisation entre deux silanes.

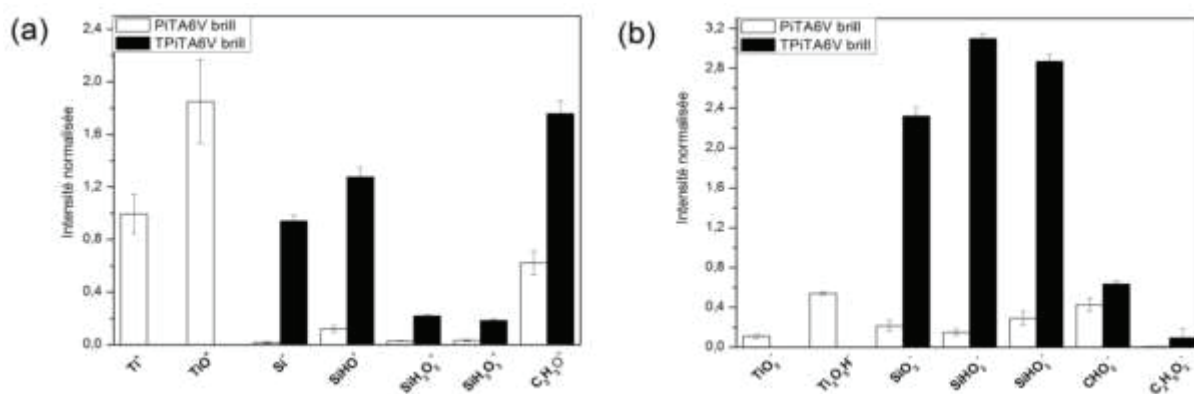


Figure II- 33 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs de  $\text{PiT}_{\text{A6V brill}}$ ,  $\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$  (a et b).

#### V.3.1.3 Contrôle du dépôt de chitosane et étude de sa résistance en milieu salivaire

### - Evaluation de l'épaisseur du chitosane par profilométrie optique

Des mesures effectuées en profilométrie optique 3D ont montré que la couche de chitosane  $\text{C}_{\text{kit}}$  a une épaisseur variable en fonction de la zone sondée, allant de 700 nm, en périphérie, à plus de 10  $\mu\text{m}$  au centre de la pastille (images de profilométrie 3D en annexe A5) avec une moyenne de  $7,77 \pm 2,18 \mu\text{m}$  d'épaisseur lors des mesures des cratères de chitosane.

### - Mise en évidence du dépôt de CS par IR-ATR

Le contrôle du dépôt de chitosane  $\text{C}_{\text{kit}}$  a été validé par des caractérisations infrarouge (Figure II- 34 a et b).

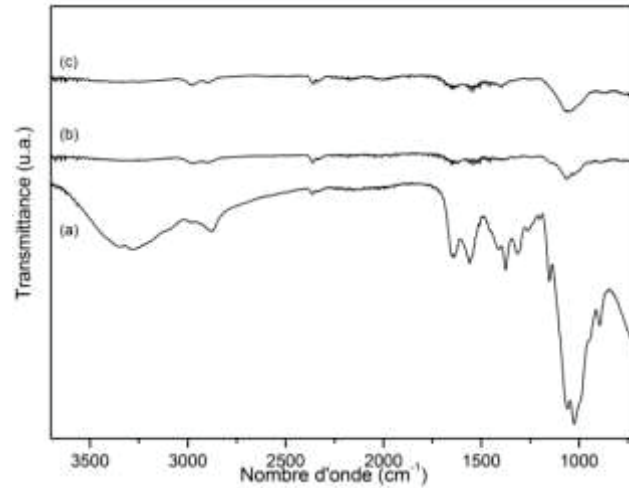


Figure II- 34 : Spectres infrarouge enregistrés sur les des échantillons  $C_{kit}SAPiT_{A6V}$  brill (a),  $C_{kit}SAPiT_{A6V}$  brill – pH 5 (b), et  $C_{kit}SAPiT_{A6V}$  brill – pH 3 (c).

Suite aux immersions en milieu acide, on peut observer visuellement une tenue du chitosane après 24 h d’immersion en milieu acide pH 5 et pH 3. Suite aux analyses IR, on observe la signature caractéristique du chitosane  $C_{kit}$ , bien que l’intensité soit relativement faible.

#### - Morphologie de surface par MEB

Les clichés MEB enregistrés sur les échantillons avant et après immersion à pH 3 prouvent le maintien du polymère, même après le traitement le plus drastique (Figure II- 35).

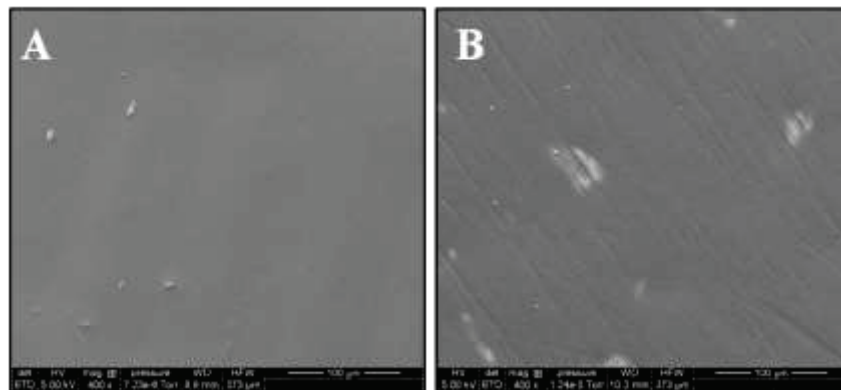


Figure II- 35 : Images MEB en mode électrons secondaires des échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill (A) et  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill - pH 3 (B).

#### - Chimie de surface par ToF-SIMS

Suite à l’analyse ToF-SIMS, la présence des fragments caractéristiques du chitosane  $C_{kit}$  est bien retrouvée sur l’échantillon  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill. En ce qui concerne les échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill - pH 3 et  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill - pH 5, la présence de chitosane est également détectée sur les surfaces. Cependant, on note un fort masquage des fragments du chitosane à cause d’une contamination importante de la surface, en sels alcalins de type KCl, NaCl ou phosphate de calcium ( $Ca_3(PO_4)_2$ ),

provenant de la solution salivaire artificielle. Du fait de ces contaminations, on ne peut pas conclure si le chitosane est dégradé ou non.

### - Profils DSIMS

L'analyse DSIMS de l'échantillon avant immersion a été réalisée et les profils en profondeur des fragments positifs mesurés sur  $C_{kit}SAPiT_{A6V\ brill}$  à deux zones d'intérêt différents de l'échantillon sont donnés sur la Figure II- 36.

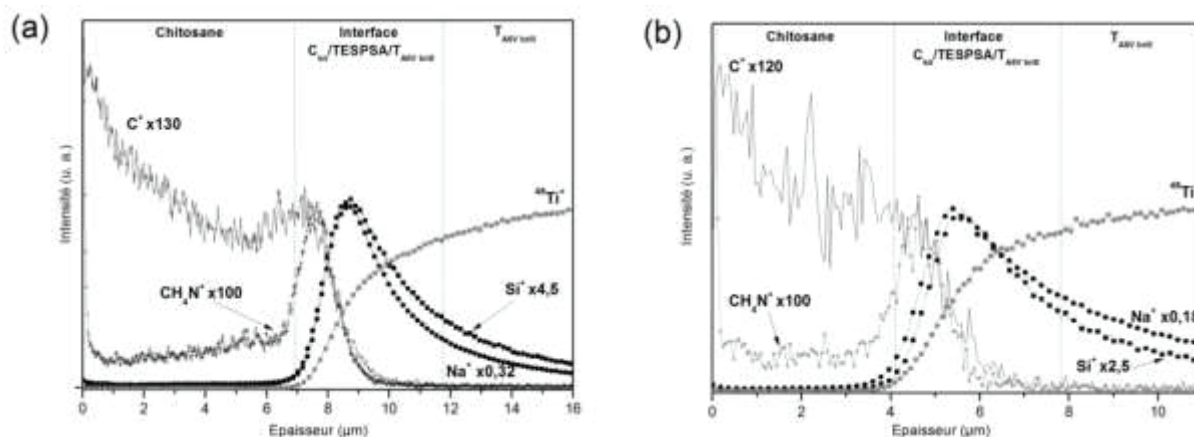


Figure II- 36 : Profils en profondeur par ToF-SIMS des fragments positifs mesurés sur  $C_{kit}SAPiT_{A6V\ brill}$  à deux zones d'intérêt différents de l'échantillon (a et b).

Sur l'échantillon, on retrouve bien la succession des trois zones (couche organique attribuée au chitosane puis interface  $C_{kit}-TESPSA-T_{A6V\ brill}$  et enfin substrat nu  $T_{A6V\ brill}$ ) visibles sur les deux graphes de la Figure II- 36.

En ce qui concerne les données brutes obtenues pour les deux échantillons après traitement en milieu acide, les profils DSIMS mesurés sont difficilement exploitables car les différentes mesures semblent sujettes à des effets de matrice et/ou de charges dues aux différentes traces de la solution salivaire (*cf* contamination partie ToF-SIMS). L'évolution de l'épaisseur des couches organiques restantes ne peut pas ainsi être clairement étudiée dans ce cas présent, mais elles permettent de confirmer toutefois la présence du biopolymère en surface. En effet, les profils mesurés montrent qu'il n'y a pas de pénétration directe dans le substrat à partir de la surface, donc qu'il y a bien une certaine épaisseur de couche organique qui serait bien le chitosane  $C_{kit}$ .



*En conclusion de ces analyses, l'immersion en milieu salivaire a donc fortement contaminé la surface du revêtement chitosane  $C_{kit}$  mais ce dernier est toujours présent sur le substrat  $T_{A6V}$  brillant. Le greffage d'un revêtement de chitosane sur un substrat en alliage de titane brillanté via la voie de greffage B, apparaît ici comme la voie la plus prometteuse, en lien spécifiquement avec sa tenue en milieu salivaire acide (pH 3 et pH 5). C'est donc la voie qui a été sélectionnée et qui sera étudiée dans la suite du manuscrit.*

## VI. Application de la voie sélectionnée à la fabrication d'un prototype

Parallèlement à la mise au point et l'optimisation du revêtement de chitosane sur une surface modèle, il nous a semblé intéressant de tester le dépôt sur un prototype d'implant, de façon à montrer que le procédé développé en laboratoire est transposable sur un outil industriel. Plus précisément, dans le cadre de ce projet, il a été choisi par le consortium d'utiliser une vis de cicatrisation et non un implant dentaire. La présence de la vis de cicatrisation dans la cavité orale n'est que temporaire et elle sera retirée après quelques semaines ou quelques mois pour être remplacée par le pilier prothétique sur lequel sera fixé la prothèse (Figure II- 37).

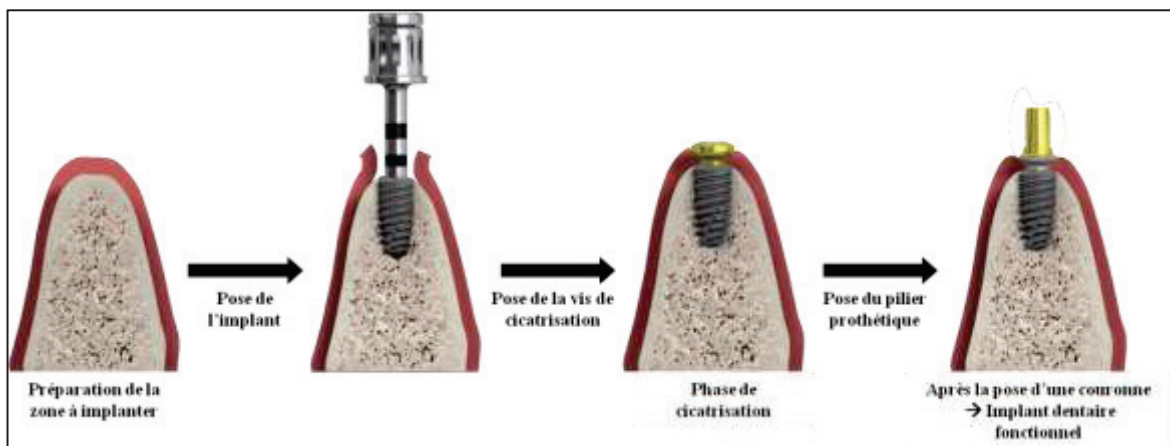


Figure II- 37 : Illustrations des différentes étapes nécessaires lors de la pose d'un implant dentaire avec une phase de cicatrisation (images fournies par Global D).

Comme cela est illustré sur la Figure II- 38, il n'est pas nécessaire de recouvrir entièrement la vis de cicatrisation, seule la partie en contact étroit avec les tissus mous doit être revêtue.

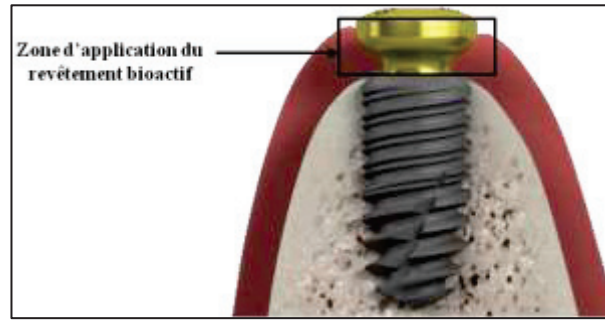


Figure II- 38 : Représentations de la zone à revêtir.

## VI.1 Application de la voie sélectionnée

### VI.1.1 Adaptation du protocole expérimental

La transposition du protocole expérimental de laboratoire à l'échelle du prototype demande nécessairement une adaptation. Dans ce sens, Global D nous a fourni un lot de prototypes avec des indications précises quant aux zones à revêtir (Figure II- 39) ou non.

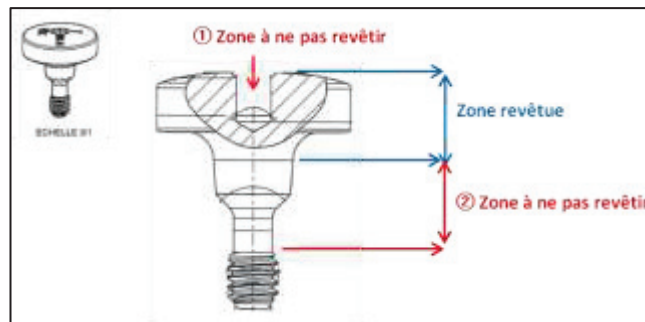


Figure II- 39 : Schéma du prototype et localisation précise des zones à revêtir ou non (images fournies par Global D).

En ce qui concerne les zones à ne pas revêtir, une solution efficace a été trouvée pour la zone ②. En effet cette zone est, normalement vissée sur l'implant lors de la pose chez le patient. L'implant en question est alors utilisé comme masque (en se visant sur la zone ②) pour ainsi éviter le dépôt du revêtement polymère. En revanche, il a été décidé, dans un premier temps, de ne pas tenir compte de la zone ①, celle-ci sera donc recouverte et une solution devra être trouvée, dans un second temps, pour la combler avec un matériau neutre tel que le Téflon.

Expérimentalement, nous avons préparé, d'une part, un dispositif en Téflon (Figure II- 40) permettant de fixer plusieurs vis de cicatrisation et d'autre part, nous avons dû adapter la dimension de la verrerie de façon à pouvoir immerger complètement les vis.

Ensuite, toutes les étapes du protocole de dépôt selon la voie B (TESPSA et  $C_{kit}$ ) ont été réalisées en respectant les atmosphères, concentrations, durées et températures. La différence principale du montage utilisé par rapport au montage laboratoire est que les prototypes sont

maintenus en position verticale lors de l'étape de séchage après dépôt du chitosane par *dip-coating*. Le risque, dans ces conditions, est d'avoir une accumulation de polymère au niveau de la zone incurvée de l'échantillon.

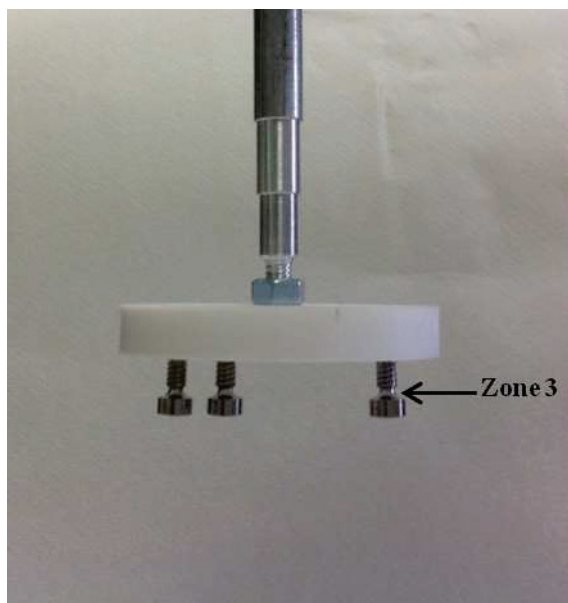


Figure II- 40 : Montage expérimental pour application de la voie sélectionnée aux vis de cicatrisation.

### VI.1.2 Caractérisations des échantillons

Après séchage en étuve, les vis traitées présentent un léger changement de couleur en comparaison avec le prototype non revêtu, laissant penser que du chitosane est bien présent. Les échantillons ont été caractérisés avant et après revêtement par microscopie (MEB) et par spectroscopie infrarouge en mode ATR.

#### VI.1.2.1 Détection du dépôt de $C_{kit}$ par IR-ATR

Des analyses IR (en mode ATR) ont été réalisées afin de mettre en évidence la présence du dépôt sur le prototype. Les spectres enregistrés sur les vis nue et recouverte sont proposés sur la Figure II- 41 et comparés à un spectre enregistré sur une surface modèle  $C_{kit}TPiT_{A6V\text{ brill}}$ . Premièrement, on peut observer sur le spectre enregistré sur la vis de départ (Figure II- 41 c), la présence d'un signal vers  $1090\text{ cm}^{-1}$ , non attendu et sans doute attribué à une contamination due probablement à l'emballage. Ensuite, la comparaison des deux spectres obtenus sur vis et surface modèle revêtues (Figure II- 41 a et b) montre bien une signature équivalente et caractéristique du chitosane (cf partie II de ce chapitre). En effet, même si l'intensité des signaux présents sur le spectre de la vis est plus faible (peut-être en lien avec la position de l'objet lors de l'analyse), la présence du chitosane sur le prototype après la voie de greffage est bien confirmée.

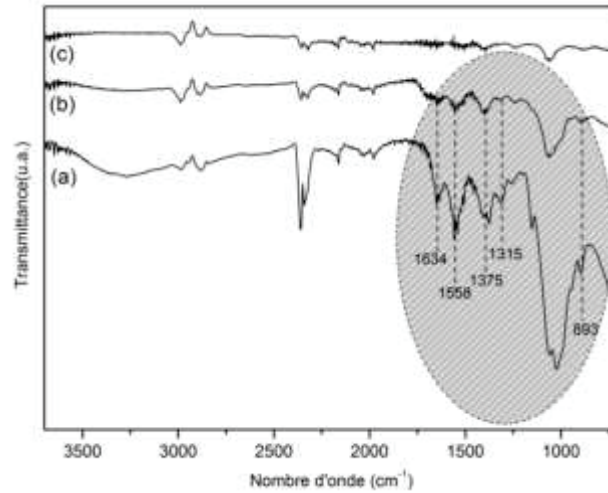


Figure II- 41 : Spectres infrarouge (IR-ATR) d'une surface modèle C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V</sub> brill (a), d'un prototype revêtu par le procédé (b), d'un prototype non revêtu (c).

#### VI.1.2.2 Analyse topographiques et chimiques des surfaces

Des observations MEB ont été réalisées sur les deux vis, nue et recouverte par le biopolymère. Cependant, la vis présente au moins trois zones d'intérêt comme cela est illustré sur la Figure II- 42. Dans ce sens, plusieurs observations ont été faite de façon à prendre en compte le maximum de zones (Figure II- 42 et Figure II- 43).

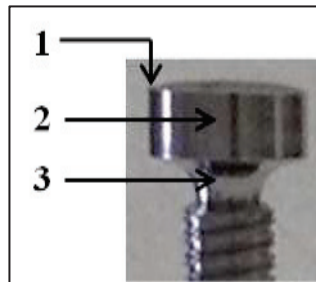


Figure II- 42 : Illustration des trois zones correspondant à des états de surface différents du prototype.

Les images enregistrées sur les différentes zones et les différents échantillons sont proposés sur la Figure II- 43.

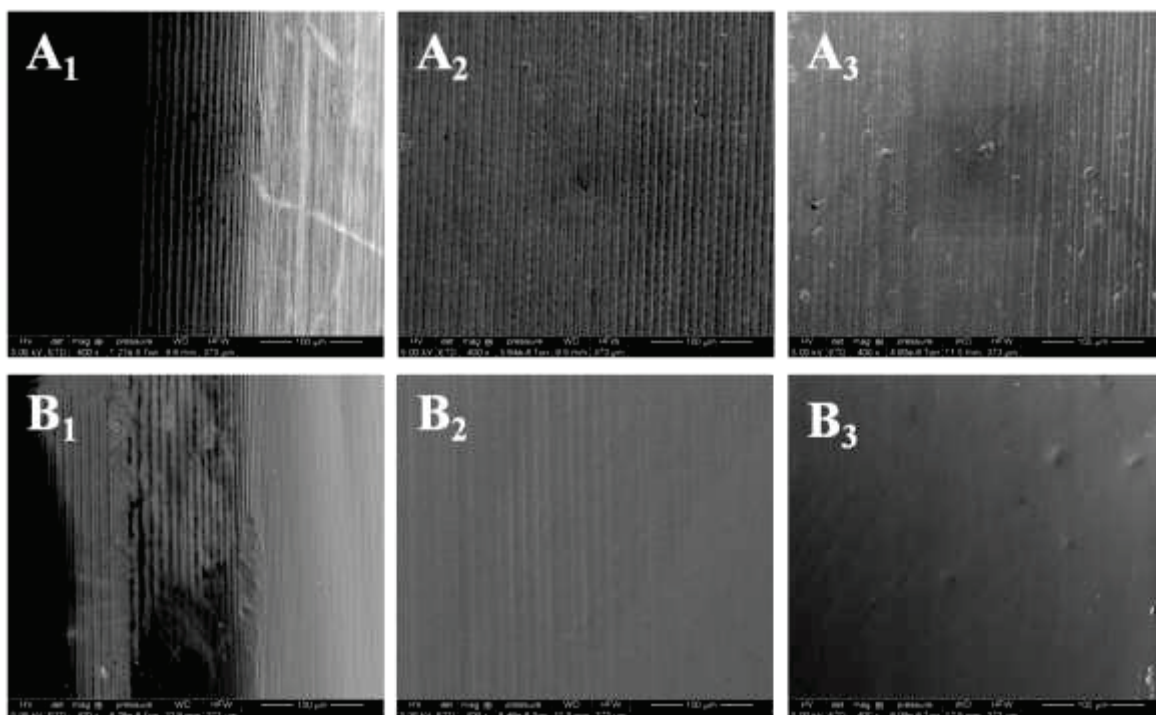


Figure II- 43 : Images MEB en mode électrons secondaires d'un prototype non revêtu (A) et revêtu (B) au niveau des zones 1, 2 et 3.

La première observation faite est que le prototype présente des états de surface très différents en fonction des zones étudiées. La zone 1 se caractérise par la présence de stries espacées d'environ 4  $\mu\text{m}$ . Suite au dépôt du  $C_{kit}$ , on peut observer un comblement partiel des sillons (Figure II- 43 A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub>). Néanmoins, cette zone est marquée par quelques hétérogénéités dans le greffage de l'agent de couplage et/ou le dépôt du CS.

La deuxième zone, au milieu de la tête de vis, correspond à la partie à revêtir absolument. D'après les observations MEB, cette zone se caractérise par des stries plus rapprochées et des sillons moins marqués (Figure II- 43 A<sub>2</sub>). Après le dépôt, on constate le masquage en quasi totalité de la rugosité de surface (Figure II- 43 B<sub>2</sub>), les stries sont toujours visibles mais moins marquées que sur la zone 1 revêtue.

En ce qui concerne la troisième et dernière zone, les stries dues à l'usinage sont moins marquées, on observe par endroits des débris dus à l'usinage des échantillons (Figure II- 43 A<sub>3</sub>). Après dépôt du revêtement, on observe un comblement complet de la surface même si on devine les débris sous le revêtement (Figure II- 43 B<sub>3</sub>). De plus, au niveau de cette zone, on peut observer quelques craquelures en surface, qui peuvent être dues au séchage d'une surépaisseur de chitosane.

Enfin, le prototype revêtu a été caractérisé par EDS. Les spectres de survol, enregistrés au niveau des trois zones, montrent tous la détection des éléments carbone, d'oxygène et d'azote caractéristiques du chitosane. Par ailleurs, sur la zone 2, on remarque, en plus, la présence de l'élément silicium caractéristique de l'agent de couplage et également la détection des éléments

aluminium et titane, caractéristiques du substrat. A certains endroits de la zone 2, il semble ainsi que la vis n'est pas été recouverte de façon très homogène (Figure II- 44).

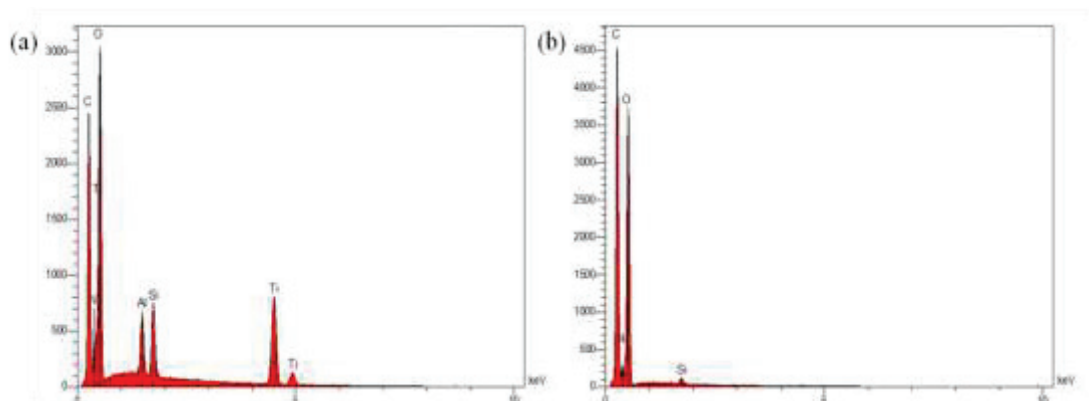


Figure II- 44 : Analyses EDS de la zone 2 après le greffage covalent du chitosane à deux endroits différents de l'échantillon (a et b).

## VI.2 Caractérisation après immersion dans un milieu tampon

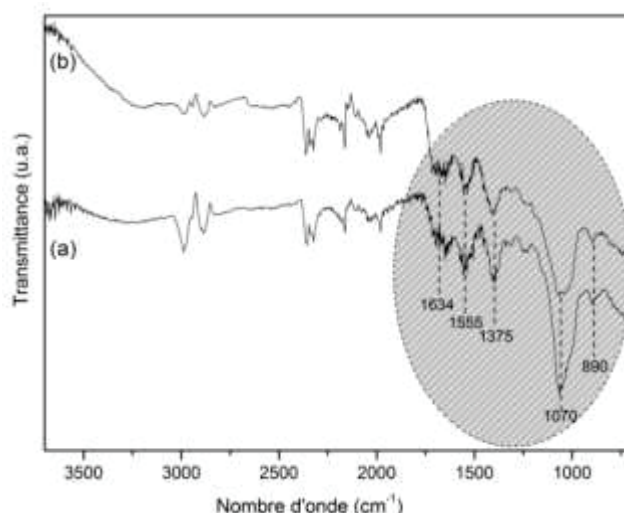
### VI.2.1 Conditions expérimentales

Afin de déterminer la tenue du prototype en milieu acide, un test d'immersion dans un milieu tampon (pH=4,5) pendant une heure a été réalisé. Brièvement, le prototype revêtu chitosane *via* le procédé de greffage est immergé dans 10 mL d'une solution tampon acétate (0,2 M d'acide acétique et 0,15 M d'ammonium acétate) pendant 1 h. Après deux rinçages dans un bain d'eau distillée, l'échantillon est ensuite séché à température ambiante pour ensuite être caractériser à la fois par MEB et par infrarouge en mode ATR.

### VI.2.2 Caractérisations des échantillons

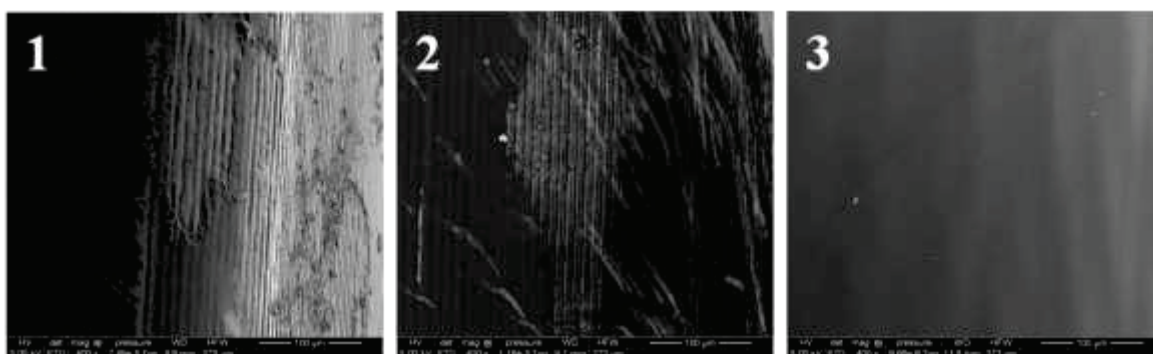
La présence de chitosane a été validée par une analyse IR-ATR. En effet, le spectre enregistré sur le prototype revêtu après immersion et rinçage est proposé sur la Figure II- 45 et comparé avec le spectre enregistré sur la vis revêtue avant immersion (Figure II- 45 a) présente toujours la signature du chitosane et valide le maintien du polymère après immersion en pH acide.





**Figure II- 45 : Spectres infrarouge enregistrés sur un prototype revêtu par le procédé avant (a), et après immersion dans un milieu tampon pendant 1 h (b).**

Par ailleurs, des images MEB ont été enregistrées sur la vis recouverte après immersion et rinçage. A nouveau, les trois zones d'intérêt ont été observées plus particulièrement (Figure II- 46).



**Figure II- 46 : Images MEB en mode électrons secondaires d'un prototype revêtu et immergé dans un milieu tampon pendant 1 h au niveau des zones 1, 2 et 3.**

Ces observations MEB permettent de mettre en évidence une dégradation différente du chitosane en fonction des zones analysées (Figure II- 46). Au niveau des zones 1 et 2, on observe un décrochement partiel du revêtement, dévoilant par endroit le substrat. En ce qui concerne la zone 3, il n'y a pas de modification significative suite à l'immersion dans un milieu tampon.

Enfin, une caractérisation EDS de l'échantillon revêtu  $C_{kit}$  traité en milieu tampon a été réalisée. Le spectre de survol confirme la présence du chitosane sur chaque zone avec une hétérogénéité de surface marquée par la détection par endroit du substrat (Al,Ti).



*En conclusion de ce chapitre, deux voies de greffage sur plusieurs substrats ont été explorées : la voie A correspondant au greffage APTES + AS et la voie B utilisant un silane fonctionnalisé par une fonction anhydre acide (le TESPSA).*

*Les différents revêtements biopolymères ont été caractérisés lors de leur étape de synthèse mais également suite à leur immersion dans un milieu acidifié. Les meilleurs résultats en termes de reproductibilité et de tenue en milieu salivaire acide ont été obtenus avec le greffage B, réalisé sous atmosphère inerte sur une surface TA6V brillantée. Enfin, le transfert de ce procédé a été effectué avec succès sur un prototype.*

## Références

1. Bagno A, Di Bello C: **Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials.** *J Mater Sci Mater Med* 2004, **15**(9):935-949.
2. Dohan Ehrenfest DM, Vazquez L, Park YJ, Sammartino G, Bernard JP: **Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 14 dental implant surfaces.** *J Oral Implantol* 2011, **37**(5):525-542.
3. Guida L, Oliva A, Basile MA, Giordano M, Nastri L, Annunziata M: **Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces.** *Journal of Dentistry* 2013, **41**(10):900-907.
4. Bigerelle M, Anselme K, Noel B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A: **Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response.** *Biomaterials* 2002, **23**(7):1563-1577.
5. Wennerberg A, Albertsson A-C: **Suggested Guidelines for the Topographic Evaluation of Implant Surfaces.** *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2000, **15**(3):331-344.
6. Lamarque G, Cretenet M, Viton C, Domard A: **New Route of Deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chitins by Means of Freeze-Pump Out-Thaw Cycles.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(3):1380-1388.
7. Lamarque G, Viton C, Domard A: **Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process.** *Biomacromolecules* 2004, **5**(3):992-1001.
8. Domard A: **Physicochemical properties of chitinous materials.** In: *Advances in Chitin Sciences*. Edited by Jacques André L; 1998: 24.
9. Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P: **Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation.** *Polymers* 2011, **3**(4):1875-1901.
10. Prasitsilp M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P: **Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation.** *J Mater Sci Mater Med* 2000, **11**(12):773-778.
11. Chatelet C, Damour O, Domard A: **Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films.** *Biomaterials* 2001, **22**(3):261-268.
12. Cid C, Ramos V, Lopez-Lacombe JL, Heras A: **Preparation and characterization of chitosan films: application in cell cultures.** *Adv Chitin Sci* 2000, **4**:93-97.
13. Ramos V, Garcia-Cantalejo JM, Heras A, Lopez-Lacombe JL: **Chitosan influence on the growth of several cellular lines.** *Adv Chitin Sci* 2000, **4**:194-201.
14. Li G, Zhang L, Wang C, Zhao X, Zhu C, Zheng Y, Wang Y, Zhao Y, Yang Y: **Effect of silanization on chitosan porous scaffolds for peripheral nerve regeneration.** *Carbohydrate Polymers* 2014, **101**(0):718-726.
15. Aiping Z, Tian C, Lanhua Y, Hao W, Ping L: **Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres.** *Carbohydrate Polymers* 2006, **66**(2):274-279.
16. Zemljič LF, Tkavc T, Vesel A, Šauprel O: **Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material.** *Applied Surface Science* 2013, **265**(0):697-703.
17. Kurmirska J, Czerwicka M, Kaczynski Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, Stepnowski P: **Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan.** *Marine Drugs* 2010, **8**: 1567-1636.
18. Muzzarelli RAA: **Chitin:** Elsevier Science Limited; 1977.
19. Domard A, Vasseur V: **Non-specificity of a colorimetric method for the estimation of N-acetyl-D-glucosamine.** *Int J Biol Macromol* 1991, **13**(6):366-368.
20. Aiba S-i: **Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography.** *International Journal of Biological Macromolecules* 1986, **8**(3):173-176.

21. Pedroni VI, Gschaidner ME, Schulz PC: **UV Spectrophotometry: Improvements in the Study of the Degree of Acetylation of Chitosan.** *Macromolecular Bioscience* 2003, **3**(10):531-534.
22. Kasaai MR: **A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy.** *Carbohydrate Polymers* 2008, **71**(4):497-508.
23. Hirai A, Odani H, Nakajima A: **Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy.** *Polymer Bulletin* 1991, **26**(1):87-94.
24. Bosso C, Domard A: **Characterization of glucosamine and N-acetylglucosamine oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry.** *Organic Mass Spectrometry* 1992, **27**(7):799-806.
25. Vårum KM, Antohonsen MW, Grasdalen H, Smidsrød O: **Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy.** *Carbohydrate Research* 1991, **211**(1):17-23.
26. Rivas Araiza RN: **Hydrogels physiques de chitosane sous forme de macrofibres creuses et multi-membranaires : Mise en oeuvre et étude microstructurale.** Université Claude Bernard Lyon 1; 2013.
27. Sewvandi G, Adikary S: **Synthesizing and Characterization of Natural Biopolymer Chitosan Derived from Shrimp Type, *Penaeus monodon*,** vol. 23; 2012.
28. Parker AC, Smith JK, Reves B, Jennings JA, Bumgardner JD, Haggard WO: **Effects of sodium acetate buffer on chitosan sponge properties and in vivo degradation in a rat intramuscular model.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014, **3**(10):33204.
29. Yuan Y, Chesnutt BM, Haggard WO, Bumgardner JD: **Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures.** *Materials* 2011, **4**(8):1399-1416.
30. Jaworska M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E: **Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties.** *Polymer International* 2003, **52**(2):198-205.
31. Zhang Y, Xue C, Xue Y, Gao R, Zhang X: **Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction.** *Carbohydrate Research* 2005, **340**(11):1914-1917.
32. Schiff N, Grosgeat B, Lissac M, Dalard F: **Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys.** *Biomaterials* 2002, **23**(9):1995-2002.
33. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E: **Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates.** *J Mater Sci: Mater Med* 2011, **22**(1):85-96.
34. Tan G, Zhang L, Ning C, Liu X, Liao J: **Preparation and characterization of APTES films on modification titanium by SAMs.** *Thin Solid Films* 2011, **519**(15):4997-5001.
35. Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P: **The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces.** *Biomaterials* 2005, **26**(14):1721-1730.
36. Yoon I-K, Hwang J-Y, Jang W-C, Kim H-W, Shin US: **Natural bone-like biomimetic surface modification of titanium.** *Applied Surface Science* 2014, **301**(0):401-409.
37. Rodriguez-Cano A, Cintas P, Fernandez-Calderon MC, Pacha-Olivenza MA, Crespo L, Saldana L, Vilaboa N, Gonzalez-Martin ML, Babiano R: **Controlled silanization-amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013, **106**:248-257.
38. Fauchaux N, Schweiss R, Lützow K, Werner C, Groth T: **Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies.** *Biomaterials* 2004, **25**(14):2721-2730.
39. Toworfe GK, Composto RJ, Shapiro IM, Ducheyne P: **Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers.** *Biomaterials* 2006, **27**(4):631-642.

40. Peyre J: **Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre et de titane.** Université Pierre et Marie Curie; 2013.
41. Taira S, Kaneko D, Onuma K, Miyazato A, Hiroki T, Kawamura-Konishi Y, Ichihyanagi Y: **Synthesis and Characterization of Functionalized Magnetic Nanoparticles for the Detection of Pesticide.** *International Journal of Inorganic Chemistry* 2012, **2012**:7.
42. Nayak S, Dey T, Naskar D, Kundu SC: **The promotion of osseointegration of titanium surfaces by coating with silk protein sericin.** *Biomaterials* 2013, **34**(12):2855-2864.
43. Martin HJ, Schulz KH, Bumgardner JD, Walters KB: **XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface.** *Langmuir* 2007, **23**(12):6645-6651.
44. Xu X, Wang L, Guo S, Lei L, Tang T: **Surface chemical study on the covalent attachment of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan to titanium surfaces.** *Applied Surface Science* 2011, **257**(24):10520-10528.
45. Gunda NSK, Singh M, Norman L, Kaur K, Mitra SK: **Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker.** *Applied Surface Science* 2014, **305**(0):522-530.
46. Eichler M, Katzur V, Scheideler L, Haupt M, Geis-Gerstorfer J, Schmalz G, Ruhl S, Müller R, Rupp F: **The impact of dendrimer-grafted modifications to model silicon surfaces on protein adsorption and bacterial adhesion.** *Biomaterials* 2011, **32**(35):9168-9179.
47. Abdelaal MY, Sobahi TR, Al-Shareef HF: **Modification of chitosan derivatives of environmental and biological interest: A green chemistry approach.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2013, **55**(0):231-239.
48. Bahadur NM, Furusawa T, Sato M, Kurayama F, Siddiquey IA, Suzuki N: **Fast and facile synthesis of silica coated silver nanoparticles by microwave irradiation.** *J Colloid Interface Sci* 2011, **355**(2):312-320.
49. An Y, Chen M, Xue Q, Liu W: **Preparation and self-assembly of carboxylic acid-functionalized silica.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2007, **311**(2):507-513.
50. Niu Y, Jin G: **Surface modification methods to improve behavior of biosensor based on imaging ellipsometry.** *Applied Surface Science* 2013, **281**(0):84-88.
51. Ranjbar-Mohammadi M, Arami M, Bahrami H, Mazaheri F, Mahmoodi NM: **Grafting of chitosan as a biopolymer onto wool fabric using anhydride bridge and its antibacterial property.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, **76**(2):397-403.
52. Renoud P, Toury B, Benayoun S, Attik G, Grosogeat B: **Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances.** *PLoS One* 2012, **7**(7):31.
53. Toury B, Grosogeat B, Renoud P, Desroches C: **Substrate on which chitosan or collagen is grafted via a covalent bond.** In: *PCT process in press Fev 2013.* vol. French patent FR1250689. France: Inventors (2013) UCBL CNRS; Jan. 2012.
54. Barabanova AI, Pryakhina TA, Afanas'ev ES, Zavin BG, Vygodskii YS, Askadskii AA, Philippova OE, Khokhlov AR: **Anhydride modified silica nanoparticles: Preparation and characterization.** *Applied Surface Science* 2012, **258**(7):3168-3172.
55. Bhattacharyya S, Wang H, Ducheyne P: **Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for the controlled release of macromolecules.** *Acta Biomaterialia* 2012, **8**(9):3429-3435.
56. Lee MH, Ducheyne P, Lynch L, Boettiger D, Composto RJ: **Effect of biomaterial surface properties on fibronectin-alpha5beta1 integrin interaction and cellular attachment.** *Biomaterials* 2006, **27**(9):1907-1916.
57. Wu P, Fu Y, Cai K: **Regulation of the migration of endothelial cells by a gradient density of vascular endothelial growth factor.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014(0).
58. Toworfe GK, Bhattacharyya S, Composto RJ, Adams CS, Shapiro IM, Ducheyne P: **Effect of functional end groups of silane self-assembled monolayer surfaces on apatite formation, fibronectin adsorption and osteoblast cell function.** *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2009, **3**(1):26-36.

59. Campos D, Toury B, D’Almeida M, Attik G, Ferrand A, Renoud P, Grosogeat B: **Acidic pH resistance of grafted chitosan on dental implant.** *Odontology* 2014:1-8.
60. Katzur V, Eichler M, Deigele E, Stage C, Karageorgiev P, Geis-Gerstorfer J, Schmalz G, Ruhl S, Rupp F, Müller R: **Surface-immobilized PAMAM-dendrimers modified with cationic or anionic terminal functions: Physicochemical surface properties and conformational changes after application of liquid interface stress.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, **366**(1):179-190.
61. Yang Z, Chevolot Y, Géhin T, Solassol J, Mange A, Souteyrand E, Laurenceau E: **Improvement of protein immobilization for the elaboration of tumor-associated antigen microarrays: Application to the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera.** *Biosensors and Bioelectronics* 2013, **40**(1):385-392.

# **Chapitre III**

## **Etude de la résistance des revêtements**

# SOMMAIRE

<b>I.</b>	<b>RESTITUTION DU BIOPOLYMER EN MILIEU ACIDE.....</b>	<b>127</b>
<i>I.1</i>	<i>Principe du dosage colorimétrique à l'orange II.....</i>	<i>127</i>
<i>I.2</i>	<i>Conditions expérimentales du dosage.....</i>	<i>129</i>
<i>I.3</i>	<i>Etude de la restitution du chitosane sur des temps courts .....</i>	<i>129</i>
<i>I.3.1</i>	<i>Tests préliminaires.....</i>	<i>129</i>
<i>I.3.2</i>	<i>Pourcentage de polymère restitué dans le milieu tampon .....</i>	<i>132</i>
<i>I.4</i>	<i>Etude de la restitution du chitosane sur des temps longs.....</i>	<i>134</i>
<b>II.</b>	<b>IMPACT DE LA STERILISATION .....</b>	<b>136</b>
<i>II.1</i>	<i>Stérilisation des substrats non revêtus.....</i>	<i>137</i>
<i>II.1.1</i>	<i>Etude de la morphologie de surface.....</i>	<i>137</i>
<i>II.1.2</i>	<i>Mouillabilité des surfaces stérilisées.....</i>	<i>138</i>
<i>II.1.3</i>	<i>Evolution de la chimie de surface suite aux stérilisations .....</i>	<i>139</i>
<i>II.2</i>	<i>Stérilisation des films de chitosane autosupportés .....</i>	<i>140</i>
<i>II.3</i>	<i>Caractérisation des échantillons revêtus stérilisés.....</i>	<i>142</i>
<i>II.3.1</i>	<i>Etude de la morphologie de surface.....</i>	<i>142</i>
<i>II.3.2</i>	<i>Topographie de la surface stérilisée.....</i>	<i>144</i>
<i>II.3.3</i>	<i>Evolution de la chimie de surface suite à la stérilisation.....</i>	<i>144</i>



Dans ce chapitre, nous allons étudier les revêtements polymère selon deux points importants du cahier des charges. Ainsi, la première partie concerne l'étude de la restitution progressive du biopolymère dans un milieu à bas pH. La seconde partie est, quant à elle, dédiée à l'étude de l'impact des méthodes de stérilisation sur les caractéristiques du revêtement polymère (morphologie, mouillabilité, rugosité, masse molaire et DA).

## I. Restitution du biopolymère en milieu acide

Afin de valider la tenue du revêtement polymère et de quantifier sa durée d'activité dans la cavité buccale, il est nécessaire d'étudier sa cinétique de dégradation (restitution) dans un milieu expérimental proche du milieu réel. Dans ce contexte, il est envisagé de doser la quantité de chitosane restitué après immersion du revêtement dans un milieu tampon acide. Il existe, dans la littérature, plusieurs méthodes pour quantifier le chitosane : (i) par marquage du chitosane par un composé fluorescent, la rhodamine, lié au CS *via* un isothiocyanate [1], (ii) par dosage du chitosane par absorbance à 290 nm dans une solution tampon phosphate salin (PBS) [2] et (iii) par dosage colorimétrique. La méthode de marquage du chitosane par un composé fluorescent est assez sensible et directe, mais cette méthode n'a pas été retenue à cause des éventuelles modifications qu'elle peut engendrer sur les propriétés du chitosane en solution (viscosité, interaction entre les chaînes). Une méthode similaire consiste à employer la ninhydrine, composé réagissant préférentiellement avec les groupements amine primaire pour former un produit coloré facilement détectable et quantifiable par spectrophotométrie UV-visible [3]. Pour les dosages colorimétriques en retour, il existe plusieurs composés capable de se fixer au chitosane tels que l'acide 2,4, 6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS) [4], le colorant Coomassie Brilliant [5] et l'orange II [1].

### I.1 Principe du dosage colorimétrique à l'orange II

La méthode choisie pour cette étude s'inspire des travaux de Brunel *et al.* qui utilisent l'orange II, colorant anionique pour doser en retour, par colorimétrie, la quantité de chitosane présent dans des nanoparticules [6]. Dans une étude récente, il a été démontré que la réaction de complexation de

l'orange II avec les groupements amine libres du chitosane est sensible et spécifique, permettant, aisément, de remonter à une quantité de chitosane si le DA est connu [7].

Il s'agit d'un dosage dans lequel un excès connu d'orange II est introduit à une solution de chitosane. Dans des conditions de pH spécifiques, l'orange II se complexe sur les groupements ammonium du chitosane selon l'équation de la Figure III - 1.

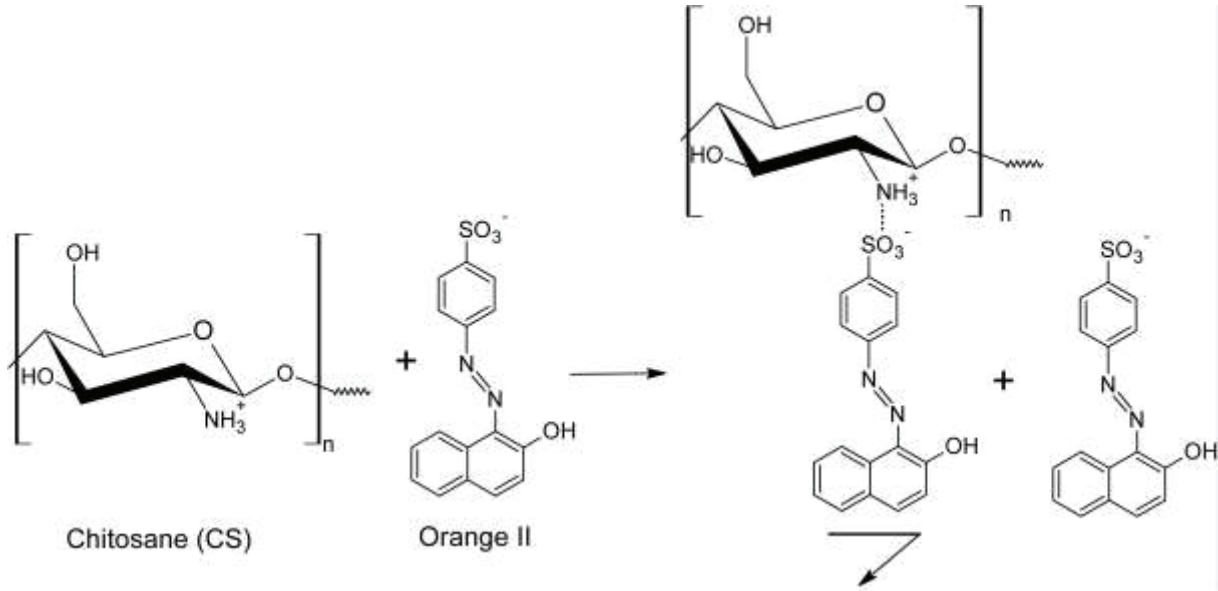


Figure III - 1 : Schéma de la réaction de complexation du chitosane par un colorant anionique (Orange II) (Brunel *et al.*, 2008).

L'excès de colorant (non complexé), récupéré dans le surnageant après centrifugation, est alors mesuré par absorbance par spectroscopie UV-visible (485 nm). Cette réaction de complexation nécessite des conditions de pH strictes qui peuvent être facilement obtenues dans un tampon  $\text{pH} = 4,5$  (0.15 M d'acétate d'ammonium et de 0.2 M d'acide acétique). La différence avec la quantité initialement présente permet, par le calcul, de remonter à la quantité d'orange II complexé et donc au nombre de sites ammonium présent.

La masse de chitosane est calculée, à partir de la concentration de  $\text{NH}_3^+$  (dosée) selon l'équation III-1 :

$$m_{cs} = \frac{[\text{NH}_3^+] * Mo * V}{\left(1 - \frac{\% \text{ eau}}{100}\right) * \left(1 - \frac{DA}{100}\right)}$$

$m_{cs}$  = Masse de chitosane mesurée

$\% \text{ eau}$  = Quantité d'eau que contient le CS solide (déterminée par ATG)

$V$  = Volume de solution tampon

$Mo$  = Masse molaire moyenne de CS par unité défini par l'équation

$$Mo = 203 \times \frac{DA}{100} + 161 \times \left(1 - \frac{DA}{100}\right) \quad \text{Equation III - 2}$$

Les valeurs 203 et 161 correspondent aux masses molaires d'un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'un résidu de glucosamine (Glc), respectivement.

## I.2 Conditions expérimentales du dosage

L'ensemble des mesures a été effectué au Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères, en collaboration avec **Agnès Crépet**.

A titre comparatif, toutes les mesures de restitution sont réalisées, à la fois, sur des revêtements polymère greffés ( $C_{\text{kit}}\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$ ) et sur des revêtements simplement déposés (sans greffage covalent) sur alliage de titane ( $C_{\text{kit}}\text{T}_{\text{A6V brill}}$ ). Les échantillons sont immergés en solution acide pendant un temps donné. Les solutions d'immersion sont récupérées et la quantité de chitosane présente dans les solutions est déterminée par calcul à l'aide des données issues des dosages colorimétriques. Le protocole expérimental est détaillé dans la partie annexe.

La mise au point d'un protocole fiable et reproductible a nécessité un nombre important d'expériences. Initialement, il a été envisagé de conserver comme milieu d'immersion, les solutions salivaires artificielles acidifiées à pH 3 et 5. Ces conditions imposent, alors, la cryogénisation des solutions et l'évaporation des milieux d'immersion pour les reprendre dans le milieu tampon, indispensable à la réaction de complexation. Cependant, la complexité de ces étapes supplémentaires liée aux réactions parasites éventuelles entre les composés de la solution salivaire artificielle et l'orange II, n'a pas permis d'aboutir, dans ces conditions expérimentales, à des résultats concluants. Pour simplifier les mesures, intrinsèquement complexes, il a donc été décidé, en première approche, de réaliser les immersions directement dans la solution tampon.

Dans la suite de cette partie, la quantité de chitosane restitué a été évaluée à la fois sur des temps courts (5, 10, 25, 30 min jusqu'à 24 h) et sur des temps longs (15 jours).

## I.3 Etude de la restitution du chitosane sur des temps courts

### I.3.1 Tests préliminaires

Les expériences suivantes ont donc été effectuées dans une solution tampon d'acétate d'ammonium (0.15 M d'acétate d'ammonium et de 0.2 M d'acide acétique (pH = 4,5)) comme milieu d'immersion et l'étude de la restitution du chitosane a été réalisée à des temps courts (5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 minutes, 8 et 24 heures) dans le cas d'un simple dépôt ( $C_{\text{kit}}\text{T}_{\text{A6V brill}}$ ) et dans le cas d'un dépôt de chitosane greffé ( $C_{\text{kit}}\text{TPiT}_{\text{A6V brill}}$ ). Les quantités de chitosane restitué sont dépendantes du temps d'immersion et les ordres de grandeurs sont très différents d'un échantillon à l'autre. Dans ces

conditions, il a été nécessaire de réaliser plusieurs dilutions des solutions récupérées de façon à rester dans la gamme d'absorbance du colorant. Ces manipulations supplémentaires demandent beaucoup de précision pour la cohérence des résultats. Après calculs, les valeurs en masse de chitosane récupéré dans les solutions d'immersion sont placées sur un graphe en fonction du temps d'immersion et de l'échantillon analysé (avec ou sans greffage) (Figure III - 2).

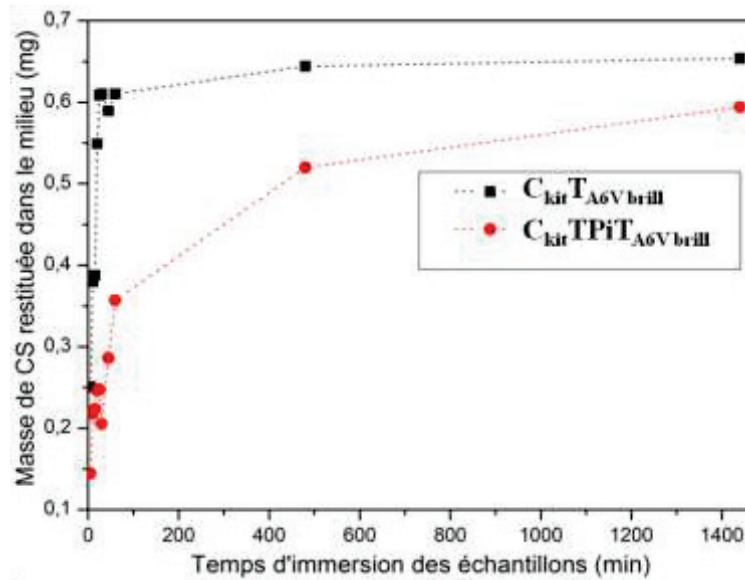
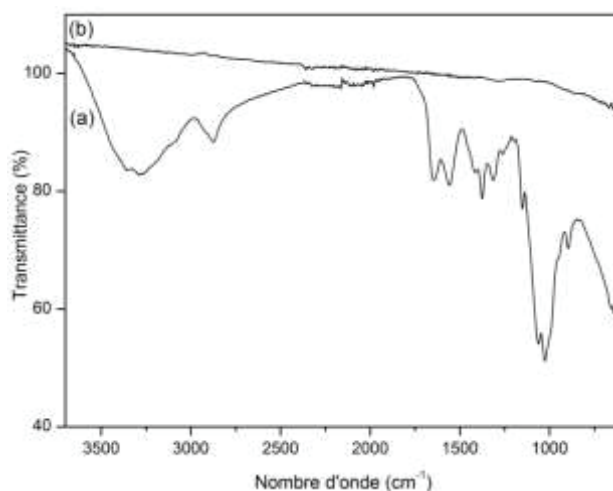


Figure III - 2 : Quantité de chitosane restitué (en masse) au cours du temps dans le cas d'un simple dépôt de chitosane ( $C_{kit} T_{A6V\ brill}$ ) et dans le cas d'un dépôt par greffage covalent ( $C_{kit} TPiT_{A6V\ brill}$ ).

Le graphe présente deux courbes d'allures assez similaires mais décalées en échelle des ordonnées. Ceci permet de montrer une cinétique de restitution du chitosane plus lente dans le cas d'un dépôt de  $C_{kit}$  par greffage covalent par rapport à un simple dépôt. On constate également une stabilisation de la quantité de  $C_{kit}$  restitué dans les deux procédés de dépôt du biopolymère. Par ailleurs, dans le cas d'un simple dépôt ce palier est atteint au bout de 20 min alors qu'il faut plus de 8 h pour le dépôt par greffage covalent. On peut également noter une faible différence de masse restante entre la quantité de chitosane restitué après 24 h pour  $C_{kit} TPiT_{A6V\ brill}$  et pour  $C_{kit} T_{A6V\ brill}$ .

Pour confirmer les résultats obtenus à 24h pour les deux types d'échantillons, des caractérisations infrarouges en mode ATR-FTIR ont été réalisées sur différentes zones des échantillons (n=2) (Figure III - 3).



**Figure III - 3 : Spectres Infrarouge des échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill (a) et  $C_{kit}T_{A6V}$  brill (b) après 24h d'immersion en milieu tampon.**

Les spectres confirment les observations visuelles et les résultats des dosages. En effet, le  $C_{kit}$  est toujours bien détecté sur l'échantillon  $C_{kit}TPiT_{A6V}$  brill après 24h d'immersion en milieu tampon, alors que plus une trace de chitosane n'est observée sur l'échantillon avec le simple dépôt.

Pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode et des résultats, une deuxième série d'expériences a été réalisée dans les mêmes conditions. Ainsi, des résultats tout à fait comparables ont été obtenus et confirment que la cinétique de restitution du chitosane apparait plus lente dans le cas du chitosane fixé sur l'échantillon par greffage covalent, par rapport au chitosane déposé simplement par *dip coating* sur une même surface de titane.

Enfin, à titre comparatif, la masse de chitosane déposé a été déterminée sur de nouvelles pastilles avant et après « simple dépôt » du chitosane, de façon à accéder à la masse du dépôt. Ainsi, en moyenne la masse de chitosane présente sur une pastille après un « simple dépôt » est de  $0,85 \pm 0,5$  mg, alors que le dosage permet de remonter à une valeur sensiblement plus faible de 0,65 mg pour l'échantillon qui a été immergé 24 h (non détection par IR du chitosane). Bien qu'elles soient du même ordre de grandeur, une différence non négligeable existe entre les deux masses mesurées. On peut émettre plusieurs hypothèses : (i) la sensibilité de la méthode de dosage est de  $\pm 30\%$ , (ii) le chitosane déposé ne se dissout pas entièrement dans la solution tampon ( $C_{kit}$  trop concentré ou agrégats de  $C_{kit}$  insoluble en milieu acide), il n'est donc pas entièrement complexé et (iii) la masse de chitosane présente initialement sur la surface de l'échantillon n'est pas identique pour chacun des échantillons étudiés.

La première hypothèse peut être facilement réfutée *via* des expériences complémentaires de dosage de quantités connues et maîtrisées de chitosane, qui montrent un accord strict entre masses introduites et masses mesurées par dosage.

Concernant les potentielles difficultés de dissolution du  $C_{kit}$  mis en forme dans la solution tampon, nous avons réalisé des essais de dissolution de films autosupportés de  $C_{kit}$  à 2%, de masses connues, dans deux volumes de solution tampon (9 et 18 mL), pendant 6 jours. Toutes les solutions ont, ensuite, été dosées selon notre protocole et les résultats ont montrés que tout le chitosane dissout a bien été retrouvé. Dans le même sens, aucune influence du volume de solution tampon utilisé sur la quantité de CS dosée n'a été démontrée. Il n'y a donc pas d'influence de la dilution sur les résultats obtenus.

Les différences observées sont, donc, liées, non pas à un problème de méthode de dosage mais à une difficulté dans la reproductibilité de la méthode de dépôt qui ne conduit pas systématiquement à des revêtements de masses identiques, bien que le protocole opératoire soit strictement respecté. Ce constat est, sans doute, lié à la morphologie des pastilles qui ne sont pas toutes identiques, certaines présentent des sillons ou de courbures plus prononcés qui retiennent une plus grande quantité de polymère (cf schéma Figure II-8 du chapitre II). De façon à exprimer les résultats en termes de pourcentage de perte de masse (par rapport à la masse initiale réellement présente sur l'échantillon), tous les échantillons testés sont systématiquement pesés avant et après dépôt de chitosane pour déterminer précisément la masse référence (100%).

### I.3.2 Pourcentage de polymère restitué dans le milieu tampon

Dans ce contexte, une nouvelle série d'expériences a été menée en mesurant, cette fois, la masse de chitosane présente initialement sur la surface des échantillons. Chaque mesure a été réalisée sur trois échantillons. Le graphe présenté sur la Figure III - 4 représente alors le pourcentage de perte de masse en fonction du temps d'immersion et du type d'échantillon analysé (greffé ou non) (n=3).

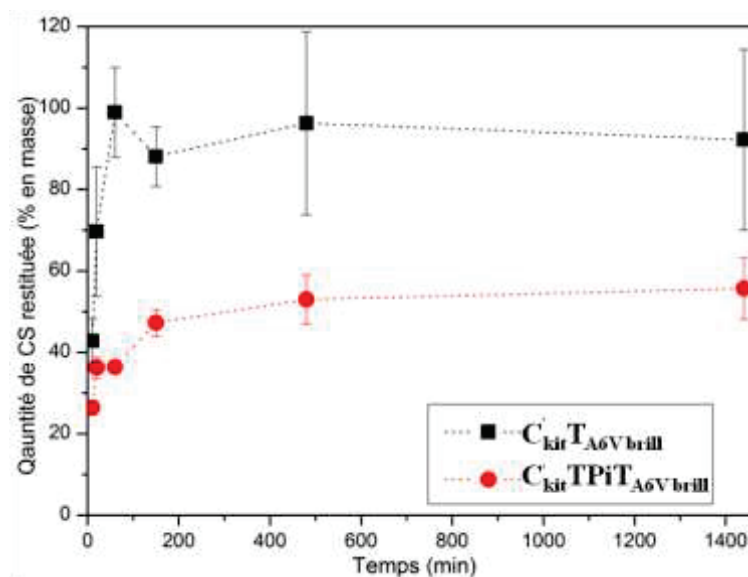


Figure III - 4 : Evolution du pourcentage en masse de la quantité de  $C_{kit}$  restituée au cours du temps dans le cas des échantillons  $C_{kit} T_{A6V} brill$  et  $C_{kit} TPi T_{A6V} brill$ .

L'allure des courbes est assez similaire à celles précédemment obtenues. La cinétique de restitution du chitosane est plus lente dans le cas des revêtements polymère  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$  par rapport aux revêtements témoins  $C_{kit}T_{A6V\ brill}$ . Les barres d'erreur sont relativement importantes, cela peut s'expliquer notamment par la forte hétérogénéité des surfaces, par les difficultés dues à la pesée et par les masses différentes sur chacun des échantillons.

Lors des pesées des pastilles obtenues par « simple dépôt » ( $C_{kit}T_{A6V\ brill}$ ) et par notre procédé ( $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ ), nous avons pu remarquer que les masses moyennes déterminées pour chaque type d'échantillons étaient significativement différentes ( $C_{kit}T_{A6V\ brill} = 0,73 \pm 0,09$  mg et pour  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill} = 1,06 \pm 0,07$  mg). Il y a clairement deux possibilités pour expliquer ces différences. Premièrement, on peut considérer qu'en raison de l'état de surface différent (surface fonctionnalisée par le TESPSA et substrat nu) avant le dépôt, la quantité de chitosane déposée est plus importante dans le cas du substrat  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ . Deuxièmement, on peut penser que les 0,30 mg supplémentaires pour les échantillons greffés proviennent justement du greffage et sont dus à la couche de silane déposée et réticulée en surface. Vraisemblablement, la seconde hypothèse paraît la plus plausible aux vues des résultats du chapitre II (analyse de la chimie surface).

Si l'on considère que la masse corrigée de chitosane est initialement de 0,73 mg en moyenne pour tous les échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ , on peut alors, recalculer les pourcentages de perte de masse en fonction des temps d'immersion et on obtient alors les courbes présentées sur la Figure III - 5.

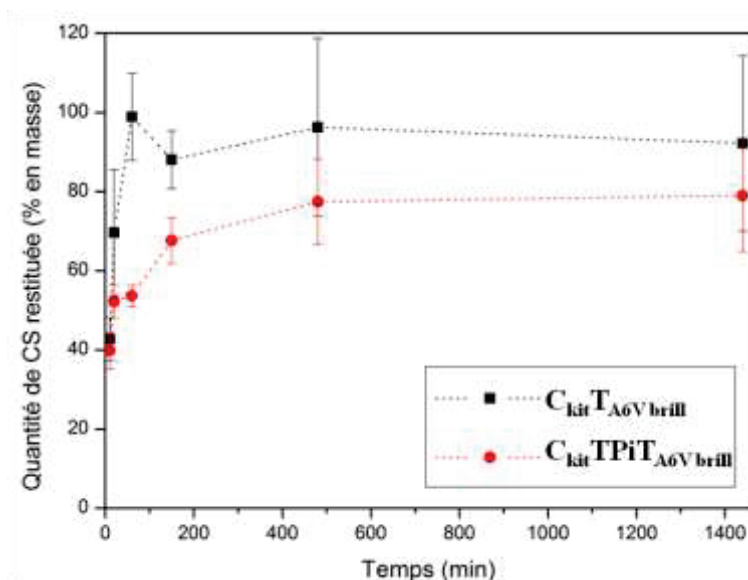


Figure III - 5 : Evolution du pourcentage en masse de la quantité de  $C_{kit}$  restitué au cours du temps dans le cas des échantillons  $C_{kit}T_{A6V\ brill}$  et  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ .

Bien que le pourcentage en masse de chitosane restitué dans le milieu tampon soit plus important par rapport aux résultats précédents, la cinétique de restitution du chitosane reste toujours plus lente pour le substrat  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$  par rapport au substrat témoin  $T_{A6V\ brill}$ . Cette différence étant, toutefois, moins marquée par rapport aux précédents résultats.



#### I.4 Etude de la restitution du chitosane sur des temps longs

Dans la continuité des tests précédents et parce que le cahier des charges mentionne des tenues du revêtement à plus d'une semaine (temps de cicatrisation 8-15 jours), il nous a paru pertinent de tester les revêtements après 15 jours d'immersion en milieu acide. Ainsi, une nouvelle série d'expériences a été effectuée à des temps d'immersion allant d'une heure à 15 jours. Pour chaque échantillon testé, la masse initiale de chitosane a été déterminée par pesée avant immersion. Après le dosage colorimétrique, les pourcentages de masse de chitosane restitué dans les solutions d'immersion sont placées sur un graphe en fonction du temps d'immersion et de l'échantillon analysé (avec ou sans greffage) sur la Figure III - 6.

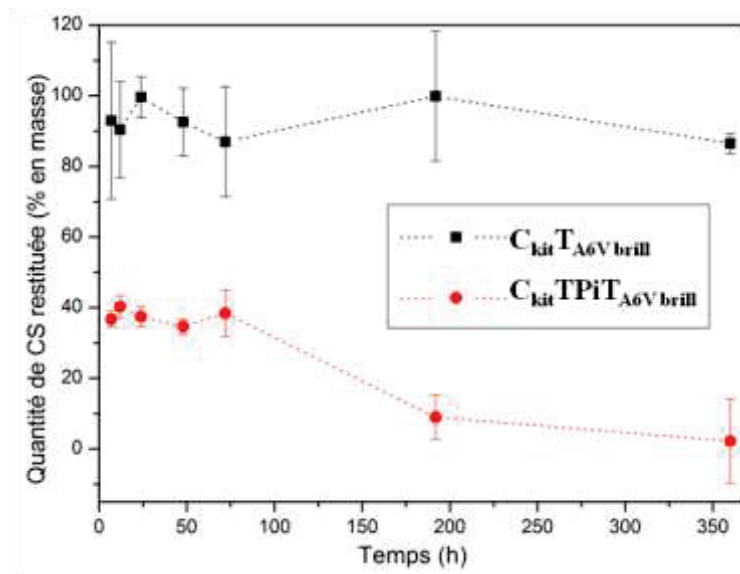


Figure III - 6 : Evolution du pourcentage en masse de la quantité de  $C_{kit}$  restitué au cours du temps dans le cas des échantillons  $C_{kit} T_{A6V} brill$  et  $C_{kit} TPiT_{A6V} brill$ .

A nouveau, on peut conclure que le pourcentage de chitosane restitué dans le milieu est plus faible pour les échantillons greffés  $C_{kit} TPiT_{A6V} brill$  que pour les échantillons « simple dépôt ». Par ailleurs, les valeurs reportées sur le graphe à 1 jour d'immersion sont en accord avec celles obtenues précédemment pour la même durée (Figure III - 4).

Comme précédemment, on a pu noter une différence de masse moyenne de chitosane entre les deux types d'échantillons et un nouveau graphe, tenant compte de la masse corrigée est proposé sur la Figure III - 7.

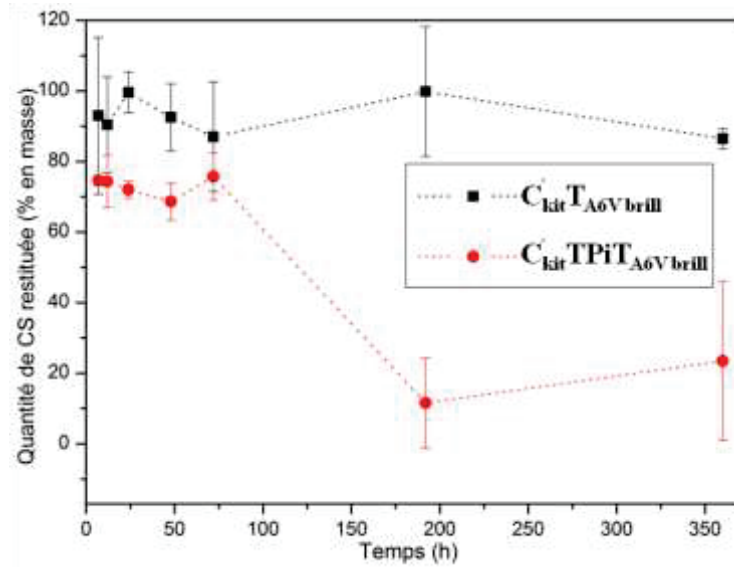


Figure III - 7 : Evolution du pourcentage en masse de la quantité de  $C_{kit}$  restitué au cours du temps dans le cas des échantillons  $C_{kit} T_{A6V} brill$  et  $C_{kit} TPiT_{A6V} brill$ .

La cinétique de restitution du chitosane est toujours plus lente dans le cas du  $C_{kit} TPiT_{A6V} brill$  par rapport aux échantillons témoins mais, logiquement, moins marquée. De plus, on observe toujours un écart type important sur les pourcentages de masses mesurés.

Enfin, qu'il s'agisse des résultats bruts ou corrigés, on note dans les deux cas des valeurs aberrantes à partir de 8 jours d'immersion en milieu acide pour les échantillons greffés. En effet, la quantité de chitosane restitué a fortement diminué, ce qui sous entendrait une tenue du chitosane plus importante à des temps très longs. Or, aucune raison plausible ne permet d'aboutir à cette conclusion. Une explication proposée est qu'il existe une réaction parasite entre le chitosane et le silane qui se détacherait du substrat. Le silane ainsi libéré dans le milieu aurait tendance à se lier avec le chitosane, faussant ainsi le dosage avec l'orange II. Cette observation a pu être faite une deuxième fois lors de la répétition de cette expérience. Visuellement, on observe bien une détérioration de la surface des échantillons  $C_{kit} TPiT_{A6V} brill$  après 7 jours d'immersion en milieu acide. Il semblerait que la couche de silane soit également détériorée en plus du revêtement chitosane. Des analyses de surfaces sont maintenant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

*En conclusion, toutes les séries d'expériences menées sur l'étude de la cinétique de restitution du chitosane en milieu acide montrent, une restitution plus lente du polymère lorsqu'il est greffé de manière covalente au substrat. Ce résultat très positif, justifie le choix de la méthode de greffage pour améliorer la tenue du polymère. Néanmoins, il semblerait qu'une dégradation du revêtement polymère mais également de la couche de silane sur des temps plus longs (au-delà de 7 jours) ne permette pas d'atteindre complètement l'objectif fixé par le cahier des charges pour une tenue de 8 à 15 jours.*

Cependant, il est nécessaire de relativiser cette dernière conclusion. En effet, les conditions d'immersion fixées par l'expérience sont très sévères et ne représentent pas fidèlement le comportement de la cavité buccale. D'autres expériences pourraient être menées avec un cycle de variation contrôlé du pH et également l'immersion des échantillons dans un système plus représentatif de la cavité buccale.

## II. Impact de la stérilisation

Dans cette partie de l'étude, quatre méthodes de stérilisation ont été testées : la stérilisation autoclave (Aut), la stérilisation gamma ( $\gamma$ ), la stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique (CO<sub>2</sub> sup) et la stérilisation à l'éthylène oxyde (ETO) (cf chapitre I). L'effet de la stérilisation a été évalué sur plusieurs types d'échantillons, sur des substrats témoins (pastilles brillantées en alliage de titane) (T<sub>A6V brill</sub>), sur des films de chitosane grade médical autosupportés (C<sub>kit</sub>) et sur des revêtements de chitosane grade médical préparés par greffage selon la voie B sur des pastilles brillantées en alliage de titane (C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>). Tous les échantillons supportés ont été caractérisés en termes de topographie, de morphologie et de chimie de surface. Dans le cas des T<sub>A6V brill</sub>, une étude de la mouillabilité de surface a été également réalisée. Enfin, les films autosupportés ont été dissous après stérilisation pour évaluer leurs DA et masses molaires moyennes. Le schéma de la Figure III - 8 récapitule les échantillons testés et les caractérisations effectuées sur chacun d'eux.

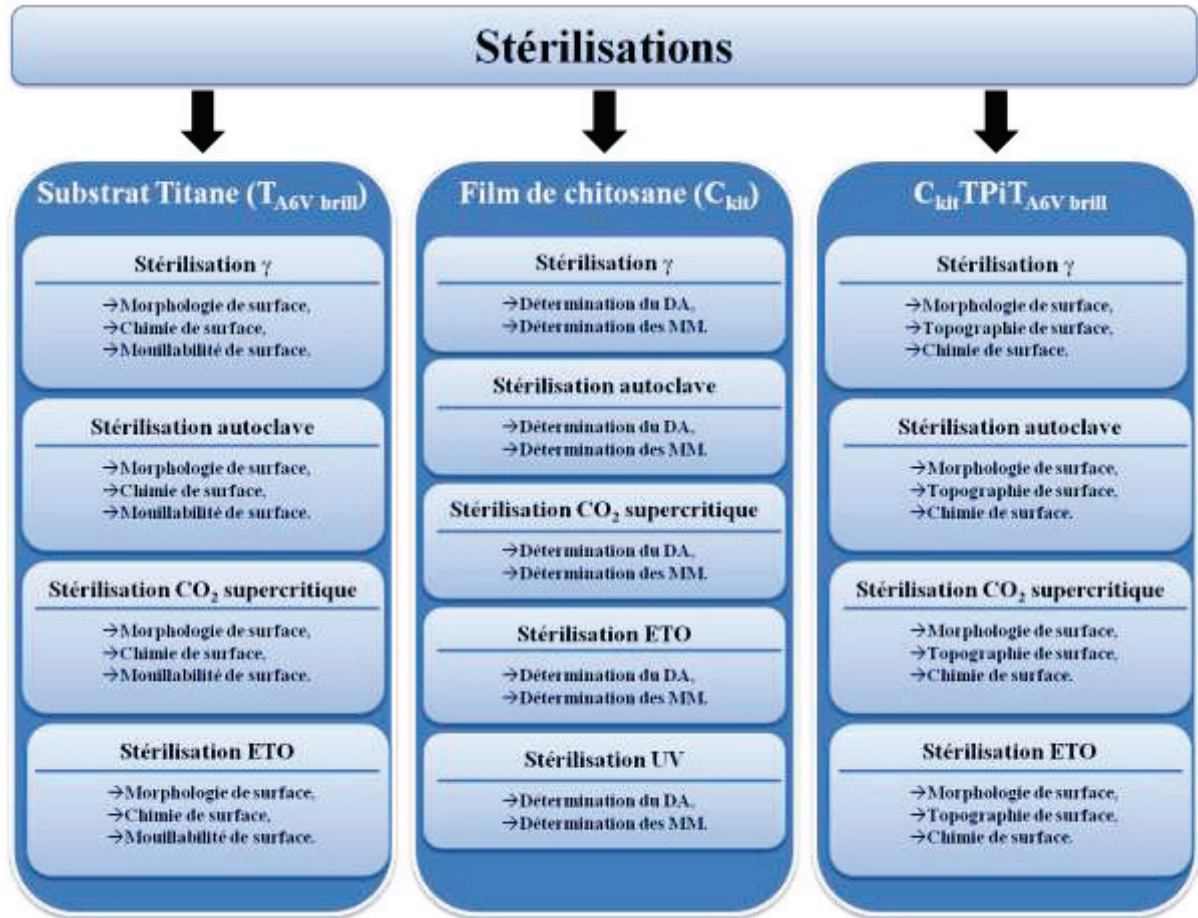


Figure III - 8 : Récapitulatif des différentes stérilisations et caractérisations sur les trois échantillons étudiés.

## II.1 Stérilisation des substrats non revêtus

### II.1.1 Etude de la morphologie de surface

La morphologie des échantillons  $T_{A6V\ brill}$  non revêtus a été observée à l'œil et aucune différence macroscopique entre les échantillons stérilisés ou non, n'a été observée. Les clichés MEB des surfaces stérilisées sont comparés à une image enregistrée sur un échantillon de  $T_{A6V\ brill}$  non stérilisé (Figure III - 9 et Figure III - 10). La comparaison ne montre aucune différence significative pour les échantillons stérilisés en gamma et par ETO (Figure III - 10 – A et C). En revanche, sur les échantillons ayant subi la stérilisation  $CO_2$  supercritique et en autoclave, il semble apparaître quelques différences comme des traces noires ou des cristaux après autoclave (Figure III - 10 B) et des stries blanches après  $CO_2$  supercritique (Figure III - 10 D).

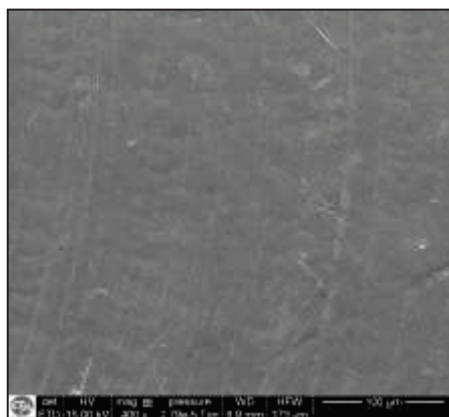


Figure III - 9 : Image MEB de l'échantillon T<sub>A6V</sub> brill non stérilisé.

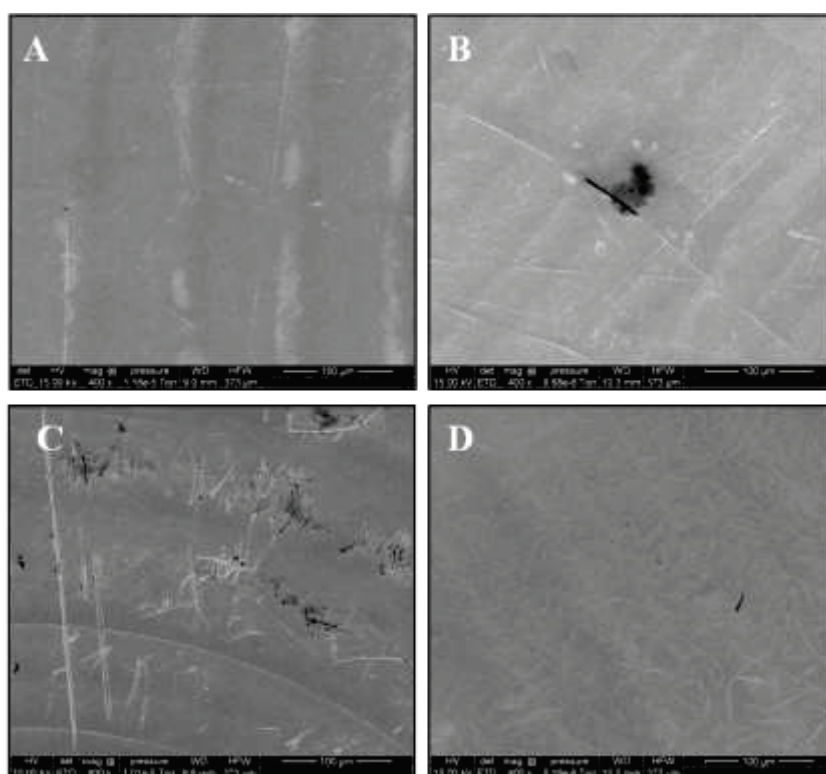


Figure III - 10 : Images MEB (SE) des échantillons T<sub>A6V</sub> brill stérilisés par rayons  $\gamma$  (A), par autoclave (B), par ETO (C) et par CO<sub>2</sub> supercritique (D).

### II.1.2 Mouillabilité des surfaces stérilisées

L'impact de la stérilisation sur la mouillabilité des surfaces a été investiguée. Le Tableau III - 1 récapitule les valeurs moyennes d'angles de contact mesurées pour chaque échantillon T<sub>A6V</sub> brill stérilisé.

Tableau III - 1 : Valeurs d'angles de contact des surfaces TA6V brill stérilisées ou non.

	Sans stérilisation	ETO	$\gamma$	Autoclave	CO <sub>2</sub> super
Angle de contact (°)	81,4 ± 2,9	91,5 ± 1,7	86,7 ± 3,3	82,7 ± 9,3	74,4 ± 1,8

On peut remarquer que toutes ces surfaces, exceptée la surface stérilisée par ETO, sont hydrophiles. En comparaison avec la surface non stérilisée, on note tout d'abord que les stérilisations autoclave et gamma n'ont pas d'impact significatif sur la mouillabilité de surface. En revanche, la stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique entraîne une diminution notable de l'angle de contact, et ainsi une augmentation de son hydrophilie. Pour l'expliquer, il doit être rappelé que la stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique utilise de l'eau oxygénée. La présence de cet additif peut provoquer une oxydation de la surface et ainsi la formation d'une couche de TiO<sub>2</sub> plus hydrophile en surface. Enfin, dans le sens opposé, la stérilisation ETO entraîne une augmentation du caractère hydrophobe de la surface. Ce constat peut facilement être expliqué par la présence éventuelle de résidu organique d'oxyde d'éthylène hydrophobe.

### II.1.3 Evolution de la chimie de surface suite aux stérilisations

Afin d'analyser les éventuels impacts des méthodes de stérilisation sur la chimie de surface des échantillons sans dépôt T<sub>A6V brill</sub>, des analyses d'extrême surface par XPS ont été réalisées et comparées à celle précédemment obtenue pour l'échantillon non stérilisé (cf chapitre II partie IV.3.3.3.) Le Tableau III - 2 permet de récapituler la quantification en pourcentage atomique des éléments présents en surface des échantillons.

**Tableau III - 2 : Compositions en éléments atomiques exprimés en pourcentage pour les échantillons T<sub>A6V brill</sub> avant et après stérilisation déterminées par XPS. Les mesures sont réalisées à deux endroits différents. Autres = contaminations en surface comme S, Ca, Zn, F, Pb.**

	Sans stér	Stér ETO	Stér $\gamma$	Stér Aut	Stér CO <sub>2</sub> sup
C1s (%)	34,8 $\pm$ 0,9	42,9 $\pm$ 0,4	42,4 $\pm$ 8,3	53,4 $\pm$ 0,2	43,9 $\pm$ 2,4
N1s (%)	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,0
O1s (%)	46,9 $\pm$ 0,6	40,1 $\pm$ 0,3	41,8 $\pm$ 6,1	32,4 $\pm$ 0,2	40,3 $\pm$ 2,5
Ti2p (%)	13,3 $\pm$ 0,3	10,4 $\pm$ 0,1	10,8 $\pm$ 1,8	8,6 $\pm$ 1,3	9,7 $\pm$ 0,2
Si2p (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Al2p (%)	2,6 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,0	4,3 $\pm$ 0,3
Autres (%)	1,2 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,1

Ces analyses mettent en évidence la détection des éléments de l'alliage de titane TA6V (titane et aluminium), même si le pourcentage de ces éléments pour les échantillons stérilisés semble légèrement plus faible. En parallèle, la teneur en carbone augmente significativement sur les échantillons stérilisés, signe d'une contamination carbonée des surfaces. Par ailleurs, de l'azote est détecté sur tous les échantillons stérilisés ou non, et les analyses montrent que cet élément est sous forme organique.

Afin de connaître la nature des contaminations carbonées en surface, une décomposition du signal du carbone a été réalisée (Figure III - 11).



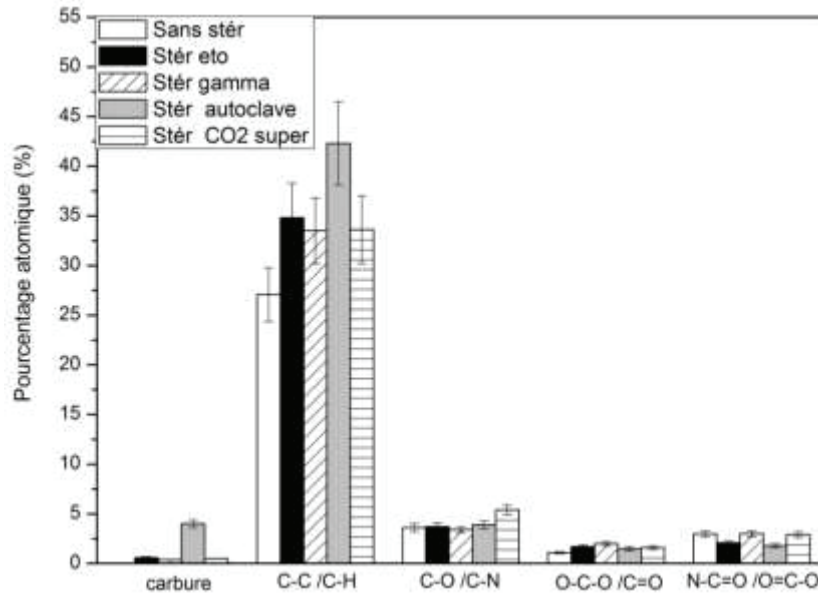


Figure III - 11 : Pourcentage atomique de chaque forme chimique du carbone.

D'une manière générale, on constate que les stérilisations provoquent une augmentation des liaisons C-C/C-H. On peut supposer qu'il s'agit de la dégradation du sachet plastique (marque Südpack medica composé de polyéthylène (PE) et de polyéthylène téréphtalate (PET)) contenant les échantillons au cours de la stérilisation. Cette contamination semble plus importante dans le cas de la stérilisation autoclave.

*En conclusion sur l'ensemble des caractérisations réalisées sur les substrats non revêtus après stérilisation, on note essentiellement une modification du caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces ainsi qu'une contamination systématique des échantillons par le sachet plastique recouvrant les échantillons au cours de la stérilisation.*

## II.2 Stérilisation des films de chitosane autosupportés

Dans cette partie nous avons étudié l'impact des méthodes des stérilisations sur les caractéristiques (DA et masses molaires moyennes) du chitosane sous forme de film autosupporté. A titre comparatif, des analyses similaires ont été réalisées sur le chitosane poudre (c'est à dire n'ayant pas subi la mise en forme mais seulement la stérilisation).

Les spectres RMN et les chromatogrammes ne sont pas présentés ici mais ils ont été traités comme précédemment. Les valeurs de DA, masse molaire moyenne et indice de polydispersité



déterminées sur les poudres et sur les films après stérilisation sont reportées, respectivement dans le Tableau III - 4 et le Tableau III - 5. Le Tableau III - 3 rappelle ces mêmes valeurs dans le cas de poudre et film non stérilisés.

**Tableau III - 3 : Récapitulatif des valeurs obtenues dans le chapitre II.**

	C <sub>kit</sub> (poudre)	C <sub>kit</sub> (film)
DA	21,7 ± 2	17,88 ± 2
Mn (g/mol)	127 500	182 200
Mp (g/mol)	184 100	162 500
Mw (g/mol)	221 900	502 600
Đ (Mw/Mn)	1,74	2,76

**Tableau III - 4 : Récapitulatif des valeurs de DA, de masses molaires moyennes (Mw, Mp, Mn) et d'indice de polydispersité du biopolymère C<sub>kit</sub> à l'état solide (les flèches indiquent l'évolution par rapport aux valeurs obtenues avec le chitosane non stérilisé).**

	Stér ETO	Stér γ	Stér Aut	Stér CO <sub>2</sub> sup	Stér UV
DA	↓ 18 ± 2	~ 22 ± 2	~ 21 ± 2	~ 21 ± 2	↓ 19 ± 2
Mn (g/mol)	~ 127 300	↓ 41 700	~ 130 500	↓ 78 290	~ 118 300
Mp (g/mol)	↓ 167 500	↓ 47 960	↓ 168 400	↓ 103 200	↓ 160 200
Mw (g/mol)	~ 225 400	↓ 73 320	↑ 285 700	↓ 141 700	~ 221 000
Đ (Mw/Mn)	~ 1,77	~ 1,76	↑ 2,19	~ 1,81	~ 1,87

**Tableau III - 5 : Récapitulatif des valeurs de DA, de masses molaires moyennes (Mw, Mp, Mn) et d'indice de polydispersité du biopolymère C<sub>kit</sub> mis en forme (les flèches indiquent l'évolution par rapport aux valeurs obtenues avec le chitosane mise en forme non stérilisé).**

	Stér ETO	Stér γ	Stér Aut	Stér CO <sub>2</sub> sup	Stér UV
DA	~ 19 ± 2	~ 19 ± 2	-*	~ 21 ± 2	~ 20 ± 2
Mn (g/mol)	↓ 159 700	↓ 49 870	↓ 25 520	↓ 20 410	↓ 113 700
Mp (g/mol)	↓ 147 300	↓ 43 660	↓ 31 510	↓ 20 360	↓ 107 900
Mw (g/mol)	↓ 425 200	↓ 134 100	↓ 38 590	↓ 34 490	↓ 376 400
Đ (Mw/Mn)	~ 2,66	~ 2,69	↓ 1,51	↓ 1,69	↑ 3,31

*\*en raison de la non-dissolution du film de chitosane dans la solution d'eau deutéré acidifiée, l'analyse RMN de cet échantillon n'a pas pu être effectuée.*

*Remarque : la stérilisation en UV a également été investiguée dans le cas des films de chitosane car elle a été employée pour l'étude des tests préliminaires de biocompatibilité.*

Concernant le degré d'acétylisation mesuré sur l'ensemble des échantillons confondus (poudres et films, stérilisés ou non), les modifications observées ne sont pas significatives pour conclure sur un éventuel impact de la stérilisation sur le DA.

Pour les masses molaires mesurées sur les poudres, on observe, cette fois, des évolutions très significatives dans les valeurs qu'il s'agisse de  $M_n$ ,  $M_p$  et  $M_w$ . Si l'on considère la masse molaire au pic ( $M_p$ ), correspondant à la masse molaire maximale présente dans le polymère, on observe que celle-ci diminue pour toutes les stérilisations effectuées. Les stérilisations dégradent sensiblement le polymère solide. Concernant la masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ), celle-ci n'évolue pas après les stérilisations ETO et UV. En revanche, elle diminue suite à la stérilisation  $CO_2$  supercritique et à la stérilisation par rayons gamma.  $M_w$  augmente même, suite à la stérilisation par autoclave en raison de l'augmentation d'agrégats relatifs à ce mode stérilisation. L'indice de polydispersité confirme ces résultats avec globalement une augmentation de cette valeur suite à la stérilisation par autoclave, signe d'une dégradation du polymère.

Pour les valeurs mesurées sur les films autosupportés après redissolution, le bilan de l'impact des stérilisations est beaucoup moins contrasté puisque toutes les masses molaires ( $M_p$ ,  $M_n$  et  $M_w$ ) diminuent significativement. C'est la stérilisation ETO qui semble cependant le moins dégrader le film polymère. Les stérilisations autoclave et  $CO_2$  supercritique, quant à elles, ont un impact très important sur la dégradation des chaînes de chitosane.

*En conclusion, les stérilisations étudiées ne semblent pas avoir d'influence sur le degré d'acétylation du chitosane poudre ou mis en forme. Ce paramètre aura, donc, une influence minime sur le comportement biologique des revêtements. En revanche, une modification importante des masses molaires moyennes du polymère a été constatée après toutes les stérilisations, un effet d'autant plus marqué lorsque le polymère a été mis en forme. Les stérilisations autoclave et  $CO_2$  sup apparaissent au vu de ces résultats comme les plus destructrices pour notre matériau polymère.*

## II.3 Caractérisation des échantillons revêtus stérilisés

### II.3.1 Etude de la morphologie de surface

La morphologie des échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$  stérilisés a été observée à l'œil dans un premier temps. Des différences sont observées essentiellement sur les échantillons stérilisés en autoclave et par  $CO_2$  sup, avec des films très détériorés et la présence de bulles, respectivement. En revanche, aucune différence notable n'a pu être constatée suite aux stérilisations ETO et gamma. Ces premières observations sont confirmées par les analyses MEB par comparaison avec l'échantillon non stérilisé (Figure III - 12 et Figure III - 13).



Figure III - 12 : Image MEB de l'échantillon C<sub>kit</sub> TPiT<sub>A6V</sub> brill non stérilisé.

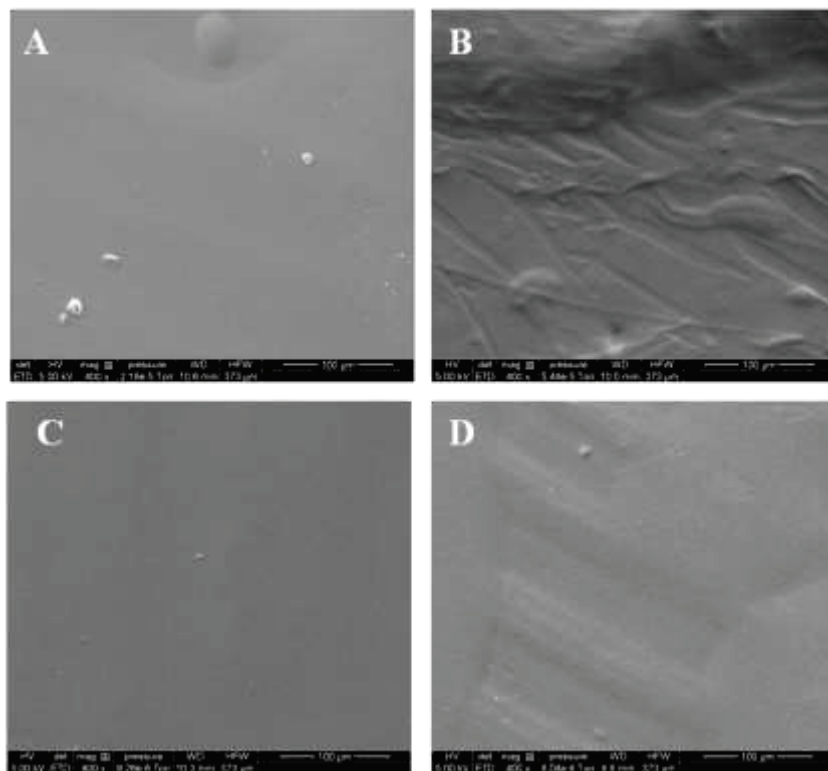


Figure III - 13 : Images MEB (SE) des échantillons T<sub>A6V</sub> brill stérilisés par rayons  $\gamma$  (A), par autoclave (B), par ETO (C) et par CO<sub>2</sub> supercritique (D).

En ce qui concerne la stérilisation gamma (Figure III - 13 A), la surface observée est équivalente à celle non stérilisée. Suite à la stérilisation autoclave, on observe une détérioration sévère du chitosane, qui semble avoir perdu en épaisseur et laisse deviner les traces d'usinage du substrat (Figure III - 13B). Aucune modification notable de la surface n'a été observée dans le cas de la stérilisation par ETO (Figure III - 13 C). Enfin, suite à la stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique, la surface de l'échantillon (Figure III - 13 D) présente une morphologie particulière avec des zones qui apparaissent bombées (en lien avec les bulles observées à l'échelle macroscopique) et des zones de plus faible épaisseur qui laisse, à nouveau deviner les sillons d'usinage, comme pour l'échantillon non stérilisé.

### II.3.2 Topographie de la surface stérilisée

Le Tableau III - 6 donne les valeurs de Sa, mesurées par profilométrie à pointe sur les échantillons avant et après stérilisation.

**Tableau III - 6 : Rugosité des surfaces C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> stérilisées ou non.**

	Sans stérilisation	ETO	$\gamma$	Autoclave	CO <sub>2</sub> sup
Sa ( $\mu\text{m}$ )	0,9 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,8	6,3 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 4,7	0,8 $\pm$ 0,1

Si la dégradation du chitosane faisant suite à la stérilisation autoclave et mise en évidence par MEB semble bien corrélée à une valeur de rugosité importante, les autres résultats ne semblent pas corrélés avec les observations MEB. Ainsi, il était attendu une rugosité également importante pour la surface stérilisée par CO<sub>2</sub> sup et une plus faible pour la surface ETO, or les résultats sont contradictoires et peuvent difficilement être expliqués. Il peut s'agir d'un manque de reproductibilité des surfaces. Il devient alors difficile de conclure sur cette caractérisation et sur l'impact de la stérilisation sur les topographies.

### II.3.3 Evolution de la chimie de surface suite à la stérilisation

L'analyse de l'extrême surface par XPS a également été utilisée afin d'étudier les variations en termes de chimie de surface des échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> suite aux différentes méthodes de stérilisations. Le Tableau III - 7 récapitule la quantification en pourcentage atomique des éléments présents à la surface des échantillons.

**Tableau III - 7 : Compositions en éléments atomiques exprimés en pourcentage pour les échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> déterminées par XPS. Les mesures sont réalisées à deux endroits différents. Autres = contaminations en surface comme S et Si.**

	Sans stér	Stér ETO	Stér $\gamma$	Stér Aut	Stér CO <sub>2</sub> sup
C1s (%)	61,7 $\pm$ 0,5	63,8 $\pm$ 0,7	60,8 $\pm$ 0,6	68,3 $\pm$ 0,6	65,5 $\pm$ 1,1
N1s (%)	6,4 $\pm$ 0,0	6,3 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ ,1	6,1 $\pm$ 0,0
O1s (%)	31,7 $\pm$ 0,8	29,9 $\pm$ 0,6	32,3 $\pm$ 0,5	25,8 $\pm$ 0,7	28,3 $\pm$ 1,0
Ti2p (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Autres (%)	0,3 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 1,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0

Pour toutes les stérilisations, on observe un masquage complet du substrat. Le dépôt de chitosane reste suffisamment épais quelque soit le mode de stérilisation. Globalement, les valeurs en éléments C, N et O sont assez proches les unes des autres et assez similaires à celles détectées sur le revêtement non stérilisé.

En parallèle, le signal de l'élément carbone a été décomposé pour chaque échantillon revêtu CS (Figure III - 14).

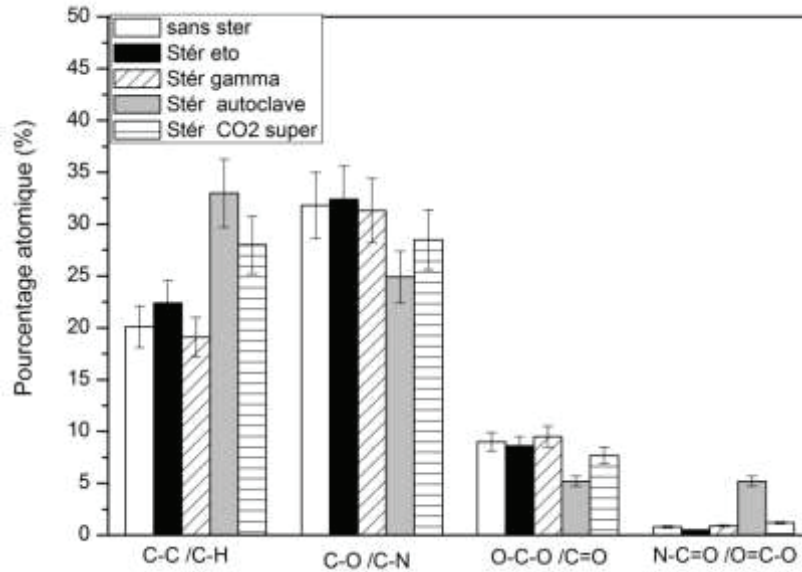


Figure III - 14 : Pourcentage atomique de chaque forme chimique du carbone pour les échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V</sub> brill stérilisés.

D'après la décomposition, on observe une augmentation de la teneur en carbone des liaisons C-C/C-H suite aux stérilisations ETO, autoclave et CO<sub>2</sub> supercritique. Ces résultats sont, sans doute, lié à la probable dégradation du packaging (*cf* résultats substrat nu stérilisé II.1.3), sans dégradation apparente du chitosane.

*Les observations macroscopique et microscopique des échantillons revêtus stérilisés ont permis de mettre en évidence la détérioration du revêtement chitosane lorsqu'il est stérilisé par autoclave. La stérilisation des échantillons par CO<sub>2</sub> supercritique engendre, quant à elle, la formation de bulles à l'intérieur du revêtement. Les stérilisations par rayons gamma et ETO n'apportent pas de modification significative de la morphologie des échantillons. Les analyses chimiques semblent mettre en évidence la détérioration du sachet plastique entourant l'échantillon à stériliser et l'apport de contamination à la surface.*

## Références

1. Ma PL, Buschmann MD, Winnik FoM: **One-Step Analysis of DNA/Chitosan Complexes by Field-Flow Fractionation Reveals Particle Size and Free Chitosan Content.** *Biomacromolecules* 2010, **11**(3):549-554.
2. Lee K, Ahn S, Choi CH, Lee D, Jung W-K, Kim G: **Functionalized alginate/chitosan biocomposites consisted of cylindrical struts and biologically designed for chitosan release.** *Current Applied Physics* 2014, **14**(8):1105-1115.
3. Prochazkova S, Vårum KM, Ostgaard K: **Quantitative determination of chitosans by ninhydrin.** *Carbohydrate Polymers* 1999, **38**(2):115-122.
4. Janolino V, Swaisgood H: **A spectrophotometric assay for solid phase primary amino groups.** *Appl Biochem Biotechnol* 1992, **36**(2):81-85.
5. Coussot G, Faye C, Ibrahim A, Ramonda M, Dobrijevic M, Le Postollec A, Granier F, Vandenabeele-Trambouze O: **Aminated dendritic surfaces characterization: a rapid and versatile colorimetric assay for estimating the amine density and coating stability.** *Anal Bioanal Chem* 2011, **399**(6):2295-2302.
6. Brunel F, Veron L, David L, Domard A, Delair T: **A novel synthesis of chitosan nanoparticles in reverse emulsion.** *Langmuir* 2008, **24**(20):11370-11377.
7. Noel S, Liberelle B, Robitaille L, De Crescenzo G: **Quantification of Primary Amine Groups Available for Subsequent Biofunctionalization of Polymer Surfaces.** *Bioconjugate Chemistry* 2011, **22**(8):1690-1699.

# **Chapitre IV**

## **Caractérisations biologiques des revêtements**



# SOMMAIRE

<b>I. TESTS MICROBIOLOGIQUES.....</b>	<b>149</b>
<i>I.1 Activité antibactérienne .....</i>	<i>149</i>
I.1.1 Principe de l'expérience .....	150
I.1.2 Application de la méthode de calcul issu de la norme ISO 20743 .....	152
I.1.3 Activité antibactérienne en présence de bactéries communes.....	153
<i>I.2 Tests préliminaires d'adhésion bactérienne .....</i>	<i>158</i>
<b>II. CYTOCOMPATIBILITE DES REVETEMENTS .....</b>	<b>159</b>
<i>II.1 Principe du test de cytotoxicité .....</i>	<i>160</i>
<i>II.2 Tests préliminaires et mise au point des conditions opératoires .....</i>	<i>161</i>
<i>II.3 Viabilité cellulaire des revêtements stérilisés .....</i>	<i>163</i>
II.3.1 Stérilisation gamma .....	163
II.3.2 Stérilisation UV .....	164
II.3.3 Synthèses de la reproductibilité sur les échantillons T <sub>A6V brill</sub> .....	165
<i>II.4 Viabilité cellulaire en présence de cellules embryonnaires de souris (NiH3T3) .....</i>	<i>167</i>
II.4.1 Choix des conditions expérimentales.....	167
II.4.2 Cytotoxicité des revêtements à base de chitosane stérilisés .....	167
<i>II.5 Cytocompatibilité des biopolymères .....</i>	<i>170</i>
II.5.1 Criblage en présence de cellules humaines osseuses (MG63) .....	170
II.5.2 Viabilité cellulaire des revêtements en présence de NiH3T3.....	172

Dans ce chapitre, l'évaluation des propriétés biologiques des revêtements polymères sélectionnés au chapitre II, en termes de capacité d'inhibition de la formation du biofilm bactérien et de biocompatibilité, est déterminée *in vitro*. Plus particulièrement, dans la première partie, l'étude des capacités inhibitrices des revêtements est effectuée par l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes en présence de bactéries témoins. Dans une seconde partie, la biocompatibilité des revêtements est évaluée *via* l'étude de leur cytocompatibilité en présence de différentes lignées cellulaires.

## I. Tests microbiologiques

### I.1 Activité antibactérienne

Les propriétés antibactériennes des revêtements bioactifs précédemment élaborés sont évaluées vis-à-vis de 2 souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ces deux types de bactérie, l'une à Gram négatif (*E. coli*) et l'autre à Gram positif (*S. aureus*) sont représentatives de la grande majorité du monde bactérien.

La différence entre ces deux types de bactéries a été mise en évidence par Gram (mis au point en 1884 par Hans Christian Gram) grâce à une technique de coloration, la paroi bactérienne prenant une couleur différente en fonction de ses caractéristiques, permettant de différencier le type de bactéries. Les deux classes de bactérie se différencient par la structure et l'épaisseur de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram positif et négatif sont constituées d'une paroi cellulaire composée de trois couches : (i) une couche de peptidoglycanes, un espace péri-plasmique et une membrane plasmique (épaisseur 20-100 nm) [1] pour le Gram positif et (ii) une membrane externe, un espace péri-plasmique et une membrane plasmique (épaisseur 15-20 nm) [2, 3] pour le Gram négatif. De ce fait, différentes réponses des agents antimicrobiens vis-à-vis de ces deux familles de bactéries sont logiquement constatées [4].

Les structures pariétales conférant aux bactéries donc des propriétés différentes, en particulier en ce qui concerne leur résistance aux biocides, ces deux types de souches bactériennes sont systématiquement testées dans toutes les normes visant un effet antibactérien. Il a donc été choisi de

faire les premiers essais d'activité antibactérienne de revêtements à base de chitosane sur les deux souches précitées.

A l'heure actuelle, il existe deux normes permettant d'évaluer les propriétés antimicrobiennes de supports polymères : les normes ISO 20743 [5] et ISO 22196 [6]. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la norme ISO 22196, laquelle, initialement mise au point pour l'évaluation de l'action antibactérienne de surfaces en plastique (ISO 22196-2007), a été révisée et étendue aux surfaces non poreuses en 2011 [7]. La Figure IV- 1 présente l'ensemble des tests menés et des échantillons testés.

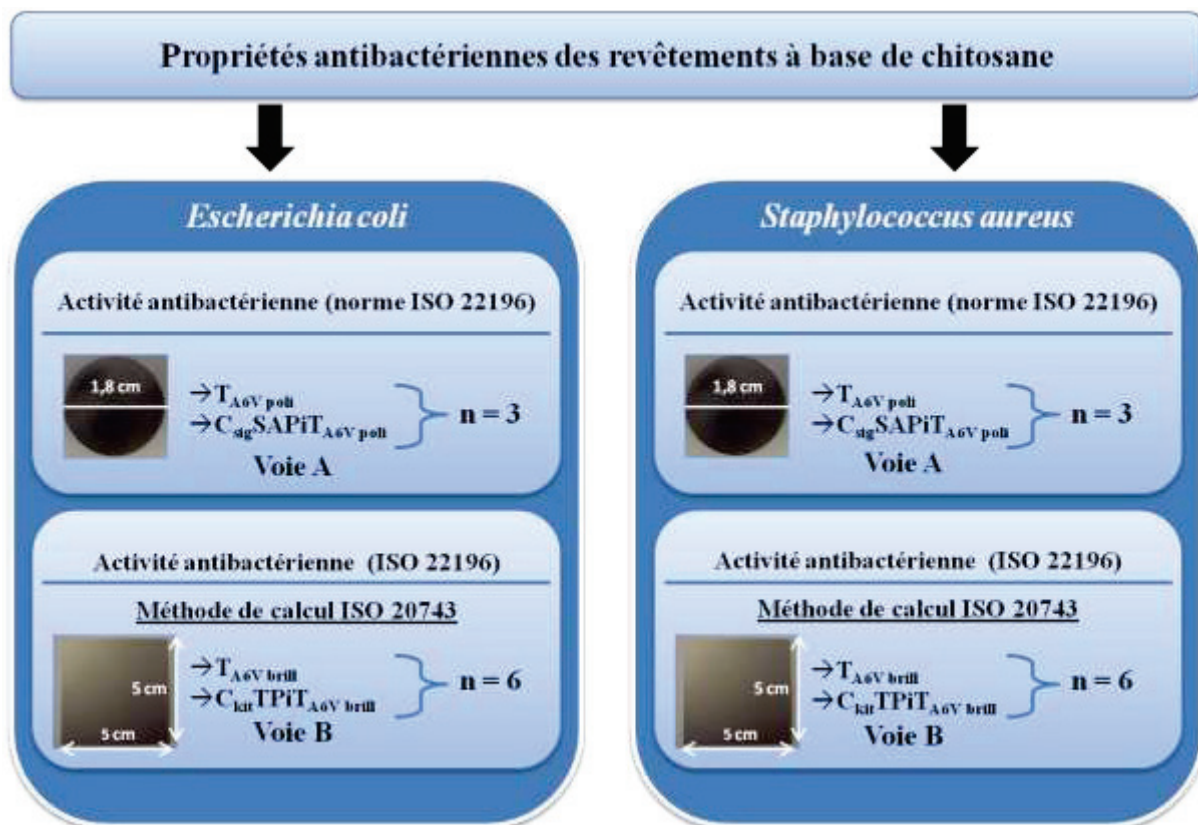


Figure IV- 1 : Récapitulatif de l'ensemble des tests menés et des échantillons utilisés au cours de cette étude.

### I.1.1 Principe de l'expérience

#### I.1.1.1 Application de la norme ISO 22196

Un protocole a été mise en place, conformément à la norme ISO 22196, à l'exception de la taille des échantillons, afin d'évaluer les propriétés antibactériennes des revêtements bioactifs précédemment préparés. L'ensemble de ces expériences a été effectué chez l'un des partenaires du consortium RIBIO, Nosoco.Tech®. Il peut être ajouté que nous avons dû adapter la taille de nos échantillons (1 cm<sup>2</sup> vs 16 cm<sup>2</sup> dans la norme) en raison de la disponibilité des échantillons fournis par l'industriel.

Le protocole opératoire (voir conditions expérimentales détaillées en annexe A7) est résumé Figure IV- 2. Brièvement, un inoculum contenant une concentration définie de bactéries est déposé sur l'échantillon (Essai) et sur un témoin (Témoin) et recouvert d'un parafilm afin de créer un contact étroit entre les micro-organismes et la surface à tester. Les échantillons sont incubés 24 h à 37°C, la température optimale de croissance du micro-organisme cible en conditions saturantes d'humidité. Puis, les supports sont ensuite immergés dans un milieu neutralisant afin de décrocher les bactéries de la surface par agitation manuelle. On procède ensuite à une numération en milieu solide [8]. Le dénombrement est exprimé en UFC/cm<sup>2</sup> de substrat, sachant que la suspension bactérienne utilisée au départ en tant qu'inoculum est de  $2,5.10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Dans ces conditions, il est fait l'hypothèse que les quantités initiales de bactéries présentes sur le témoin( $C_0$ ) et sur l'échantillon essai ( $E_0$ ) sont identiques.

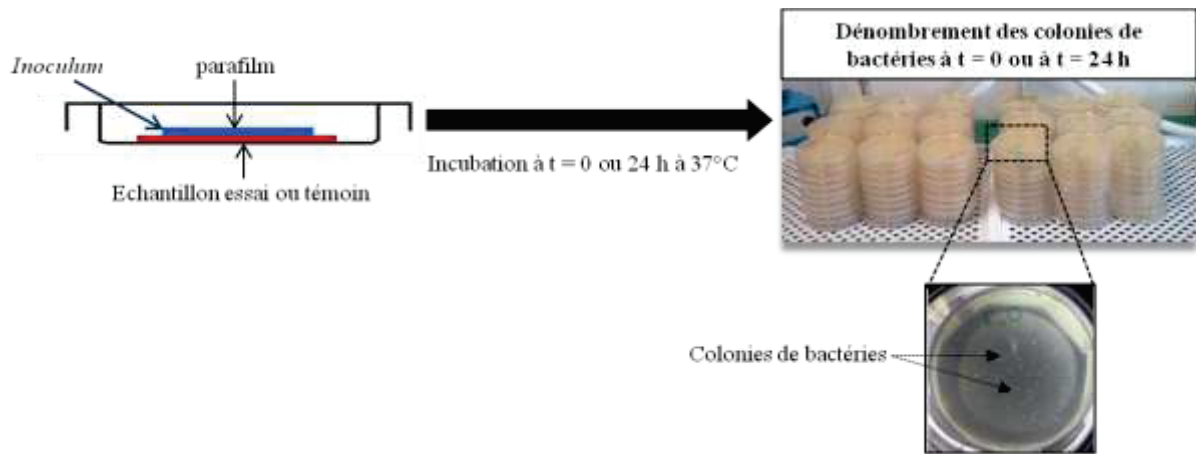


Figure IV- 2 : Schéma du protocole issu de la norme ISO 22196 pour tester l'activité antibactérienne des revêtements.

L'activité antimicrobienne (A) peut alors être calculée suivant la relation :

$$A = \text{Log } C_{24} - \text{Log } E_{24} \text{ (équation IV-1)}$$

où  $C_{24}$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage et 24 h de contact sur le substrat témoin (C = contrôle) et  $E_{24}$  est le nombre de bactéries après décrochage après 24h sur les échantillons essais c'est-à-dire ici le substrat nu et revêtu (revêtement bioactif sur titane), respectivement.

Enfin, pour qualifier l'activité antibactérienne du système, on applique les règles suivantes :

- Si  $A < 1 \text{ Log} \rightarrow$  le matériau est inactif,
- Si  $A \geq 1 \text{ Log} \rightarrow$  le matériau possède des propriétés antibactériennes, on dit qu'il est bactériostatique,
- Si  $E_{24} = 0 \text{ UFC/cm}^2 \rightarrow$  le matériau est appelé bactéricide.

Remarque : la valeur du log (UFC/cm<sup>2</sup>) obtenue pour les échantillons témoins au début de l'expérimentation doit être comprise entre 4 et 5 en valeur de log pour que l'essai soit réalisé conformément à la norme.

De façon à mieux rendre compte du résultat, on peut placer, sur un graphe les valeurs calculées du **Log C<sub>24</sub>** et du **Log E<sub>24</sub>** en fonction du temps (Figure IV- 3).

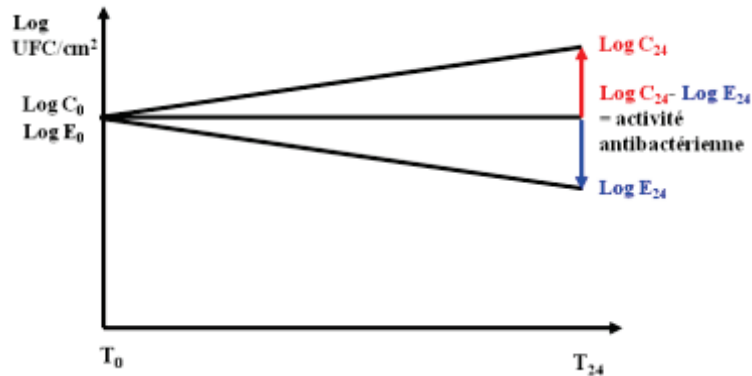


Figure IV- 3 : Représentation du suivi de la croissance de la souche bactérienne (formation du biofilm) testée sur substrat (0 et 24 heures) et calcul de l'activité antimicrobienne selon la norme ISO 22 196.

#### I.1.2 Application de la méthode de calcul issu de la norme ISO 20743

Comme mentionné dans la partie I.1, les propriétés antibactériennes de dispositifs médicaux peuvent être définies par la norme ISO 20743 [5]. Cette norme a été mise au point pour des textiles destinés à des applications médicales (ISO 20743:2007). D'un point de vue strictement expérimental, cette norme n'est pas indiquée pour l'évaluation des propriétés antibactériennes de revêtements bioactifs sur substrat de titane. En revanche, le principe ainsi que la méthode de calcul peuvent être intéressants à appliquer à nos matériaux. En effet, le principe de cette norme s'appuie sur l'hypothèse que la quantité de bactéries présente initialement ( $t = 0$ ) sur les échantillons témoins ( $C_0$ ) et les échantillons essais ( $E_0$ ) n'est pas identique (Figure IV- 4). A partir de là, il devient donc opportun d'intégrer  $C_0$  et  $E_0$  dans la méthode de calcul.

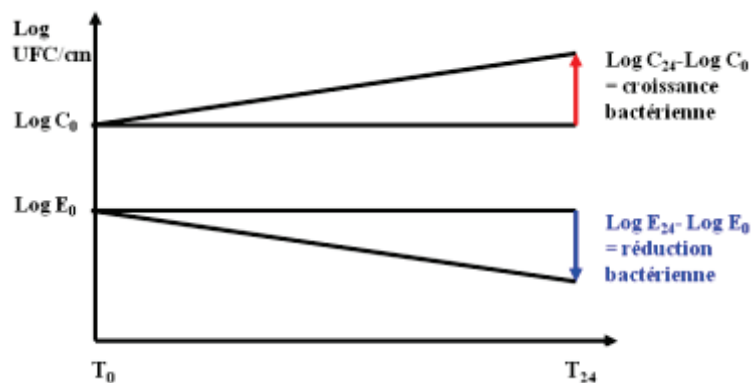


Figure IV- 4 : Représentation du suivi de la croissance de la souche bactérienne (formation du biofilm) testée sur substrat de titane et verre (0 et 24 heures) et calcul de l'activité antimicrobienne selon la norme ISO 20743.

L'activité antimicrobienne peut alors être calculée suivant la relation suivante :

$$A = (\text{Log } C_{24} - \text{Log } C_0) - (\text{Log } E_{24} - \text{Log } E_0) \text{ (équation IV-2)}$$

où  $C_{24}$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage et 24 h de contact,  $C_0$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage au début de l'expérimentation (1 min) sur le substrat témoin,  $E_{24}$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage et 24 h de contact et  $E_0$  est le nombre de bactéries dénombrées après décrochage au début de l'expérimentation (1 min) sur l'échantillon essai (Titane revêtu).

*Remarque : les mêmes règles que précédemment s'appliquent pour qualifier l'activité antibactérienne d'un revêtement. Dans les prochaines expériences, le titane non revêtu sera utilisé comme contrôle.*

Pour ces tests, les échantillons ont été décontaminés par un nettoyage à l'alcool à 70% suivi d'un séchage à température ambiante. Bien que l'alcool n'ait pas d'effet sur les spores et les virus, ce type de décontamination est néanmoins efficace pour assurer une élimination quasi complète des bactéries. Et, comme nous le montre l'étude de Marreco *et al.*, la décontamination par l'éthanol est une méthode non destructrice pour les matériaux à base de chitosane et non toxique pour les cellules [9]. Ce traitement a permis ainsi de conserver à la fois la morphologie et les propriétés du biopolymère avant sa mise en contact avec les souches bactériennes.

### I.1.3 Activité antibactérienne en présence de bactéries communes

#### I.1.3.1 *Etude de la voie de greffage A sur une surface polie ( $T_{A6V_{poli}}$ )*

Comme évoqué dans le chapitre II, pour atteindre l'objectif principal du projet que représente la synthèse d'un revêtement bioactif à base de chitosane, il a été décidé de mener en parallèle les premiers essais de bactériologie tout en continuant de travailler à l'optimisation de la chimie de greffage. Ceci explique pourquoi les premiers tests bactériologiques ont été réalisés sur des revêtements de chitosane greffés selon la voie A (APTES + AS), même si ce n'est pas la voie qui, au final, aura été retenue. Les résultats préliminaires présentés ici ont cependant permis d'évaluer le potentiel antibactérien du chitosane (CS).

L'activité antibactérienne a ainsi pu être évaluée selon la norme ISO 22196, en présence, respectivement, des souches de *S. aureus* et d'*E. coli*.

#### - **Activité antibactérienne en présence de *S. aureus***

L'expérience a été réalisée selon le principe donné en I-2. Le dénombrement des UFC a été réalisé puis utilisé avec la relation IV-1, donnant ainsi l'activité antibactérienne. Les résultats sont donnés dans le Tableau IV- 1. A titre indicatif, le tableau donne également le nombre de colonies de bactéries en UFC/cm<sup>2</sup>. Cependant, il est plus facile de conclure sur les valeurs des logarithmes.

Tableau IV- 1 : Dénombrement des colonies de bactéries après 24 h d'incubation dans le cas de *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
		Nombre moyen UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>	Activité antibactérienne
Lame de verre = C <sup>-</sup> (t = 0)		14 900	4,17	Croissance bactérienne: 1,68
Incubation 24h à 37°C	Lame de verre = C <sup>-</sup>	715 000	5,85	
	T <sub>A6V poli</sub> = C <sup>+</sup>	488 333	5,69	0,16 ~ 0
	C <sub>sig</sub> SAPiT <sub>A6V poli</sub>	6,67	0,82	5,03

Il peut être relevé que la croissance bactérienne obtenue en 24 h sur la surface témoin est suffisante pour valider le test dans le cadre de la norme ( $1,68 > 1$ ). Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'échantillon de titane non revêtu (T<sub>A6V poli</sub>) présente une croissance bactérienne de 5,69 Log sur l'essai, valeur équivalente à celle obtenue avec le contrôle. Comme attendu et démontré dans la littérature [10, 11], l'échantillon T<sub>A6V poli</sub> ne présente aucune propriété antibactérienne.

En revanche, les résultats obtenus montrent une croissance de 0,82 Log/cm<sup>2</sup> sur l'essai pour l'échantillon C<sub>sig</sub>SAPiT<sub>A6V poli</sub>. On peut ainsi en conclure que l'échantillon revêtu chitosane est bactériostatique.

*Remarque : La prolifération de la souche bactérienne a également été validée au début de l'expérience via le contrôle de l'inoculum par la méthode du dénombrement.*

#### - Activité antibactérienne en présence d'*E. coli*

De la même manière que pour *S. aureus*, l'activité antibactérienne des revêtements envers une bactérie représentative de la famille des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli*, a été évaluée. Le Tableau IV- 2 récapitule l'ensemble des résultats obtenus en présence de cette bactérie.

Tableau IV- 2 : Dénombrement des colonies de bactéries après 24h d'incubation dans le cas d'*E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>				
		Nombre moyen UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>	Activité antibactérienne
Lame de verre = C <sup>+</sup> (t = 0)		14 016	4,51	Croissance bactérienne: 1,71
Incubation 24h à 37°C	Lame de verre = C <sup>+</sup>	1 100 000	6,22	
	T <sub>A6V poli</sub>	2 033 333	6,30	-0,08 ~ 0
	C <sub>sig</sub> SAPiT <sub>A6V poli</sub>	6,67	0,82	5,4



Le dénombrement des UFC présentes sur l'échantillon  $T_{A6V\text{ poli}}$  après un temps de contact de 24 h a permis de vérifier l'absence de propriétés antibactériennes pour cet échantillon. En ce qui concerne l'échantillon  $C_{\text{sig}}SAPiT_{A6V\text{ poli}}$  une croissance de 0,82 Log sur l'essai a pu être observée, correspondant à une activité antibactérienne de 5,4 Log. Comme pour *S. aureus*, on admet alors que cet échantillon est bactériostatique.

***En conclusion sur cette première série d'analyse, un effet antibactérien du revêtement polymère a bien été mis en évidence, à la fois pour des bactéries à Gram – et à Gram +.***

#### *1.1.3.2 Etude de la voie de greffage B sur une surface brillantée ( $T_{A6V\text{ brill}}$ )*

Comme déjà évoqué, ces expériences ont été menées en parallèle de la partie optimisation de la voie de greffage (chap II). Au cours de cette optimisation, il a été décidé de modifier la source du chitosane, pour travailler sur un biopolymère de grade médical. Ce dernier présente des valeurs de DA et de masses molaires moyennes différentes de celles obtenues pour le chitosane commercial de chez sigma ( $C_{\text{sig}}$ ). Ces différences peuvent entraîner un changement des propriétés antibactériennes des revêtements à base de ce chitosane [12]. Dans ce contexte, il était nécessaire de vérifier, à nouveau, les propriétés des revêtements préparés à partir de chitosane kitozyme ( $C_{\text{kit}}$ ). Les caractéristiques du revêtement évalué dans cette deuxième partie sont rappelées dans la Figure IV- 1. Il est à noter que la forme et la surface des nouveaux échantillons analysés ont également été modifiées. Il s'agit à présent de plaques de 5 cm x 5 cm. Ce choix est justifié par la norme ISO 22196 qui fait référence à des surfaces de plus grande taille.

L'activité antibactérienne du revêtement sélectionné a été évaluée vis-à-vis des deux souches déjà évoquées en utilisant la norme ISO 22196 pour la partie expérimentale et la norme ISO 20743 pour la méthode de calcul (afin de prendre en considération la quantité de bactérie initialement présente en surface du revêtement).

#### **- Activité antibactérienne en présence de *S. aureus***

Les résultats obtenus avec *S. aureus* après comptage et calcul sont reportés dans le Tableau IV- 3.

Tableau IV- 3 : Dénombrement des colonies de bactéries après 24h d'incubation dans le cas de *S. aureus*.

Staphylococcus aureus				
	Nombre moyen UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>	Croissance bactérienne	Activité antibactérienne
T <sub>A6V brill</sub> (t = 1 min)	11 563,5	4,06	1,06	
T <sub>A6V brill</sub> (t = 24 h)	131 250	5,12		
C <sub>kit</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> (t = 1 min)	57,29	1,76	-	Bactéricide
C <sub>kit</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> (t = 24 h)	0	-		

Les résultats confirment la croissance bactérienne attendue sur les échantillons témoins. De plus, le revêtement bioactif montre des propriétés antibactériennes dès le début de l'expérimentation ; cet effet se confirme après 24 h avec l'absence de bactéries en surface des échantillons analysés. On peut en conclure que les revêtements C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> ont un effet bactéricide sur la souche bactérienne *S. aureus*. Cette expérience a été reproduite une seconde fois au laboratoire, sur un même lot d'échantillons, conduisant aux mêmes observations et conclusions.

#### - Activité antibactérienne en présence d'*E. coli*

De façon identique, la procédure a été appliquée en présence d'*E. coli*. Les résultats obtenus après comptage et calcul sont reportés dans le Tableau IV- 4.

Tableau IV- 4 : Dénombrement des colonies de bactéries après 24h d'incubation dans le cas d'*E. coli*.

Escherichia coli				
	Nombre moyen UFC/cm²	Log UFC/cm²	Croissance bactérienne	Activité antibactérienne
T <sub>A6V brill</sub> (t = 1 min)	17 291,67	4,24	1,99	
T <sub>A6V brill</sub> (t = 24 h)	1 673 958,33	6,22		
C <sub>kit</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> (t = 1 min)	364,6	2,56	-	Bactéricide
C <sub>kit</sub> TPiT <sub>A6V brill</sub> (t = 24 h)	0	-		

De nouveau, les résultats confirment l'absence de propriétés antibactériennes de la surface d'alliage de titane non revêtue (témoin). De plus, comme pour les tests avec *S. aureus*, le revêtement de chitosane présente des propriétés antibactériennes dès le début de l'expérimentation, validées par un faible nombre de colonies bactériennes décomptées après 1 min. Après 24 h l'absence de bactéries

en surface confirme l'effet bactéricide des échantillons analysés C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V</sub> brill. Les revêtements C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V</sub> brill ont donc un effet bactéricide sur la souche bactérienne *E. coli*. Cette expérience a été reproduite au laboratoire sur un même lot d'échantillons, donnant des résultats équivalents.

***En conclusion de ces deux séries d'expériences, on a pu démontrer l'effet bactéricide des revêtements polymère élaborés avec le chitosane kitozyme. Par ailleurs, le changement de substrat, de voie de greffage et de biopolymère n'a pas modifié les propriétés antibactériennes du dispositif final.***

#### 1.1.3.3 Discussion

Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, dans laquelle l'évaluation de l'activité antibactérienne du chitosane est rapportée. Ces études étant nombreuses, nous nous sommes focalisés sur les études réalisées sur des films de chitosane.

Par exemple, Mi et *al.* ont montré la conservation des propriétés antibactériennes du chitosane après sa mise en forme de film par réticulation avec du glutaraldéhyde ou de l'acide aglycone géniposidique, permettant ainsi une diminution significative de la quantité d'*E. coli* et de *S. aureus* [13].

En lien avec les propriétés antibactériennes du chitosane, dépendantes à la fois des facteurs intrinsèques du chitosane (DA, masse molaire, origine, mise en forme) et des facteurs environnementaux (acidité du milieu, type de bactéries visés, température..), les mécanismes de l'action antibactérienne du chitosane varient en fonction des propriétés et de la structure de la paroi bactérienne [14]. Par ailleurs, Dutta et *al.* ont répertorié les différentes méthodes de préparation de films antimicrobiens à base de chitosane en vue d'une application pour les films alimentaires [15].

Ainsi, les différences obtenues en termes d'intensité d'action antibactérienne des deux chitosanes s'expliquent par les différences de caractéristiques des chitosanes (DA et masse molaire).

## I.2 Tests préliminaires d'adhésion bactérienne

Une donnée importante en bactériologie concerne l'étude de l'adhésion des bactéries. En effet, comme cela a été évoqué au chapitre I, une méthode pour lutter contre la formation du biofilm bactérien est de rendre les surfaces antiadhésives. Ainsi, nous avons envisagé de vérifier les propriétés antiadhésives des revêtements préparés.

Pour cela, un test préliminaire a été réalisé en présence de la bactérie commune *S. aureus*. Brièvement, le protocole expérimental consiste à immerger les échantillons à tester dans une solution d'inoculum de bactéries à  $10^8$  CFU/mL. Après incubation pendant 1 h à 37 °C sous légère agitation, les échantillons sont lavés à trois reprises dans une solution de PBS (0,08 M) sous agitation pendant 15 min. Les bactéries en surface des échantillons sont ensuite récupérées et dénombrées par comptage des colonies de bactéries en milieu gélosé (Tableau IV- 5).

**Tableau IV- 5 : Dénombrement des colonies de bactéries après tests d'adhésion.**

	Nombre moyen UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>
Témoin	3 610 000	6,55
Essai	2 360 000	6,37

Aucune différence significative d'adhésion entre l'échantillon témoin (titane non revêtu) et le revêtement (essai) n'a ainsi pu être mise évidence. A l'issue de ce premier test, on peut penser que le revêtement ne possède pas, à priori, de propriétés antiadhésives.

Pour confirmer ce résultat, il était envisagé une seconde expérience en utilisant *S. epidermidis* ica+ connue pour ses propriétés adhésives. En effet, dans l'étude de Verheyen *et al.*, *S. aureus* présente une adhésion préférentielle sur les métaux et les composites alors que *S. epidermidis* adhère indifféremment à la surface des métaux, des composites ou des polymères [16]. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de réaliser cette expérience.

***Cette première partie du quatrième chapitre a donc permis de démontrer que les revêtements de chitosane préparés à partir des deux biopolymères d'origine animale (crustacé) et d'origine non-animale (champignon), possèdent bien les propriétés bactéricides attendues.***

Si les résultats ont été validés sur des bactéries communes, il sera utile dans la suite du projet d'évaluer aussi les propriétés antibactériennes en présence de trois des neuf bactéries pathogènes

parodontales couramment recherchées en clinique, telles que *P. gingivalis*, *T. forsythia* et *P. intermedia* (présentées dans le chapitre I). Une étude précédente réalisée au laboratoire et avec un autre mode de greffage du chitosane, permet d'espérer des résultats tout aussi positifs sur les revêtements préparés dans le cadre du projet. En effet, dans celle-ci, il a été démontré une réduction significative de bactéries parodontales telles que *P. gingivalis* et *A. naeslundii* en présence de revêtements bioactifs à base de chitosane [17].

## II. Cytocompatibilité des revêtements

Comme évoqué dans le chapitre I, un des paramètres clé à la réussite de la pose d'un implant dentaire est lié à la bonne stabilité de ce dernier dans la cavité orale, cette stabilité passant nécessairement par une phase d'ostéointégration optimale de l'implant [18]. Dans ce sens, la littérature reporte de nombreux articles centrés sur l'étude de l'interface tissu osseux/implant [19, 20]. Cependant, il est tout aussi important de considérer la zone à risque, définie dans le chapitre I comme l'interface tissu mou/implant, qui peut être un lieu privilégié pour la colonisation bactérienne. Il est donc nécessaire que l'adhésion des tissus mous sur l'implant soit optimale afin de constituer une barrière efficace contre l'infiltration des bactéries [21]. Ainsi, cette dernière partie est dédiée à l'évaluation de la cytotatibilité *in vitro* des revêtements à base de chitosane, pour rendre compte de l'interface tissu mou/implant.

Selon les recommandations des normes ISO 7405 et 10993-partie 5, il existe plusieurs critères afin de mettre en évidence la cytotatibilité des dispositifs médicaux [22, 23]. Par exemple, l'évaluation de l'adhésion, de la morphologie et/ou de la prolifération cellulaire en présence de matériaux, sont des critères pertinents pour déterminer la cytotatibilité. Celles-ci peuvent être suivies par des études en microscopie électronique à balayage (MEB) [24, 25] ou en imagerie confocale [17, 26].

Par ailleurs, un autre critère de biocompatibilité nécessaire à évaluer pour un échantillon, est l'absence de toxicité de celui-ci pour les cellules. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés plus précisément à ce critère, en évaluant la cytotoxicité des revêtements *via* l'étude de l'intégrité membranaire des cellules en présence des revêtements. Celle-ci est basée sur le marquage des cellules par la coloration Live/Dead® suivie d'une observation par épifluorescence. Chronologiquement, cette étude a été menée après la sélection de la méthode de préparation des revêtements, ce qui nous a permis de tester les échantillons les plus aboutis, à savoir les revêtements de chitosane kitozyme déposé sur substrat TA6V *via* un greffage TESPSA (C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>).

Par ailleurs, pour des raisons qui seront expliquées au fur et à mesure de la rédaction, nous avons travaillé avec trois types cellulaires différents : des fibroblastes humains gingivaux (HGF1), des

fibroblastes embryonnaires de souris (NiH3T3) et des ostéoblastes humains (MG63). Le choix de la lignée gingivale HGF1 a été fait en raison de l'application visée de nos revêtements, qui seront en contact avec des cellules primaires relativement proches des cellules HGF1 lors de l'implantation chez un patient. Le choix de fibroblastes de souris NiH3T3 a été basé sur la similitude de cette lignée avec les HGF1, ainsi que sur la facilité de cette culture à se développer en laboratoire. Le dernier choix effectué, les MG63, a été décidé en raison du possible élargissement du revêtement à l'implant, qui serait ainsi en contact avec les tissus osseux. L'ensemble des tests menés dans cette partie peut être résumé par le schéma récapitulatif suivant :

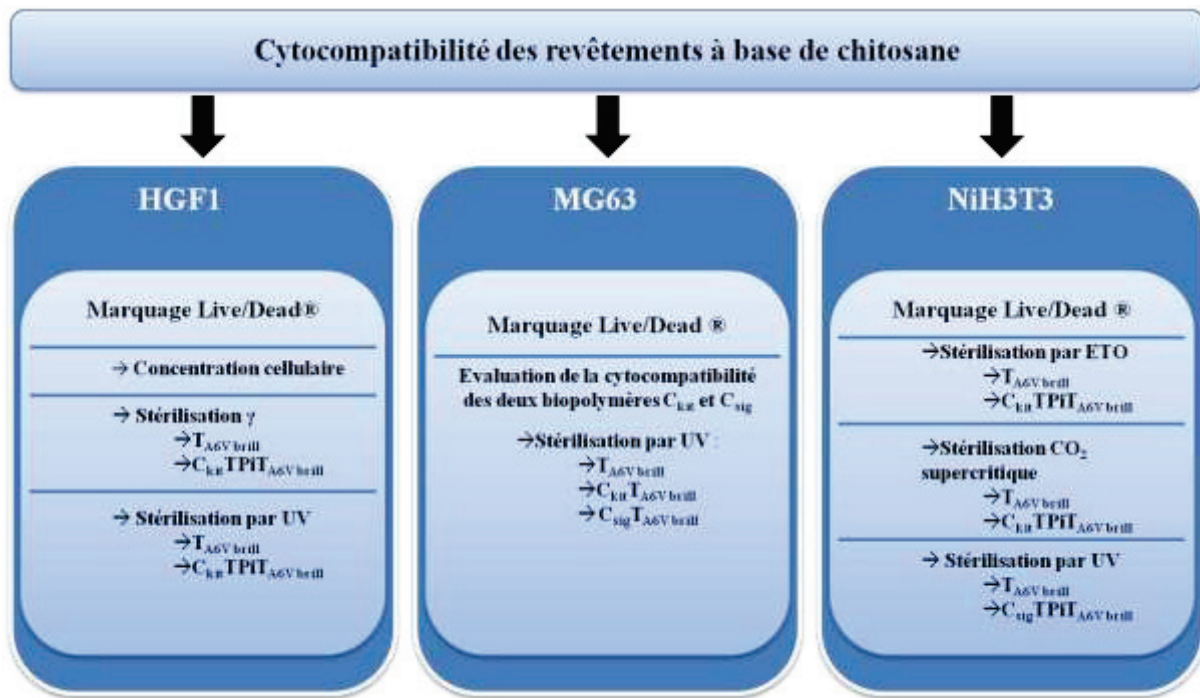


Figure IV- 5 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des lignées cellulaires ainsi que des tests de cytotoxicité utilisés.

Les expériences décrites ci dessous, ont été réalisées par le **Dr. Alice Ferrand**, post-doctorante au LMI sur le projet RIBIO.

## II.1 Principe du test de cytotoxicité

Une des méthodes pour mesurer la cytotoxicité des échantillons, consiste à étudier l'intégrité membranaire des cellules. Le marquage Live/Dead® est une technique commerciale largement utilisée dans ce but [27]. Son principe est basé sur l'utilisation de deux composés fluorescents ayant la capacité de marquer préférentiellement différentes parties de la cellule [28]. Le premier marqueur, l'acétoxyméthyl calcéine (calcéine AM) peut être clivé par une enzyme, l'estérase intracellulaire et ainsi conduire à une fluorescence verte. Cette enzyme étant présente uniquement dans les cellules vivantes, l'apparition d'une fluorescence verte sera donc liée à une viabilité cellulaire. Dans le cas où la membrane des cellules est endommagée, le second marqueur, l'homodimère-1 d'éthidium (ETD-1),

peut pénétrer la cellule et se lier à l'ADN, conduisant ainsi à une fluorescence rouge. En résumé, si la cellule est vivante, la calcéine fluoresce et on observe des cellules marquées en vert (494 - 517 nm) et si la cellule est endommagée, une fluorescence rouge (528 - 617 nm) est visualisée par épifluorescence. Le protocole expérimental détaillé est proposé en annexe A8.

Toutefois, il est important de noter que des événements cytotoxiques, qui n'affectent pas les propriétés physiques et biochimiques des cellules, ne pourront pas être détectés par la méthode Live/Dead®.

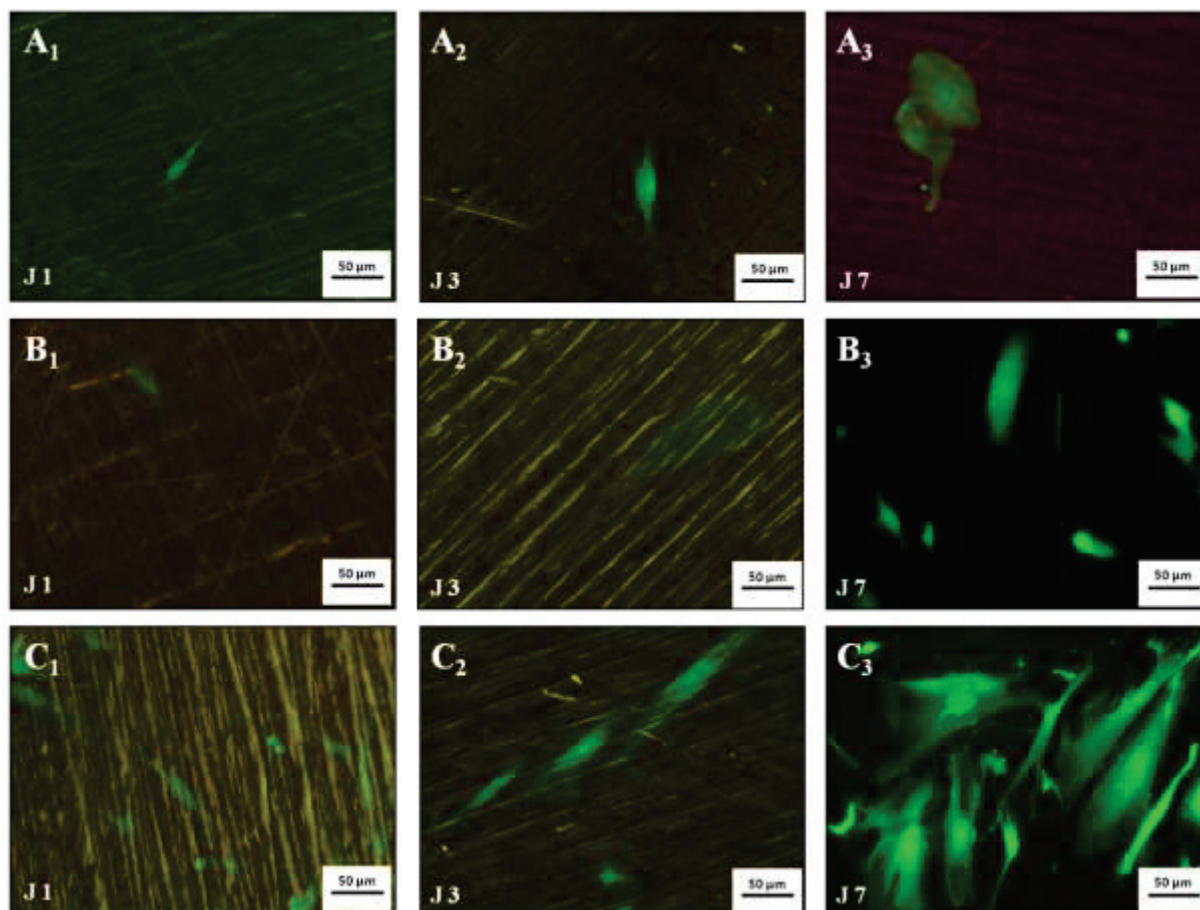
## **II.2 Tests préliminaires et mise au point des conditions opératoires**

Afin de déterminer la concentration cellulaire optimale pour réaliser les tests de cytotoxicité en présence de nos échantillons, plusieurs concentrations cellulaires ont été testées au cours des expériences suivantes. La méthode choisie pour effectuer ces tests sera le marquage Live/Dead®.

Comme de nombreuses études le démontrent, le choix de la concentration cellulaire à ensemer sur les échantillons est un paramètre important [29]. En effet, si la concentration cellulaire initiale est insuffisante, les cellules ne vont pas proliférer sur la surface même si celle-ci est idéale pour la prolifération cellulaire. Par ailleurs, elle ne doit pas non plus être trop élevée afin de ne pas dépasser 100 % de confluence (observation d'un tapis cellulaire recouvrant la totalité de la surface sans aucun interstice entre chaque cellule) au temps maximale d'incubation. Un décrochement du tapis cellulaire et une mort cellulaire pourrait être observée dans le cas d'une trop forte concentration cellulaire.

Dans ce contexte, la viabilité pour trois concentrations cellulaires de la lignée HGF1 sur témoin titane ( $T_{A6V\text{ brill}}$ ) stérilisé UV (1 h) a été étudiée par marquage Live/Dead®, suivi d'une observation par microscopie en épifluorescence. Les observations ont été effectuées après 1, 3 et 7 jours d'incubation à 37 °C. Les trois concentrations cellulaires initiales sont  $2.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>,  $5.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> et  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Les résultats obtenus avec les trois concentrations sont proposés sur la Figure IV- 6. Comme il s'agit d'une mise au point d'expérience, il n'y a eu qu'une seule répétition pour chaque échantillon et condition testés.





**Figure IV- 6 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée HGF1 et observation en épifluorescence des surfaces témoins ( $T_{AgV\ brill}$ ) avec une concentration cellulaire initiale de  $2.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> (A), des surfaces témoins ( $T_{AgV\ brill}$ ) avec une concentration cellulaire initiale de  $5.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> (B), et des surfaces témoins ( $T_{AgV\ brill}$ ) avec une concentration cellulaire initiale de  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> à 1, 3 et 7 jours d'incubation.**

En observant les images à J+1 pour la première concentration de  $2.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>, on note que les cellules ensemencées présentent une prolifération très faible. Ce même constat a également été fait au niveau des puits contrôles observés en optique au cours de l'expérience (puits sans échantillon). Des observations similaires sont réalisées pour un temps d'incubation de 3 jours. A noter qu'en conditions de culture cellulaire normale, les fibroblastes sont filiformes. Après 7 jours de culture, la densité cellulaire reste faible et les quelques cellules observées sont de forme ronde, ce qui pourrait être lié à la faible concentration cellulaire de départ.

Avec une concentration initiale plus importante, de  $5.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>, une faible prolifération cellulaire est observée sur la surface analysée  $T_{AgV\ brill}$  (Figure IV- 6 B). Cependant, ici et contrairement aux précédents résultats, la densité cellulaire après 7 jours de culture semble plus élevée et on peut noter sur la photo Figure IV- 6 B<sub>3</sub>, un allongement des cellules en surface, signe d'une adhésion cellulaire. Ce résultat est alors assez concluant.

Enfin, l'observation des images prises avec une concentration cellulaire initiale de  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur les surfaces  $T_{AgV\ brill}$  à J+1, J+3, J+7, montrent ici que les cellules ensemencées

présentent une densité cellulaire significativement plus importante que celles observées pour les deux plus faibles concentrations (Figure IV- 6 C). On note, par ailleurs, que l'effet est d'autant plus marqué à J+7, temps pour lequel la prolifération cellulaire est optimale.

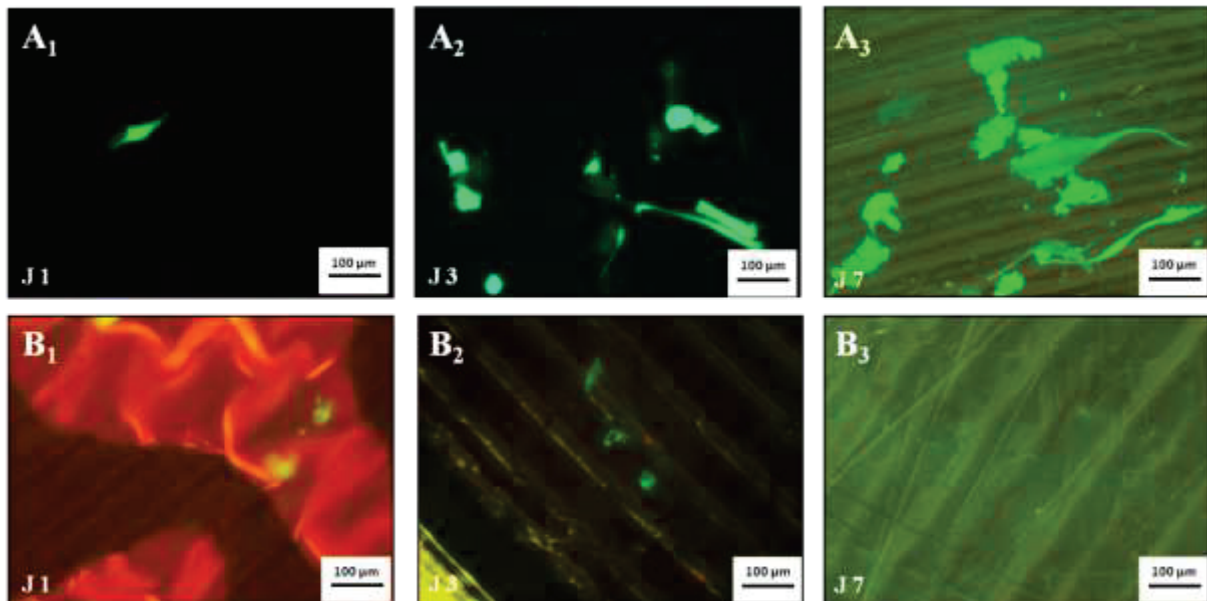
Aux vues des conclusions énoncées pour ces trois séries de mesure, une concentration cellulaire initiale 10 fois plus forte a été sélectionnée, soit  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>.

### II.3 Viabilité cellulaire des revêtements stérilisés

Avec le protocole de test Live/Dead® mis au point pour une concentration idéale de  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, il a été décidé d'étudier l'effet de la méthode de stérilisation (gamma ou UV) sur l'évaluation de la viabilité de la lignée cellulaire HGF1 sur des revêtements de chitosane greffé (C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>) ainsi que sur des échantillons témoins (T<sub>A6V brill</sub>).

#### II.3.1 Stérilisation gamma

Dans cette expérience ont donc été testés par la méthode du Live/Dead®, des échantillons revêtus et non revêtus stérilisés par rayon  $\gamma$ . La Figure IV-6 montre les images obtenues sur l'ensemble des échantillons après 1, 3 et 7 jours de culture.



**Figure IV- 7 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée HGF1 et observation en épifluorescence des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) (A) et des revêtements bioactifs C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> (B) tous deux stérilisés par rayons gamma après 1, 3 et 7 jours de culture.**

En comparant les images des séries A avec les puits contrôles observés au microscope optique, on peut noter une prolifération cellulaire sur l'ensemble des échantillons même si celle-ci semble moins importante que pour les puits contrôles. On peut noter, par ailleurs, que le substrat T<sub>A6V brill</sub> à J+7, présente des cellules dégradées ainsi que des débris cellulaires à côté de cellules adhérentes. L'observation de la dernière série (images B, échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>) montre la quasi-absence de

cellules à J+1. De plus, le revêtement apparaît dégradé dès le premier jour d'incubation avec une visualisation du support dès le 3<sup>ème</sup> jour, signe d'une détérioration du revêtement à base de chitosane. Aux vues de l'ensemble des résultats sur substrats nus et échantillons revêtus stérilisés, on peut penser que la méthode de stérilisation employée ici a deux impacts négatifs ; le premier sur le revêtement qui semble s'être détérioré et le second sur la morphologie et la prolifération cellulaire qui semblent assez perturbées sur les deux échantillons stérilisés.

### II.3.2 Stérilisation UV

Bien que la stérilisation UV ne soit pas une méthode homologuée pour les dispositifs biomédicaux (cf. Chapitre I), des essais ont été réalisés sur nos échantillons pour confirmer le rôle négatif de la stérilisation gamma sur les revêtements de chitosane. Ainsi, les substrats T<sub>A6V brill</sub> et les échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> ont été stérilisés sous UV avant l'ensemencement des fibroblastes et la mesure Live/Dead®. Les images obtenues sur l'ensemble de ces échantillons à J+1, J+3 et J+7 sont proposées sur la Figure IV.7.

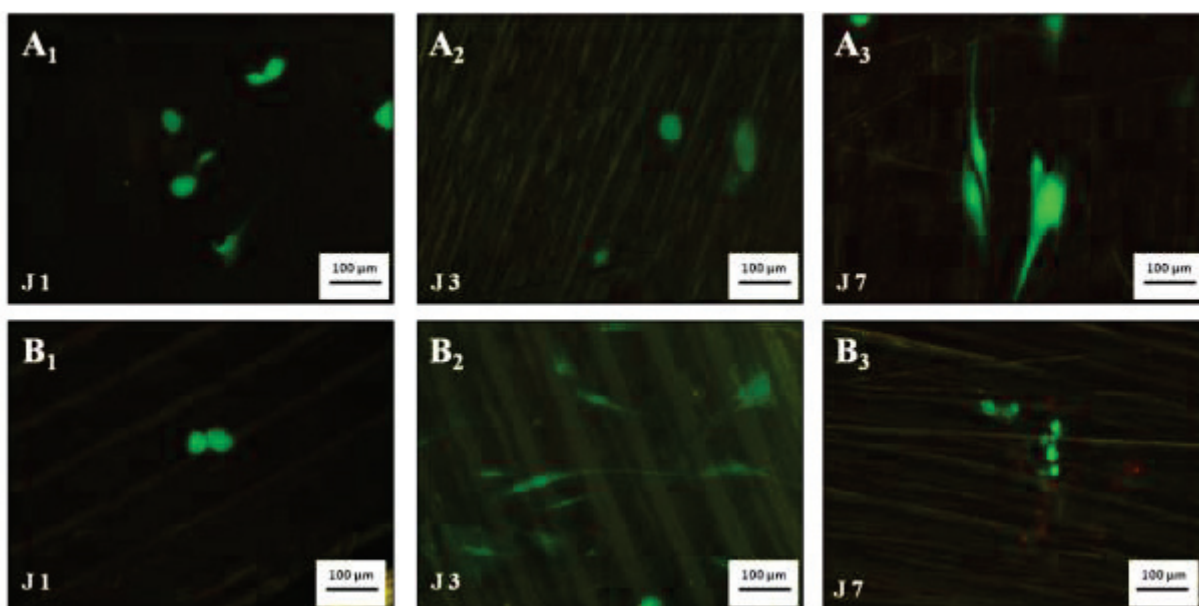


Figure IV- 8 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée HGF1 et observation en épifluorescence des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) (A) et des revêtements bioactifs C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> (B) tous deux stérilisés par UV après 1, 3 et 7 jours de culture.

A partir de ces images, plusieurs observations peuvent être faites. Contrairement à ce qui a été vu précédemment, les cellulesensemencées ne prolifèrent pas au bout de 7 jours sur l'échantillon témoin T<sub>A6V brill</sub> même si les cellules adhèrent normalement. En ce qui concerne les échantillons C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>, on observe une prolifération cellulaire jusqu'à 3 jours avec une adhésion marquée. Après 7 jours d'incubation, à coté des cellules vivantes, on ne remarque que très peu de cellules mortes, marquées en rouge.

*En conclusion, la comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes de stérilisation, a permis d'observer que la stérilisation gamma avait un effet délétère sur le revêtement/les cellules.*

### II.3.3 Synthèses de la reproductibilité sur les échantillons T<sub>A6V brill</sub>

A l'issue de ces premières séries d'expériences (optimisation de la valeur de la concentration cellulaire - § II.3.2 et influence de la stérilisation UV sur la viabilité cellulaire - § II.4.2), on a pu noter des différences significatives quant à la prolifération des cellules sur substrats non revêtus, stérilisés en UV. En effet, si l'on juxtapose les images enregistrées sur les deux séries susmentionnées et réalisées dans les mêmes conditions sur des échantillons identiques, on observe, sur les trois temps d'incubation, des résultats hétérogènes en termes de densité, prolifération et différenciation cellulaire des fibroblastes humains HGF1 (Figure IV- 9).

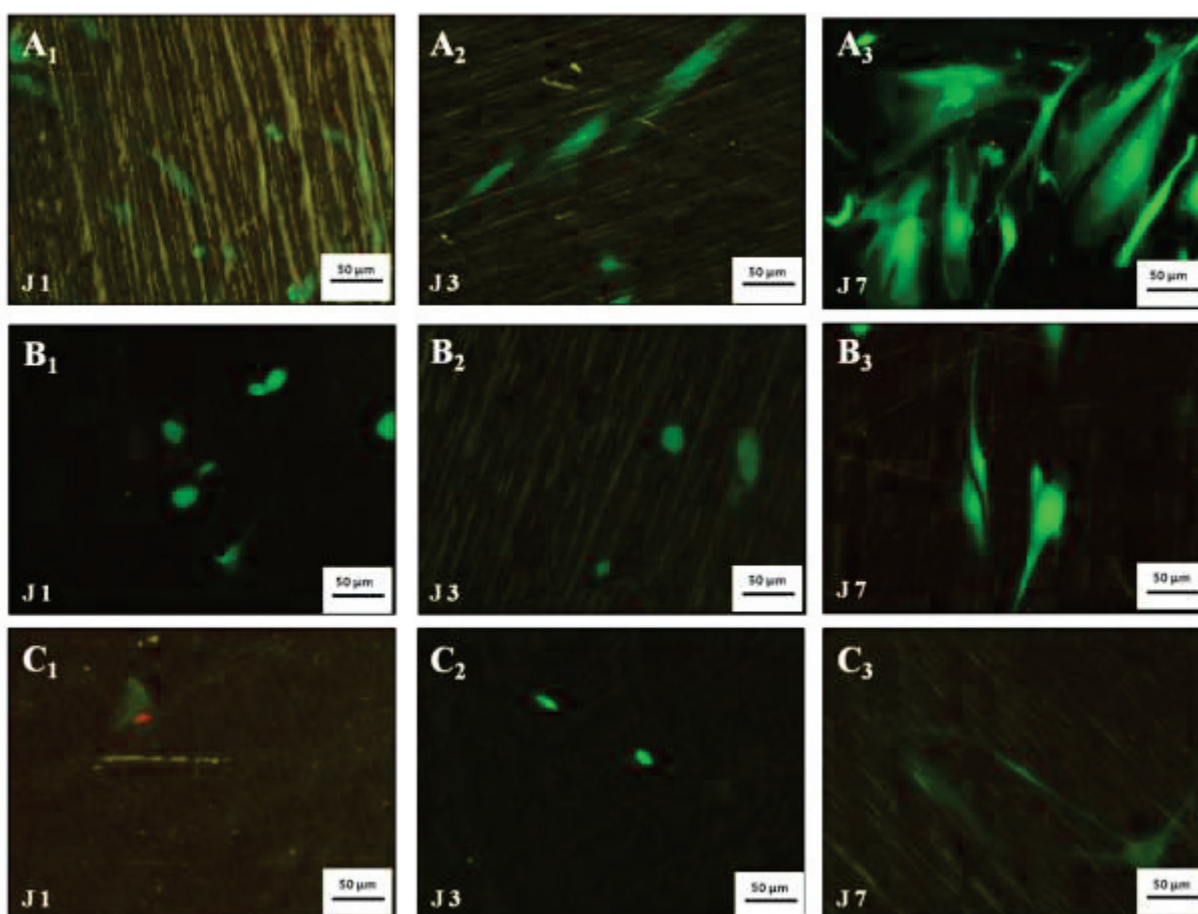


Figure IV- 9 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée HGF1 et observation en épifluorescence des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) à une concentration de  $1.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> à un temps donné 1 (A), des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) à un temps donné 2 (B) et des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) à une concentration cellulaire de  $2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> à un temps donné 3 (C) à 1, 3 et 7 jours d'incubation.



Alors que la première série d'expérience conduit à des résultats attendus avec une prolifération et une adhésion des cellules, pour la seconde série, les cellules ensemencées prolifèrent peu au bout de 7 jours, même si les cellules adhèrent normalement. Ces disparités pourraient être expliquées par des surfaces différentes, en termes notamment de rugosité de surface. En effet, comme évoqué dans le chapitre II, les surfaces brillantées étudiées peuvent présenter des différences significatives de rugosité d'un lot à l'autre et même d'un échantillon à l'autre au sein du même lot (présence de sillons en surface, rayure plus ou moins marquées du à l'usinage...). Or, dans la littérature, de nombreuses études ont montré l'importance de l'état de surface de l'implant sur l'adhésion et la prolifération des fibroblastes gingivaux [21, 30-34]. Dans ce sens, selon Kokubu et *al.*, la topographie de surface peut avoir un impact sur l'adhésion des fibroblastes [35]. Oates et al. ont, également, montré une différence dans l'adhésion et la prolifération des HGF1 sur des surfaces de titane de rugosité très différentes. En fonction de l'ensemencement des cellules sur une surface polie ( $Ra=0,54\ \mu m$ ) ou rugueuse ( $Ra=4.14\ \mu m$ ), l'orientation des cellules sera différente. Les cellules ensemencées sur la surface rugueuse sont plus adhérentes et suivent les irrégularités de la surface alors que celles ensemencées sur le titane lisse s'orientent de manière parallèle aux stries de surface du à l'usinage des échantillons [36]. Une autre hypothèse quant à la faible reproductibilité des résultats est liée à l'utilisation même de la lignée étudiée.

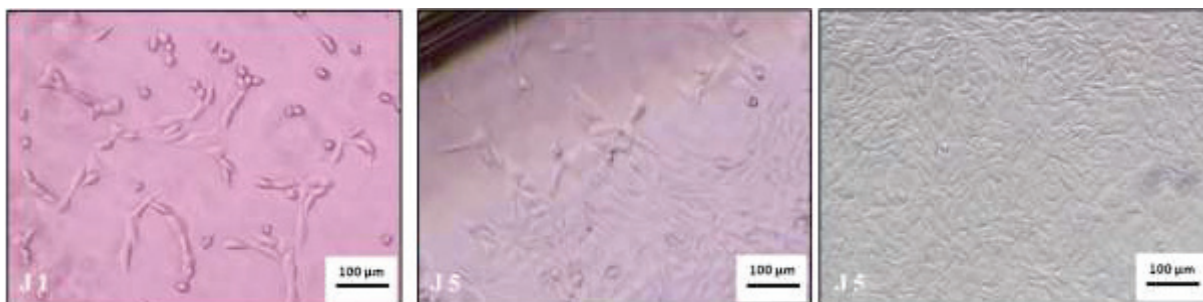
Pour vérifier cette dernière hypothèse, la concentration cellulaire initiale des cellules de la lignée HGF1, déposée sur les surfaces titanes non revêtues et stérilisées en UV, a été doublée ( $2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) par rapport aux deux premières expériences présentées. Les échantillons sont testés avec quatre répétitions. Au bout de 7 jours, contrairement à ce qui était attendu, la prolifération des cellules ensemencées est assez faible (Figure IV- 9). La quantité de cellules présente en surface après 7 jours est même inférieure à celle obtenue pour une concentration deux fois plus faible. Un problème au niveau de la lignée cellulaire est ainsi mis en évidence. La lignée cellulaire HGF1 est connue pour être assez difficile à mettre en œuvre en culture cellulaire, ce qui pourrait expliquer les résultats divergents observés.

Dans ce contexte de difficulté de mise en culture et de manque de reproductibilité des expériences réalisées avec la lignée cellulaire HGF1, il a été décidé de travailler avec une autre lignée cellulaire connue pour sa facilité de mise en culture : les fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3.

## II.4 Viabilité cellulaire en présence de cellules embryonnaires de souris (NiH3T3)

### II.4.1 Choix des conditions expérimentales

Le choix de cette nouvelle lignée est, alors, basée sur la littérature [37, 38] et sur l'expertise propre des chercheurs du laboratoire. En effet, une précédente étude, menée par Renoud et al. a montré une bonne prolifération de fibroblastes de souris en présence de revêtements à base de chitosane [17]. Expérimentalement, les cellules sontensemencées sur les puits de culture et observées après 1 et 5 jours d'incubations (Figure IV- 10).



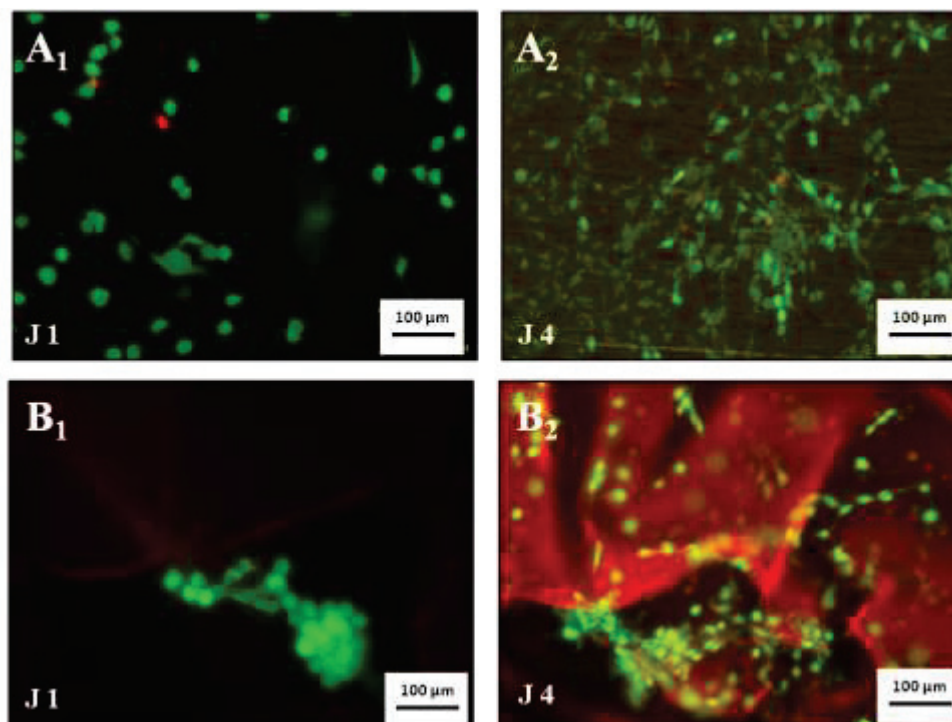
**Figure IV- 10 : Observations en optique de la croissance cellulaire des cellules NiH3T3 sur la boîte de culture à J1, J5 avec une concentration initiale de  $8.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>.**

A J+1, on peut observer sur le support plastique que les cellules commencent à adhérer. La densité cellulaire augmente exponentiellement jusqu'à atteindre la confluence à J+5. La concentration cellulaire sélectionnée ici ( $8.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) est donc suffisante pour effectuer les prochaines expériences de viabilité cellulaire par les tests de cytotoxicité. Aux vues de nos résultats, les expériences suivantes seront réalisées de manière à obtenir une quantité de cellules optimale (cellules non confluentes) : J1 et J4.

### II.4.2 Cytotoxicité des revêtements à base de chitosane stérilisés

#### II.4.2.1 *Viabilité des cellules sur les échantillons stérilisés par ETO*

Dans cette nouvelle expérience, la viabilité cellulaire a été observée par marquage Live/Dead® sur les deux systèmes T<sub>A6V brill</sub> et C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub> (Figure IV- 1). Tous les échantillons ont été stérilisés, au préalable, par l'oxyde d'éthylène. Les images en épifluorescence enregistrées à J+1et J+4 sont proposées sur la Figure IV- 11.



**Figure IV- 11 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée NiH3T3 et observation en épifluorescence des surfaces  $T_{A6V\ brill}$  (A) et des revêtements  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$  (B) tous deux stérilisés par ETO après 1 et 4 jours de culture.**

On observe sur la série d'images A que les cellules sont bien adhérentes et prolifèrent normalement sur les substrats non revêtus jusqu'à J+4. Par ailleurs, on note pour la série B relative aux échantillons  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ , que les cellules sont toutes agglomérées en surface (Figure IV- 11 B). Le revêtement chitosane apparaît ici dégradé à J1 et J4 d'incubation (gonflement du film de chitosane). Toutefois, une partie des cellules observées sur cet échantillon semblent avoir adhéré au revêtement de chitosane. Le manque d'adhésion cellulaire pourrait ainsi être dû uniquement à la dégradation du revêtement chitosane stérilisé à l'ETO.

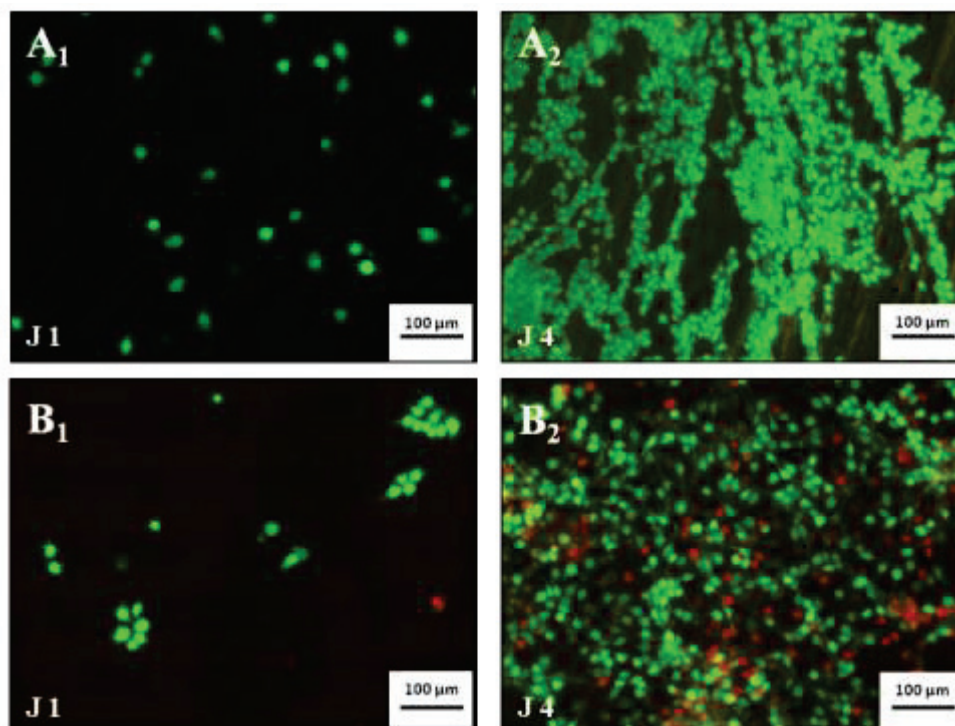
*Ces observations montrent que les cellules adhèrent et prolifèrent mieux sur le  $T_{A6V\ brill}$  que sur le revêtement chitosane  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$ .*

#### II.4.2.2 Viabilité des cellules sur les échantillons stérilisés par $CO_2$ supercritique

Enfin, l'influence de la méthode de stérilisation sur la viabilité cellulaire a été testée sur des échantillons  $T_{A6V\ brill}$  et  $C_{kit}TPiT_{A6V\ brill}$  stérilisés par  $CO_2$  supercritique. La technique de stérilisation par  $CO_2$  supercritique « classique » entraînant une détérioration visible à l'œil des échantillons revêtus CS (cf chapitre III) (du aux conditions de dépressurisation), la société Rescoll, l'un de nos partenaires du consortium, a optimisé cette méthode en interne afin de limiter au maximum une dégradation du



revêtement chitosane. C'est cette méthode de stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique dans des conditions douces qui a été utilisée pour stériliser les échantillons avant ces tests de viabilité cellulaire. Les images des observations de l'épifluorescence des différents échantillons après 1 et 4 jours d'incubation sont proposées sur la Figure IV- 12.



**Figure IV- 12 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée NiH3T3 et observation en épifluorescence des surfaces témoins (T<sub>A6V brill</sub>) (A) et des revêtements bioactifs C<sub>kitTPiT<sub>A6V brill</sub></sub> (B) après 1 et 4 jours de culture.**

L'adhésion et la prolifération des NiH3T3 sur les échantillons T<sub>A6V brill</sub> (série A) ont ainsi pu être vérifiées à tous les temps (Figure IV- 12 A). La densité cellulaire augmente exponentiellement avec le temps d'incubation et les cellules adhèrent à la surface ; signe d'une viabilité cellulaire optimale. En ce qui concerne les échantillons C<sub>kitTPiT<sub>A6V brill</sub></sub> (série B), des différences significatives de comportement cellulaire sont observées (Figure IV- 12 B). Après 1 jour de culture, l'adhésion cellulaire sur les revêtements est comparable à l'échantillon témoin, avec cependant l'observation de cellules rondes et agglutinées. A J4, une prolifération cellulaire est observée sur les échantillons C<sub>kitTPiT<sub>A6V brill</sub></sub> mais plus faible que pour les échantillons contrôles. Toutefois, il est important de remarquer qu'une partie des cellules ensemencées sur les C<sub>kitTPiT<sub>A6V brill</sub></sub> à J4 n'est pas viable (observation d'une faible quantité de cellules fluorescent en rouge sur l'image).

Plusieurs pistes pour expliquer ce dernier résultat peuvent être avancées. Premièrement, il pourrait s'agir d'une toxicité à long terme du revêtement (soit du au chitosane, à l'agent de couplage utilisé ou soit du à la stérilisation employée). Cependant les premiers résultats obtenus à J4 et ceux obtenus dans la littérature peuvent remettre en question cette hypothèse d'un revêtement toxique. En effet, d'après l'étude de Tchemtchoua et *al.*, les fibroblastes primaires se développent sur des films de

chitosane de chez kitozyme, même si la densité cellulaire est largement plus faible que sur les puits contrôles [39].

Deuxièmement, ce résultat pourrait être lié aux conditions opératoires, en effet, les observations étant effectuées avec un microscope inversé, les échantillons doivent être retournés pour analyse d'où un risque d'une potentielle dégradation cellulaire lors de l'analyse. De plus, les étapes de lavage de l'échantillon peuvent parfois entraîner un décrochement des débris cellulaires et des cellules faiblement adhérentes au support (observations en interne).

## II.5 Cytocompatibilité des biopolymères

Les résultats de cytotoxicité présentés jusqu'ici sont assez mitigés. En effet, tout au long des expériences, il a été mis en lumière de nombreuses difficultés (concentration cellulaire, type de lignée, effet néfaste de certaine voie de stérilisation, dégradation partielle du revêtement, problème de manipulation...). Il est donc assez difficile de conclure sur une réelle non cytotoxicité du revêtement préparé. Pour aller plus loin, il a été décidé d'étudier, plus en détail, un dernier paramètre qui est le choix du chitosane. En effet, toutes les études menées précédemment au laboratoire (antérieures aux travaux menés en thèse) ont été réalisées avec du chitosane de chez sigma (pour rappel, origine crustacés et DA de 16,68). Comme évoqué dans l'étude bibliographique et dans le chapitre II, l'origine du chitosane kitozyme ainsi que ses paramètres structuraux (DA de 21,7, masse molaire) peuvent moduler les propriétés biologiques des chitosanes vis-à-vis des cellules. En conséquence, il a été jugé utile de tester aussi le chitosane sigma ( $C_{sig}$ ). Bien que ce dernier ne soit pas de grade médical, sa capacité à favoriser l'adhésion et la prolifération cellulaire a déjà été démontré au laboratoire par la coloration Live/Dead® et le dosage alamar blue [17, 26, 40].

### II.5.1 Criblage en présence de cellules humaines osseuses (MG63)

Afin de comparer la cytotoxicité des deux types de chitosane, un criblage a été réalisé sur des films de chitosane  $C_{sig}$  et  $C_{kit}$  préparés à partir de solution présentant deux concentrations différentes (2 et 4 % massique) et déposés sur des substrats de titane par un simple dépôt. L'ensemble des échantillons a été stérilisé par UV avant ensemencement des cellules ( $5.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) et incubation 24 h à 37°C. Suite au marquage Live/Dead®, on a pu obtenir les résultats présentés sur la Figure IV-13. L'observation des images A et B montre une densité et une prolifération cellulaire satisfaisante pour les deux contrôles de l'expérience, c'est à dire sur puits seul et sur l'échantillon  $T_{A6V\ brill}$  (Figure IV-13 A et B).

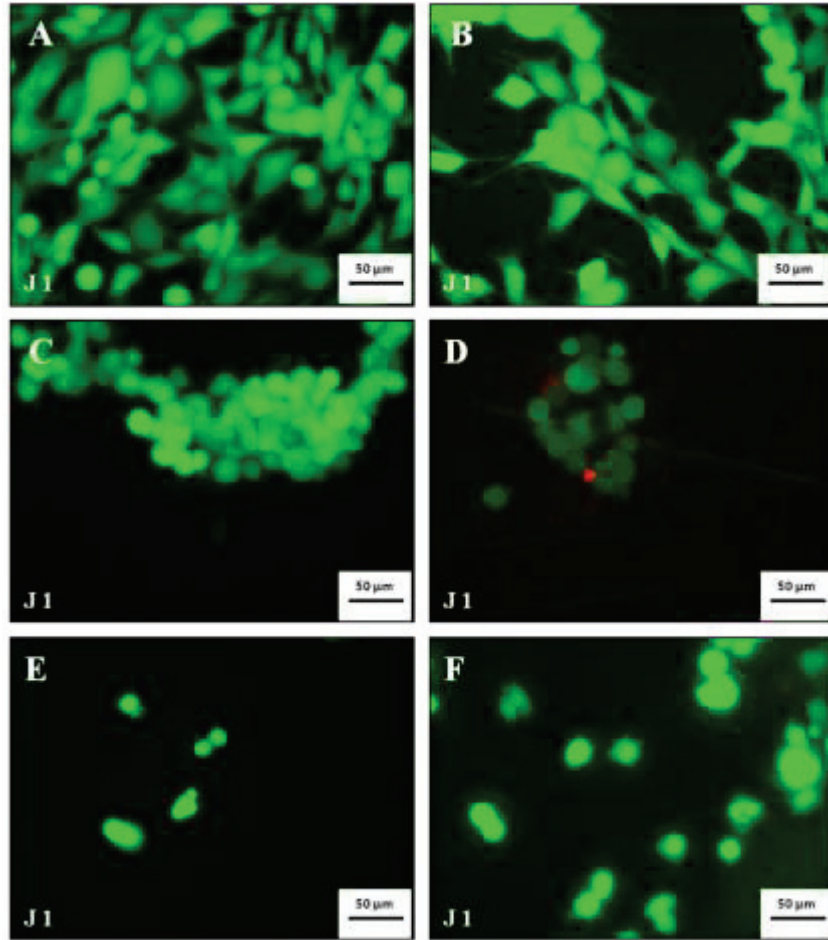


Figure IV- 13 : Marquage Live/Dead® des ostéoblastes sur cellules déposées dans le puits control négatif (A), sur substrat de titane brut (B), sur film de  $C_{kit}2\%$  (C), sur film de  $C_{sig}2\%$  (D), sur film de  $C_{kit}4\%$  (E), sur film de  $C_{sig}4\%$  (F).

En ce qui concerne les films à base de  $C_{kit}$ , préparés avec une solution de chitosane à 2 et 4%, respectivement images C et E, les cellules sont peu nombreuses, rondes et non adhérentes (Figure IV- 13 C et E). Par ailleurs, dans le cas de la plus faible concentration, les cellules s'agglutinent à la surface, signe d'une surface non idéale pour l'adhésion et la prolifération cellulaire. Ensuite, le film préparé à partir de chitosane sigma à 2%, montre des ostéoblastes peu adhérents et agglutinés sur le film (Figure IV- 13 D). Dans le cas d'une plus forte concentration en  $C_{sig}$ , (4%, Figure IV- 13-F), la densité cellulaire observée est la plus importante des 4 échantillons analysés. Les cellules sont bien adhérentes et séparées à la surface de l'échantillon, ce qui devrait être favorable à une prolifération optimale à plus grand temps d'incubation. A côté de cette série d'expériences, une seconde série identique mais sur film autosupporté, c'est à dire sans substrat a montré des résultats comparables. En conclusion, ce screening a permis de montrer que les cellules adhèrent davantage sur les échantillons préparés à partir du  $C_{sig}$  avec une concentration de 4%.

### II.5.2 Viabilité cellulaire des revêtements en présence de NiH3T3

Il a été également réalisé une série d'expériences, cette fois sur substrats revêtus de chitosane sigma en présence des cellules embryonnaires de souris NiH3T3.

Dans cette série expériences, la viabilité cellulaire a été observée par marquage Live/Dead® sur les deux systèmes:  $T_{A6V \text{ brill}}$  et  $C_{\text{sig}}\text{TPiT}_{A6V \text{ brill}}$  (descriptif détaillé des échantillons Figure IV- 1). L'ensemble des échantillons a été stérilisé, au préalable, par irradiation UV, les échantillons sont testés avec deux répétitions.

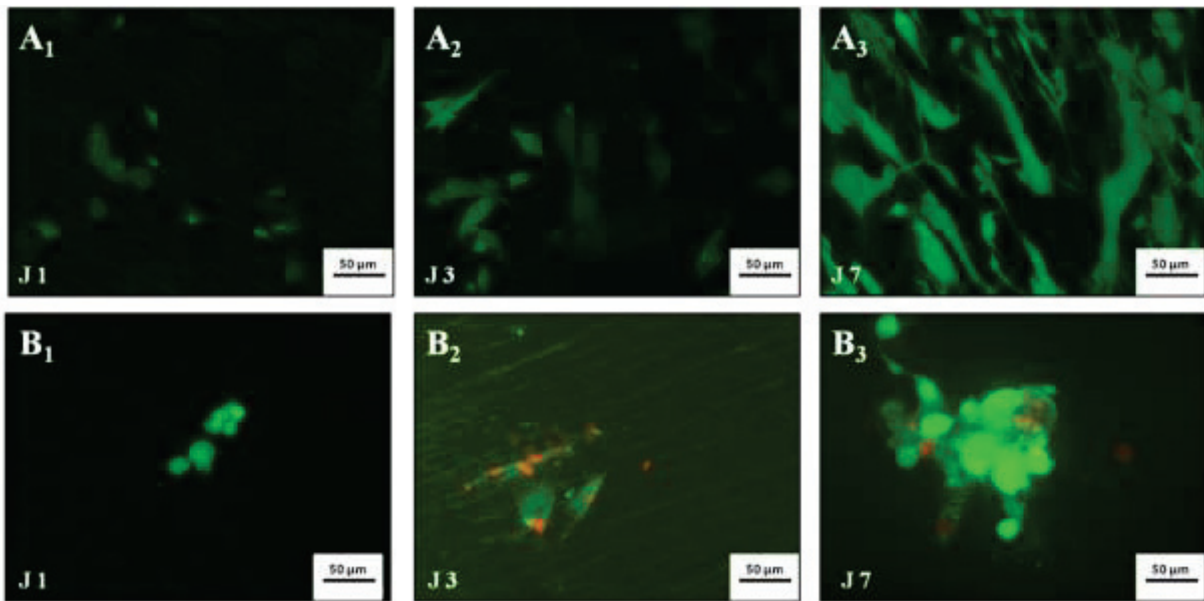


Figure IV- 14 : Marquage Live/Dead® des cellules de la lignée NiH3T3 et observation en épifluorescence des surfaces témoins ( $T_{A6V \text{ brill}}$ ) (A) et des surfaces revêtues  $C_{\text{sig}}\text{TPiT}_{A6V \text{ brill}}$  (B).

D'après les observations proposées sur la figure IV-15, à J1 les cellules sont bien adhérentes et prolifèrent normalement sur l'échantillon  $T_{A6V \text{ brill}}$  avec une densité cellulaire importante à J7. En revanche, dans le cas des échantillons  $C_{\text{sig}}\text{TPiT}_{A6V \text{ brill}}$ , à J1 les cellules sont moins nombreuses, rondes et regroupées en amas, signe d'une mauvaise adhésion de surface. A partir de J3, les cellules ensemencées sur le revêtement sont toutes mortes (Figure IV- 14 B<sub>2</sub>) et à J7 plus aucune cellule, ni vivante ni morte, n'est observée. De ce résultat, à nouveau plutôt négatif, on peut conclure qu'il y a un problème d'adhérence cellulaire, de cytotoxicité des revêtements préparés ou de l'effet de la stérilisation.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, en plus, de conditions expérimentales difficiles, on peut également supposer que le film greffé est cytotoxique. Cependant, cette hypothèse reste difficile à valider car comme cela a déjà été rappelé, la cytocompatibilité de ce type de film de chitosane a, précédemment, été démontré en présence de NiH3T3 ainsi que de fibroblastes gingivaux HGF1 [17, 26].

Une deuxième hypothèse possible serait la présence de résidus toxiques en surface de l'échantillon en lien avec la méthode-même de préparation du revêtement. Une remise en cause du silane alors employé pourrait ainsi être faite. Cependant, ce silane a été choisi en raison de sa large utilisation dans le domaine biomédical, notamment en tant que sonde [41] ou en tant que surface initiale permettant le dépôt d'hydroxyapatite pour des tests de biocompatibilité en présence d'ostéoblastes [42]. Par ailleurs, Lee et al. ont précédemment démontré que l'utilisation du silane, le TESPSA, déposé en monocouche sur une surface présente une force d'adhésion cellulaire équivalente à celle de peptides [43]. De plus précédemment au laboratoire nous avons pu démontrer la biocompatibilité des cellules HGF1 en présence d'un revêtement de chitosane greffé *via* la voie B sur le substrat de titane [40].

*Nous avons pu mettre en évidence une mauvaise compatibilité des revêtements utilisés avec la croissance des lignées cellulaires étudiées in vitro. Afin de répondre de façon plus précise à la question de savoir quelle est la cause de ce comportement, il s'avère nécessaire de réaliser de nouvelles expériences pour prouver la reproductibilité des résultats avec les revêtements obtenus avec les deux types de chitosane différents et une concentration de 4% pour  $C_{sig}$  et 2% pour  $C_{kit}$  en présence des cellules NiH3T3 et des cellules osseuses humaines (MG63).*

*Par ailleurs, comme les expériences de biocompatibilité sur matériau sont des méthodes difficiles à mettre en œuvre (nombreux problèmes techniques à surmonter), il serait intéressant de réaliser une analyse complémentaire en analysant la cytotoxicité des produits restitués par le revêtement bioactif dans le milieu de culture (une méthode indirecte de détection de la cytotoxicité) [44].*



## Références

1. Shockman GD, Barrett JF: **Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria.** *Annu Rev Microbiol* 1983, **37**:501-527.
2. Hancock REW: **Resistance Mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria.** *Clinical Infectious Diseases* 1998, **27**(Supplement 1):S93-S99.
3. Russell AD: **Plasmids and bacterial resistance to biocides.** *J Appl Microbiol* 1997, **83**(2):155-165.
4. Casimiro J: **Modifications de surfaces de matériaux polymères pour des visées antibactériennes.** Université Paris-Sud; 2011.
5. Comité E, de normalisation: **Textiles - Détermination de l'activité antibactérienne des produits finis antibactériens.** In: *ISO 20743:2007*. 2007.
6. International A: **Mesurage de l'action antibactérienne sur les surfaces en plastique.** In: *ISO 22196:2007*. Edited by 61 TCIT; 2007.
7. International S: **Mesurage de l'action antibactérienne sur les surfaces en plastique et autres surfaces non poreuses.** In: *ISO 22196-2011*. 2011.
8. ISO4833: **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C.** In.; 19991.
9. Marreco PR, da Luz Moreira P, Genari SC, Moraes AM: **Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004, **71**(2):268-277.
10. Yeung KWK, Wu SL, Zhao Y, Liu XM, Kao RYT, Luk KDK, Cheung KMC, Chu PK: **Antimicrobial effects of oxygen plasma modified medical grade Ti–6Al–4V alloy.** *Vacuum* 2013, **89**(0):271-279.
11. Zhao L, Hu Y, Xu D, Cai K: **Surface functionalization of titanium substrates with chitosan–lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014, **119**(0):115-125.
12. Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P: **Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation.** *Polymers* 2011, **3**(4):1875-1901.
13. Mi F-L, Huang C-T, Liang H-F, Chen M-C, Chiu Y-L, Chen C-H, Sung H-W: **Physicochemical, Antimicrobial, and Cytotoxic Characteristics of a Chitosan Film Cross-Linked by a Naturally Occurring Cross-Linking Agent, Aglycone Geniposidic Acid.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, **54**(9):3290-3296.
14. Raafat D, Sahl HG: **Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey.** *Microb Biotechnol* 2009, **2**(2):186-201.
15. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J: **Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications.** *Food Chemistry* 2009, **114**(4):1173-1182.
16. Verheyen CCPM, Dhert WJA, de Bleeck-Hogervorst JMA, van der Reijden TJK, Petit PLC, de Groot K: **Adherence to a metal, polymer and composite by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.** *Biomaterials* 1993, **14**(5):383-391.
17. Renoud P, Toury B, Benayoun S, Attik G, Grosgeat B: **Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances.** *PLoS One* 2012, **7**(7):31.
18. Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G: **A review of bioceramics and fibrin sealant.** *Eur Cell Mater* 2004, **8**(13):1-11.
19. Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, Tirino V, Mangano F, Papaccio G: **The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures.** *Biomaterials* 2010, **31**(13):3543-3551.
20. Dimassi O: **Interaction biomatériaux/cellules à l'interface os/implant.** Université Claude Bernard Lyon 1; 2011.

21. Moon YH, Yoon MK, Moon JS, Kang JH, Kim SH, Yang HS, Kim MS: **Focal adhesion linker proteins expression of fibroblast related to adhesion in response to different transmucosal abutment surfaces.** *J Adv Prosthodont* 2013, **5**(3):341-350.
22. ISO10993-5: **Evaluation biologique de dispositifs médicaux: essais concernant a toxicité in vitro.** In.; 2009.
23. ISO7405: **Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials.** In. Edited by Organization IS; 2009.
24. Jiang T, Zhang Z, Zhou Y, Liu Y, Wang Z, Tong H, Shen X, Wang Y: **Surface Functionalization of Titanium with Chitosan/Gelatin via Electrophoretic Deposition: Characterization and Cell Behavior.** *Biomacromolecules* 2010, **11**(5):1254-1260.
25. Inzunza D, Covarrubias C, Marttens AV, Leighton Y, Carvajal JC, Valenzuela F, Diaz-Dosque M, Mendez N, Martinez C, Pino AM *et al*: **Synthesis of nanostructured porous silica coatings on titanium and their cell adhesive and osteogenic differentiation properties.** *J Biomed Mater Res A* 2013, **9**(10):34673.
26. Attik G, D'Almeida M, Toury B, Grosogeat B: **FUNCTIONALIZATION OF TITANIUM SURFACE WITH CHITOSAN VIA SILANATION: 3D CLSM IMAGING OF CELL BIOCOMPATIBILITY BEHAVIOUR.** *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2012, **52**(1):35-44.
27. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, Pippenger B, Bareille R, Rémy M, Bellance S *et al*: **High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering.** *Acta Biomaterialia* 2010, **6**(7):2494-2500.
28. **LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit \*for mammalian cells** [<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/L3224>]
29. **guide pratique de culture cellulaire** [[http://partages.univ-rennes1.fr/files/partages/Recherche/Recherche%20%20SVE/Plateforme%20Microscopie/Fabrice%20Senger/partage/guide\\_pratique\\_culture\\_cellulaire\\_2009.pdf](http://partages.univ-rennes1.fr/files/partages/Recherche/Recherche%20%20SVE/Plateforme%20Microscopie/Fabrice%20Senger/partage/guide_pratique_culture_cellulaire_2009.pdf).]
30. Mustafa K, Silva Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K: **Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO<sub>2</sub> particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis.** *Clin Oral Implants Res* 1998, **9**(3):195-207.
31. Ponsonnet L, Comte V, Othmane A, Lagneau C, Charbonnier M, Lissac M, Jaffrezic N: **Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel–titanium substrates.** *Materials Science and Engineering: C* 2002, **21**(1–2):157-165.
32. Sauberlich S, Klee D, Richter EJ, Hocker H, Spiekermann H: **Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces.** *Clin Oral Implants Res* 1999, **10**(5):379-393.
33. Xing R, Salou L, Taxt-Lamolle S, Reseland JE, Lyngstadaas SP, Haugen HJ: **Surface hydride on titanium by cathodic polarization promotes human gingival fibroblast growth.** *J Biomed Mater Res A* 2014, **102**(5):1389-1398.
34. Yamano S, Ma AK, Shanti RM, Kim SW, Wada K, Sukotjo C: **The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression.** *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011, **26**(6):1247-1255.
35. Kokubu E, Hamilton DW, Inoue T, Brunette DM: **Modulation of human gingival fibroblast adhesion, morphology, tyrosine phosphorylation, and ERK 1/2 localization on polished, grooved and SLA substratum topographies.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, **91A**(3):663-670.
36. Oates TW, Maller SC, West J, Steffensen B: **Human gingival fibroblast integrin subunit expression on titanium implant surfaces.** *J Periodontol* 2005, **76**(10):1743-1750.
37. Chen S, Hao Y, Cui W, Chang J, Zhou Y: **Biodegradable electrospun PLLA/chitosan membrane as guided tissue regeneration membrane for treating periodontitis.** *J Mater Sci* 2013, **48**(19):6567-6577.



38. Archana D, Singh BK, Dutta J, Dutta PK: **In vivo evaluation of chitosan–PVP–titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material.** *Carbohydrate Polymers* 2013, **95**(1):530-539.
39. Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Filée P, Garbacki N, Vanhooetghem O, Deroanne C, Noël As, Jérôme C, Nussgens B *et al*: **Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration.** *Biomacromolecules* 2011, **12**(9):3194-3204.
40. Campos D, Toury B, D’Almeida M, Attik G, Ferrand A, Renoud P, Grosogeat B: **Acidic pH resistance of grafted chitosan on dental implant.** *Odontology* 2014:1-8.
41. Stanicki D, Boutry S, Laurent S, Wacheul L, Nicolas E, Crombez D, Vander Elst L, Lafontaine DLJ, Muller RN: **Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging.** *Journal of Materials Chemistry B* 2014, **2**(4):387-397.
42. Wijenayaka AAR, Colby C, Atkins G, Majewski P: **Biomimetic hydroxyapatite coating on glass coverslips for the assay of osteoclast activity in vitro.** *J Mater Sci: Mater Med* 2009, **20**(7):1467-1473.
43. Lee MH, Boettiger D, Ducheyne P, Composto RJ: **Self-assembled monolayers of omega-functional silanes: A platform for understanding cellular adhesion at the molecular level.** *Silanes and Other Coupling Agents* 2007, **4**:1-16.
44. Rach J, Halter B, Aufderheide M: **Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques.** *Exp Toxicol Pathol* 2013, **65**(7-8):973-978.

# **Conclusion générale**

Cette thèse porte sur la synthèse et les caractérisations physico-chimiques et biologiques de revêtements polymère à base de chitosane. L'objectif affiché de ce travail a trait à la fonctionnalisation d'implants dentaires existants par ledit revêtement de façon à lutter efficacement contre la péri-implantite. Dans ce sens, des efforts ont été effectués pour préparer un revêtement homogène et adhérent de chitosane sur une surface modèle en alliage de titane.

Ainsi, afin d'immobiliser le chitosane sur le substrat, deux voies de greffage ont été proposées, toutes deux basées sur l'utilisation d'un agent de couplage de type organo-alcoxysilane pour former une liaison amide entre le polymère et ce dernier. Pour la première voie de greffage (voie A), il a été utilisé le système APTES+AS ainsi qu'un chitosane d'origine animal  $C_{sig}$ . Il s'agit d'un procédé en trois étapes conduisant à la formation d'une double liaison peptidique. Des problèmes de reproductibilité spécifiques à cette voie associés à une tenue non optimale du revêtement après son immersion dans une solution salivaire acide nous ont amenés à stopper cette voie au profit d'une deuxième plus performante. Cette deuxième voie (voie B), basée sur l'utilisation d'un silane fonctionnalisé par un anhydride succinique (TESPSA), comprend une étape de moins et conduit à la formation d'une simple liaison peptidique entre le silane et le biopolymère. Après optimisation du procédé de greffage, des revêtements très performants ont pu être produits, en termes d'homogénéité, d'adhérence et surtout de tenue en milieu salivaire acide. Ainsi, cette solution considérée comme la plus pertinente pour l'application visée a été testée sur un prototype. Le succès de cette opération valide la pertinence du procédé mis au point.

Une étude de la restitution en milieu acide du chitosane déposé par la voie sélectionnée a aussi été menée. Les résultats des dosages ont permis de mettre en évidence deux points importants, (i) le maintien d'une quantité de chitosane sur une période de 5 à 6 jours et (ii) une cinétique de restitution du chitosane plus lente lorsque ce dernier est greffé par rapport à un revêtement « simplement déposé ». Ensuite, l'impact des modes de stérilisation sur les propriétés des revêtements (morphologies, topographies, mouillabilité, DA, masses molaires moyennes et indice de polydispersité) a été étudié. Cette étude a mis en évidence une détérioration morphologique des dépôts après la stérilisation autoclave. Les stérilisations par rayons gamma et sous ETO, se sont avérées, quant à elles, les plus pertinentes pour conserver la morphologie des revêtements après stérilisation. Enfin, pour l'ensemble des stérilisations, les caractérisations par RMN et SEC ont montré une

modification des masses molaires moyennes du chitosane et les analyses chimiques des surfaces ont montré la présence de produits issus de la dégradation de l'emballage ayant servi à contenir l'échantillon lors de la stérilisation.

Des tests bactériologiques, sur des échantillons préparés par la voie sélectionnée, ont été effectués en présence des bactéries communes *E. coli* et *S. aureus*, confirmant les propriétés antibactériennes du dispositif (C<sub>kit</sub>TPiT<sub>A6V brill</sub>).

En revanche les tests de cytocompatibilité n'ont pas pu être concluants et de nouveaux essais doivent être entrepris.

De nombreuses perspectives peuvent être proposées pour la suite de ce travail.

Tout d'abord, il semble possible d'optimiser la voie A, en utilisant le Di-(N-succinimidyl)oxalate (DSO), en remplacement de l'anhydride succinique. Le principe de cette réaction peut être illustré *via* le greffage de la glycine sur une surface fonctionnalisée par un groupement amine [1].

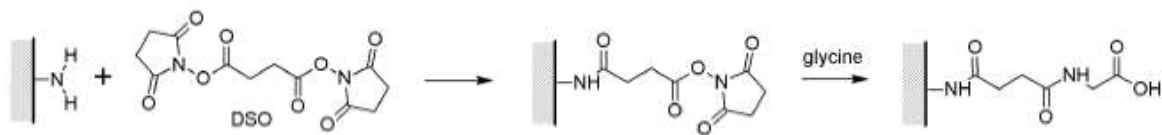


Figure 1 : Réaction du DSO et du groupement amine de la surface, suivi par la réaction de la surface activée par le DSO avec un acide aminé : la glycine (Böhmler, 2012).

Par ailleurs, toujours en lien avec la chimie du procédé de greffage, il pourrait être envisagé l'utilisation d'autres agents de couplage, à base d'organosilane (isocyanate) ou d'organophosphate. De même, l'amélioration du greffage pourrait être envisagée par l'augmentation de la surface spécifique du substrat de façon à maximiser les densités de greffage (surfaces micro, méso-poreuses).

Concernant l'évaluation bactériologique, il serait opportun d'évaluer les propriétés antibactériennes des revêtements chitosane en présence de bactéries pathogènes parodontales telles que par exemple *P. gingivalis*, *T. forsythia* et *P. intermedia*. Par ailleurs, il serait également intéressant de déterminer les propriétés antiadhésives des revêtements en présence de *S. epidermidis ica*<sup>+</sup>.

Enfin, concernant l'évaluation de la cytocompatibilité des revêtements chitosane, il s'avère nécessaire dans un premier temps de prouver la reproductibilité des résultats obtenus en présence des lignées cellulaires NiH3T3 et MG63. Par ailleurs, une autre méthode pourrait être employée afin de rendre compte de la viabilité cellulaire : le test Alamar Blue® qui se base sur l'étude de l'activité métabolique de la cellule. La cytotoxicité des produits restitués par le revêtement polymère semble être, de plus, une analyse complémentaire pertinente à réaliser.

## Références

1. Böhmler J: **Well-controlled and well-described SAMs-based platforms for the study of material-bacteria interactions occuring at the molecular scale.** Université de Haute Alsace; 2012.

# **Annexes**

# SOMMAIRE

<b>ANNEXE A1 : TRAITEMENT DE SURFACE.....</b>	<b>184</b>
I.    ANODISATION .....	184
II.   POLISSAGE DES SURFACES.....	184
III.  BRILLANTAGE.....	184
<b>ANNEXE A2 : ELABORATION DES REVÊTEMENTS DE CHITOSANE.....</b>	<b>185</b>
I.    MÉTHODE DE DÉPÔT DU CHITOSANE .....	185
II.   GREFFAGE COVALENT <i>VIA</i> LA VOIE A.....	185
III.  GREFFAGE COVALENT <i>VIA</i> LA VOIE B .....	186
III.1 <i>Protocole sous air</i> .....	186
III.2 <i>Protocole sous gaz inerte</i> .....	186
IV.   RESISTANCE EN MILIEU SALIVAIRE .....	187
<b>ANNEXE A3 : CARACTÉRISATIONS DE SURFACE.....</b>	<b>189</b>
I.    ETUDE DES SURFACES PAR MICROSCOPIES .....	189
I.1 <i>Microscopie Electronique à Balayage (MEB)</i> .....	189
I.2 <i>Microscopie à force atomique (AFM)</i> .....	190
I.3 <i>Profilométrie 3D de contact</i> .....	190
I.4 <i>Profilométrie 3D optique</i> .....	190
II.   ETUDES DES SURFACES PAR SPECTROSCOPIES .....	191
II.1 <i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)</i> .....	191
II.2 <i>Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS): ToF-SIMS et DSIMS</i> .....	191
II.3 <i>Spectroscopie Infrarouge</i> .....	193
III.  MOUILLABILITÉ DE SURFACE <i>VIA</i> LA TECHNIQUE DE LA GOUTTE POSÉE.....	193
<b>ANNEXE A4 : CARACTÉRISATIONS DES CHITOSANES .....</b>	<b>195</b>
I.    RMN .....	195
II.   CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE (SEC) .....	195
III.  DRX.....	195
IV.   VISCOSITÉ DES SOLUTIONS DE CHITOSANE .....	196
<b>ANNEXE A5 : RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE II .....</b>	<b>197</b>
I.    VALORISATION SCIENTIFIQUE DE LA VOIE DE GREFFAGE A.....	197
II.   RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES DE L'ÉTUDE SUR UNE SURFACE POLIE .....	221
III.  ETUDE DE LA VOIE DE GREFFAGE A SUR UNE SURFACE ANODISÉE .....	222
III.1 <i>Caractérisation des étapes de greffage</i> .....	222
III.2 <i>Contrôle du revêtement polymère et résistance en milieu acide</i> .....	225
IV.   VOIE DE GREFFAGE TESPSA.....	228



IV.1	<i>Protocole sous air</i> .....	228
IV.2	<i>Protocole sous argon</i> .....	229
<b>ANNEXE A6 : PROTOCOLE DE RESTITUTION DU CS EN MILIEU ACIDE .....</b>		<b>231</b>
<b>ANNEXE A7 : TESTS MICROBIOLOGIQUES .....</b>		<b>233</b>
I.	TESTS ANTIBACTÉRIENS SELON LA NORME ISO 22196 .....	233
I.1	<i>Protocole expérimental</i> .....	233
I.2	<i>Fiche de réalisation d'essai via la technique ISO 22196</i> .....	235
I.3	<i>Méthode de calcul</i> .....	236
II.	ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE SELON LA NORME ISO 20743 .....	237
II.1	<i>Méthode de calcul</i> .....	237
<b>ANNEXE A8 : CYTOCOMPATIBILITÉ DES REVÊTEMENTS DE CS .....</b>		<b>239</b>

## Annexe A1 : Traitement de surface

### I. Anodisation

Les surfaces anodisées  $T_{A6V \text{ anod}}$  ont été préparées par l'entreprise Sélénium medical.

La technique d'anodisation est un procédé électrochimique qui, par traitement de surface du substrat, transforme le métal en son oxyde. La pastille de titane à traiter sert d'anode et trempe dans une solution électrolytique, la cathode consiste en une électrode de platine de référence. En présence d'un courant continu et d'une différence de potentiel (entre 0 et 100V) entre les deux électrodes, une réaction d'oxydation a lieu à la surface du titane. Une couche de  $TiO_2$  d'environ quelques micromètres est ainsi formée, présentant un état de surface différent du substrat avant anodisation.

Les pastilles d'alliage de titane (TA6V) sont préalablement microbillés avant l'anodisation. La solution électrolytique est interne à la société Sélénium medical et sa composition est confidentielle.

### II. Polissage des surfaces

Les surfaces d'alliage de titane (TA6V) polies ont été fournies par la société Global D. Les pastilles sont usinées à partir d'une barre de titane, puis polies avec une pâte diamantée et une brosse tournante.

### III. Brillantage

Les surfaces d'alliage de titane (TA6V) ont été brillantées par la société Global D. Pour réaliser ce traitement, les échantillons (pastilles ou plaques) sont placés après usinage dans un bac contenant le média de brillantage (Figure A- 1). Des cycles d'une durée définie sont ensuite réalisés afin de brillanter les surfaces. Le média de brillantage est composé de granules de polissage, issus de noyaux de noix et de fruits moulus et nettoyés (fournisseur Dreher).



Figure A- 1 : Images du procédé de brillantage.

## Annexe A2 : Elaboration des revêtements de chitosane

### I. Méthode de dépôt du chitosane

Le dépôt du chitosane sur les pastilles de titane a été réalisé par *dip-coating*. Ce procédé consiste à tremper le substrat dans une cuve contenant la solution polymère, puis à le retirer de façon contrôlée (Figure A- 2). Un temps d'immersion dans la solution de 30 s et une vitesse de retrait 1 mm/s ont été utilisés pour tous les dépôts de chitosane.

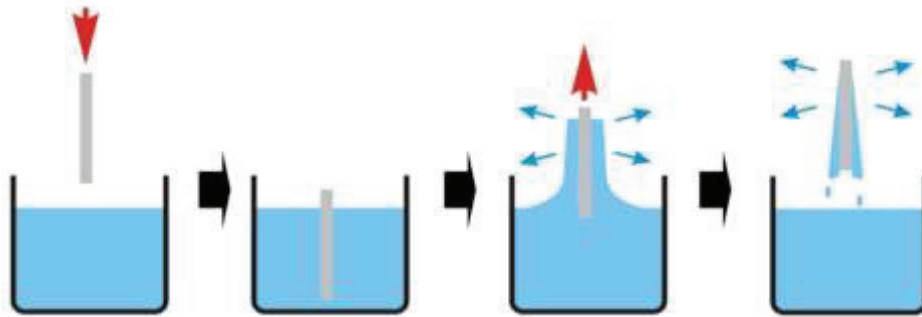


Figure A- 2 : Principe de dépôt d'un film de chitosane par *dip-coating*.

### II. Greffage covalent *via* la voie A

Le protocole expérimental pour l'élaboration des revêtements de chitosane *via* la voie A est le suivant:

- Prétraitement de la surface de titane : les échantillons sont nettoyés aux ultrasons dans un mélange acétone-éthanol (50/50 v/v) (20 mL par échantillon) pendant 10 min, puis séchés à température ambiante.
- Activation de la surface : les échantillons sont immergés dans une solution piranha (7/3, v/v, 95-98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ / 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pendant 10 min (10 mL par pastille). Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée et séchés à température ambiante.
- Greffage covalent de l'APTES : les échantillons sont immergés dans une solution d'APTES 3% dans du toluène anhydre (v/v, 3/97) (10 mL par pastille) pendant 24 h. Ils sont ensuite nettoyés aux ultrasons dans du toluène anhydre pendant 20 min, afin d'enlever tous les composés physisorbés en surface (20 mL par pastille). Cette procédure est réalisée trois fois.
- Réaction avec l'anhydride succinique (SA) : les échantillons sont immergés dans une solution d'anhydride succinique (0,1 M) dans du DiMethylFormamide (DMF) pendant 24 h. Ils sont ensuite lavés par ultrasons dans une solution de DMF puis d'eau distillée pendant 20 min chacun.
- Dépôt du chitosane : après avoir séché les échantillons, la solution de chitosane  $C_{\text{sig}}$  à 4 wt% (3% (v/v) d'acide acétique et 97% (v/v) d'eau distillée) est déposée sur les échantillons par *dip-coating*.

- Séchage des échantillons : les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 80°C pendant 48h.

### III. Greffage covalent *via* la voie B

Les deux protocoles expérimentaux pour l'élaboration des revêtements à base de chitosane *via* la voie B sont les suivants:

#### III.1 Protocole sous air

- Prétraitement de la surface de titane : les échantillons sont nettoyés aux ultrasons dans un mélange acétone-éthanol (50/50 v/v) (20 mL par échantillon) pendant 10 min, puis séchés à température ambiante.
- Activation de la surface : les échantillons sont immergés dans une solution piranha (7/3, v/v, 95-98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 10 min (10 mL par pastille). Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée et séchés à température ambiante.
- Greffage covalent du TESPSA : les échantillons sont immergés dans une solution de TESPSA 10% dans du toluène anhydre (v/v, 10/90) (10 mL par pastille) pendant 24 h. Ils sont ensuite nettoyés aux ultrasons dans du toluène anhydre, du DMF et de l'eau distillée pendant 15 min chacun (20 mL par pastille).
- Dépôt du chitosane : après avoir séché, les échantillons, la solution de chitosane C<sub>sig</sub> à 4 wt% (3% (v/v) d'acide acétique et 97% (v/v) d'eau distillée) est déposée sur les échantillons par *dip-coating*.
- Séchage des échantillons : les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 80°C pendant 24h.

#### III.2 Protocole sous gaz inerte

- Prétraitement de la surface de titane : les échantillons sont nettoyés aux ultrasons dans un mélange acétone-éthanol (50/50, v/v) (20 mL par échantillon) pendant 10 min, puis séchés 30 min à 40°C.
- Activation de la surface : les échantillons sont immergés dans une solution piranha (7/3, v/v, 95-98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 10 min (10 mL par pastille). Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée et séchés à 150°C sous gaz inerte pendant 1 h.
- Greffage covalent du TESPSA : les échantillons sont immergés dans une solution de TESPSA à 0,1% (v/v) dans du pentane, sous gaz inerte. Après une heure de mise en contact, le solvant est retiré et les échantillons sont ensuite chauffés à 150°C pendant 12 h sous gaz inerte. Suite à cette étape, les échantillons sont nettoyés aux ultrasons par trois lavages successifs dans une solution de pentane, de tétrahydrofurane et de dichlorométhane pendant 10 min chacun.

- Dépôt du chitosane : après avoir séché les échantillons sous gaz inerte, la solution de chitosane ( $C_{sig}$  à 4 wt% ou  $C_{kit}$  à 2wt%) (3% (v/v) d'acide acétique et 97% (v/v) d'eau distillée) est déposée sur les échantillons par *dip-coating*.
- Séchage des échantillons : les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 80°C pendant 24h.

## IV. Résistance en milieu salivaire

La tenue des revêtements de chitosane a été vérifiée par immersion des revêtements en milieu salivaire artificiel. La composition des solutions de salive artificielle est la suivante :

KCl 0.4 g/L	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.609 g/L
NaCl 0.4 g/L	Na <sub>2</sub> S 0.005g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.906 g/L	Urée 1g/L

L'urée est ajouté le jour de l'utilisation de la solution. Afin d'atteindre le pH désiré, l'acide acétique est ajouté goutte à goutte à la solution. Les pastilles à tester sont placées dans un bécher contenant la solution salivaire à pH 3 ou à pH 5. Après 24 h d'immersion, on rince les échantillons à l'eau distillée, puis ils sont séchés à température ambiante avant les caractérisations.



## Annexe A3 : Caractérisations de surface

### I. Etude des surfaces par microscopies

#### I.1 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les surfaces employées dans ce projet ont été analysées en Microscopie Electronique à Balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy). Le principe de cette technique consiste à balayer avec un faisceau d'électrons la surface à analyser. Le signal émis par l'échantillon est composé de particules et de rayonnements électromagnétiques résultant des interactions électrons-matière : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, photons X et électrons Auger. L'étude de ces particules et rayonnements apporte différentes informations sur la surface de l'échantillon. Il est ainsi possible d'observer les contrastes topographiques (mode électrons secondaires) et chimiques (mode électrons rétrodiffusés) de la surface étudiée.

Au cours du projet, trois microscopes électroniques à balayage ont été utilisés : le microscope SEM/FEG Quanta 250 (FEI, Hillsboro, USA) de Science et Surface et celui du Centre Technologique des Microstructures (CT $\mu$ ), équipés de détecteurs d'électrons secondaires, d'électrons rétrodiffusés et de photons X (détecteur EDX Brûker) et un microscope Hitachi S800 FEG situé au CT $\mu$ , équipé d'un système de microanalyse EDX avec logiciels IDFix et MaxView de SamX.

Les substrats étudiés dans la partie I du chapitre II ont été analysés par MEB sur l'appareil FEI Quanta 250 FEG (CT $\mu$ ) à 15 kV en mode électrons secondaires à un grossissement  $\times 400$ . La comparaison des surfaces d'alliage de titane brillantées de deux formats différents a été réalisée sur l'appareil FEI Quanta 250 FEG (Science et Surface) et les images ont été enregistrées à 15 kV en mode électrons secondaires à un grossissement de  $\times 400$  et  $\times 5000$ .

Dans la partie V du chapitre II, les clichés des revêtements à base de chitosane après immersion en milieu acide, ont été enregistrés sur un microscope FEI Quanta 250 FEG (CT $\mu$  et Science et Surface). Dans la partie V.1 de ce chapitre, les revêtements polymères avant et après immersion en milieu salivaire acide ont été observés avec une tension d'accélération de 1 kV en mode électrons secondaires et les images ont été enregistrées à un grossissement de  $\times 8$  et de  $\times 80$  (*cf* publication soumise). Dans la partie V.2, les images ont été obtenues à un grossissement de  $\times 400$  à une tension de 5 kV.

Dans la partie VI du chapitre II, les prototypes avant et après greffage du chitosane ont été observés en mode électrons secondaires sur le FEI Quanta 250 FEG du CT $\mu$  à une tension d'accélération de 5 kV avec un grossissement de  $\times 400$ . Les mêmes paramètres sont appliqués pour l'observation des surfaces après immersion en milieu acide.



Enfin dans la partie I du chapitre III, les échantillons sont étudiés avec le FEI Quanta 250 FEG (CTμ) à un grossissement de  $\times 400$  avec une tension de 15 kV pour les substrats nus et une tension de 5 kV pour les substrats revêtus (mode électrons secondaires).

## I.2 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie AFM permet de réaliser des images topographiques de la surface des échantillons avec une haute résolution (quelques angströms). Le principe de l'AFM est basé sur les forces d'interaction entre l'échantillon à analyser et une pointe montée sur un microlevier. L'appareil utilisé pour les mesures sur les substrats non revêtus est un AFM Scientec Molecular Imaging (camera Picosim II) disponible au LMI. La vitesse de balayage est identique pour les deux dimensions d'image, soit 1 ligne/s.

## I.3 Profilométrie 3D de contact

Une autre technique que l'on peut utiliser afin de déterminer la rugosité de surface est la profilométrie à pointe. Cette technique est basée sur le contact entre une pointe en diamant et la surface de l'échantillon. La position verticale Z est alors mesurée *via* un capteur solidaire de la pointe lors de son déplacement selon l'axe X, ce qui permet ainsi d'établir le profil  $Z=f(X)$  de la surface. Dans le cadre de notre projet, comme nous analysons des surfaces accidentées, un seul profil n'est pas représentatif de la surface. Il est plus pertinent de passer à une cartographie 3D de la surface. Ainsi, l'axe en Y sera également considéré, permettant des mesures de rugosité non plus sur un seul profil mais sur une surface ( $S_a$ ,  $S_q$ ).

Cette technique a été employée afin de caractériser les substrats non revêtus (I du chapitre II). Après nettoyage des substrats, les échantillons sont analysés avec le profilomètre (Veeco, Dektak). Les valeurs de rugosité ( $S_a$  et  $S_q$ ) ont été obtenues suite à une analyse d'une surface de dimension 3 mm x 3 mm, la durée de passage étant de 20 s. La résolution est de 500 nm/cartographie.

## I.4 Profilométrie 3D optique

La profilométrie optique est une autre technique utilisée pour l'analyse de la surface d'un implant. Elle permet l'obtention d'une valeur de rugosité sur une grande surface sans contact. Les mesures ont été effectuées au laboratoire LACMOS (UCBL) par le Pr. **Philippe Sainsot**. Les valeurs de rugosité ( $S_a = R_a$ ) ont été obtenues sur une surface de 1,273 mm x 0,955 mm. Le pas est de 1,66 μm et 332 nm pour un grandissement de 10 et 50, respectivement. Sur cet appareil l'erreur acceptée est de 10 %.

Cette technique a été employée afin de caractériser les substrats non revêtus (I du chapitre II) ainsi que pour des mesures d'épaisseur du chitosane sur substrat (V du chapitre II).

## II. Etudes des surfaces par spectroscopies

### II.1 X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Cette technique également appelée ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) est une analyse de surface élémentaire, qualitative et semi-quantitative basée sur l'étude de la réponse de la surface d'un échantillon à une irradiation de rayons X (Figure A- 3).

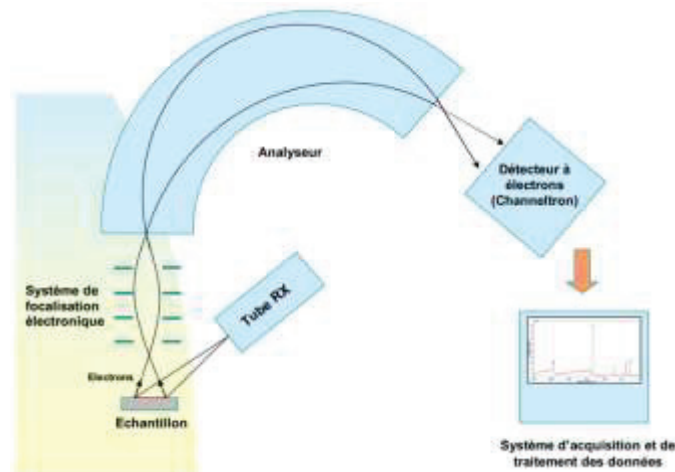


Figure A- 3 : Schéma du fonctionnement de l'XPS.

L'analyse de l'interaction photons X/matière permet d'étudier les formes chimiques des éléments détectés (profondeur sondée de l'ordre de 5 à 10 nm). L'appareil utilisé pour caractériser les échantillons est un XPS PHI Quantera SXM (Physical Electronics, Chanhassen, USA) localisé chez le partenaire Science et Surface. Cet appareil est équipé d'un analyseur d'énergies d'électrons hémisphérique à 180° et d'une source monochromatique Al K $\alpha$  (1486,6 eV, 15 kV et 4 mA). La zone d'analyse est de 200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$  et l'angle de détection par rapport à la surface du substrat est de 45°. La résolution en énergie est de 0,5 eV (mesurée sur Ag3d5/2). Deux mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

Cette technique a été utilisée afin de caractériser les substrats au cours des différentes étapes d'élaboration des revêtements mais également suite à l'immersion en milieu acide. Elle a été également employée afin de caractériser les revêtements chitosane suite aux différentes méthodes de stérilisation.

### II.2 Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS): ToF-SIMS et DSIMS

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de surface très sensible permettant de déterminer les structures chimiques *via* la séparation en phase gazeuse d'ions atomiques et moléculaires en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Cette technique est basée sur l'analyse en masse de particules ionisées émises suite au bombardement de la surface par un faisceau d'ions ( $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Bi}_n^+$ ...). Elle est basée sur l'interaction de pulvérisation combinée à l'ionisation (Figure A- 4).

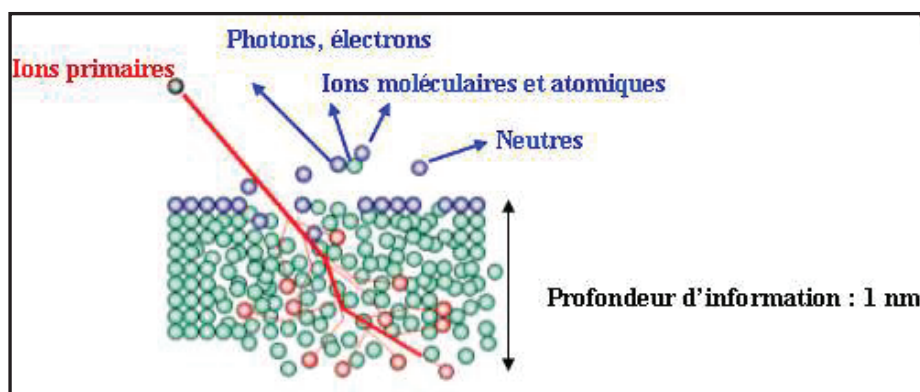


Figure A- 4 : Schéma de principe des cascades de collisions isotropes et des particules éjectées après bombardement d'un substrat par des ions primaires (images fournies par Science et Surface).

Certaines des collisions permettent ainsi l'émission de fragments depuis la surface. En spectrométrie de masse des ions secondaires, deux types de conditions d'analyse peuvent être employées : en conditions statiques (ToF-SIMS) et en conditions dynamiques (DSIMS).

### II.2.1 ToF-SIMS

La technique ToF-SIMS permet de réaliser une analyse en extrême surface des matériaux, la profondeur sondée est de l'ordre de 1 à 2 nm.

L'appareil utilisé pour caractériser les échantillons est le ToF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Germany) situé à Science et Surface. Cet appareil est équipé d'un canon à ions  $\text{Bi}_3^+$  pulsé de 25 KeV avec une zone scannée de  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ . Les données ont été traitées avec le logiciel IONTOF Measurement Explorer. Les effets de charge ont été compensés par un canon à électrons en mode pulsé à faible énergie. La calibration en masse a été réalisée avec les ions secondaires hydrocarbonés en mode positif et avec les ions carbonés en mode négatif. Avant comparaison des données, les intensités mesurées ont été normalisées par rapport à l'intensité totale de chaque spectre. Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

Cette analyse d'extrême surface a été utilisée dans le chapitre II partie V afin de déterminer les composés chimiques présents en surface au cours des étapes d'élaboration des revêtements mais aussi pour comparer les échantillons revêtus chitosane suite aux traitements salivaires acides. Elle nous a permis également d'obtenir les fragments caractéristiques des silanes et des polymères utilisés.

De l'imagerie ionique à partir d'espèces ioniques (en ions positifs et en ions négatifs) caractéristiques a été également réalisée pour comparer les différents échantillons (au cours des étapes de synthèse et après traitement en milieu acide). Les images ont été obtenues par large scans d'une zone de  $10\ 000\ \mu\text{m} \times 10\ 000\ \mu\text{m}$  avec une résolution de  $250 \times 250$  pixels (*cf* partie V du chapitre II).

### II.2.2 DSIMS

L'analyse de spectrométrie de masse en mode dynamique (DSIMS) nous permet d'obtenir un profil de répartition en profondeur des ions positifs des éléments majeurs et de toutes les espèces ioniques (profondeur d'analyse de 1 nm à 20  $\mu\text{m}$ ).

L'appareil utilisé pour caractériser les échantillons est le ToF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Germany) situé à Science et Surface. Cet appareil est équipé d'un canon à ions  $\text{Bi}_1^+$  pulsé de 25 KeV. L'aire analysée était de 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  afin d'éviter les effets de bord et de redéposition (aire abrasée de 300  $\mu\text{m}$  x 300  $\mu\text{m}$ ). La calibration de l'échelle en profondeur a été réalisée en mesurant la profondeur du cratère avec un profilomètre optique (*cf* I.4).

Cette technique a été utilisée dans le chapitre II partie V afin de déterminer l'épaisseur des dépôt de chitosane ainsi que de l'empilement des couches avant et après immersion en milieu acide.

### II.3 Spectroscopie Infrarouge

Les spectres ont été enregistrés avec un spectromètre Thermo Scientific (Nicolet iS10) à transformée de Fourier dans la région de 3700 à 700  $\text{cm}^{-1}$ , en mode réflexion totale atténuée (ATR), équipé d'un crystal en diamant. Chaque spectre infrarouge présenté est une moyenne de 32 scans.

## III. Mouillabilité de surface *via* la technique de la goutte posée

L'appareil utilisé, un easydrop (DSA30 Krüss), se situe au laboratoire. Les analyses ont été réalisées sur trois échantillons et sur chacun, quatre mesures au minimum ont été effectuées. Le volume d'eau déposé pour toutes les mesures est de 3  $\mu\text{L}$ . Les angles de contact entre la surface et la goutte sont ensuite mesurés.



## Annexe A4 : Caractérisations des chitosanes

### I. RMN

Des analyses RMN ont été effectuées à la fois sur les chitosanes en poudre obtenus des fournisseurs et sur les films de chitosane une fois mis en forme. Avant analyse, les polymères (10 mg) sont dissous dans 1 mL d'eau deutéré ( $D_2O$ ) acidifié avec 5  $\mu L$  d'acide chlorhydrique concentré (37 %). Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker 400 (400 MHz) à température ambiante. Le nombre de scans est de 128.

### II. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les analyses en SEC couplées à la diffusion de la lumière ont été effectuées par **Agnès Crépet**. L'utilisation d'un détecteur MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) en plus du réfractomètre a permis la détermination de l'indice de polymolécularité ( $\bar{M}_w$ ).

Les colonnes utilisées sont des colonnes Tosoh TSK PW 2500 et TSK PW 6000, couplées en ligne avec un réfractomètre différentiel (Wyatt Optilab T-rEX) et une diffusion de la lumière multi-angles (MALLS Wyatt EOS (laser 690 nm, cellule K5)). Un tampon acétate dégazé composé de 0,2 M d'acide acétique et 0,15 M d'acétate d'ammonium (pH = 4,5) a été utilisé comme éluant à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> (pompe Agilent 1260 Infinity). Les solutions de chitosane à analyser ont été préparées à 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> ou 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon et injectées (volume injecté = 100  $\mu L$ ) après filtration sur une membrane de taille de pores de 0,45  $\mu m$  (Millipore). Pour déterminer  $\bar{M}_w$ , un incrément indice de réfraction  $dn/dc$  de 0,1850 mL.g<sup>-1</sup> a été employé, celui-ci ayant été déterminé lors des précédents travaux de Schatz et al. [1].

### III. DRX

Les poudres de chitosane ont été analysés par Diffraction des Rayons X (DRX). Le diffractomètre utilisé est un Panalytical X'Pert Pro, utilisant la radiation  $CuK\alpha$  à 45 kV et à 30 mA. Les angles  $2\theta$  ont été scannés entre 5 et 40° avec un temps de comptage de 550 s à chaque pas d'angle (0,0167°). Une correction en z (déplacement en  $z = 0,27$  mm), utilisant le plan (110) à 19,9474 °, a été effectuée sur le diffractogramme de la poudre  $C_{sig}$ .

## IV. Viscosité des solutions de chitosane

De manière générale, les viscosimètres à chute de bille utilisent la mesure de la vitesse limite de chute  $V$  d'une sphère de diamètre  $D$  et de masse volumique  $\rho_2$  dans un liquide de masse volumique  $\rho_1$ , suffisamment visqueux pour que cette vitesse soit faible et dans le domaine d'application de la loi de Stokes. En effet, la bille, tout d'abord animée d'un mouvement uniformément accéléré, est rapidement freinée. Quand la résistance est égale et opposée au poids, le mouvement devient rectiligne et uniforme. On mesure le temps nécessaire à la chute d'une bille soumise à la gravité dans un tube rempli du fluide à analyser (principe d'Höppler).

Les billes utilisées sont calibrées et répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau A- 1). Selon la gamme de viscosité mesurée, les billes employées vont être plus ou moins lourdes et de diamètre plus ou moins grands. Grâce à la mesure du temps que met la bille à parcourir une portion bien définie du tube, on remonte à la viscosité grâce à la formule suivante :

$$\eta = t(\rho_2 - \rho_1) \times K$$

$\eta$  : viscosité du fluide (mPa.s)

$t$  : temps de chute de la bille (s)

$\rho_1$  : densité du fluide (g/cm<sup>3</sup>)

$\rho_2$  : densité de la bille (g/cm<sup>3</sup>)

$K$  : constante associée à la bille (mPa.cm<sup>3</sup>/g).

**Tableau A- 1 : Caractéristiques des billes employées dans le cas de mesure de la viscosité en chute de bille.**

Billes	Diamètre (mm)	Masse (g)	Densité	K (mPa.cm <sup>3</sup> /g)
4	15,228	15,205	8,1270	0,472
5	13,978	11,037	7,7183	6,799

Pour les quatre différentes solutions de chitosane, les mesures de viscosité ont été réalisées trois fois (cf chapitre II partie II).



## Annexe A5 : Résultats complémentaires du chapitre II

### I. Valorisation scientifique de la voie de greffage A

Cette première étude a fait l'objet de la publication suivante soumise à *Applied Surface Science*. L'objectif de cet article est double ; premièrement, il vise à évaluer précisément la chimie de surface au cours du greffage covalent de chitosane ( $C_{sig}$ ) sur un substrat en titane pur (Ti) et deuxièmement, il vise à étudier la résistance de ce revêtement polymère en milieu salivaire acidifié. De nombreuses techniques de caractérisation de surface ont été utilisées, la spectroscopie infrarouge en mode ATR (FTIR-ATR), la microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie d'énergie dispersive (EDS), la profilométrie 3D, la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) et la spectrométrie de masse des ions secondaires en mode dynamique (DSIMS) et statique (ToF-SIMS).

Ce travail concerne le greffage covalent du chitosane à la surface de titane *via* l'utilisation de deux agents de couplage : l'APTES qui réagit à la surface du titane préalablement traité par de l'eau piranha, et l'anhydride succinique (SA), qui permet la formation d'une double liaison amide avec, d'une part, le groupement amine de l'APTES et, d'autre part, l'un des groupements amine libre du chitosane  $C_{sig}$ .

Ces travaux ont été menés en collaboration avec les docteurs **Julien Amalric** et **Céline Brunon**, de la société Science et Surface, partenaire du projet.

# Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance.

Mélanie D'Almeida<sup>1</sup>, Julien Amalric<sup>2</sup>, Céline Brunon<sup>2</sup>, Brigitte Grosgeat<sup>1, 3, 4</sup>, Bérangère Toury<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (UMR CNRS 5615), Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> Science et Surface, Ecully, France.

<sup>3</sup> UFR d'Odontologie, Université Lyon 1, Lyon, France.

<sup>4</sup> Service de Traitements et de Consultations Dentaires, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

Corresponding author : at Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (UMR CNRS 5615), Université Lyon 1, 22 avenue Gaston Berger, 69100 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 (0)4 72 43 36 12; Fax: +33 (0)4 72 44 06 18

Corresponding author: [toury@univ-lyon1.fr](mailto:toury@univ-lyon1.fr)

## Abstract:

Peri-implant bacterial infections are the main cause of complications in dentistry. Our group has previously proposed the attachment of chitosan on titanium implants *via* a covalent bond to improve its antibacterial properties while maintaining its biocompatibility. A better knowledge of the coating preparation process allows a better understanding of the bioactive coating in biological conditions. In this work, several relevant characterization techniques were used to assess an implant device during its production phase and its resistance in natural media at different pH. The titanium surface was functionalized with 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) followed by grafting of an organic coupling agent; succinic anhydride, able to form two covalent links, with the substrate through a Ti-O-Si bond and the biopolymer through a peptide bond. Each step of the coating synthesis as well as the presence confirmation of the biopolymer on titanium after saliva immersion were followed by FTIR-ATR, SEM, EDS, 3D profilometry, XPS and ToF-SIMS analyses. Results allowed to highlight the efficiency of each step of the process, and to propose a mechanism occurring during the chitosan coating degradation in saliva media at pH 5 and at pH 3.

*Keywords: Chitosan, Titanium, Surface characterization, Chemical resistance.*

## Introduction

Synthesis and improvement of biomaterials are challenging goals to increase performances of implantology cares [2]. Among usual biomaterials, metallic implants based on titanium and its alloys

are preferred, essentially because of their biocompatibility, high corrosion resistance and suitable mechanical properties [3, 4]. However, titanium implants present a main weakness linked to its inability to avoid establishment and proliferation of bacteria [5]. Actually, according to previous studies, the implant surface itself constitutes a preferential site for bacterial adhesion [6] and in oral implantology, this infection is a worsen factor leading to Peri-implantitis [7]. This is defined as an inflammatory disease that induces the loss of supporting bone in the tissues surrounding a functional implant [8] and it represents the most common reason for implant failure. Hence, in order to obtain sufficient integration of dental implant, it is necessary both, to inhibit biofilm formation and to improve the adhesion between metal implant and peri-implant tissues [9]. Functionalization of titanium implant with bioactive molecules could thus be a pertinent solution to enhance integration of titanium [10-12].

Among interesting biomolecules, such as hyaluronic acid and collagen [13, 14], chitosan (CS) appears as a prime candidate to improve dental materials due to its non-toxicity, biodegradability and biocompatibility suitable for biomedical application [15]. Many studies have demonstrated the antibacterial properties of chitosan against gingival pathogens [16, 17]. It is a polysaccharide composed of *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *D*-glucosamine units with  $\beta$  binding at position 1 and 4. It is obtained from deacetylation of chitin [18], one of the most abundant polysaccharide in nature after cellulose. For example, it can be found in exoskeletons of crustaceans and insects as well as in some fungi and microorganisms [19].

Various strategies such as electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer on substrates [20], the use of catechol groups [21] or dopamine-glutaraldehyde system [22] have been already reported to bond chitosan to titanium. Another widespread approach consists in using organosilane as coupling agent such as TriEthoxySilylButyrAldehyde (TESBA) [23, 24], TriEthoxySilylPropylSuccinic Anhydride (TESPSA) [25] or 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) associated with glutaraldehyde [26-28].

Even though efforts have been made to reduce the number of steps using new organically modified silane, this approach still remains a multistep synthesis requiring a fine control of each stage. Hence, it appears very important to analyze, control and understand each step of the bioactive coating preparation to improve further the grafting and the ageing of the bioactive coating [29]. Different types of techniques could be used such as Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), 3D profilometry, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) in static and dynamic modes. Recent studies focused on the surface characterization, especially on the interface between chitosan coating and metal support [27, 30].

Nevertheless up to now, no study combining both bulk and outermost surface characterization techniques presented above were reported in the literature.

In this work, relevant surface characterization techniques were used to highlight and well-understand the different grafting steps. Efforts were made to precisely outline and analyze characteristic ionic fragments and chemical groups of each reactant in order to clearly define references, which will be monitored along the grafting progression.

Furthermore, when dental implantology applications are aimed, a key factor concerns the chitosan degradation in terms of matrix composition, film thickness and resistance on titanium after immersion in saliva media. Oral cavity can observe consequent pH variation, function of the patient eating and drinking as well as its personal buccal health. Even though chitosan is stable in neutral pH, it becomes soluble / degradable in aqueous acid media. Consequently, an important challenge consists in synthesizing a chitosan-based dental implant resistant at low pH values. Previous work has already highlighted acidic resistance of chitosan film on hydroxyapatite substrate [31]. Our group has also recently proved the acidic pH resistance of grafted chitosan using TESPSA as coupling agent [25, 32].

In this study, we propose a new procedure to graft chitosan on pure titanium T40 consisting in the successive use of two coupling agents. To react with the Ti support, APTES was employed as silane source to ensure i. a covalent bond with the substrate (Ti-O-Si) and ii. the formation of double peptide bond between amino groups from both APTES and chitosan, it was associated with succinic anhydride. Reports on APTES use as coupling agent [26, 27] can already be found but always in association with glutaraldehyde, which is toxic [33]. Furthermore, study of bioactive coating after acidic saliva immersion is presented here. Accurate analyzes of all prepared surfaces, meaning after each grafting step and immersion in acidic saliva media at pH 3 and pH 5 might be a reliable method of an implant device prior any biological tests.

## **Experimental**

### ***Chemical functionalization of titanium***

Titanium (Ti) disks (18 mm diameter) were supplied by Global D (France). Samples were cleaned first in an ultrasonic bath with ethanol/acetone solution (v/v, 50/50) for 20 min. Then, the surface was decontaminated and oxidized in fresh piranha solution (sulfuric acid/hydrogen peroxide, v/v, 70/30) for 10 min, rinsed in deionized water and dried at room temperature. This treatment has usually two roles i.e. surface decontamination and chemical oxidation etching by the formation of surface hydroxyl groups [34] The thus-cleaned surface is labelled PiTi. Silanation of the surface was achieved by immersion of the sample in a solution of APTES (Sigma-Aldrich, France) in extra-dry toluene (v/v, 3/97) for 24 h (Fig. 1, step 1). Then samples were cleaned three times in extra-dry

toluene by ultrasound for 20 min each in order to remove physisorbed compounds (APiTi). After room temperature drying, the samples were submerged in a solution of Succinic Anhydride (SA) (Sigma-Aldrich, France) in DiMethylFormamide (DMF) (0.1 M) for 24h to functionalize the surface with carbonyl groups (Fig. 1, step 2). Then samples were cleaned in DMF and finally in deionized water by ultrasound for 20 min each in order to remove physisorbed compounds (SAPiTi). A biopolymer solution containing 4 wt % chitosan (DA = 17, Sigma-Aldrich, France), 3% (v/v) acetic acid, and 97% (v/v) deionized water was grafted on the surface by dip coating ( $v = 1$  mm/s) (Fig. 1, step 3). Chitosan-coated samples were then dried at 80°C for 48 h (CSAPiTi).



**Figure 1. Scheme of chitosan immobilization on titanium surface using APTES-SA coupling agent method.**

Table 1 summarizes the labels used to define the different surfaces obtained during this study.

**Table 1.** Summary of label samples used in this study.

	Step of coating production
Ti	Unmodified surface
PiTi	Piranha treated titanium surface
APiTi	APTES modified PiTi surface
SAPiTi	Succinic anhydride modified APiTi
CSAPiTi	Chitosan modified SAPiTi surface
CSAPiTi-pH 5	Immersion of CSAPiTi in pH 5
CSAPiTi-pH 3	Immersion of CSAPiTi in pH 3

### ***Resistance of the coating in physiological media***

In order to evaluate the resistance of the chitosan coating on Ti surface in physiological media, tests using artificial saliva (Fusayama Meyer solution) were performed at pH 3 and 5 [35]. The solution, similar to natural human saliva, is composed of: KCl (0.4 g/l), NaCl (0.4 g/l),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.906 g/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.690 g/l),  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0.005 g/l), Urea (1 g/l). Final pH values were adjusted using glacial acetic acid. Coated samples were placed in each acid solution for 24 h at room temperature and rinsed twice with water. These surfaces are labelled CSAPiTi-pH 3 and CSAPiTi-pH 5, respectively.

### ***Surface chemistry characterizations***

#### *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR)*

Spectra were recorded on a Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spectrometer from 4000 to  $600\text{ cm}^{-1}$ . Each FTIR spectrum was an average of 32 scans. Thermo Scientific omnic software was used.

#### *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*

Measurements were done using a PHI Quantera SXM instrument (Physical Electronics, Chanhassen, USA) equipped with a 180 hemispherical electron energy analyzer and a monochromatized Al  $K\alpha$  (1486.6 eV) source operated at 15 kV and 4 mA. The analysis spot had a diameter of 200  $\mu\text{m}$  and the detection angle relative to the substrate surface was  $45^\circ$ . Standard deviations were calculated from measurements performed on two different areas. Data were analyzed using the Multipak software. The depth probed of XPS analysis is between 5-10 nm.

#### *Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)*

Measurements were performed using a ToF-SIMS 5 instrument (ION-TOF GmbH, Germany). Pulsed primary ion source of  $\text{Bi}_3^+$  was operated at 25 KeV. The scanning area of secondary ions was  $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ . The depth probed is about the first monolayer in the static mode. Data were analyzed using the *IONTOF Measurement Explorer* software. Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas. The spectra were acquired in high current bunched mode. When required, charge effects were compensated by means of a pulsed electron flood gun ( $E_k = 20\text{ eV}$ ), the primary ion dose density being then  $1.25 \times 10^{12}\text{ Bi}_3^+/\text{cm}^2$ . Spectra calibration was achieved using positions of  $\text{C}^-$ ,  $\text{C}_3^-$ ,  $\text{C}_4^-$  peaks in negative mode, and  $\text{CH}_3^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_7^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_9^+$  peaks in positive mode. Spectra comparison was carried out after a normalization of the intensity, proportionally to the total intensity of each spectrum. Pure APTES and self-supported chitosan film were used as references in order to select characteristic fragments (Table 2).

**Table 2.** Specific positive and negative fragments of APTES and chitosan.

	Negative ion	Theoretical m/z	Measured m/z	Positive ion	Theoretical m/z	Measured m/z
APTES	CN <sup>-</sup>	26.003	26.004	Si <sup>+</sup>	27.977	27.975
	SiO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	59.967	59.967	SiHO <sup>+</sup>	44.980	44.979
	SiHO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	60.975	60.975	SiH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	62.990	62.988
	SiHO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	76.969	76.968	SiH <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	78.985	78.984
Chitosan	CHO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	44.998	44.998	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> NO <sup>+</sup>	60.045	60.043
	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sup>-</sup>	58.030	58.034	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	61.029	61.027
	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	59.013	59.015	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sup>+</sup>	96.045	96.049
	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	71.013	71.016	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	97.029	97.029
	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	86.024	86.025	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	100.040	100.041
	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	100.040	100.045	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	112.040	112.039
				C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	144.066	144.065

Chemical images were obtained by large scan from a 10 000  $\mu\text{m} \times 10\,000\, \mu\text{m}$  area with  $250 \times 250$  pixels resolution. In order to control the coupling agent grafting, the negative and positive ionic fragments below were chosen: TiO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, TiSiHO<sub>5</sub><sup>-</sup>, Si<sub>2</sub>HO<sub>4</sub><sup>-</sup> in negative mode and Si<sup>+</sup>, Ti<sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>NO<sup>+</sup> in positive mode. Monitoring of the positive ionic fragments such as Ti<sup>+</sup>, C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>NO<sup>+</sup> and C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>NO<sup>+</sup> allow controlling the polymer deposit and its resistibility to immersion in acidic solutions.

#### *Dynamic-mode Secondary Ion Mass Spectrometry (DSIMS)*

ToF-SIMS 5 instrument (ION-TOF GmbH, Germany) was used with a pulsed primary ion source of Bi<sub>1</sub><sup>+</sup> operated at 25 KeV for analysis. Scanning area of secondary ions was 100  $\mu\text{m} \times 100\, \mu\text{m}$  in the center of a larger sputtered area, in order to minimize edge effects and redeposition linked to the formation of the crater. Primary ion source of O<sub>2</sub><sup>+</sup> was operated in non-interlaced mode at 2 KeV for sputtering with sputtered area of 300  $\mu\text{m} \times 300\, \mu\text{m}$ . Charge effects were compensated by means of a pulsed electron flood gun ( $E_k = 20\, \text{eV}$ ). The depth probed is at the nanometer scale in the dynamic mode, with each point of the profiles obtained from a mass spectrum. The maximum depth reached is around 15  $\mu\text{m}$ . Ions intensities were plotted *versus* the sputtering time, which was converted into depth after profilometry measurements.

#### *Scanning Electron Microscopy-Field Emission Gun (SEM) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)*

SEM was performed using a FEI Quanta 250 FEG instrument with SDD Bruker detector at 1 kV in Secondary Electrons (SE) and 5 kV in Back-Scattered Electrons (BSE) mode. Images were recorded at  $\times 8$  and  $\times 80$  magnifications. EDS data were analyzed using the Esprit software.



### *3D optical profilometry*

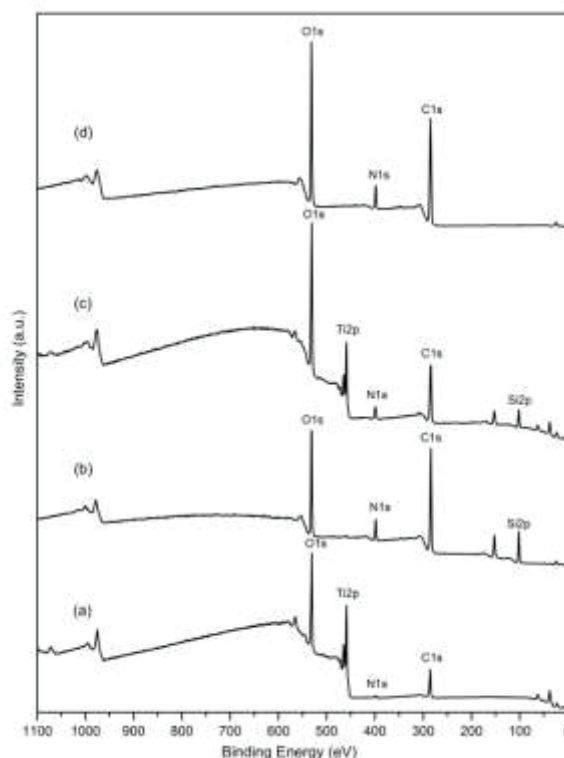
Profilometry characterization was performed with a Sensofar Neox instrument in interferometry method following the ISO 25178 norm. Measurements were made on different locations given two types of information. The organic layer thickness permits to retrieve its DSIMS sputtering rate and on the other hand the area surface roughness parameters, arithmetic average height (Sa) and developed area (Sdr), allow control of the sample homogeneity. Scanning area was  $1\,273\ \mu\text{m} \times 955\ \mu\text{m}$  with a pace of  $1.66\ \mu\text{m}$ . The film thickness measurement was achieved by profile of a  $300\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$  crater created by  $\text{O}_2^+$  ions sputtering using ToF-SIMS 5 instrument in dynamic mode, up to the interface between the deposited organic layer and the substrate.

## **Results and Discussion**

### *Control of coupling agent grafting*

#### *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis*

XPS being sensitive, it allows the precise monitoring of surface changes and gives information on chemical structure and atomic concentration of different types of surface [36]. Hence both first steps of the grafting (reaction between APTES and  $-\text{OH}$  surface groups of titanium substrates, and succinic anhydride addition, as depicted on Fig. 1) were analyzed *via* this technique. Fig. 2 shows XPS survey spectra of PiTi (a), APiTi (b), SAPiTi (c) and CSAPiTi (d) and element composition changes as a function of the reaction stage and acidic exposure for chitosan coated samples are presented Table 3.



**Figure 2.** XPS survey spectra of PiTi (a); APiTi (b); SAPiTi (c); CSAPiTi (d).

**Table 3.** Atomic element composition percent for the individual reaction steps and for chitosan coated samples CSAPiTi, CSAPiTi-pH 3 and CSAPiTi-pH 5 determined by XPS. Standard deviations were calculated from measurements performed on two different areas. Others: F, Al, Ca, S, Cl, Mg, Na, P, K.

	Ti	PiTi	APiTi	SAPiTi	CSAPiTi	CSAPiTi-pH 3	CSAPiTi-pH 5
C1s (%)	46.7 ± 1.3	35.3 ± 2.6	55.3 ± 2.0	47.6 ± 3.0	62.8 ± 0.5	59.1 ± 0.3	60.3 ± 0.6
N1s (%)	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.0	7.3 ± 0.8	6.0 ± 0.2	7.6 ± 0.4	7.3 ± 0.4	6.6 ± 0.0
O1s (%)	36.4 ± 0.7	45.2 ± 1.6	23.7 ± 0.1	30.1 ± 1.8	29.0 ± 0.2	30.6 ± 0.1	29.7 ± 0.5
Ti2p (%)	8.6 ± 0.3	17.1 ± 1.1	0.1 ± 0.2	3.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Si2p (%)	3.0 ± 1.6	0.0 ± 0.0	13.1 ± 1.8	10.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Others (%)	2.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.6	2.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3

Pristine Ti surface presents high and unexpected carbon content probably due to surface contamination partially attributed to a polysiloxane compound in sight of the silicon peak at 102.2 eV [37]. The Ti 2p deconvoluted peaks at 454.1 eV ( $8.4 \pm 0.4$  %) and 458.6-460 eV ( $91.6 \pm 0.4$  %) were attributed to  $Ti^0$  from the support [27] and  $Ti^{4+}$  of  $TiO_2$  layer, respectively [38]. After piranha treatment, the carbon ratio decreases even if it is still detected on the PiTi sample. In parallel, the peaks relatives to oxygen and titanium increase, with for Ti 2p deconvoluted peak, no change of assignments percent (see Table S1 in supplementary data). In good accordance, the deconvoluted O 1s peak at 530 eV was assigned to  $TiO_2$  in Ti ( $49.4 \pm 2.4$  %) and PiTi ( $71.8 \pm 1.8$  %) samples. It can be mentioned that peaks at 531.5 eV and at 532.5-533 eV found in both first samples were attributed to

contaminations. As Xu and co-workers shown, it appears difficult to eliminate physisorbed carbon and atmospheric nitrogen, this latter being considered as minor contaminations on both starting surfaces [27]. It can be noted that no trace of other elements was detected on the surface after piranha cleaning proving its efficiency. In the literature, to highlight the different steps, most of the studies do not take into account surface contaminations and directly compare the relative content of atomic ratios of selected elements such as O/C and N/C in the case of polyethylene substrates [39] and C/Ti, O/Ti and N/Ti for titanium substrates [27]. This approach does not seem appropriate here precisely because of the partial masking of Ti substrate. Others methods can be found in the literature to clean and activate titanium substrates before covalent attachment of silane, such as passivation method and immersion in alkali solution [40, 41].

After the silanation step, the C and Si peaks intensities increase as expected [26] while the Ti peak is almost no longer detected which is a sign of layer of silane more than 10 nm (detection limits of XPS analysis). The C signal was deconvoluted into two main peaks: at 284.7 eV ( $73.4 \pm 6.6$  %) and at 286.1 eV ( $23.1 \pm 5.3$  %), assigned to  $\underline{\text{C}}\text{-C}/\underline{\text{C}}\text{-H}/\underline{\text{C}}\text{-Si}$  and  $\underline{\text{C}}\text{-N}/\underline{\text{C}}\text{-O}$  respectively in good agreement with silane deposition (see Table S1 in supplementary data). Oxygen peak decreases due to the masking of substrate and the signal can be divided in two parts: peaks at 531.5 eV ( $89.2 \pm 5.1$  %) and at 532.5-533 eV ( $10.8 \pm 5.1$  %) were assigned to  $\underline{\text{O}}\text{-Si}$  and  $\underline{\text{O}}\text{-C}$  respectively, the latter corresponding to some contaminations. As expected, N 1s intensity increases considering amino groups presents in APTES. The deconvoluted N 1s signal gave two peaks at 399.3 eV ( $95.3 \pm 4.5$  %) and at 401.5 eV ( $4.7 \pm 4.5$  %) corresponding to  $\text{-NH}_2$  and  $\text{-NR}_3^+$ , respectively [42].

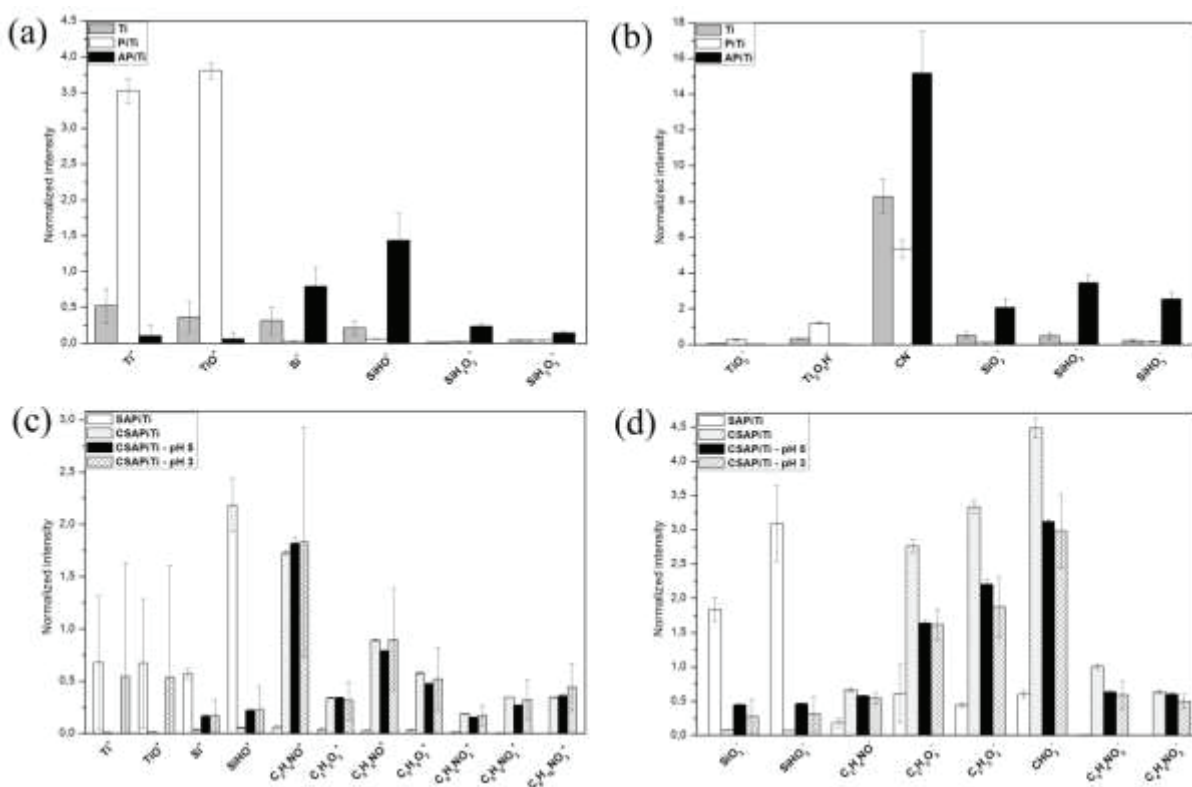
Then after the SA deposition step, signals relative to C 1s and Si 2p lightly decrease in parallel of increasing of Ti 2p and O 1s percents, suggesting degradation during the SA process with partial detachment of the silane. However the nitrogen signal, which is still detected in significant amounts on SAPiTi sample, is thus mostly attributed to the silane (see Table S1 in supplementary data). The deconvoluted peak of C 1s of SAPiTi sample gave four peaks: peak at 284.7 eV ( $63.3 \pm 1.8$  %), the peak at 286.1 eV ( $27.4 \pm 2.4$  %), the peak at 287.8 eV ( $6.2 \pm 0.2$  %), and the peak at 289 eV ( $0.8 \pm 0.6$  %) which were assigned to  $\underline{\text{C}}\text{-Si}/\underline{\text{C}}\text{-C}/\underline{\text{C}}\text{-H}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{-N}/\underline{\text{C}}\text{-O}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{=O}$  and  $\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-O}/\text{N}-\underline{\text{C}}\text{=O}$  respectively. These results are consistent with a formation of a peptide bond between APTES and SA. However the characteristic signal of peptide bond is hard to clearly demonstrate with XPS on titanium substrates because of surface analysis size. Bahadur and co-workers characterize successfully APTES-SA reaction using XPS in the case of nanoparticles [43].

#### *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)*

In contrast to XPS, ToF-SIMS not only provides elemental information, but also detailed molecular one with a high sensitivity with depth probed at the monolayer scale [44]. Analyzes of positive and negative fragments are another way to study grafting of covalent agents to titanium

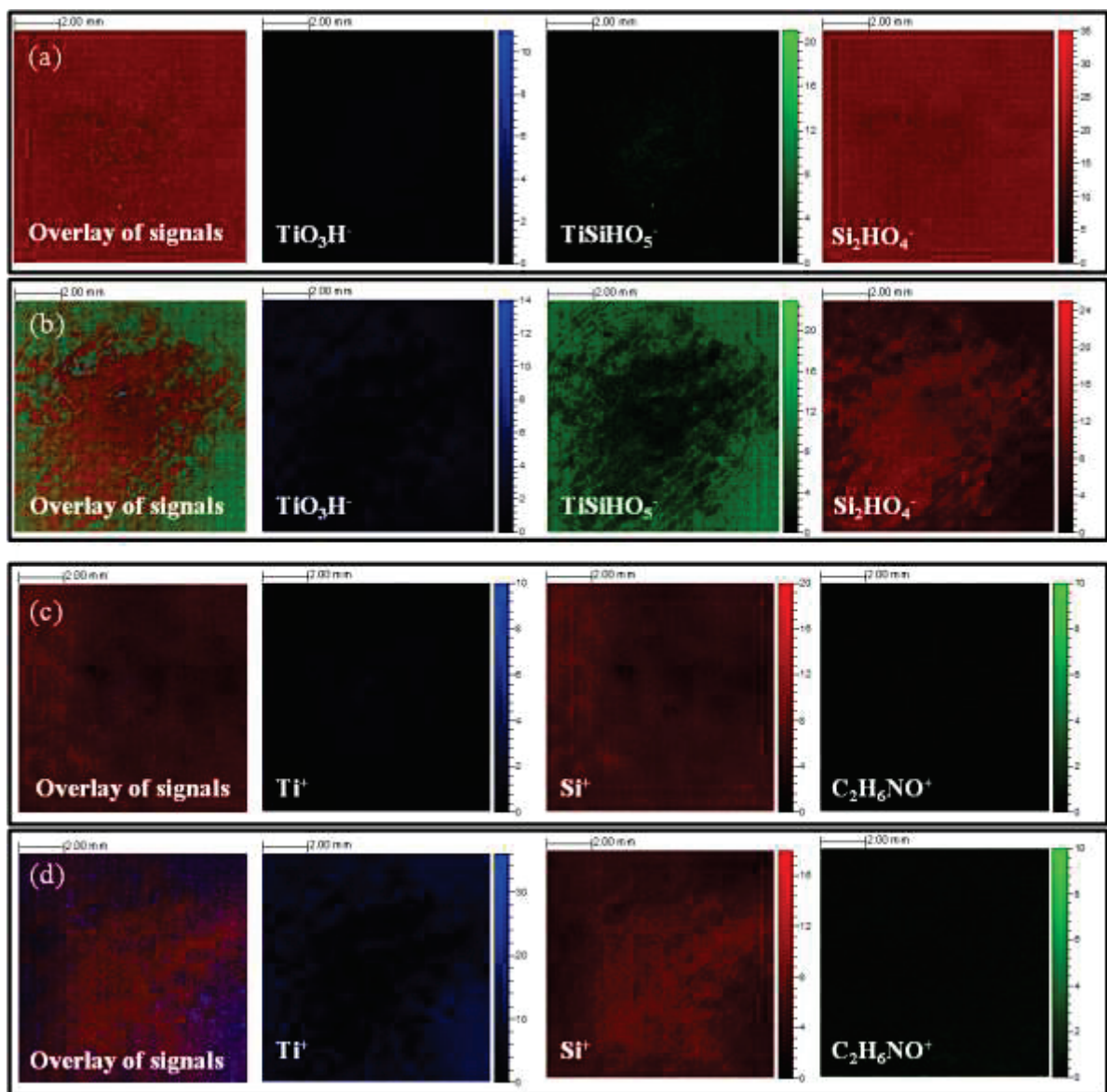
substrate (Fig. 3, 4 and 5). Contaminations from silicon based compounds such as  $\text{Si}^+$ ,  $\text{SiHO}^+$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SiO}_2^-$  and  $\text{SiHO}_2^-$  are detected on Ti substrate (Fig. 3a and b). Analysis of the outermost surface can be disturbed by these contaminations, which are possibly due to traces of PolyDiMethylSiloxane (PDMS). After piranha stage, characteristic peaks of the substrate (such as  $\text{Ti}^+$  and  $\text{TiO}_2^-$ ) show higher intensities, associated with a significant decrease of polysiloxane detection. Furthermore, the slight increasing of  $\text{TiO}^+/\text{Ti}^+$  ratio and of  $\text{Ti}_2\text{O}_5\text{H}^-$  ion detection could indicate a slight chemical oxidation of surface and presence of Ti-OH sites on PiTi sample [45].

Characteristic positive and negative fragments of APTES selected Table 2 were investigated after the silanization step by two ToF-SIMS analysis modes: surface spectroscopy and 2D surface imaging (Fig. 3 and 4). Despite presence of PDMS corresponding partly to the silicon detected in ToF-SIMS (data not shown) and XPS, significant increase of APTES fragments is observed (Fig. 3a and b). It is confirmed by 2D surface images (Fig. 4a and c), that show the relatively good homogeneity of the silane layer with an homogeneous  $\text{Si}^+$  ion repartition, mainly attributed to the silane. The image of  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$  fragment indicates formation of cross-polymerization through Si-O-Si bonds, with a homogeneous repartition. Monitoring of the  $\text{TiSiHO}_5^-$  fragment permits to track the binding between the silane and titanium. However, this fragment is not significantly detected on APiTi sample, which suggests a thick silane layer; confirming XPS results (see previous section 3.1.1). In addition, absence of characteristic fragments of chitosan such as  $\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}^+$  in 2D surface images (Fig. 4) and the spectra (data not shown) proves that no confusion can be done during the detection of the biopolymer [46]. Furthermore, absence of fragments corresponding to aminopropyl silane associated with ethoxy group such as  $\text{SiC}_5\text{H}_{12}\text{NO}^+$  and  $\text{SiC}_7\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$  (data not shown), and the homogeneous  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$  ion repartition are in agreement with two possible types of reaction. Indeed, condensation reaction can occur either between ethoxy-silane groups (Si-OEt) and the substrate leading to Ti-O-Si bond or between two silanol of two APTES molecules during the silanization step [47]. The Si-O-Si bond obtained by this latter cross-polymerization [27] can strengthen the film and improve further the retention of the entire coating. Studies of these two reaction types were performed on APTES film deposit on substrates using immersion technique or chemical vapor deposition [41, 48].

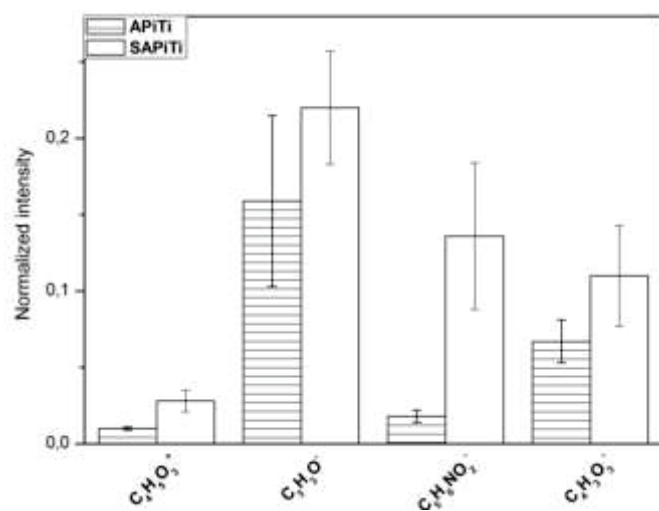


**Figure 3.** Average normalized intensity of positive and negative fragments of Ti, PiTi and APiTi (a) and (b), and average normalized intensity of positive and negative fragments of SAPiTi, CSAPiTi, CSAPiTi – pH 5 and CSAPiTi – pH 3 (c) and (d).

Reaction with SA leads to significant surface modification (Fig. 4b, d and 5). Compared to APiTi samples, signals of titanium fragments on SAPiTi in both negative and positive modes are increased in some areas, as in the periphery, suggesting partial degradation of the silane layer. Indeed, silane fragments are localized in the middle of the sample where no titanium peaks are detected. An intensity decrease of  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$  and  $\text{Si}^+$  is also noted and  $\text{SiHO}_5\text{Ti}^-$  fragments, indicator of Ti-O-Si bond, are detected on the periphery of the wafer, in agreement with silane degradation. In order to highlight the reaction between amino groups of grafted silane and the succinic anhydride,  $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^-$ ,  $\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_2^-$  and  $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_3^-$  negative and positive fragments characteristic of amide bonding were investigated in APTES-SA film (see Fig S1 in supplementary data) as well as in SAPiTi and APiTi (Fig. 5). After SA treatment, intensity of these fragments significantly increases confirming reaction of SA with APTES to form amide group. This reaction has been largely employed in the literature [49-51], but none deals with deposit on titanium.



**Figure 4.** 2D surface imaging of positive fragments and negative fragments of APiTi (a and c) and SAPiTi (b and d).



**Figure 5.** Average normalized intensity of positive and negative fragments of APiTi and SAPiTi.



## ***Control of biopolymer deposit on titanium samples and resistance of the coating after immersion in acidic solutions***

### *XPS analysis*

The surface atomic composition changes of chitosan coated samples before and after acidic exposure were determined by XPS analysis (Table 3). Following chitosan deposition, a significant increasing of C 1s and N 1s peak intensities and a decrease of Si 2p peak are observed. Absence of titanium suggests a chitosan thickness superior to 10 nm (XPS detection limit). The deconvoluted peaks of C 1s and O 1s of CSAPiTi sample gave four and two peaks respectively (see Table S1 in supplementary data): peaks at 284.6 eV ( $30.4 \pm 4.0$  %), at 286.1 eV ( $51.5 \pm 2.4$  %), at 287.8 eV ( $15.7 \pm 1.5$  %), and at 289 eV ( $1.9 \pm 0.1$  %) were assigned to  $\underline{\text{C}}\text{-C}/\underline{\text{C}}\text{-H}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{-N}/\underline{\text{C}}\text{-O}$ ,  $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{-O}/\underline{\text{C}}=\text{O}$  and  $\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$  respectively for C 1s signal [30, 52] and peaks at 531.5 eV ( $99.2 \pm 0.1$  %) and at 532.5-533 eV ( $0.8 \pm 0.1$  %) which were assigned to  $\underline{\text{O}}=\text{C}-\text{N}$  and  $\underline{\text{O}}-\text{C}$  respectively [53, 54]. The deconvoluted N 1s signal gave two peaks at 399.3 eV and at 401.5 eV corresponding to  $-\text{NH}_2$  and  $-\text{NH}_3^+$ , respectively. These results confirm the success of chitosan deposit and suggest the peptide bond formation. Gadenne and co-workers used also this type of covalent binding in order to graft polysaccharide *via* a silane onto titanium surface [55]. In the literature, chitosan grafting on Ti can be performed *via* imide bond formation using TESBA [23] or APTES associated with glutaraldehyde [26].

Study of the biopolymer coating retention in saliva media is primordial for future applications in oral implantology. pH variation tests in similar conditions appear as a relevant way to evaluate dental materials resistance according to previous studies [25, 35]. Two pH values (3 and 5) were chosen arbitrarily in order to simulate acidic condition of saliva medium according to previous work in our group [25]. Following pH immersion, no significant changes about surface atomic composition are observed by XPS analysis on CSATPiTi-pH 3 and CSATPiTi-pH 5 (Table 2), proving the presence of chitosan on both samples. Note that an increasing of others elements corresponding to saliva media composition is observed. Moreover, hypothesis of no impact of acidic pH treatments chitosan coated sample can be done according to this analysis.

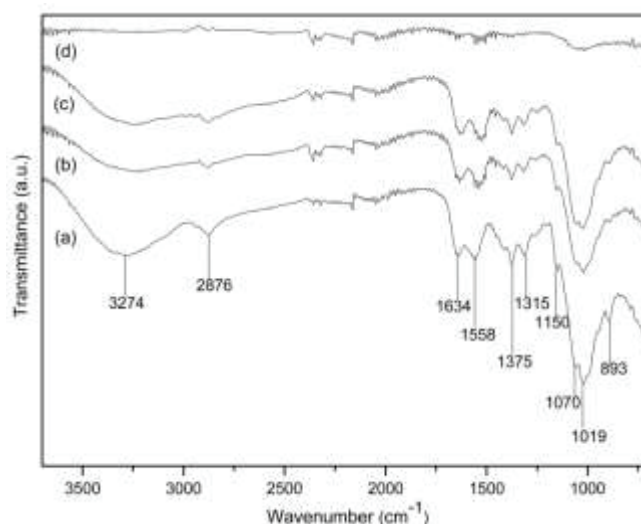
### *FTIR-ATR analysis*

Following FTIR-ATR analysis, spectra presented in Fig. 6 show equivalent signature and the characteristic bands of chitosan [24], except for one recorded from CSAPiTi-pH 3 (Fig. 6d). Overlapped peaks of N-H stretching and O-H stretching vibrations visible around  $3274\text{ cm}^{-1}$  indicate the presence of hydroxyl and amine groups [56]. Weaker band intensity is noted for CSAPiTi-pH 5 (Fig. 6b) and CSAPiTi-pH 3 at area 1 (Fig. 6c) compared to CSAPiTi (Fig. 6a). The weak band at  $2876\text{ cm}^{-1}$  corresponds to  $(-\text{CH}_2-)$  stretching while bands at  $1634\text{ cm}^{-1}$ ,  $1558\text{ cm}^{-1}$ ,  $1375\text{ cm}^{-1}$  and  $1315\text{ cm}^{-1}$  are attributed to  $\text{C}=\text{O}$  of amide,  $-\text{NH}_2$  stretching vibration,  $-\text{NHCO}$  of amide and  $-\text{C}-\text{N}$ ,



respectively [52, 57]. The bands at 1150, 1070, 1019 and 893  $\text{cm}^{-1}$  are characteristics of chitosan structure [52, 57, 58].

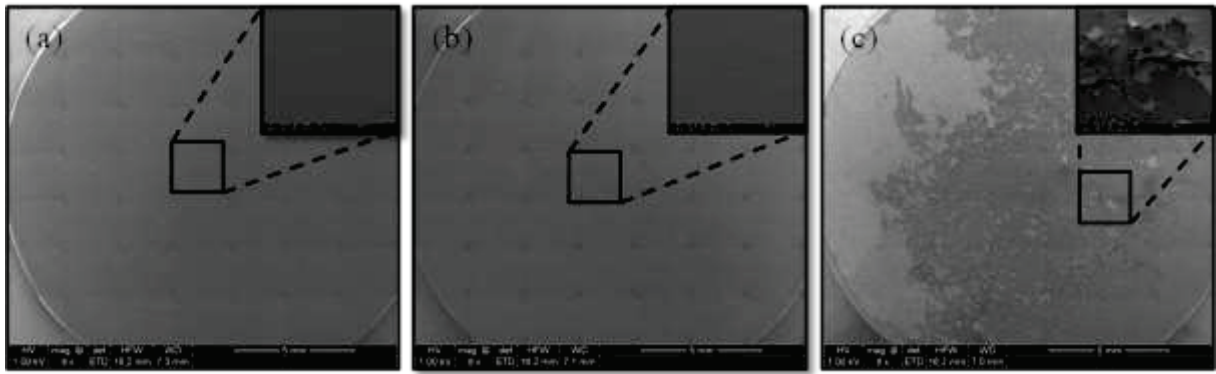
As above-mentioned, spectrum recorded on sample CSAPiTi-pH 5 shows all expected bands for chitosan signature proving its presence on the entire Ti surface even after the longest acidic immersion. Besides, CSAPiTi-pH 3 gives ambivalent results, since analyzes of two different areas not lead to reproducible spectra. Actually, the chitosan is not remained on the entire surface (Fig. 6d), suggesting its partial deterioration and partial lift off. However as noted in previous studies [25], all signal intensities on CSAPiTi-pH 5 and CSAPiTi-pH 3 are weaker, possibly attributable to loss of biopolymer material. It should be pointed out that IR remains here a qualitative analysis and no information about degradation mechanism could be extracted because of non-detection of silane on titanium surface.



**Figure 6.** FT-IR/ATR spectra of CSAPiTi (a); CSAPiTi-pH 5 (b); CSAPiTi-pH 3 area 1 (c); CSAPiTi-pH 3 area 2 (d).

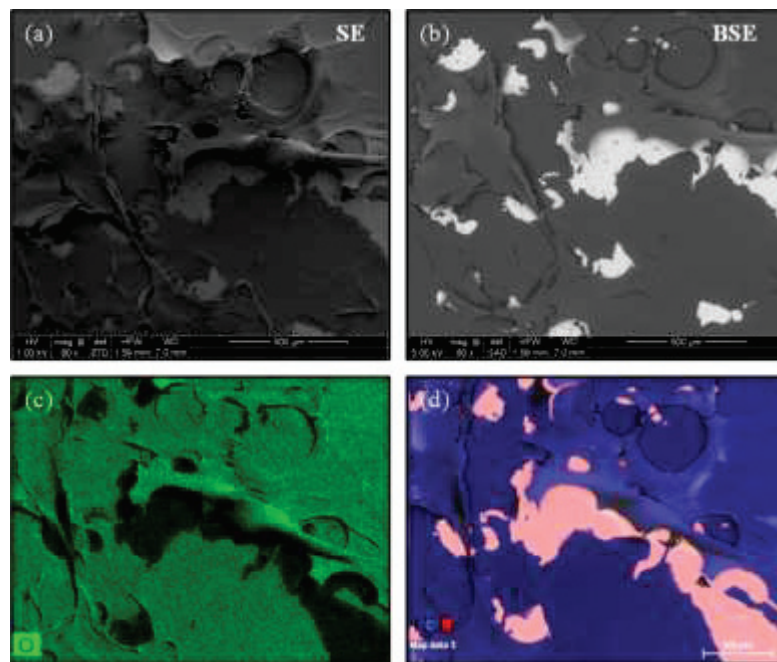
### *SEM analysis*

The morphology of chitosan-coated samples before and after immersion in acidic solutions was observed using SEM technique (Fig. 7a, b and c). An overview of the sample surface was shown as well as for each of them, a zoom of one pertinent area is presented. In the case of CSAPiTi (Fig. 7a) and CSAPiTi-pH 5 samples (Fig. 7b), no chemical or topographic contrast is observed regardless of the magnification. Therefore we can conclude that the chitosan coating is homogeneous and uniform and that the acid treatment at pH 5 of chitosan-coated sample does not change its surface morphology.



**Figure 7.** SEM micrographs in Secondary Electron (SE) mode of CSAPiTi (a); CSAPiTi-pH 5 (b); CSAPiTi-pH 3 (c).

On the contrary and in good accordance with the previous IR conclusions, after immersion at pH 3 for 24 h of chitosan-coated sample, strong chemical and topographic contrasts are observed (Fig. 7c, 8a and b). At low magnification, observation of a quarter of substrate suggests partial degradation of the biopolymer and lift of at the disk periphery. At high magnification, contrasts are even more obvious with the substrate exposed in some areas (Fig. 8b). Folding and retraction of the film seems also to occur during the acid immersion. Oxygen, Carbon and Titanium mapping of CSAPiTi-pH 3 are shown in Fig. 8c and d. The intensity of O and C is correlated to the biopolymer amount, rich of these two elements. In the same manner, the Ti intensity increases where the amount of carbon and oxygen is low. These results support previous findings of partial detachment and retraction of chitosan at pH 3.



**Figure 8.** SEM micrographs of CSAPiTi-pH 3 in Secondary Electron (SE) (a) and Back-Scattering Electron (BSE) (b) modes; EDS mapping of O element in green code (c); C and Ti in blue and red code (d) of CSAPiTi-pH 3.

### *ToF-SIMS analysis*

It was demonstrated above, that chitosan deposition leads to the decrease of  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{TiO}^+$ ,  $\text{Si}^+$ ,  $\text{SiHO}^+$ ,  $\text{SiO}_2^-$  and  $\text{SiHO}_2^-$  fragments intensities due to a thick coating (Fig 3c and d). Characteristic positive and negative chitosan fragments shown Table 2 are fully detected after chitosan deposition highlighting the grafting efficiency like previous study [24]. After acidic exposure, different results are observed depending on the pH. No significant difference is observed between the three samples; however it should be pointed out a noticeable standard deviation value in the case of CSAPiTi-pH 3 attributed to the chitosan deterioration in some areas. Indeed at these damage zones, the substrate is clearly observed with detection of  $\text{Ti}^+$  ions in a lower intensity than pristine titanium. Presence of silicon fragments mainly attributed to silane and characteristic fragments of CS are also proved here but in a fewer amounts than reference deposit sample. 2D surface imaging of positive fragments of CSAPiTi, CSAPiTi-pH 3, and CSAPiTi-pH 5 confirms these findings with detection of Ti and less chitosan after pH 3 treatment (see Fig S2 in supplementary data). Analysis of negative ions assigned to chitosan film shows a slight decrease of normalized intensity after exposure to acidic solutions, attributable to loss of biopolymer material. These results provide a possible indication of mechanisms leading to the partial degradation following exposure to acidic solution. Indeed, two mechanisms can occurred at pH 3 with the rupture of the covalent bond between chitosan and coupling agent and/or the rupture of covalent bond between the silane and the titanium substrate.

### *Thickness and area roughness of the coating*

Optical profilometry is one of the technique used to precise an implant surface [59]. It is used to characterize the surface roughness:  $S_a$ ,  $S_{dr}$  and the coating thickness (see Fig S3 in supplementary data) permitting to get interesting insights on the DSIMS sputtering rate (Table 4). Although, SEM detected no coating change before and after immersion at pH 5, profilometry shows important modifications in terms of roughness and thickness for all samples. Indeed, in the case of CSAPiTi-pH 5 sample a smoothing effect of saliva media probably due to a minor loss of chitosan is suggested as the observed roughness parameters decrease.

In the case of CSAPiTi-pH 3 at 24 h, the smoothing effect of saliva media is still present according to a lower  $S_a$  value, but the augmentation of  $S_{dr}$  value observed may be related to the heterogeneity of the film formation (Fig. 8a).

After both acidic solutions, the biopolymer layer decreases in agreement with the latter results and a noticeable standard deviation is noted in the case of CSAPiTi-pH 3. The latter film folded on itself which explains higher thickness and  $S_{dr}$  values than CSAPiTi-pH 5. The sputtering rate obtained from the various organic layers are very close: according to internal observations, the sputtering rate is significantly lower (about 10-20 times) for a silica-based layer. The slight difference observed are thus

not significant and could be due to matrix effects, i. e. change of film composition, especially in this case with the presence or not of alkaline ions.

**Table 4.** Evolution of surface parameters of CSAPiTi, CSAPiTi - pH 5, CSAPiTi - pH 3.

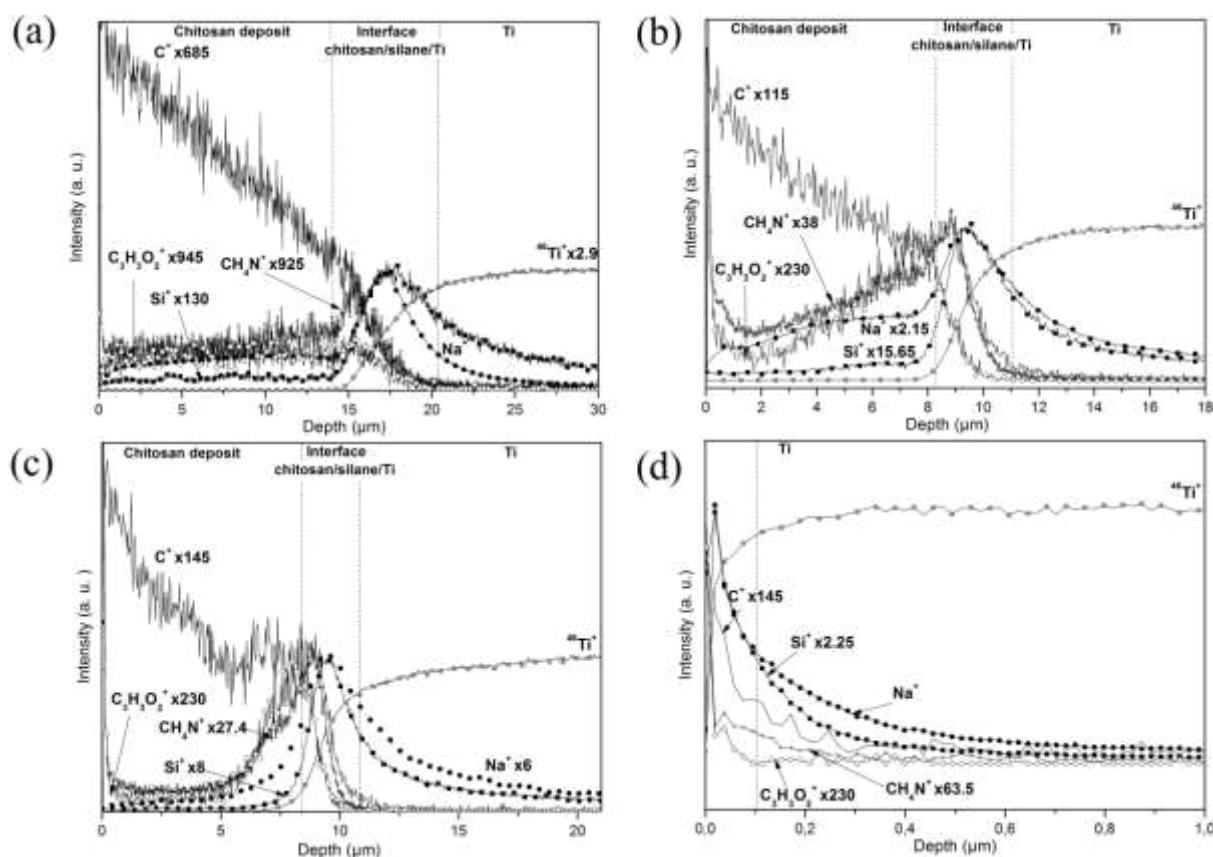
	Sa ( $\mu\text{m}$ )	Sdr (%)	Coating thickness ( $\mu\text{m}$ )	DSIMS sputtering rate ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ )
CSAPiTi	1.17	1.06	$15.95 \pm 1.13$	0.017
CSAPiTi-pH 5	0.77	0.16	$9.56 \pm 0.11$	0.021
CSAPiTi-pH 3	0.85	2.51	$11.40 \pm 2.90$	0.019

#### *Dynamic-mode Secondary Ion Mass Spectrometry (DSIMS)*

Using depth profiling, DSIMS method provides a clear indication on the thickness of the remaining film before and after immersion [60] and information about the stacking of the deposited layer. ToF-SIMS positive ions depth profiles were recorded on chitosan-coated samples before and after 24 h exposure (Fig. 9). The depth distribution of  $^{46}\text{Ti}^+$  (saturation on  $^{48}\text{Ti}^+$ ),  $\text{C}^+$ ,  $\text{Si}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$ ,  $\text{CH}_4\text{N}^+$  and  $\text{Na}^+$  ions intensities is profiled. In order to study composition and stack of layers, fragment intensities are reported in Fig 9 using a linear scale. In agreement with previous results and ion evolution, CSAPiTi sample can be divided in three regions. A first layer corresponds to the chitosan film with presence of  $\text{C}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  and  $\text{CH}_4\text{N}^+$  attributed to the polymer (Fig. 9a). The organic layer with  $\text{C}^+$  as characteristic signal gradually decreases until a second area assigned to the chitosan/coupling agent/substrate interface with the appearance of  $\text{Si}^+$  ion that is ascribed to the silane layer, in agreement with ToF-SIMS analyses on SAPiTi and APiTi samples. Enrichment and then disappearance of  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions are localized at the interface of the substrate with the organic layer before Si maximum detection. Hypothesis of the bond formation between chitosan amino group and the coupling agent can be assumed according to this result. The last detected region is assigned to the support presenting rising  $^{46}\text{Ti}^+$  ion amount with the depth analysis. Contamination with alkaline elements such as  $\text{Na}^+$  was detected in the organic layer and mainly in the intermediate one.

After acidic exposure (Fig. 9b and c), intensity of alkaline elements in chitosan layer decreases, confirming hypothesis of its contamination. The polymer thickness decreases after 24 h of exposure in both acidic saliva media. Therefore in both cases,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  ions followed the  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions evolution in CSAPiTi sample, with enrichment and then disappearance at the interface chitosan / silane / substrate before Si detection. This result could be a consequence of acidic exposure which damage CS deposit. On the area of deterioration of chitosan,  $\text{C}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  and  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions are quickly eliminated, sign of an almost complete film deterioration (Fig. 9d). Therefore, in the same area,  $\text{Si}^+$  ions, characteristics of the intermediate silane layer, were partially present. It can be noticed that beyond the chitosan-silane interface area, the thickness is biased due to the chemical difference of the different layers. These

findings, in agreement with profilometry results, complete the results obtained with ToF-SIMS. Indeed, following exposure to acidic solution, besides the two mechanisms suggested by ToF-SIMS, coating thickness reduction can be also observed.



**Figure 9.** ToF-SIMS depth profiles of positive fragments recorded from CSAPiTi (a), CSAPiTi - pH 5 (b), and two different areas of CSAPiTi - pH 3 (c and d).

## Conclusions

In this work, a covalent grafting of chitosan to titanium was performed using a three-step reaction procedure. It involves the use of two coupling agents: 3-AminoPropylTriEthoxySilane (APTES) as silane to react on titanium previously treated during the piranha step, and succinic anhydride used to ensure the formation of a double peptide bond between both amino groups from APTES and chitosan. Accurate monitoring of the resistance of chitosan-coated samples in saliva media at pH 3 and 5 for 24 h was performed. A decrease of thickness and surface roughness were the only changes observed after pH 5 immersion. In the case of pH 3, heterogeneity of the surface has been demonstrated with no trace of CS in some area even if silane was detected. The use of surface characterization technique was necessary to evaluate the production process of a bioactive coating. These analysis methods are permitted also to follow and understand precisely the matrix modification of coating following immersion in biological solutions. This study allowed providing reference fragments for products used in the coating production (CS and APTES); these results might be a key

factor in the selection of bioactive coating in dental implantology applications but also in other applications using these products. The combination of these techniques appears here necessary to clearly characterize the coating production. Efforts are occurring in our group to improve both the grafting step and the resistance of chitosan-coated titanium at pH 3. The next challenge will be the study of its biocompatibility and antibacterial properties of this new procedure to graft chitosan.

### **Acknowledgments**

This work was partially supported by the Rhône-Alpes Region, DGCIS, FEDER, Global D and the Fonds Unique Interministériel program through the research project “Plastipolis”. The authors would like to thank Dr. Philippe Sainsot for the 3D profilometry measurements.

### **Appendix A. Supplementary data**

XPS binding energies of C 1s, N 1s, Ti 2p and O 1s at the surface of pristine Ti and modified Ti and the corresponding assignments to surface modification; Average normalized intensity of positive and negative fragments of APTES + SA reaction in ethanol; 2D surface imaging of positive fragments of CSAPiTi, CSAPiTi-pH 5 and CSAPiTi-pH 3; Measurement of the chitosan deposit thickness by optical profilometry in the case of CSAPiTi sample.



## **Supporting information**

### **Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance.**

Mélanie D’Almeida<sup>1</sup>, Julien Amalric<sup>2</sup>, Céline Brunon<sup>2</sup>, Brigitte Grosogoeat<sup>1, 3, 4</sup>, Bérangère Toury<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (UMR CNRS 5615), Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> Science et Surface, Ecully, France.

<sup>3</sup> UFR d’Odontologie, Université Lyon 1, Lyon, France.

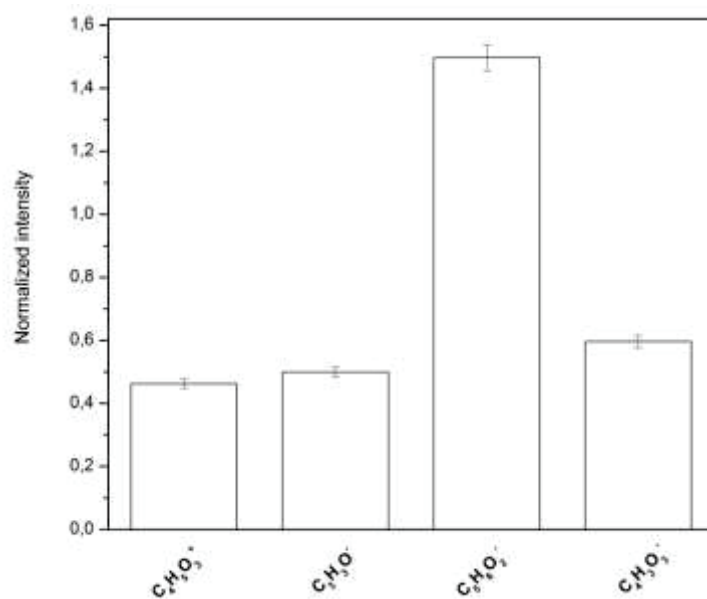
<sup>4</sup> Service de Traitements et de Consultations Dentaires, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.



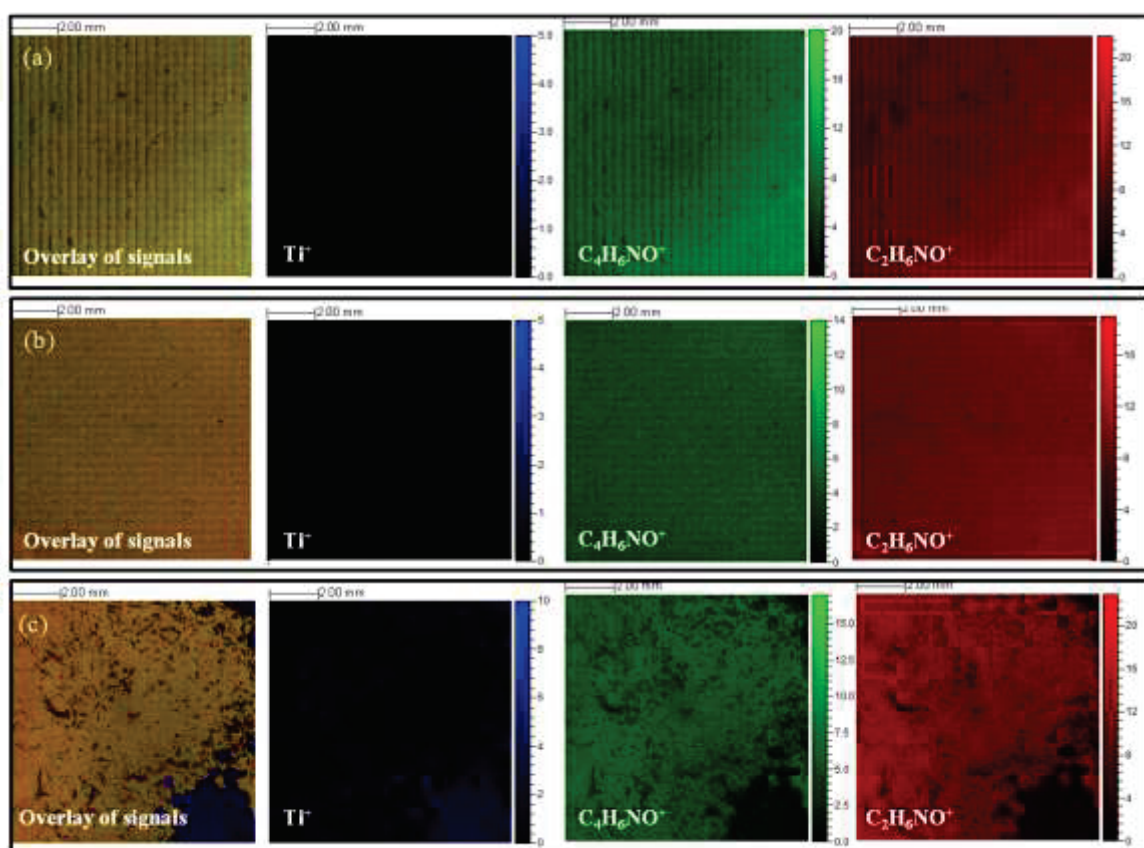
Table **S1**. XPS binding energies of C 1s, N 1s, Ti 2p and O 1s at the surface of pristine Ti and the corresponding assignments to surface modification.

	C 1s region BE (eV), % assignments	N 1s region BE (eV), % assignments	Ti 2p region BE (eV), % assignments	O 1s region BE (eV), % assignments
Ti	283.2 (0.3 ± 0.4) <sup>a</sup> 284.7 (68.1 ± 2.2) <sup>a</sup> 286.1 (21.1 ± 0.9) <sup>a</sup> 287.8 (8 ± 0.5) <sup>a</sup>	399.3 (59.9 ± 3.2) <sup>a</sup> 401.5 (40.1 ± 3.2) <sup>a</sup>	454.1 (8.4 ± 0.4) Ti base 458.6-460 (91.6 ± 0.4) TiO <sub>2</sub>	530 (49.4 ± 2.4) TiO <sub>2</sub> 531.5 (42.5 ± 1.8) <sup>a</sup> 532.5-533 (8.1 ± 0.6) <sup>a</sup>
PiTi	284.7 (68.6 ± 0.9) <sup>a</sup> 286.1 (19.7 ± 1.1) <sup>a</sup> 287.8 (6.2 ± 0.6) <sup>a</sup> 289 (5.6 ± 0.4) <sup>a</sup>	396.1 (50.0 ± 3.5) <sup>a</sup> 399.3 (50.0 ± 1.6) <sup>a</sup>	454.1 (8.2 ± 0.1) Ti base 458.6-460 (91.9 ± 0.1) TiO <sub>2</sub>	530 (71.8 ± 1.8) TiO <sub>2</sub> 531.5 (18.0 ± 0.9) <sup>a</sup> 532.5-533 (10.3 ± 0.9) <sup>a</sup>
APiTi	283.2 (1.5 ± 1.5) <sup>a</sup> 284.7 (73.4 ± 6.6) <u>C-C</u> / <u>C-H</u> 286.1 (23.1 ± 5.3) <u>C-N</u> 287.8 (1.6 ± 2.3) <sup>a</sup> 289 (0.4 ± 0.5) <sup>a</sup>	399.3 (95.3 ± 4.5) NH <sub>2</sub> 401.5 (4.7 ± 4.5) NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	458.6-460 (100 ± 0.0) TiO <sub>2</sub>	531.5 (89.2 ± 5.1) Si-O 532.5-533 (10.8 ± 5.1) <u>O-C</u> <sup>a</sup>
SAPiTi	283.2 (2.3 ± 0.2) <sup>a</sup> 284.7 (63.3 ± 1.8) <u>C-C</u> / <u>C-H</u> 286.1 (27.4 ± 2.4) <u>C-N</u> / <u>C-O</u> 287.8 (6.2 ± 0.2) <u>C=O</u> 289 (0.8 ± 0.6) <u>O-C=O</u> / <u>N-C=O</u>	399.3 (72.6 ± 4.7) NH <sub>2</sub> 401.5 (27.4 ± 4.7) NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	458.6-460 (100 ± 0.0) TiO <sub>2</sub>	530 (6.4 ± 1.5) TiO <sub>2</sub> 531.5 (65.3 ± 4.3) Si-O 532.5-533 (28.3 ± 5.8) <u>O-C</u>
CSAPiTi	283 (0.6 ± 0.0) <sup>a</sup> 284.6 (30.4 ± 4.0) <u>C-H</u> , <u>C-C</u> 286.1 (51.5 ± 2.4) <u>C-NH</u> , <u>C-O</u> 287.6 (15.7 ± 1.5) <u>O-C-O</u> 288.9 (1.9 ± 0.1) <u>N-C=O</u>	399.3 (93.9 ± 2.1) NH <sub>2</sub> 401.5 (6.1 ± 2.1) NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>		531.5 (99.2 ± 0.1) C=O 532.5-533 (0.8 ± 0.1) <u>O-C</u>
CSAPiTi-pH 3	283.1 (0.4 ± 0.6) <sup>a</sup> 284.7 (27.3 ± 3.3) <u>C-H</u> , <u>C-C</u> 286.2 (52.8 ± 1.1) <u>C-NH</u> , <u>C-O</u> 287.7 (17.3 ± 2.5) <u>O-C-O</u> 288.9 (2.3 ± 0.2) <u>N-C=O</u>	399.3 (64.8 ± 8.2) NH <sub>2</sub> 401.5 (35.2 ± 8.2) NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>		531.5 (88.2 ± 2.8) C=O 532.5-533 (11.8 ± 2.8) <u>O-C</u>
CSAPiTi-pH 5	283.2 (0.7 ± 0.1) <sup>a</sup> 284.7 (36.9 ± 1.8) <u>C-H</u> , <u>C-C</u> 286.3 (47.5 ± 1.0) <u>C-NH</u> , <u>C-O</u> 287.8 (13.2 ± 0.6) <u>O-C-O</u> 288.9 (1.8 ± 0.0) <u>N-C=O</u>	399.3 (70.2 ± 6.3) NH <sub>2</sub> 401.5 (29.3 ± 6.3) NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>		531.5 (93.2 ± 4.0) C=O 532.5-533 (6.8 ± 4.0) <u>O-C</u>

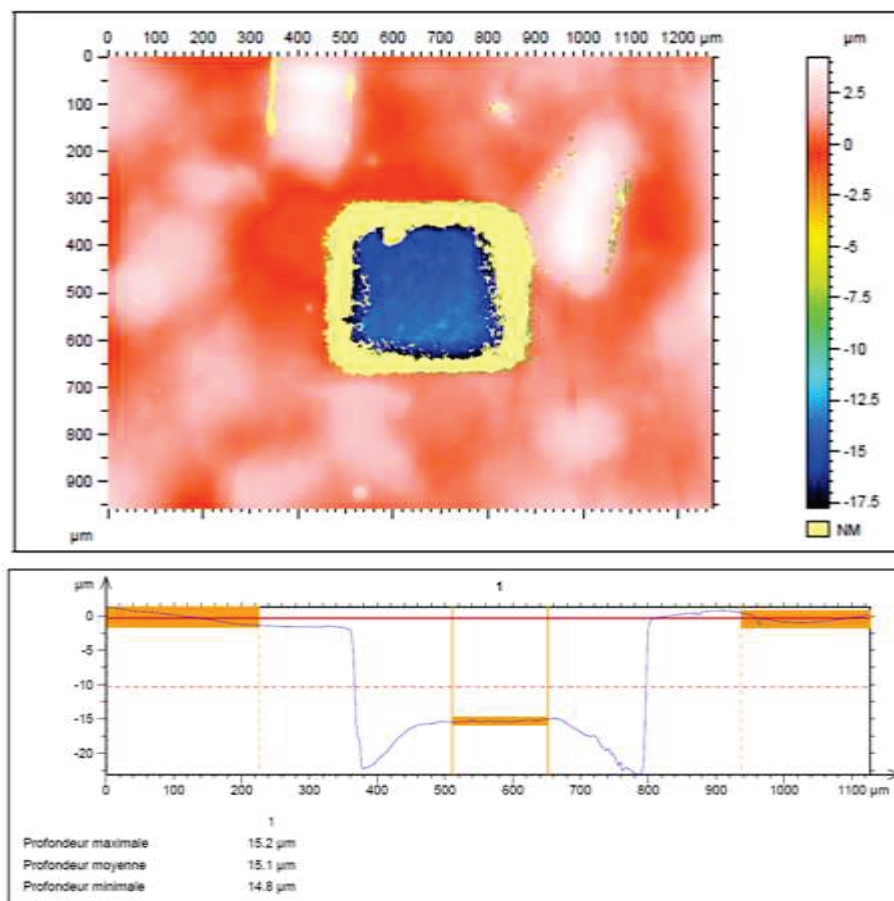
Surface contaminations.



**Fig. S1.** Average normalized intensity of positive and negative fragments of APTES + SA reaction in ethanol.



**Fig. S2.** 2D surface imaging of positive fragments of CSAPiTi (a), CSAPiTi – pH 5 (b), and CSAPiTi – pH 3 (c).



**Fig S3.** Measurement of chitosan deposit thickness by optical profilometry in the case of CSAPiTi sample.

## II. Résultats complémentaires de l'étude sur une surface polie

Cette partie complète les résultats détaillés dans la partie V.1.3.2 du chapitre II, concernant l'étude des revêtements chitosane *via* la voie A. L'imagerie ionique a été réalisée pour la série de revêtements polymère sur une surface polie avant et après immersion en milieu acide (Figure A- 5).

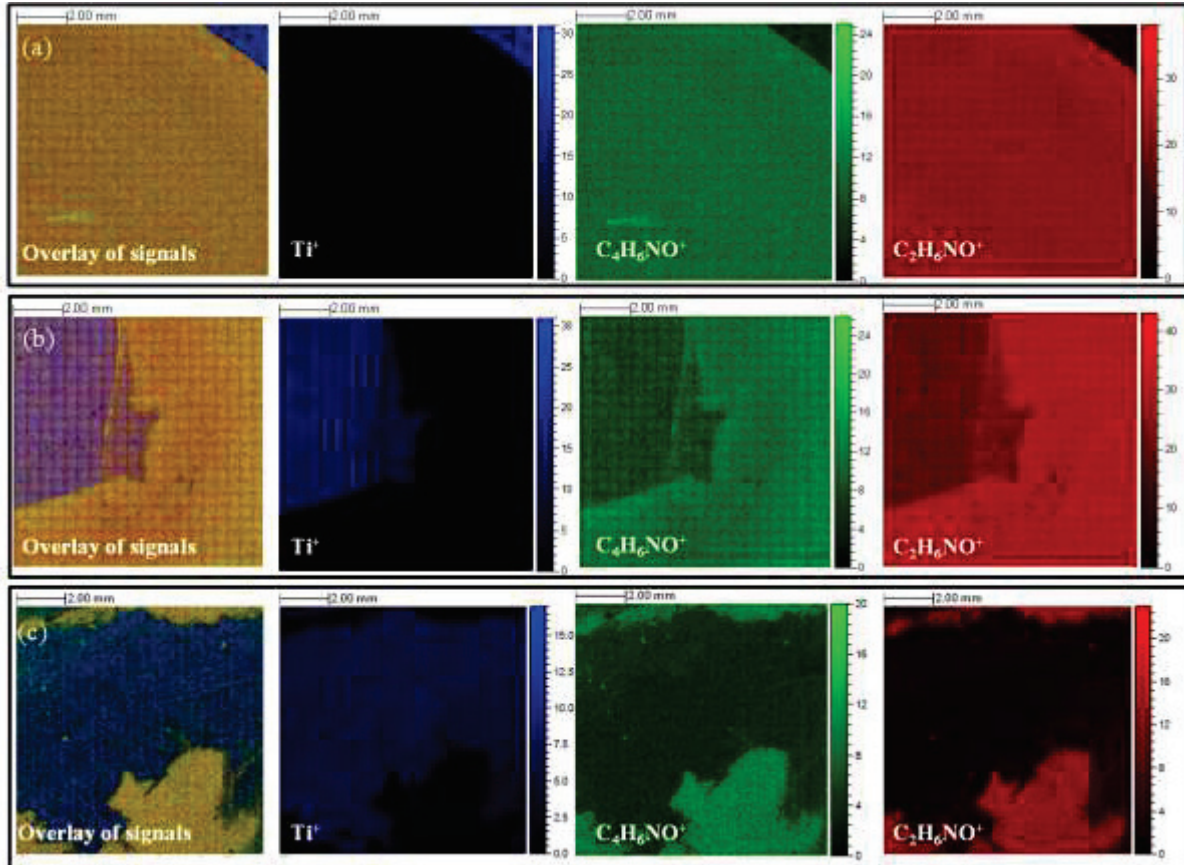


Figure A- 5 : Imagerie ionique des fragments positifs de  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ poli}$  (a),  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ poli - pH\ 5}$  (b) et  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ poli - pH\ 3}$  (c).

Après traitement en milieu acide à pH 3 et à pH 5, le dépôt du chitosane apparaît bien ici détérioré jusqu'au substrat.

### III. Etude de la voie de greffage A sur une surface anodisée

Plusieurs types de surfaces ont été employés afin d'étudier la voie de greffage A. Les résultats des échantillons anodisés,  $T_{A6V \text{ anod}}$ , sont présentés ici. L'ensemble des échantillons étudiés est résumé dans le Tableau A- 2.

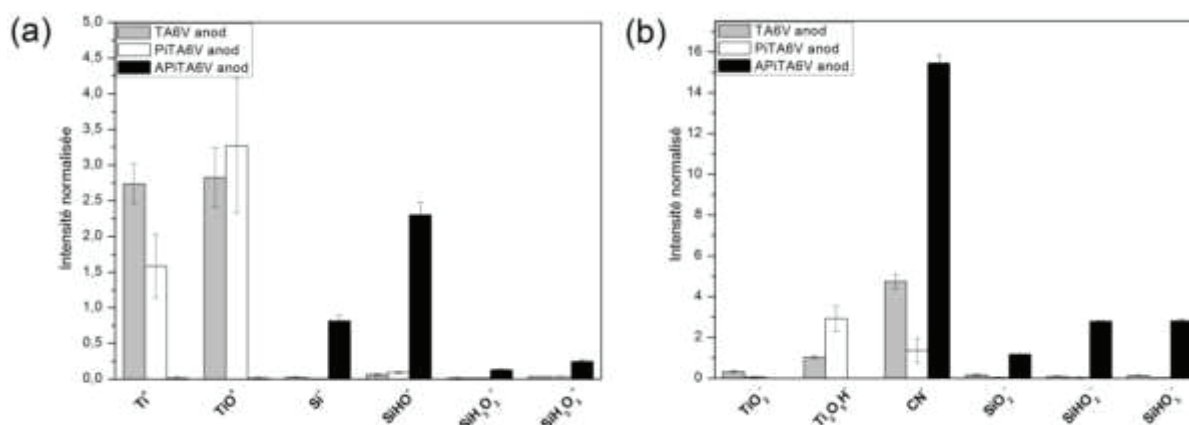
**Tableau A- 2 : Echantillons caractérisés au cours de cette étude.**

Substrats $T_{A6V \text{ anod}}$	Etape de la production du revêtement
$T_{A6V \text{ anod}}$	Surface initiale
$PiT_{A6V \text{ anod}}$	Traitement à l'eau piranha de la surface $T_{A6V \text{ anod}}$
$APiT_{A6V \text{ anod}}$	Dépôt de l'APTES sur la surface $PiT_{A6V \text{ anod}}$
$SAPiT_{A6V \text{ anod}}$	Réaction avec l'anhydride succinique sur la surface $APiT_{A6V \text{ anod}}$
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}}$	Dépôt du chitosane sur la surface greffée $SAPiT_{A6V \text{ anod}}$
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}}-pH \ 5$	Immersion du revêtement polymère à pH 5
$C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}}-pH \ 3$	Immersion du revêtement polymère à pH 3

#### III.1 Caractérisation des étapes de greffage

##### III.1.1 Contrôle du dépôt de silane sur les surfaces traitées

La Figure A- 6 donne les intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs relevés pour les échantillons  $T_{A6V \text{ anod}}$ ,  $PiT_{A6V \text{ anod}}$ ,  $APiT_{A6V \text{ anod}}$ .



**Figure A- 6: Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs de  $T_{A6V \text{ anod}}$ ,  $PiT_{A6V \text{ anod}}$ ,  $APiT_{A6V \text{ anod}}$  (a et b).**



Le substrat non traité  $T_{A6V \text{ anod}}$  est fortement contaminé en comparaison avec le substrat traité piranha. Suite au traitement piranha, une diminution significative des pics attribuables à une contamination de composés à base de polysiloxane est observée. Par ailleurs, l'augmentation du fragment  $Ti_2O_5H^-$  dans le cas de la surface anodisée est en accord avec une légère oxydation chimique de la surface et une présence des sites Ti-OH. Cependant lors des analyses, comme pour la surface polie, une hétérogénéité de surface a pu être mise en évidence, due à des zones plus ou moins oxydées.

L'étape de greffage du silane a été suivie sur l'échantillon par deux méthodes d'analyses ToF-SIMS, par spectroscopie de surface et imagerie de surface 2D (Figure A- 6 et Figure A- 7).

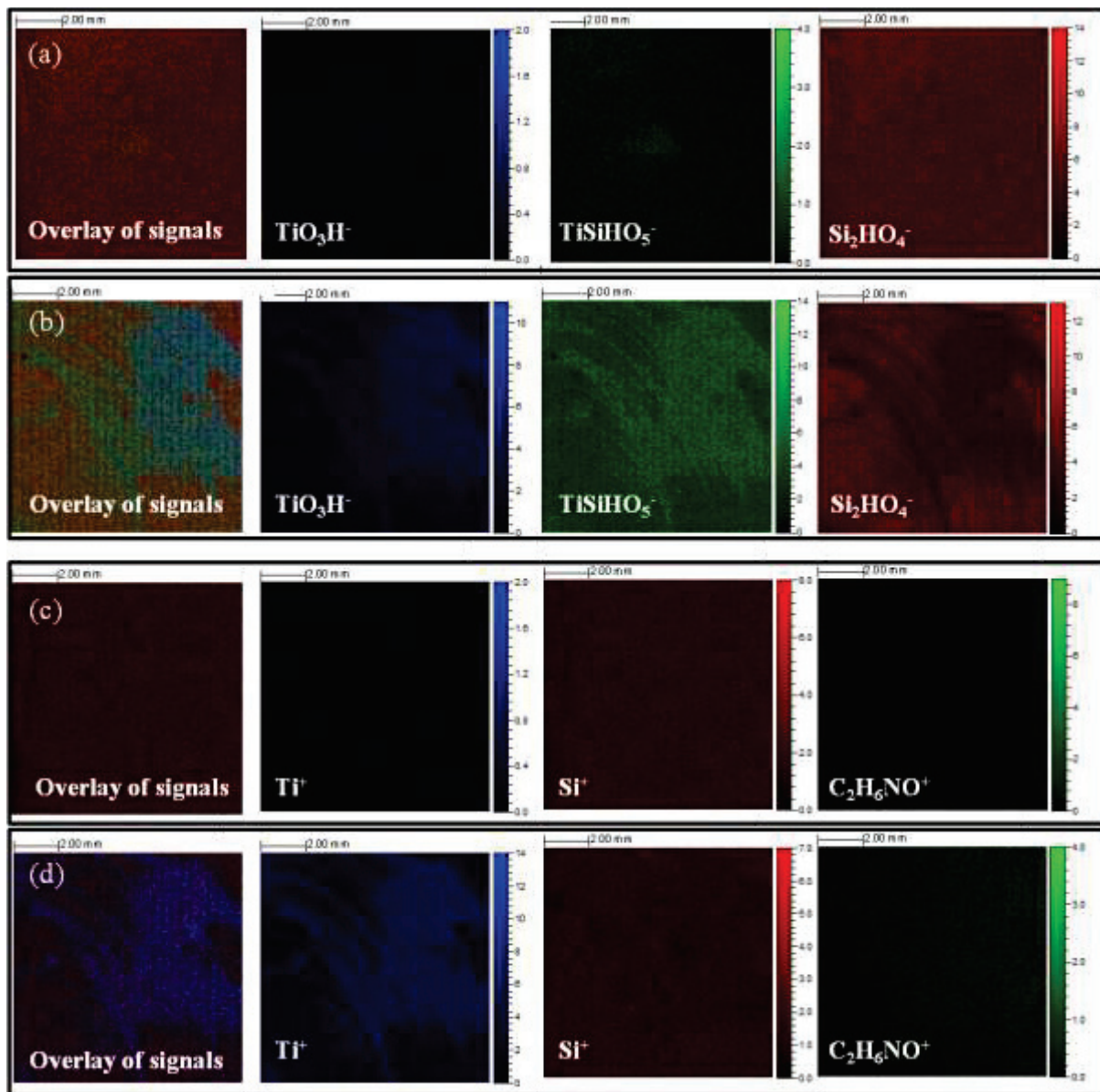


Figure A- 7 : Imagerie ionique des fragments positifs et négatifs de  $APiT_{A6V \text{ anod}}$  (a et c),  $SAPiT_{A6V \text{ anod}}$  (b et d).

Sur la surface anodisée, une augmentation significative des fragments caractéristiques de l'APTES a ainsi pu être mise en évidence. Les images 2D confirment également ce résultat, avec une

bonne homogénéité de la couche de silane observée (répartition homogène de l'ion  $\text{Si}^+$ ) (Figure A- 7 c).

### III.1.2 Contrôle de l'état de surface suite à la réaction avec le AS

Un changement significatif de la surface a été observé sur l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V anod}}$  par imagerie ionique (Figure A- 7). L'observation des ions  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$ ,  $\text{TiO}_3\text{H}^-$  et  $\text{Ti}^+$  sur l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V anod}}$  a clairement mis en évidence une réduction de l'épaisseur de la couche d'APTES greffée (Figure A- 7b-d). Celle-ci est néanmoins toujours détectée à la surface de l'échantillon. Au niveau des zones de réduction présentes sur les deux échantillons, le fragment  $\text{TiSiO}_5\text{H}^-$  est fortement détecté, signe d'une couche de silane très fine.

En parallèle, les fragments caractéristiques de la liaison amide entre l'APTES et AS ont clairement été détectés sur l'échantillon  $\text{SAPiT}_{\text{A6V anod}}$  (Figure A- 8). Après réaction avec le AS, on remarque une augmentation significative de ces fragments caractéristiques, ce qui confirme la réaction entre l'AS et l'APTES pour former une liaison amide en surface.

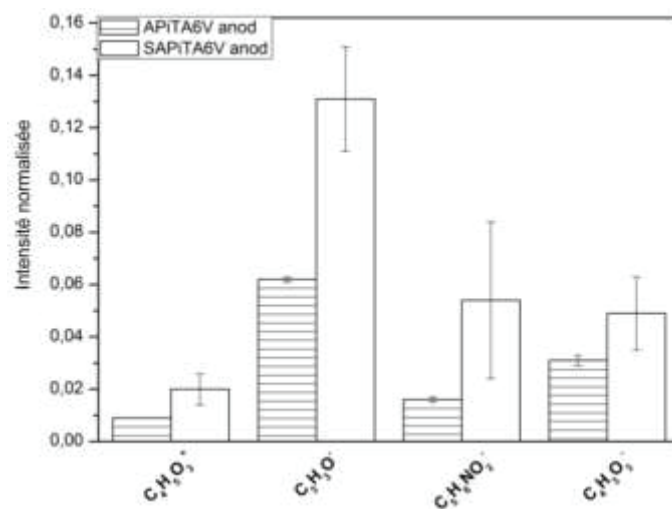


Figure A- 8 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs des échantillons  $\text{APiT}_{\text{A6V anod}}$  et  $\text{SAPiT}_{\text{A6V anod}}$ .



## III.2 Contrôle du revêtement polymère et résistance en milieu acide

### III.2.1 Suivi du revêtement chitosane par IR-ATR

L'analyse des revêtements par IR-ATR a permis de vérifier la présence du chitosane sur les échantillons avant et après traitement en milieu acide (Figure A- 9).

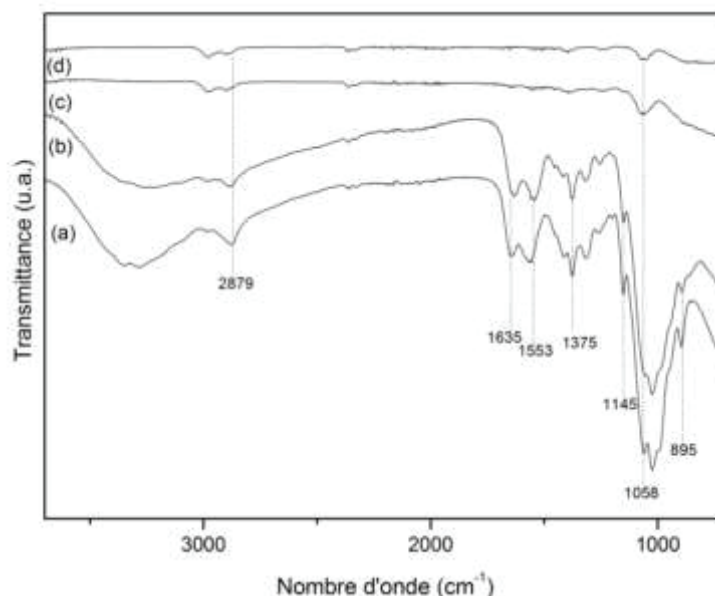


Figure A- 9 : Spectres infra-rouge enregistrés sur les échantillons  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod (a),  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod – pH 5 (b), et deux endroits différents de  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod – pH 3 (c et d).

Suite à l'immersion en milieu acide à pH 5, le chitosane est bien été détecté sur la surface. En revanche à pH 3, le chitosane est moins bien visible sur la totalité de la surface.

### III.2.2 Contrôle du dépôt CS par ToF-SIMS

Comme pour la surface polie, des analyses par ToF-SIMS en mode spectroscopie et imagerie ionique ont été effectuées sur les revêtements chitosane avant et après traitement acide (Figure A- 10 et Figure A- 11).

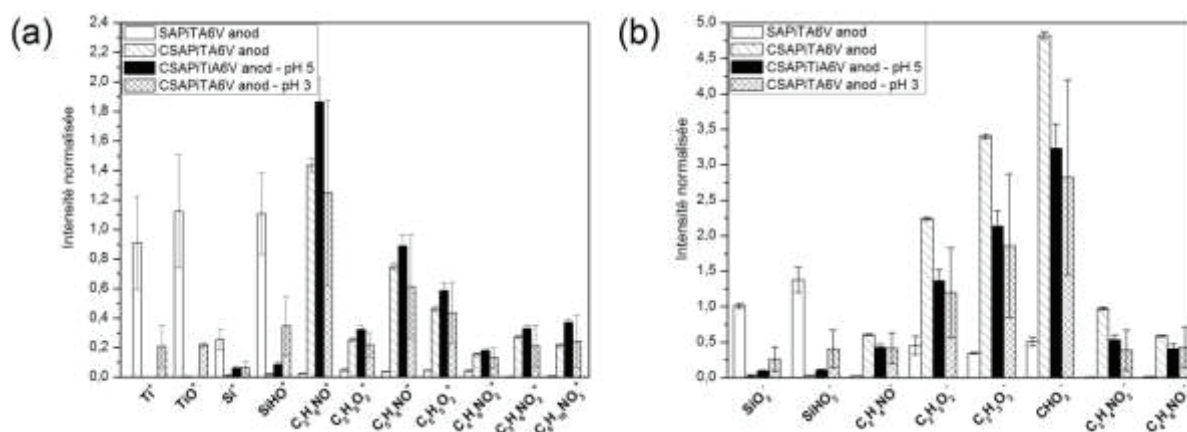


Figure A- 10 : Intensités normalisées moyennes des fragments positifs et négatifs de  $SAPiT_{A6V}$  anod,  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod,  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod – pH 5 et  $C_{sig}SAPiT_{A6V}$  anod – pH 3 (a et b).

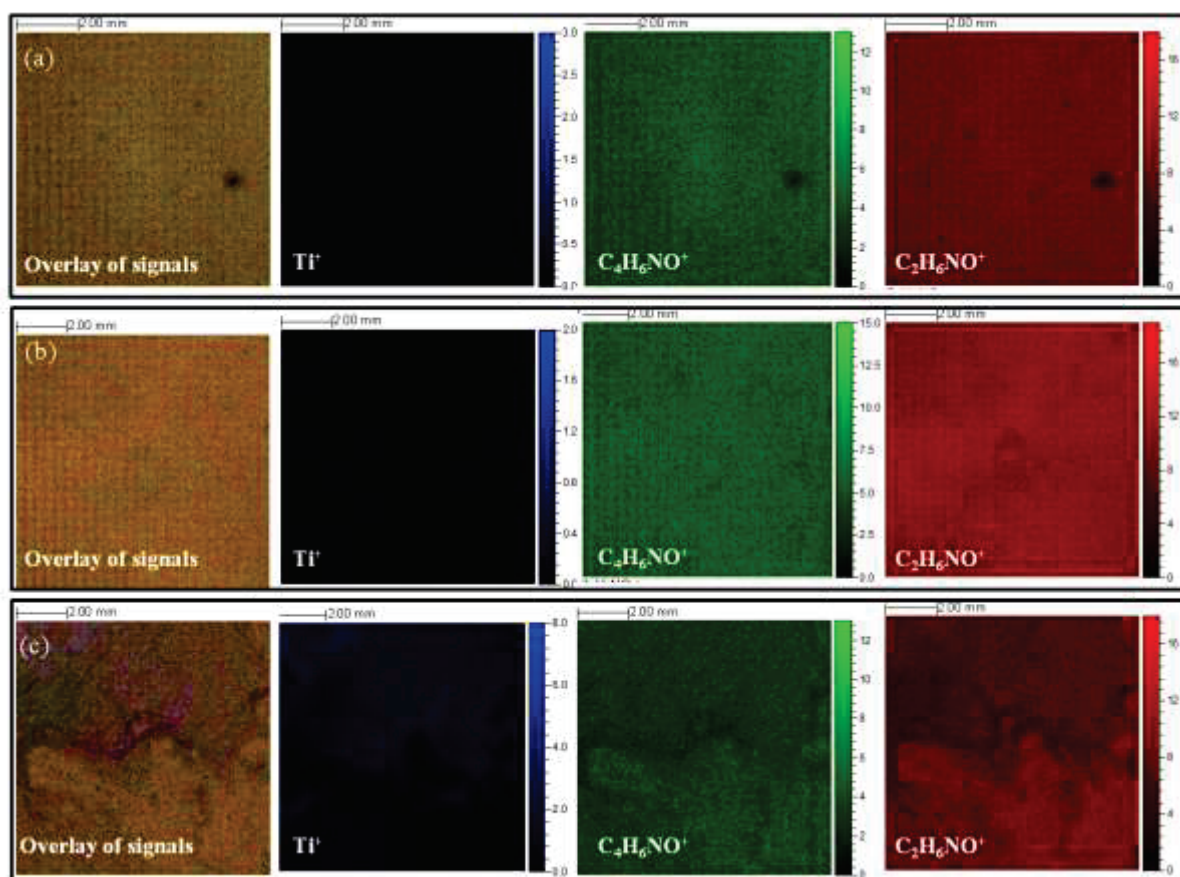


Figure A- 11 : Imagerie ionique des fragments positifs de  $C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}}$  (a),  $C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}} - pH 5$  (b) et  $C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}} - pH 3$  (c).

Le chitosane est détecté uniformément sur les échantillons  $C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}}$  et  $C_{sig}SAPiT_{A6V \text{ anod}} - pH 5$ . En revanche après traitement à pH 3, deux zones sur l'échantillon sont observées (écarts types importants pour certains fragments mesurés) : (i) une zone de détérioration du chitosane et (ii) une zone où le chitosane est toujours présent. L'imagerie ionique des échantillons avant et après immersion en milieu salivaire acide confirme ces observations.

### III.2.1 Etude de l'épaisseur des dépôts de CS par DSIMS

L'analyse en spectrométrie de masse en mode dynamique des revêtements avant et après traitement en milieu acide est présentée Figure A- 12.

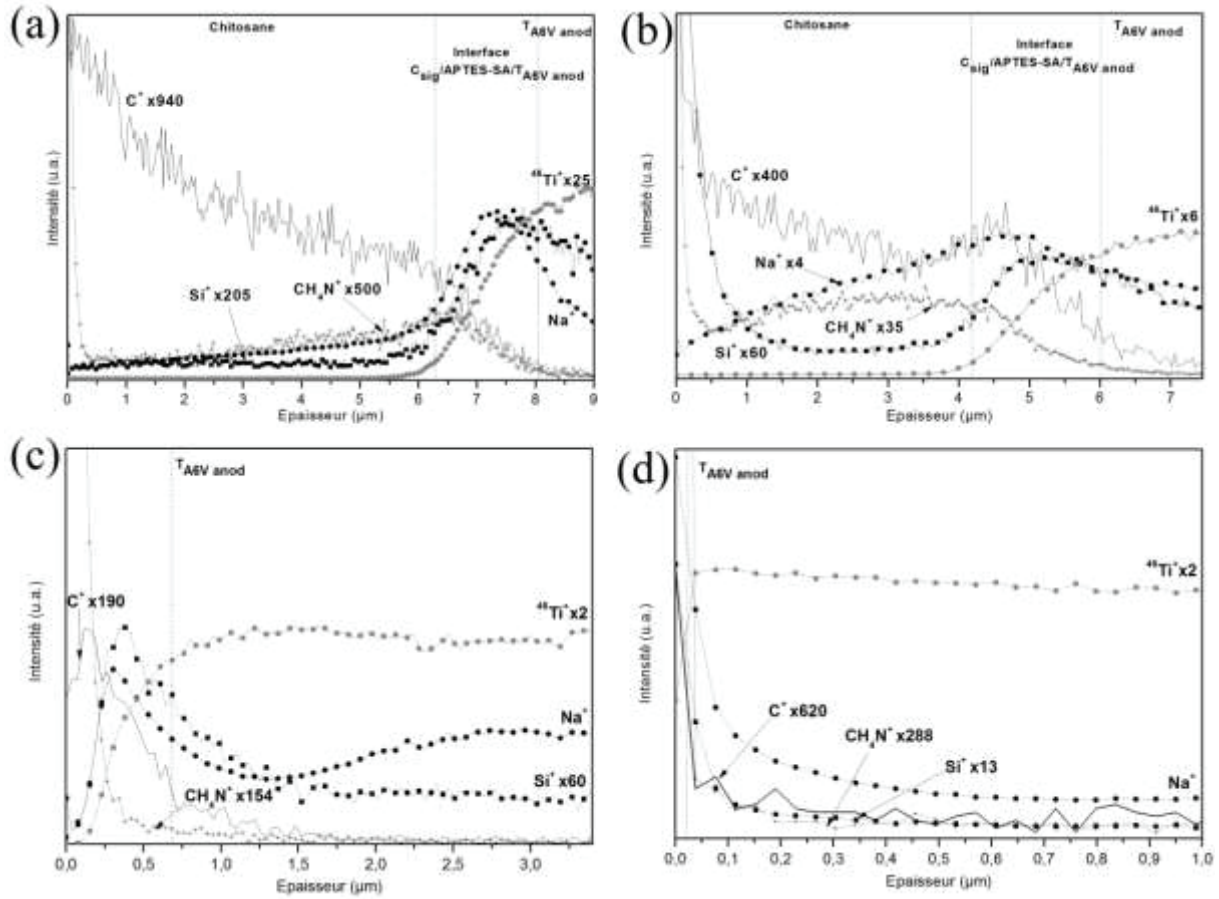


Figure A- 12 : Profils en profondeur par ToF-SIMS des fragments positifs mesurés sur  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ anod}$  (a),  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ anod} - pH\ 5$  (b), et deux endroits différents de  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ anod} - pH\ 3$  (c et d).

En ce qui concerne les échantillons  $T_{A6V\ anod}$ , l'échantillon  $C_{sig}SAPiT_{A6V\ anod}$  peut être divisé en trois zones comme pour les substrats Ti et  $T_{A6V\ poli}$ . De manière générale, les échantillons à base de  $T_{A6V\ anod}$  sont fortement contaminés par des éléments alcalins, aussi bien dans la couche organique, à l'interface et au niveau du substrat.

Après traitement en milieu acide pendant 24 h, l'épaisseur du revêtement chitosane diminue significativement pour les deux pH utilisés (Figure A- 12 b et c). Au niveau des zones de détérioration du chitosane dans le cas du traitement à pH 3, les ions  $C^+$ ,  $CH_4N^+$  et  $Si^+$  diminuent rapidement, signe d'une détérioration à la fois de la couche organique mais également de la couche de silane.

Tableau A- 3 : Evolution de l'épaisseur du revêtement CS sur  $T_{A6V \text{ anod}}$  avant et après immersion en milieu acide.

Epaisseur du revêtement ( $\mu\text{m}$ )		
$C_{\text{sig}}\text{SAPi}T_{A6V \text{ anod}}$	7,04*	
$C_{\text{sig}}\text{SAPi}T_{A6V \text{ anod}}-\text{pH } 5$	5,33*	
$C_{\text{sig}}\text{SAPi}T_{A6V \text{ anod}}-\text{pH } 3$	Mesure au point 1	Mesure au point 2
	0	1,39 $\mu\text{m}$

\* en raison de l'homogénéité des surfaces, une seule mesure d'épaisseur a été effectuée par DSIMS.

Une perte de chitosane de l'ordre de 2  $\mu\text{m}$  est observée après traitement à pH 5, ce qui est, à l'échelle de ce revêtement, relativement faible. Suite à l'immersion en milieu acide à pH 3, la dégradation est donc plus marquée dans le cas du revêtement chitosane sur la surface anodisée par rapport à la surface polie.

## IV. Voie de greffage TESPSA

### IV.1 Protocole sous air

#### IV.1.1 Etude sur une surface de titane pur (Ti)

La voie B basée sur l'emploi du TESPSA pour greffer de manière covalente le chitosane au substrat a été précédemment étudiée au laboratoire suivant le protocole "sous air". Cette étude a fait notamment l'objet d'une publication [25]. En résumé, il a été démontré une résistance en milieu acide du revêtement chitosane élaboré avec cet agent de couplage (IR-ATR) ainsi qu'une augmentation de l'adhérence du biopolymère (test d'adhérence par *peel-test*). Le mode opératoire de ce procédé est identique à celui sous air. Une analyse que nous avons choisi de ne pas insérer dans cette publication est l'analyse morphologique de la surface par MEB après traitement en milieu acide à pH 3 et pH 5 (Figure A- 13).

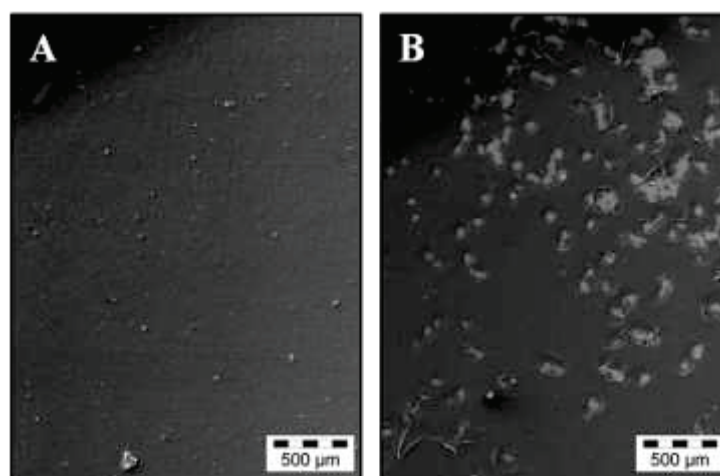


Figure A- 13 : Images MEB des échantillons  $C_{\text{sig}}\text{TPiTi-pH } 5$  (A) et  $C_{\text{sig}}\text{TPiTi-pH } 3$  (B).

Le chitosane est bien détecté sur les deux échantillons après traitement acide, avec, néanmoins, un décrochement partiel du dépôt de chitosane dans le cas de l'immersion dans une solution salivaire à pH 3.

#### IV.1.2 Etude de la voie B sur une surface anodisée

Le protocole "sous air" a également été employé pour revêtir les surfaces anodisées  $T_{A6V \text{ anod}}$ . Suite aux tests d'immersion en milieu acide à pH 5 et pH 3, une forte réduction de l'épaisseur du dépôt de chitosane a été observée. En effet, dans le cas du traitement à pH 5, le revêtement polymère reste globalement sur la surface mais de nombreux décrochements sont observés par endroit. Suite au traitement à pH 3, une grande partie du chitosane déposé s'est décrochée.

### IV.2 Protocole sous argon

Un nouveau protocole sous gaz inerte a été mis en place. Comme pour les autres procédés, un test en milieu acide (le plus drastique à pH 3) a été effectué afin de valider ce procédé. Les premières observations visuelles confirment le maintien du revêtement chitosane après immersion en milieu acide à pH 3. Celles-ci ont été confirmées par les mesures infra-rouge effectuées avant et après traitement en milieu acide (Figure A- 14 b).

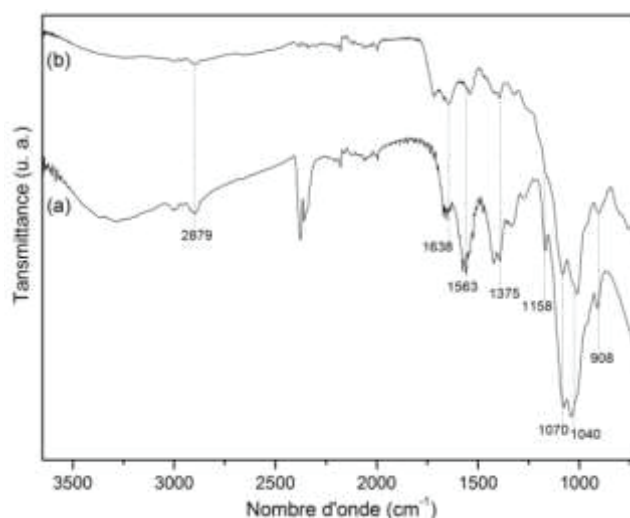


Figure A- 14 : Spectres infrarouge enregistrés sur les échantillons  $C_{sig}TPiT_{A6V \text{ anod}}$  (a),  $C_{sig}TPiT_{A6V \text{ anod}} - \text{pH } 3$  (b).



#### IV.2.1 Evaluation de l'épaisseur du CS par profilométrie optique

Les mesures de l'épaisseur du CS ont été réalisées par profilométrie optique à différents endroits de l'échantillon (Figure A- 15).

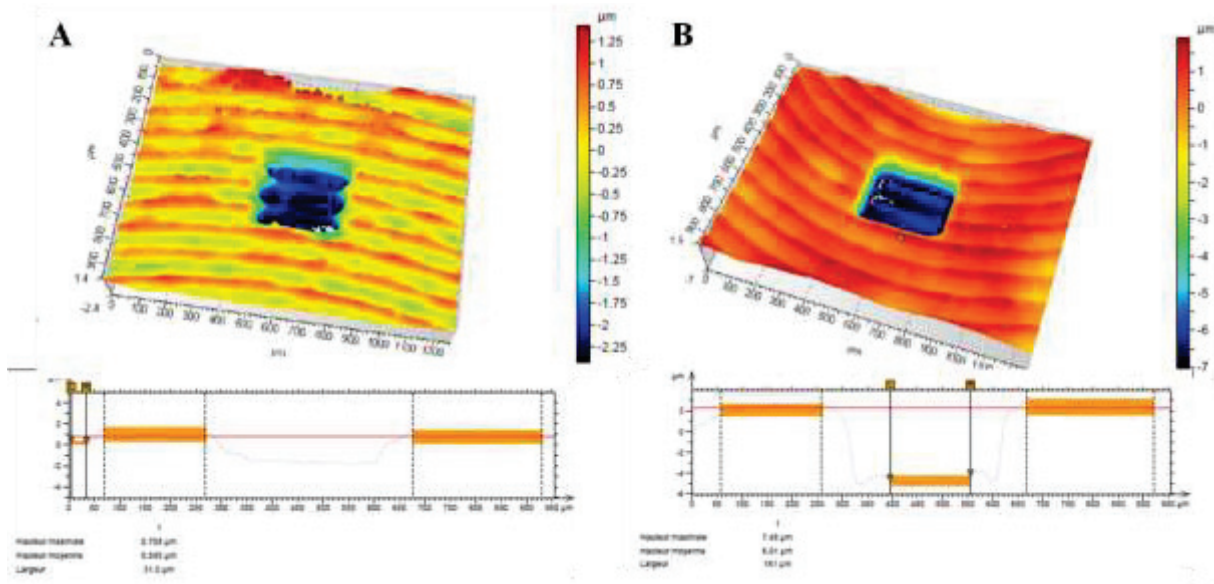


Figure A- 15 : Images 3D à deux endroits différents des échantillons revêtus CS.

Une épaisseur variable du chitosane a ainsi été mise en évidence.

#### IV.2.2 Caractérisations des étapes d'élaboration du revêtement

La déconvolution du signal relatif à l'élément carbone C1s a été réalisée sur des surfaces brillantées avant et après dépôt du silane TESPSA (Figure A- 16).

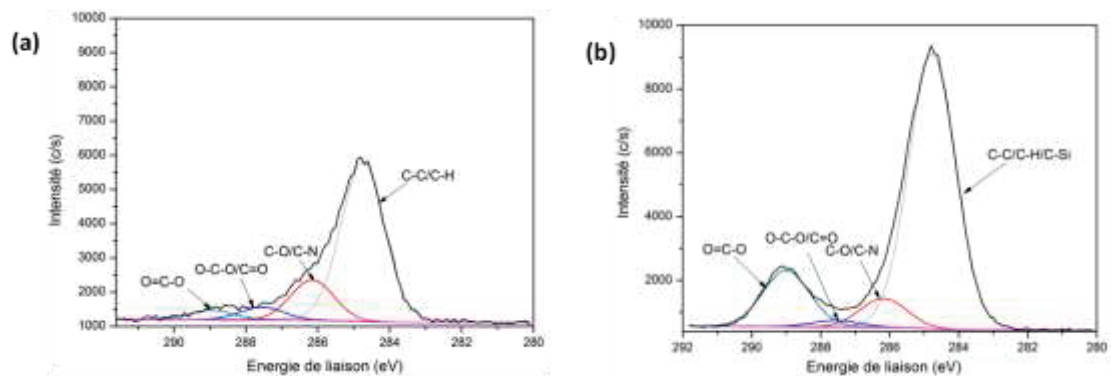
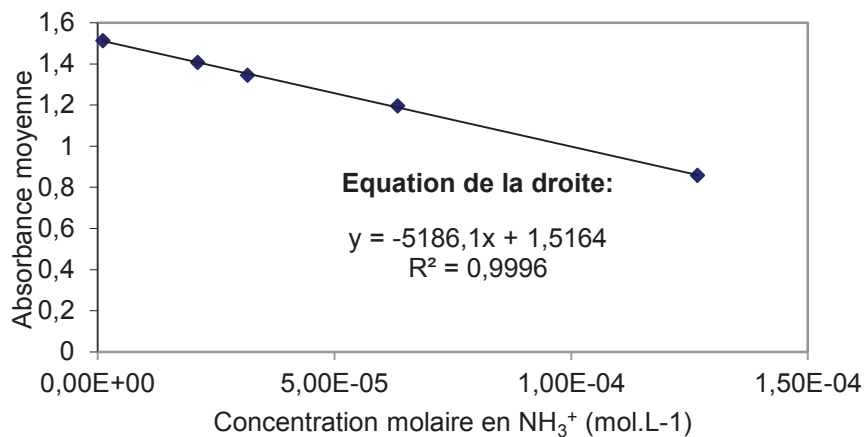


Figure A- 16 : Déconvolution du signal relatif à l'élément carbone C1s pour PiT<sub>A6V</sub> brill (a) et TPiT<sub>A6V</sub> brill (b).

## Annexe A6 : Protocole de restitution du CS en milieu acide

Avant le dosage du chitosane présent dans les solutions tampon, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions de chitosane à différentes concentrations (Figure A-17). Le chitosane (masse connue) ainsi que l'indicateur coloré "orange II" sont dissous dans une solution tampon composée de 0.15 M d'acétate d'ammonium et de 0.2 M d'acide acétique (pH = 4,5).



$$A_{485\text{nm}} = -5186.1 \times [\text{NH}_3^+] + 1.5164$$

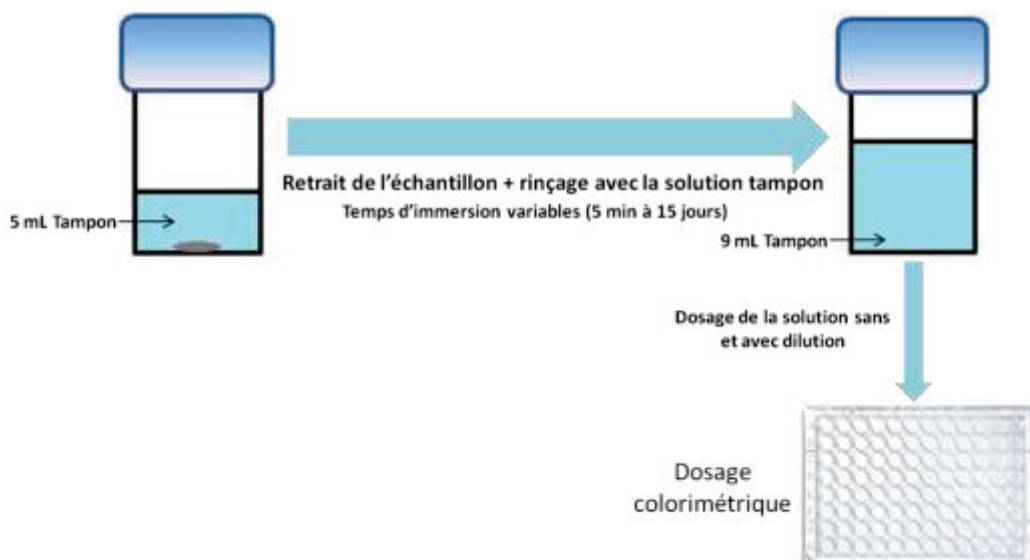
Figure A- 17 : Exemple de courbe d'étalonnage du chitosane (mesure de l'absorbance de la solution en fonction de la concentration en chitosane).

Cet étalonnage permet de retrouver la concentration en  $\text{NH}_3^+$  (et donc la masse de CS *in fine*) présent dans les solutions tampon.

*Remarque: le chitosane utilisé pour l'établissement de la droite étalon doit être de même masse molaire et de même DA que celui employé pour la mise au point des revêtements.*

Le protocole expérimental de l'immersion des échantillons chitosane (par greffage covalent ou par simple dépôt) peut être résumé par la Figure A- 18.





**Figure A- 18 : Schéma du mode opératoire des tests de restitution du chitosane en milieu tampon.**

Une pastille d'alliage de titane recouverte par le biopolymère est immergée dans une solution pendant un temps défini. La solution d'immersion est ensuite récupérée et dosée par colorimétrie. Pour cela, on prélève une quantité définie de solution de chitosane (variant en fonction de la dilution effectuée) que l'on ajoute dans un eppendorf avec 100  $\mu\text{L}$  d'orange II et un volume défini de solution tampon ( $V_{\text{total}} = 400 \mu\text{L}$ ). L'ensemble est agité pendant 5 min à 1400 rpm à 23°C, puis la solution est centrifugée à 13 200 rpm pendant 5 min afin de séparer de la solution le complexe chitosane-orange II formé. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  du surnageant est prélevé et déposé dans une plaque à 96 puits. L'absorbance du surnageant est mesurée à 485 nm avec un spectromètre UV/visible. Grâce à la courbe d'étalonnage précédemment établie, la concentration en  $\text{NH}_3^+$  présent dans les solutions tampon est calculée (et donc la masse de CS *in fine* via l'équation III-1 cf Chapitre III).

Pour une même solution de départ, deux eppendorfs sont préparés et à partir de chacun, trois puits de la plaque sont remplies ( $n = 6$ ).

*Remarque : En raison de la fenêtre restreinte de gamme de mesure (valeurs d'absorbance entre 0,8 et 1,4 correspondant à une concentration en chitosane entre  $1,1 \cdot 10^{-6}$  et  $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ), plusieurs dilutions des solutions contenant du chitosane seront parfois nécessaires.*

## Annexe A7 : Tests microbiologiques

### I. Tests antibactériens selon la norme ISO 22196

#### I.1 Protocole expérimental

L'évaluation de l'activité antibactérienne des revêtements à base de chitosane a été effectuée selon le protocole résumé à la Figure A- 19.

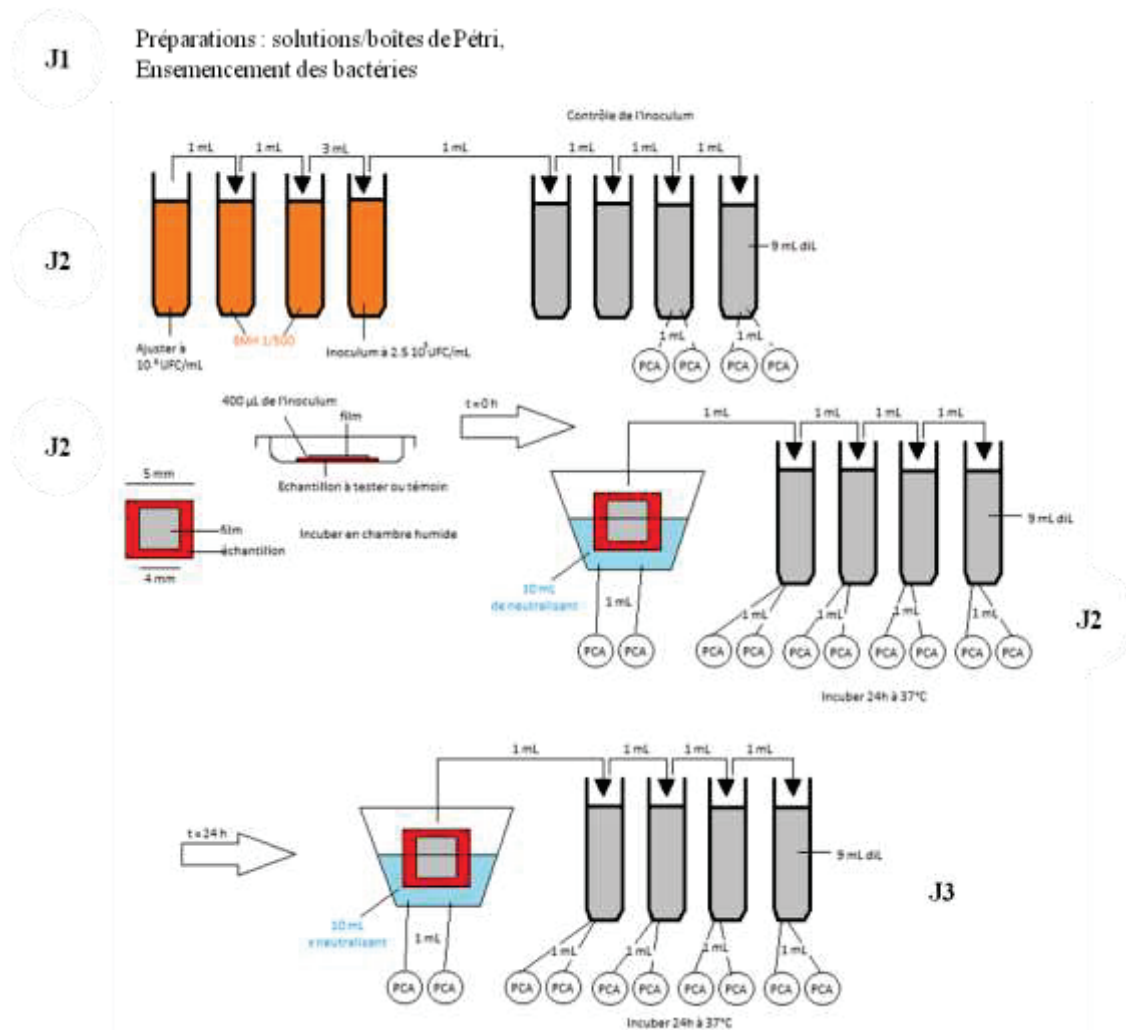


Figure A- 19 : Mode opératoire de l'évaluation de l'activité antibactérienne selon la norme ISO 22196 .

À **J1**, il est essentiel que l'ensemble des solutions ainsi que les boîtes de Pétri soient préparées (par souche bactérienne testée). La composition des solutions utilisées est:

- Plate Count Agar (PCA) : (pour un flacon) m = 11,75 g dans 500 mL d'eau permutée (14 flacons de 500 mL préparés pour deux expériences),
- Difco Maximum Recovery Diluent : (pour un flacon) m = 4,75 g dans 500 mL d'eau permutée (4 flacons de 500 mL préparés),

- BMH 1/500 : (pour un flacon) m = 0.02 g dans 400 mL d'eau permutée,
- Neutralisant (0.5% /L) : 5 mL de jaune d'œuf dans 1 L d'eau stérile.

En parallèle de ces préparations, les bactéries à tester sontensemencées sur gel de gélose 24 h avant le début de l'expérimentation (incubation 24 h à 37°C).

A **J2**, comme indiqué Figure A- 19, les 4 étapes suivantes sont réalisées:

- Préparation de l'inoculum : une solution contenant  $10^8$  UFC/mL de bactéries est préparée (mesure du McF par un turbidimètre, elle doit être comprise entre 1,5 et 1,6). Cette solution est ensuite diluée dans le BMH 1/500 pour obtenir l'inoculum à  $2,5 \cdot 10^5$  UFC/mL. La vérification de la quantité de bactéries présentes dans l'inoculum s'effectue par dilution et comptage sur milieu gélosé.
- Préparation des échantillons : les échantillons sont décontaminés par lavage à l'éthanol à 70%.
- Dépôt des bactéries à tester : 25 µL d'inoculum sont déposés sur les essais/témoins, puis l'ensemble est recouvert avec du parafilm. Les échantillons sont ensuite incubés 24 h à 37°C ou dénombrés après 1 min dans le cas d'un échantillon à  $t = 0$ .
- Dénombrement des témoins à  $t = 0$  : l'ensemble "échantillon + parafilm" est immergé dans la solution de neutralisant (10 mL). La quantité de bactérie présente en solution est ensuite vérifiée par dilution et dépôt sur milieu gélosé avant incubation 24 h à 37°C.

A **J3**:

- Comptage des colonies de bactéries : pour les échantillons à  $t = 0$  et pour le contrôle de l'inoculum.
- Dénombrement des échantillons à  $t = 24$  h : l'ensemble "échantillon + parafilm" est immergé dans la solution de neutralisant (10 mL). La quantité de bactérie présente en solution est ensuite vérifiée par dilution et dépôt sur milieu gélosé avant incubation 24 h à 37°C.

Chaque échantillon sera testé en triplicate ( $n = 3$ ) afin d'assurer la répétabilité des résultats.

## I.2 Fiche de réalisation d'essai via la technique ISO 22196

Pour chaque expérience, une fiche de réalisation d'essai doit être complétée en fonction des différents résultats obtenus suite au comptage des colonies de bactéries (Figure A- 20).

### Fiche de réalisation d'essai : technique = ISO 22196

Jour 1 : repiquage 1, date :

Souche bactérienne utilisée	
N° lot MH	

Jour 2 : inoculation des éprouvettes et numérotation à t = 0, date :

N° lot diluant	
N° lot BMH 1/500	
N° lot PCA	
N° lot neutralisant	
MCF	

Jour 3 : résultats à t=0, numérotation des éprouvettes à t = 24h, date :

N° lot diluant	
N° lot PCA	
N° lot neutralisant	
Contrôle suspension d'essai	
Témoin 1	
Témoin 2	
Témoin 3	
Essai 1	
Essai 2	
Essai 3	

Jour 4 : résultats à t = 24h, date :

N° lot diluant	
N° lot PCA	
N° lot neutralisant	
Témoin 1	
Témoin 2	
Témoin 3	
Essai 1	
Essai 2	
Essai 3	

Figure A- 20 : Exemple d'une fiche de réalisation d'essai à remplir.

### I.3 Méthode de calcul

L'ensemble des calculs effectués pour déterminer l'activité antibactérienne d'un échantillon selon la norme ISO 22196 est résumé dans le Tableau A- 4.

**Tableau A- 4 : Tableau des calculs à effectuer pour calculer l'activité antibactérienne selon la norme ISO 22196.**

		UFC/cm <sup>2</sup>	Log	Moyenne (UFC/cm <sup>2</sup> )	Moyenne (Log)	Activité antibactérienne
Inoculum		I	logI			
Témoin à temps 0	1	X <sub>1</sub>	logX <sub>1</sub>	(X <sub>1</sub> + X <sub>2</sub> + X <sub>3</sub> ) / 3		
	2	X <sub>2</sub>	log X <sub>1</sub>			
	3	X <sub>3</sub>	logX <sub>3</sub>			
Témoin à temps 24 h	1	X24 <sub>1</sub>	logX24 <sub>1</sub>	(X24 <sub>1</sub> + X24 <sub>2</sub> + X24 <sub>3</sub> ) / 3	C	
	2	X24 <sub>2</sub>	logX24 <sub>2</sub>			
	3	X24 <sub>3</sub>	logX24 <sub>3</sub>			
Essai 1 à temps 24 h	1	Y24 <sub>1</sub>	logY24 <sub>1</sub>	(Y24 <sub>1</sub> + Y24 <sub>2</sub> + Y24 <sub>3</sub> ) / 3	E <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> = C - E <sub>1</sub>
	2	Y24 <sub>2</sub>	logY24 <sub>2</sub>			
	3	Y24 <sub>3</sub>	logY24 <sub>3</sub>			
Essai 2 à temps 24 h	1	Z24 <sub>1</sub>	logZ24 <sub>1</sub>	(Z24 <sub>1</sub> + Z24 <sub>2</sub> + Z24 <sub>3</sub> ) / 3	E <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> = C - E <sub>2</sub>
	2	Z24 <sub>2</sub>	logZ24 <sub>2</sub>			
	3	Z24 <sub>3</sub>	logZ24 <sub>3</sub>			

Avec les règles suivantes :

Si A < 1 essai inactif.

Si A ≥ 1 activité antibactérienne de l'essai.

Si Z/Y à 24h ou Z/Y au temps 0 = 0 UFC alors l'essai est bactéricide.

## II. Activité antibactérienne selon la norme ISO 20743

### II.1 Méthode de calcul

Comme précisé dans le chapitre IV, le protocole expérimental appliqué lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne est celui de la norme ISO 22196 : 2007. L'ensemble des échantillons à tester et les calculs à effectuer, pour déterminer l'activité antibactérienne d'un échantillon selon la norme ISO 220743, sont résumés dans le Tableau A- 5.

**Tableau A- 5 : Tableau des calculs à effectuer pour calculer l'activité antibactérienne selon la norme ISO 20743.**

		UFC/cm <sup>2</sup>	Log	Moyenne (UFC/cm <sup>2</sup> )	Moyenne (Log)	Croissance bactérienne	Activité antibactérienne
Inoculum		I	logI				
Témoin à temps 0	1	X <sub>1</sub>	logX <sub>1</sub>	(X <sub>1</sub> + X <sub>2</sub> + X <sub>3</sub> ) / 3	Y <sub>0</sub>	Y <sub>24</sub> - Y <sub>0</sub> = C	A = C - B
	2	X <sub>2</sub>	log X <sub>1</sub>				
	3	X <sub>3</sub>	logX <sub>3</sub>				
Témoin à temps 24 h	1	X24 <sub>1</sub>	logX24 <sub>1</sub>	(X24 <sub>1</sub> + X24 <sub>2</sub> + X24 <sub>3</sub> ) / 3	Y <sub>24</sub>		
	2	X24 <sub>2</sub>	logX24 <sub>2</sub>				
	3	X24 <sub>3</sub>	logX24 <sub>3</sub>				
Essai à temps 0	1	Z <sub>1</sub>	logZ <sub>1</sub>	(Z <sub>1</sub> + Z <sub>2</sub> + Z <sub>3</sub> ) / 3	W <sub>0</sub>	W <sub>24</sub> - W <sub>0</sub> = B	
	2	Z <sub>2</sub>	logZ <sub>2</sub>				
	3	Z <sub>3</sub>	logZ <sub>3</sub>				
Essai à temps 24 h	1	Z24 <sub>1</sub>	logZ24 <sub>1</sub>	(Z24 <sub>1</sub> + Z24 <sub>2</sub> + Z24 <sub>3</sub> ) / 3	W <sub>24</sub>		
	2	Z24 <sub>2</sub>	logZ24 <sub>2</sub>				
	3	Z24 <sub>3</sub>	logZ24 <sub>3</sub>				

Si A < 1 essai inactif.

Si A > ou égale 1 activité antibactérienne de l'essai.

Si Z à 24h ou Z au temps 0 = 0 UFC alors l'essai est bactéricide.





## Annexe A8 : Cytocompatibilité des revêtements de CS

Pour évaluer la cytocompatibilité des revêtements de chitosane stérilisés, nous avons utilisé le marquage Live/Dead®. Ce marquage est disponible sous forme de kit chez Molecular Porbes. Du fait de la sensibilité de ce produit, des précautions particulières doivent être prises lors de son stockage (à - 20 °C dans l'obscurité) et de sa manipulation. L'ensemble du protocole expérimental peut être divisé en deux parties :

### Préparation de la solution Live/Dead®:

- Les solutions sont décongelées à température ambiante,
- 20 µL de la solution EthD-1 à 2 mM (composant B) sont ajoutés dans 10 mL de PBS → obtention d'une solution EthD-1 à 4 µM ,
- 5 µL de solution de calcéine AM à 4 mM (composant A) sont ajoutés dans les 10 mL de EthD-1 (4 µM),
- La solution Live/Dead® est conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

*Remarque : comme la solution aqueuse de calcéine AM est sensible à l'hydrolyse, il est impératif de la préparer le jour même.*

### Utilisation du Live/Dead® sur culture cellulaire :

- Sur une plaque 12 puits, le milieu de culture est retiré et les puits sont rincés avec du PBS 1X,
- La solution Live/Dead® est ajoutée sur la culture cellulaire et celle-ci est incubée 15 min à l'abri de la lumière (au maximum),
- La solution de marquage est retirée et les puits sont rincés avec une solution PBS 1X,
- Les échantillons sont déposés sur lame de verre en solution avec du PBS 1X et observés au microscope à fluorescence.

## Références

1. Schatz C, Viton C, Delair T, Pichot C, Domard A: **Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution**. *Biomacromolecules* 2003, **4**(3):641-648.
2. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW: **How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view**. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013, **65**(4):581-603.
3. Mishnaevsky Jr L, Levashov E, Valiev RZ, Segurado J, Sabirov I, Enikeev N, Prokoshkin S, Solov'yov AV, Korotitskiy A, Gutmanas E *et al*: **Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development**. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2014, **81**(0):1-19.
4. Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK: **Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review**. *Progress in Materials Science* 2009, **54**(3):397-425.
5. Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ: **A review of dental implants and infection**. *J Hosp Infect* 2009, **72**(2):104-110.
6. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH: **Biofilm on dental implants: a review of the literature**. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009, **24**(4):616-626.
7. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T: **The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects**. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2012, **14**(2):170-183.
8. Klinge B, Hultin M, T B: **Peri-implantitis**. *Dent Clin North Am* 2005, **49**(3):661-676.
9. Pelaez-Vargas A, Gallego-Perez D, Magallanes-Perdomo M, Fernandes MH, Hansford DJ, De Aza AH, Pena P, Monteiro FJ: **Isotropic micropatterned silica coatings on zirconia induce guided cell growth for dental implants**. *Dental Materials* 2011, **27**(6):581-589.
10. Hanawa T: **Biofunctionalization of titanium for dental implant**. *Japanese Dental Science Review* 2010, **46**(2):93-101.
11. Michiardi A, Helary G, Nguyen PC, Gamble LJ, Anagnostou F, Castner DG, Migonney V: **Bioactive polymer grafting onto titanium alloy surfaces**. *Acta Biomater* 2010, **6**(2):667-675.
12. Tejero R, Anitua E, Orive G: **Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration**. *Progress in Polymer Science* 2014, **39**(7):1406-1447.
13. Jin C, Ren L-f, Ding H-z, Shi G-s, Lin H-s, Zhang F: **Enhanced attachment, proliferation, and differentiation of human gingival fibroblasts on titanium surface modified with biomolecules**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012, **100B**(8):2167-2177.
14. Ao H, Xie Y, Tan H, Wu X, Liu G, Qin A, Zheng X, Tang T: **Improved hMSC functions on titanium coatings by type I collagen immobilization**. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014, **102**(1):204-214.
15. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: **Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications**. *Progress in Polymer Science* 2011, **36**(8):981-1014.
16. Ikinici G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, Hincal AA: **Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis**. *Int J Pharm* 2002, **235**(1-2):121-127.
17. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ: **Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review**. *Int J Food Microbiol* 2010, **144**(1):51-63.
18. Rinaudo M: **Chitin and chitosan: Properties and applications**. *Progress in Polymer Science* 2006, **31**(7):603-632.
19. Vázquez J, Rodríguez-Amado I, Montemayor M, Fraguas J, González M, Murado M: **Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review**. *Marine Drugs* 2013, **11**(3):747-774.
20. Wang Z, Zhang X, Gu J, Yang H, Nie J, Ma G: **Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates**. *Carbohydrate Polymers* 2014, **103**(0):38-45.

21. Marie H, Barrere A, Schoenstein F, Chavanne MH, Grosogeat B, Mora L: **PEM anchorage on titanium using catechol grafting**. *PLoS One* 2012, **7**(11):30.
22. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W: **Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide**. *J Biomed Mater Res A* 2008, **86**(4):865-872.
23. Martin HJ, Schulz KH, Bumgardner JD, Walters KB: **An XPS study on the attachment of triethoxysilylbutyraldehyde to two titanium surfaces as a way to bond chitosan**. *Applied Surface Science* 2008, **254**(15):4599-4605.
24. Renoud P, Toury B, Benayoun S, Attik G, Grosogeat B: **Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances**. *PLoS One* 2012, **7**(7):31.
25. Campos D, Toury B, D'Almeida M, Attik G, Ferrand A, Renoud P, Grosogeat B: **Acidic pH resistance of grafted chitosan on dental implant**. *Odontology* 2014:1-8.
26. Martin HJ, Schulz KH, Bumgardner JD, Walters KB: **XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface**. *Langmuir* 2007, **23**(12):6645-6651.
27. Xu X, Wang L, Guo S, Lei L, Tang T: **Surface chemical study on the covalent attachment of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan to titanium surfaces**. *Applied Surface Science* 2011, **257**(24):10520-10528.
28. Gunda NSK, Singh M, Norman L, Kaur K, Mitra SK: **Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker**. *Applied Surface Science* 2014, **305**(0):522-530.
29. Ma Z, Mao Z, Gao C: **Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering**. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007, **60**(2):137-157.
30. Héquet A, Humblot V, Berjeaud J-M, Pradier C-M: **Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011, **84**(2):301-309.
31. Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D, Masters J, Sullivan R, Composto RJ: **Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion**. *J Colloid Interface Sci* 2012, **385**(1):235-243.
32. Toury B, Grosogeat B, Renoud P, Desroches C: **Substrate on which chitosan or collagen is grafted via a covalent bond**. In: *PCT process in press Fev 2013*. vol. French patent FR1250689. France: Inventors (2013) UCBL CNRS; Jan. 2012.
33. Kari F: **NTP technical report on the toxicity studies of Glutaraldehyde (CAS No. 111-30-8) Adminstered by Inhalation to F344/N Rats and B6C3F1 Mice**. *Toxic Rep Ser* 1993, **25**:1-E10.
34. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD: **Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules**. *J Biomed Mater Res* 1998, **40**(2):324-335.
35. Schiff N, Grosogeat B, Lissac M, Dalard F: **Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys**. *Biomaterials* 2002, **23**(9):1995-2002.
36. Zorn G, Baio JE, Weidner T, Migonney V, Castner DG: **Characterization of Poly(sodium styrene sulfonate) Thin Films Grafted from Functionalized Titanium Surfaces**. *Langmuir* 2011, **27**(21):13104-13112.
37. Moulder JF, Stickle WF, Sobol PE, Bomben KD: **Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy**, vol. 40; 1992.
38. Boulmer-Leborgne C, Hermann J, Dubreuil B, Brault P, DeGiorgi ML, Leggieri G, Luches A, Martino M, Perrone A, Mihailescu IN *et al*: **Direct carbidation of titanium as a result of multipulse UV-laser irradiation of titanium samples in an ambient methane gas**. *Applied Surface Science* 1992, **54**(0):349-352.
39. Xin Z, Hou J, Ding J, Yang Z, Yan S, Liu C: **Surface functionalization of polyethylene via covalent immobilization of O-stearoyl-chitosan**. *Applied Surface Science* 2013, **279**(0):424-431.

40. Tsiourvas D, Tsetsekou A, Arkas M, Diplas S, Mastrogianni E: **Covalent attachment of a bioactive hyperbranched polymeric layer to titanium surface for the biomimetic growth of calcium phosphates.** *J Mater Sci: Mater Med* 2011, **22**(1):85-96.
41. Tan G, Zhang L, Ning C, Liu X, Liao J: **Preparation and characterization of APTES films on modification titanium by SAMs.** *Thin Solid Films* 2011, **519**(15):4997-5001.
42. Song Y-Y, Hildebrand H, Schmuki P: **Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO<sub>2</sub>.** *Surface Science* 2010, **604**(3-4):346-353.
43. Bahadur NM, Furusawa T, Sato M, Kurayama F, Siddiquey IA, Suzuki N: **Fast and facile synthesis of silica coated silver nanoparticles by microwave irradiation.** *J Colloid Interface Sci* 2011, **355**(2):312-320.
44. Prestidge CA, Barnes TJ, Skinner W: **Time-of-flight secondary-ion mass spectrometry for the surface characterization of solid-state pharmaceuticals.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007, **59**(2):251-259.
45. Dubruel P, Vanderleyden E, Bergadà M, De Paepe I, Chen H, Kuypers S, Luyten J, Schrooten J, Van Hoorebeke L, Schacht E: **Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces.** *Surface Science* 2006, **600**(12):2562-2571.
46. Al-Qadi S, Grenha A, Remuñán-López C: **Microspheres loaded with polysaccharide nanoparticles for pulmonary delivery: Preparation, structure and surface analysis.** *Carbohydrate Polymers* 2011, **86**(1):25-34.
47. Abel M-L, Watts JF: **Influence of Temperature on Aminosilane Thin Films Deposited on Aluminium Substrates: A Study by Surface Analysis.** *The Journal of Adhesion* 2008, **84**(10):847-871.
48. Zhang F, Sautter K, Larsen AM, Findley DA, Davis RC, Samha H, Linford MR: **Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon Dioxide: Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption.** *Langmuir* 2010, **26**(18):14648-14654.
49. Niu Y, Jin G: **Surface modification methods to improve behavior of biosensor based on imaging ellipsometry.** *Applied Surface Science* 2013, **281**(0):84-88.
50. Kwak K-A, Kim Y-H, Kim M, Lee B-T, Song H-Y: **Bio-functionalization of polycaprolactone infiltrated BCP scaffold with silicon and fibronectin enhances osteoblast activity in vitro.** *Applied Surface Science* 2013, **279**(0):13-22.
51. Wu L, Xu Y, Cai L, Zang X, Li Z: **Synthesis of a novel multi N-halamines siloxane precursor and its antimicrobial activity on cotton.** *Applied Surface Science* 2014(0).
52. Zemljič LF, Tkavc T, Vesel A, Šaupperl O: **Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material.** *Applied Surface Science* 2013, **265**(0):697-703.
53. Kara F, Aksoy EA, Yuksekdog Z, Hasirci N, Aksoy S: **Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties.** *Carbohydrate Polymers* 2014, **112**(0):39-47.
54. Vieira RS, Oliveira MLM, Guibal E, Rodríguez-Castellón E, Beppu MM: **Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: An XPS investigation of mechanism.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2011, **374**(1-3):108-114.
55. Gadenne V, Lebrun L, Jouenne T, Thebault P: **Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013, **112**:229-236.
56. Li G, Zhang L, Wang C, Zhao X, Zhu C, Zheng Y, Wang Y, Zhao Y, Yang Y: **Effect of silanization on chitosan porous scaffolds for peripheral nerve regeneration.** *Carbohydrate Polymers* 2014, **101**(0):718-726.
57. Aiping Z, Tian C, Lanhua Y, Hao W, Ping L: **Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres.** *Carbohydrate Polymers* 2006, **66**(2):274-279.

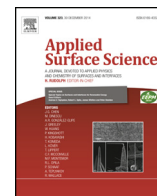
58. Kurmirska J, Czerwicka M, Kaczynski Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, Stepnowski P: **Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan.** *Marine Drugs* 2010, **8** 1567-1636.
59. Dohan Ehrenfest DM, Vazquez L, Park YJ, Sammartino G, Bernard JP: **Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 14 dental implant surfaces.** *J Oral Implantol* 2011, **37**(5):525-542.
60. Zanna S, Saulou C, Mercier-Bonin M, Despax B, Raynaud P, Seyeux A, Marcus P: **Ageing of plasma-mediated coatings with embedded silver nanoparticles on stainless steel: An XPS and ToF-SIMS investigation.** *Applied Surface Science* 2010, **256**(22):6499-6505.





Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apsusc](http://www.elsevier.com/locate/apsusc)

# Relevant insight of surface characterization techniques to study covalent grafting of a biopolymer to titanium implant and its acidic resistance



Mélanie D'Almeida<sup>a</sup>, Julien Amalric<sup>b</sup>, Céline Brunon<sup>b</sup>, Brigitte Grosogeat<sup>a,c,d</sup>,  
Bérangère Toury<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (UMR CNRS 5615), Université Lyon 1, Villeurbanne, France

<sup>b</sup> Science et Surface, Ecully, France

<sup>c</sup> UFR d'Odontologie, Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>d</sup> Service de Traitements et de Consultations Dentaires, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 September 2014

Received in revised form

27 November 2014

Accepted 28 November 2014

Available online 5 December 2014

### Keywords:

Chitosan

Titanium

Surface characterization

Chemical resistance.

## ABSTRACT

Peri-implant bacterial infections are the main cause of complications in dentistry. Our group has previously proposed the attachment of chitosan on titanium implants via a covalent bond to improve its antibacterial properties while maintaining its biocompatibility. A better knowledge of the coating preparation process allows a better understanding of the bioactive coating in biological conditions. In this work, several relevant characterization techniques were used to assess an implant device during its production phase and its resistance in natural media at different pH. The titanium surface was functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) followed by grafting of an organic coupling agent; succinic anhydride, able to form two covalent links, with the substrate through a Ti-O-Si bond and the biopolymer through a peptide bond. Each step of the coating synthesis as well as the presence confirmation of the biopolymer on titanium after saliva immersion was followed by FTIR-ATR, SEM, EDS, 3D profilometry, XPS and ToF-SIMS analyses. Results allowed to highlight the efficiency of each step of the process, and to propose a mechanism occurring during the chitosan coating degradation in saliva media at pH 5 and at pH 3.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Synthesis and improvement of biomaterials are challenging goals to increase performances of implantology cares [1]. Among usual biomaterials, metallic implants based on titanium and its alloys are preferred, essentially because of their biocompatibility, high corrosion resistance and suitable mechanical properties [2,3]. However, titanium implants present a main weakness linked to its inability to avoid establishment and proliferation of bacteria [4]. Actually, according to previous studies, the implant surface itself constitutes a preferential site for bacterial adhesion [5] and in oral implantology, this infection is a worsen factor leading to peri-implantitis [6]. This is defined as an inflammatory disease that

induces the loss of supporting bone in the tissues surrounding a functional implant [7] and it represents the most common reason for implant failure. Hence, in order to obtain sufficient integration of dental implant, it is necessary both, to inhibit biofilm formation and to improve the adhesion between metal implant and peri-implant tissues [8]. Functionalization of titanium implant with bioactive molecules could thus be a pertinent solution to enhance integration of titanium [9–11].

Among interesting biomolecules, such as hyaluronic acid and collagen [12,13], chitosan (CS) appears as a prime candidate to improve dental materials due to its non-toxicity, biodegradability and biocompatibility suitable for biomedical application [14]. Many studies have demonstrated the antibacterial properties of chitosan against gingival pathogens [15,16]. It is a polysaccharide composed of *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *D*-glucosamine units with  $\beta$  binding at positions 1 and 4. It is obtained from deacetylation of chitin [17], one of the most abundant polysaccharides in nature after cellulose. For example, it can be found in exoskeletons of crustaceans and insects as well as in some fungi and microorganisms [18].

\* Corresponding author at: Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces (UMR CNRS 5615), Université Lyon 1, 22 avenue Gaston Berger, 69100 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 4 72 43 36 12; fax: +33 4 72 44 06 18.

E-mail address: [toury@univ-lyon1.fr](mailto:toury@univ-lyon1.fr) (B. Toury).

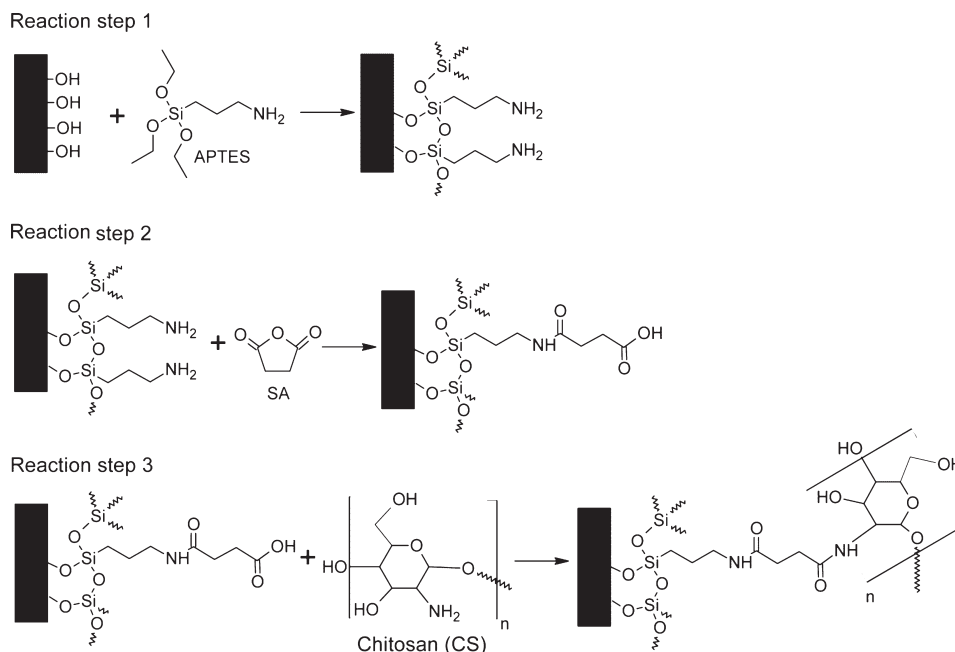


Fig. 1. Scheme of chitosan immobilization on titanium surface using APTES-SA coupling agent method.

Various strategies such as electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer on substrates [19], the use of catechol groups [20] and dopamine-glutaraldehyde system [21] have been already reported to bond chitosan to titanium. Another widespread approach consists in using organosilane as coupling agent such as triethoxysilylbutyraldehyde (TESBA) [22,23], triethoxysilylpropylsuccinic anhydride (TESPSA) [24] or 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) associated with glutaraldehyde [25–27].

Even though efforts have been made to reduce the number of steps using new organically modified silane, this approach still remains a multistep synthesis requiring a fine control of each stage. Hence, it appears very important to analyze, control and understand each step of the bioactive coating preparation to improve further the grafting and the aging of the bioactive coating [28]. Different types of techniques could be used such as attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), 3D profilometry, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) in static and dynamic modes. Recent studies focused on the surface characterization, especially on the interface between chitosan coating and metal support [26,29]. Nevertheless up to now, no study combining both bulk and outermost surface characterization techniques presented above were reported in the literature.

Furthermore, when dental implantology applications are aimed, a key factor concerns the chitosan degradation in terms of matrix composition, film thickness and resistance on titanium after immersion in saliva media. Oral cavity can observe consequent pH variation, function of the patient eating and drinking as well as its personal buccal health. Even though chitosan is stable in neutral pH, it becomes soluble/degradable in aqueous acid media. Consequently, an important challenge consists in synthesizing a chitosan-based dental implant resistant at low pH values. Previous work has already highlighted acidic resistance of chitosan film on hydroxyapatite substrate [30]. Our group has also recently proved the acidic pH resistance of grafted chitosan using TESPSA as coupling agent [24,31].

In this study, we propose a new procedure to graft chitosan on pure titanium T40 consisting in the successive use of two coupling agents. To react with the Ti support, APTES was employed as

silane source to ensure (1) a covalent bond with the substrate (Ti-O-Si) and (2) the formation of double peptide bond between amino groups from both APTES and chitosan, it was associated with succinic anhydride. Reports on APTES use as coupling agent [25,26] can already be found but always in association with glutaraldehyde, which is toxic [32]. Furthermore, study of bioactive coating after acidic saliva immersion is presented here. Accurate analyzes of all prepared surfaces, meaning after each grafting step and immersion in acidic saliva media at pH 3 and pH 5 might be a reliable method of an implant device prior any biological tests.

In this work, a combination of several relevant surface characterization techniques was used, to precisely analyze the functionalization of titanium substrates with chitosan, via a covalent bonding. These techniques are necessary to highlight and well-understand the production process of a bioactive coating and also to follow precisely the matrix modification of coating following immersion in acidic solutions. Indeed, these techniques permit direct analysis of the samples and provide information about outermost surface at nanoscale. Efforts were made to precisely outline and analyze characteristic ionic fragments and chemical groups of each reactant in order to clearly define references, which will be monitored along the grafting progression. It should be pointed out that these results could be useful not only for our study but also in other applications using these compounds, such as study of SAMs in microelectronics field and food applications.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical functionalization of titanium

Titanium (Ti) disks (18 mm diameter) were supplied by Global D (France). Samples were cleaned first in an ultrasonic bath with ethanol/acetone solution (v/v, 50/50) for 20 min. Then, the surface was decontaminated and oxidized in fresh piranha solution (sulfuric acid/hydrogen peroxide, v/v, 70/30) for 10 min, rinsed in deionized water and dried at room temperature. This treatment has usually two roles, i.e. surface decontamination and chemical oxidation etching by the formation of surface hydroxyl groups [33]. The thus-cleaned surface is labeled PiTi. Silanation of the surface was achieved by immersion of the sample in a solution of APTES



**Table 1**

Summary of label samples used in this study.

	Step of coating production
Ti	Unmodified surface
PiTi	Piranha treated titanium surface
APiTi	APTES modified PiTi surface
SAPiTi	Succinic anhydride modified APiTi surface
CSAPiTi	Chitosan modified SAPiTi surface
CSAPiTi-pH 5	Immersion of CSAPiTi in pH 5
CSAPiTi-pH 3	Immersion of CSAPiTi in pH 3

(Sigma-Aldrich, France) in extra-dry toluene (v/v, 3/97) for 24 h (Fig. 1, step 1). Then samples were cleaned three times in extra-dry toluene by ultrasound for 20 min each in order to remove physisorbed compounds (APiTi). After room temperature drying, the samples were submerged in a solution of succinic anhydride (SA) (Sigma-Aldrich, France) in dimethylformamide (DMF) (0.1 M) for 24 h to functionalize the surface with carbonyl groups (Fig. 1, step 2). Then samples were cleaned in DMF and finally in deionized water by ultrasound for 20 min each in order to remove physisorbed compounds (SAPiTi). A biopolymer solution containing 4 wt% chitosan (DA = 17, Sigma-Aldrich, France), 3% (v/v) acetic acid, and 97% (v/v) deionized water was grafted on the surface by dip coating ( $v = 1$  mm/s) (Fig. 1, step 3). Chitosan-coated samples were then dried at 80 °C for 48 h (CSAPiTi).

Table 1 summarizes the labels used to define the different surfaces obtained during this study.

## 2.2. Resistance of the coating in physiological media

In order to evaluate the resistance of the chitosan coating on Ti surface in physiological media, tests using artificial saliva (Fusayama Meyer solution) were performed at pH 3 and 5 [34]. The solution, similar to natural human saliva, is composed of: KCl (0.4 g/l), NaCl (0.4 g/l),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.906 g/l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.690 g/l),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (0.005 g/l), urea (1 g/l). Final pH values were adjusted using glacial acetic acid. Coated samples were placed in each acid solution for 24 h at room temperature and rinsed twice with water. These surfaces are labeled CSAPiTi-pH 3 and CSAPiTi-pH 5, respectively.

## 2.3. Surface chemistry characterizations

### 2.3.1. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR)

Spectra were recorded on a Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spectrometer from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ . Each FTIR spectrum was an average of 32 scans. Thermo Scientific omnic software was used.

### 2.3.2. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Measurements were done using a PHI Quantera SXM instrument (Physical Electronics, Chanhassen, USA) equipped with a 180

hemispherical electron energy analyzer and a monochromatized Al K $\alpha$  (1486.6 eV) source operated at 15 kV and 4 mA. The analysis spot had a diameter of 200  $\mu\text{m}$  and the detection angle relative to the substrate surface was 45°. Standard deviations were calculated from measurements performed on two different areas. Data were analyzed using the Multipak software. The depth probed of XPS analysis is between 5 and 10 nm.

### 2.3.3. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)

Measurements were performed using a ToF-SIMS 5 instrument (ION-TOF GmbH, Germany). Pulsed primary ion source of  $\text{Bi}_3^+$  was operated at 25 KeV. The scanning area of secondary ions was 100  $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . The depth probed is about the first monolayer in the static mode. Data were analyzed using the IONTOF Measurement Explorer software. Standard deviations were calculated from measurements performed on three different areas. The spectra were acquired in high current bunched mode. When required, charge effects were compensated by means of a pulsed electron flood gun ( $E_k = 20$  eV), the primary ion dose density being then  $1.25 \times 10^{12} \text{ Bi}_3^+/\text{cm}^2$ . Spectra calibration was achieved using positions of  $\text{C}^-$ ,  $\text{C}_3^-$ ,  $\text{C}_4^-$  peaks in negative mode, and  $\text{CH}_3^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_7^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_9^+$  peaks in positive mode. Spectra comparison was carried out after a normalization of the intensity, proportionally to the total intensity of each spectrum. Pure APTES and self-supported chitosan film were used as references in order to select characteristic fragments (Table 2).

Chemical images were obtained by large scan from a 10,000  $\times$  10,000  $\mu\text{m}^2$  area with 250  $\times$  250 pixels resolution. In order to control the coupling agent grafting, the negative and positive ionic fragments below were chosen:  $\text{TiO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{TiSiHO}_5^-$ ,  $\text{Si}_2\text{HO}_4^-$  in negative mode and  $\text{Si}^+$ ,  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}^+$  in positive mode. Monitoring of the positive ionic fragments such as  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}^+$  and  $\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}^+$  allows controlling the polymer deposit and its resistibility to immersion in acidic solutions.

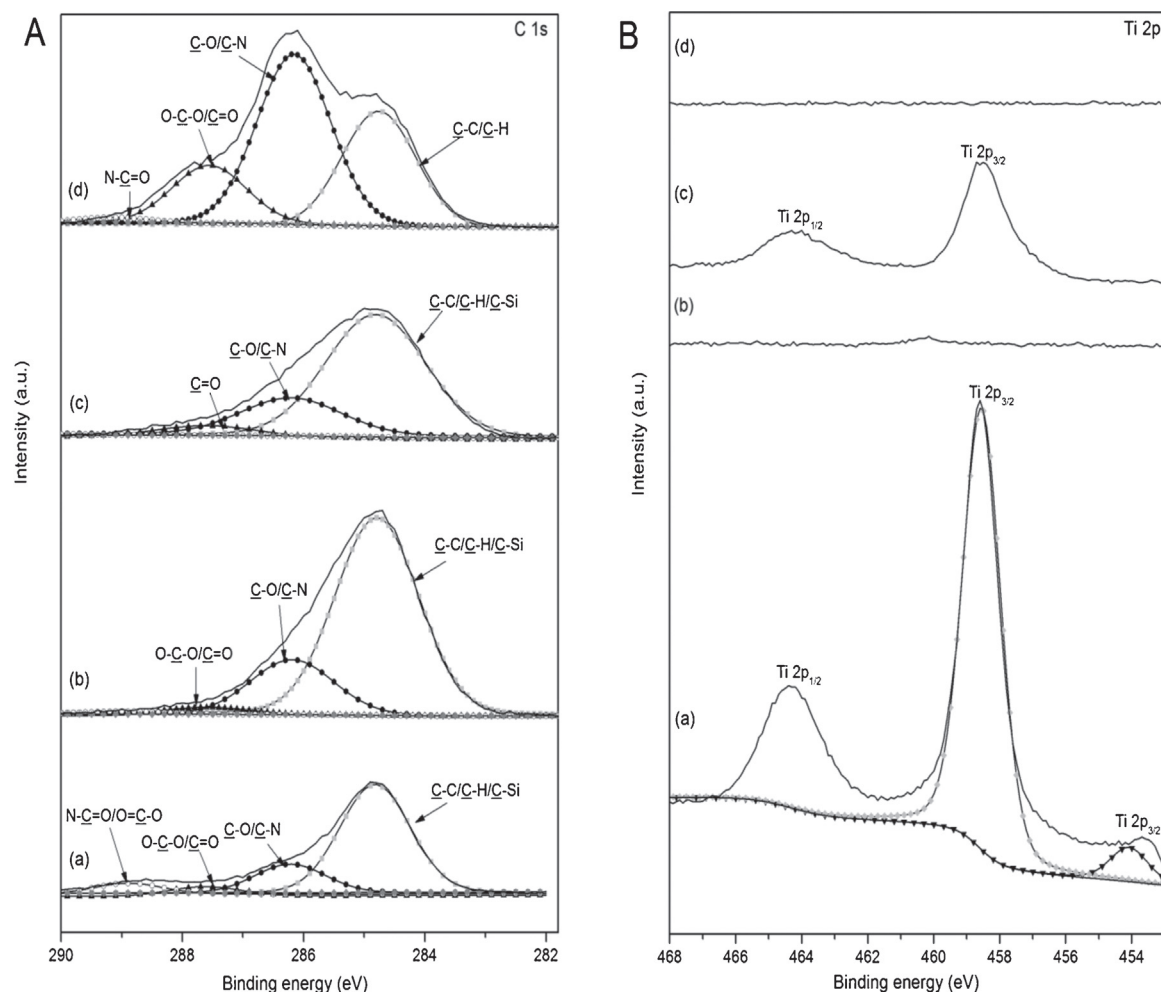
### 2.3.4. Dynamic-mode secondary ion mass spectrometry (DSIMS)

ToF-SIMS 5 instrument (ION-TOF GmbH, Germany) was used with a pulsed primary ion source of  $\text{Bi}_1^+$  operated at 25 keV for analysis. Scanning area of secondary ions was 100  $\times$  100  $\mu\text{m}^2$  in the center of a larger sputtered area, in order to minimize edge effects and redeposition linked to the formation of the crater. Primary ion source of  $\text{O}_2^+$  was operated in non-interlaced mode at 2 keV for sputtering with sputtered area of 300  $\times$  300  $\mu\text{m}^2$ . Charge effects were compensated by means of a pulsed electron flood gun ( $E_k = 20$  eV). The depth probed is at the nanometer scale in the dynamic mode, with each point of the profiles obtained from a mass spectrum. The maximum depth reached is around 15  $\mu\text{m}$ . Ion intensities were plotted versus the sputtering time, which was converted into depth after profilometry measurements.

**Table 2**

Specific positive and negative fragments of APTES and chitosan.

	Negative ion	Theoretical m/z	Measured m/z	Positive ion	Theoretical m/z	Measured m/z
APTES	$\text{CN}^-$	26.003	26.004	$\text{Si}^+$	27.977	27.975
	$\text{SiO}_2^-$	59.967	59.967	$\text{SiHO}^+$	44.980	44.979
	$\text{SiHO}_2^-$	60.975	60.975	$\text{SiH}_3\text{O}_2^+$	62.990	62.988
	$\text{SiHO}_3^-$	76.969	76.968	$\text{SiH}_3\text{O}_3^+$	78.985	78.984
	$\text{CHO}_2^-$	44.998	44.998	$\text{C}_2\text{H}_6\text{NO}^+$	60.045	60.043
Chitosan	$\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}^-$	58.030	58.034	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2^+$	61.029	61.027
	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$	59.013	59.015	$\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}^+$	96.045	96.049
	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^-$	71.013	71.016	$\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2^+$	97.029	97.029
	$\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}_2^-$	86.024	86.025	$\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2^+$	100.040	100.041
	$\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_2^-$	100.040	100.045	$\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_2^+$	112.040	112.039
				$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$	144.066	144.065



**Fig. 2.** XPS high resolution and deconvolution of carbon spectra (A, left) of PiTi (a), APiTi (b), SAPiTi (c) and CSAPiTi (d) and XPS high resolution and deconvolution of titanium spectra (when relevant) (B, right) of PiTi (a), APiTi (b), SAPiTi (c) and CSAPiTi (d).

### 2.3.5. Scanning electron microscopy-field emission gun (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS)

SEM was performed using a FEI Quanta 250 FEG instrument with SDD Bruker detector at 1 kV in secondary electrons (SE) and 5 kV in back-scattered electrons (BSE) mode. Images were recorded at  $\times 8$  and  $\times 80$  magnifications. EDS data were analyzed using the Esprit software.

### 2.4. 3D optical profilometry

Profilometry characterization was performed with a Sensofar Neox instrument in interferometry method following the ISO 25178 norm. Measurements were made on different areas given two types of information. The organic layer thickness permits to retrieve its DSIMS sputtering rate and on the other hand the area surface roughness parameters, arithmetic average height ( $S_a$ ) and developed area ( $S_{dr}$ ), allow control of the sample homogeneity. Scanning area was  $1273 \times 955 \mu\text{m}^2$  with a pace of  $1.66 \mu\text{m}$ . The film thickness measurement was achieved by profile of a  $300 \times 300 \mu\text{m}^2$  crater created by  $\text{O}_2^+$  ions sputtering using ToF-SIMS 5 instrument in dynamic mode, up to the interface between the deposited organic layer and the substrate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Control of coupling agent grafting

#### 3.1.1. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis

XPS being sensitive, it allows the precise monitoring of surface changes and gives information on chemical structure and atomic concentration of different types of surfaces [35]. Hence both first steps of the grafting (reaction between APTES and  $-\text{OH}$  surface groups of titanium substrates, and succinic anhydride addition, as depicted on Fig. 1) were analyzed via this technique. Fig. 2 shows XPS high resolution and deconvolution of carbon and titanium spectra of PiTi (a), APiTi (b), SAPiTi (c) and CSAPiTi (d) and element composition changes as a function of the reaction stage and acidic exposure for chitosan coated samples are presented in Table 3.

Pristine Ti surface presents high and unexpected carbon content probably due to surface contamination partially attributed to a polysiloxane compound in sight of the silicon peak at  $102.2 \text{ eV}$  [36]. The Ti 2p deconvoluted peaks at  $454.1 \text{ eV}$  ( $8.4 \pm 0.4\%$ ) and  $458.6\text{--}460 \text{ eV}$  ( $91.6 \pm 0.4\%$ ) were attributed to  $\text{Ti}^0$  from the support [26] and  $\text{Ti}^{4+}$  of  $\text{TiO}_2$  layer, respectively [37]. After piranha treatment, the carbon ratio decreases even if it is still detected on the PiTi sample. In parallel, the peaks relative to oxygen and titanium increase, with for Ti 2p deconvoluted peak, no change of assignment

**Table 3**

Atomic element composition percent for the individual reaction steps and for chitosan coated samples CSAPiTi, CSAPiTi-pH 3 and CSAPiTi-pH 5 determined by XPS. Standard deviations were calculated from measurements performed on two different areas. Others: F, Al, Ca, S, Cl, Mg, Na, P, K.

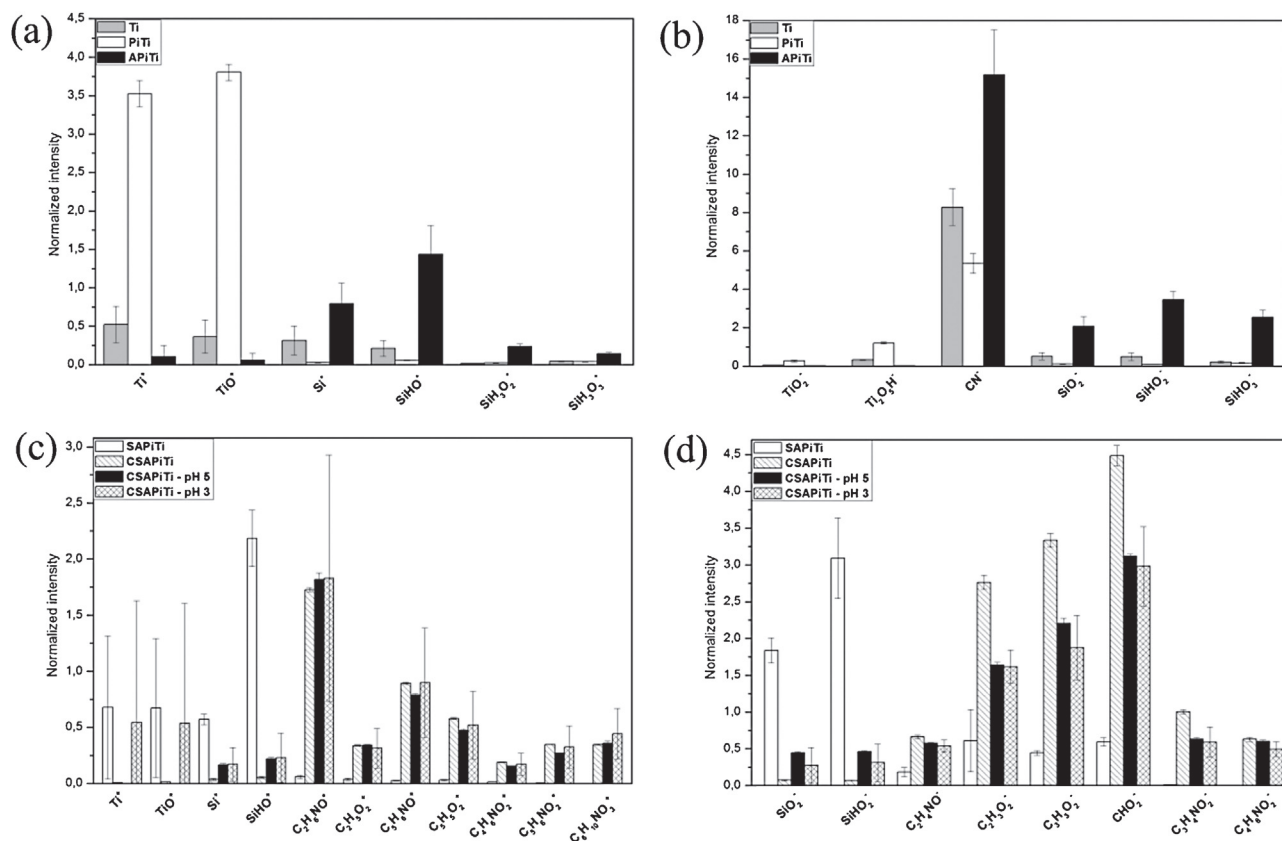
	Ti	PiTi	APiTi	SAPiTi	CSAPiTi	CSAPiTi-pH 3	CSAPiTi-pH 5
C1s (%)	46.7 ± 1.3	35.3 ± 2.6	55.3 ± 2.0	47.6 ± 3.0	62.8 ± 0.5	59.1 ± 0.3	60.3 ± 0.6
N1s (%)	2.8 ± 0.5	2.4 ± 0.0	7.3 ± 0.8	6.0 ± 0.2	7.6 ± 0.4	7.3 ± 0.4	6.6 ± 0.0
O1s (%)	36.4 ± 0.7	45.2 ± 1.6	23.7 ± 0.1	30.1 ± 1.8	29.0 ± 0.2	30.6 ± 0.1	29.7 ± 0.5
Ti2p (%)	8.6 ± 0.3	17.1 ± 1.1	0.1 ± 0.2	3.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Si2p (%)	3.0 ± 1.6	0.0 ± 0.0	13.1 ± 1.8	10.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Others (%)	2.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.6	2.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3

percent (see Table S1 in supplementary data). In good accordance, the deconvoluted O 1s peak at 530 eV was assigned to TiO<sub>2</sub> in Ti (49.4 ± 2.4%) and PiTi (71.8 ± 1.8%) samples. It can be mentioned that peaks at 531.5 and at 532.5–533 eV found in both first samples were attributed to contaminations. As Xu and co-workers shown, it appears difficult to eliminate physisorbed carbon and atmospheric nitrogen, this latter being considered as minor contaminations on both starting surfaces [26]. It can be noted that no trace of other elements was detected on the surface after piranha cleaning proving its efficiency. In the literature, to highlight the different steps, most of the studies do not take into account surface contaminations and directly compare the relative content of atomic ratios of selected elements such as O/C and N/C in the case of polyethylene substrates [38] and C/Ti, O/Ti and N/Ti for titanium substrates [26]. This approach does not seem appropriate here precisely because of the partial masking of Ti substrate. Other methods can be found in the literature to clean and activate titanium substrates before covalent attachment of silane, such as passivation method and immersion in alkali solution [39,40].

After the silanation step, the C and Si peak intensities increase as expected [25] while the Ti peak is almost no longer detected which

is a sign of layer of silane more than 10 nm (detection limits of XPS analysis). The C signal was deconvoluted into two main peaks: at 284.7 eV (73.4 ± 6.6%) and at 286.1 eV (23.1 ± 5.3%), assigned to  $\text{C}-\text{C}/\text{H}-\text{C}-\text{Si}$  and  $\text{C}-\text{N}/\text{C}-\text{O}$ , respectively, in good agreement with silane deposition (see Table S1 in supplementary data). Oxygen peak decreases due to the masking of substrate and the signal can be divided in two parts: peaks at 531.5 eV (89.2 ± 5.1%) and at 532.5–533 eV (10.8 ± 5.1%) were assigned to  $\text{O}-\text{Si}$  and  $\text{O}-\text{C}$ , respectively; the latter corresponding to some contaminations. As expected, N 1s intensity increases considering amino groups present in APTES. The deconvoluted N 1s signal gave two peaks at 399.3 eV (95.3 ± 4.5%) and at 401.5 eV (4.7 ± 4.5%) corresponding to  $-\text{NH}_2$  and  $-\text{NR}_3^+$ , respectively [41].

Then after the SA deposition step, signals relative to C 1s and Si 2p lightly decrease in parallel of increasing of Ti 2p and O 1s percents, suggesting degradation during the SA process with partial detachment of the silane. However, the nitrogen signal, which is still detected in significant amounts on SAPiTi sample, is thus mostly attributed to the silane (see Table S1 in supplementary data). The deconvoluted peak of C 1s of SAPiTi sample gave four peaks: peak at 284.7 eV (63.3 ± 1.8%), the peak at 286.1 eV



**Fig. 3.** Average normalized intensity of positive and negative fragments of Ti, PiTi and APiTi (a) and (b), and average normalized intensity of positive and negative fragments of SAPiTi, CSAPiTi, CSAPiTi-pH 5 and CSAPiTi-pH 3 (c) and (d).



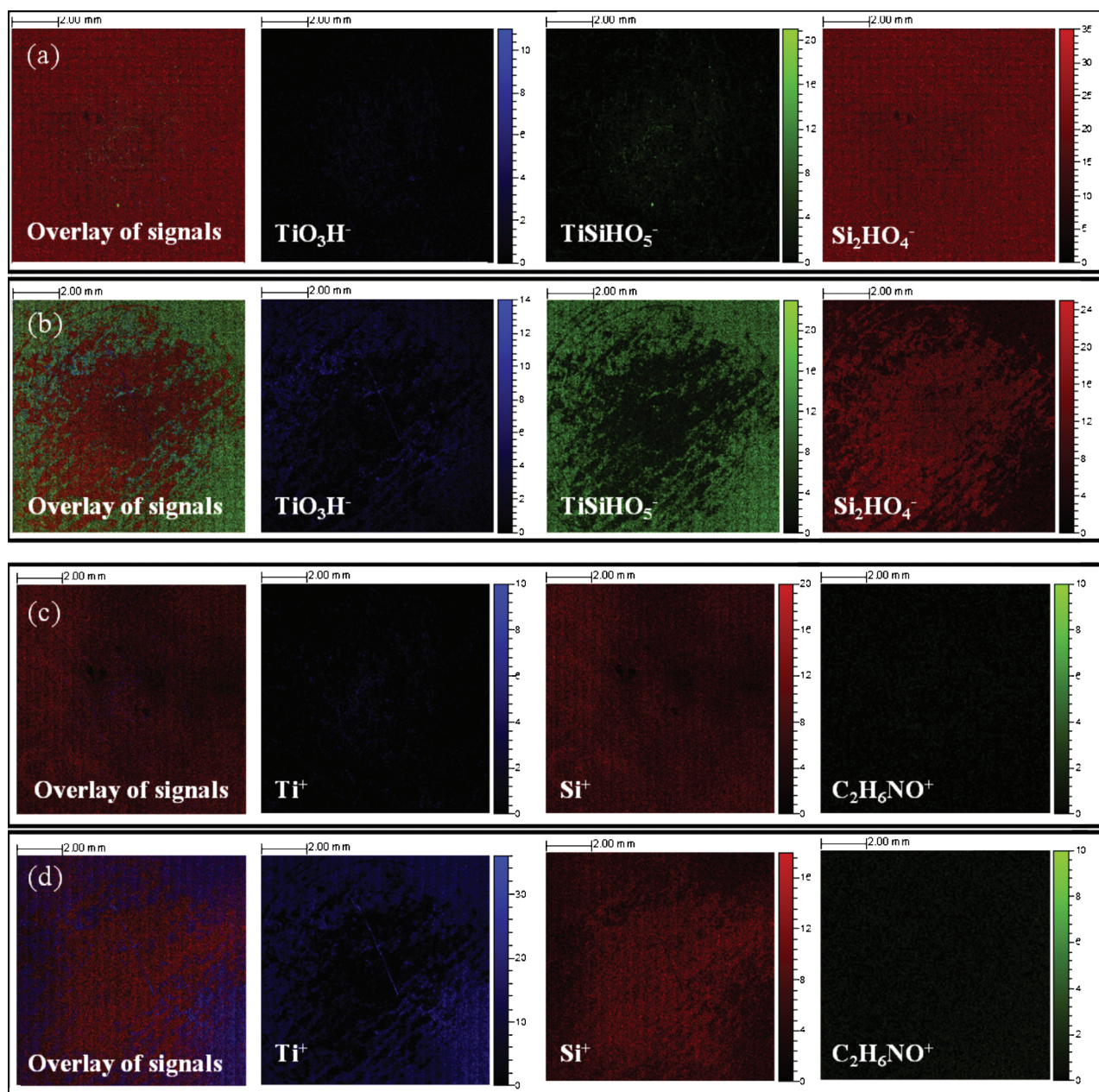


Fig. 4. 2D surface imaging of positive fragments and negative fragments of APiTi (a and c) and SAPiTi (b and d).

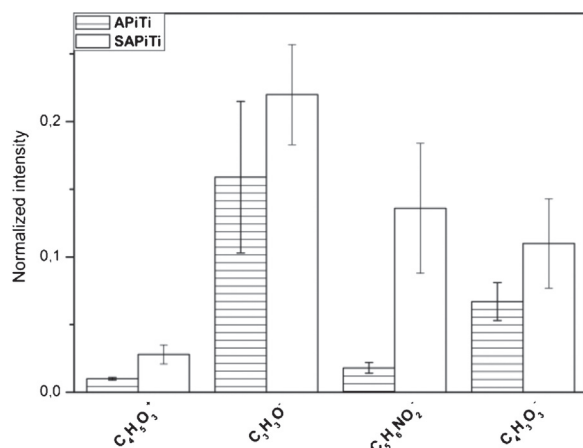
( $27.4 \pm 2.4\%$ ), the peak at 287.8 eV ( $6.2 \pm 0.2\%$ ), and the peak at 289 eV ( $0.8 \pm 0.6\%$ ) which were assigned to  $\text{C}-\text{Si}/\text{C}-\text{C}/\text{C}-\text{H}$ ,  $\text{C}-\text{N}/\text{C}-\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{O}$  and  $\text{O}=\text{C}-\text{O}/\text{N}-\text{C}=\text{O}$ , respectively. These results are consistent with a formation of a peptide bond between APTES and SA. However, the characteristic signal of peptide bond is hard to clearly demonstrate with XPS on titanium substrates because of surface analysis size. Bahadur et al. characterize successfully APTES-SA reaction using XPS in the case of nanoparticles [42].

### 3.1.2. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)

In contrast to XPS, ToF-SIMS not only provides elemental information, but also a detailed molecular one with a high sensitivity with depth probed at the monolayer scale [43]. Analyses of positive and negative fragments are another way to study grafting of covalent agents to titanium substrate (Figs. 3–5). Contaminations from silicon based compounds such as  $\text{Si}^+$ ,  $\text{SiHO}^+$ ,  $\text{SiO}_2^-$  and  $\text{SiHO}_2^-$  are detected on Ti substrate (Fig. 3a and b). Analysis of the outermost

surface can be disturbed by these contaminations, which are possibly due to traces of polydimethylsiloxane (PDMS). After piranha stage, characteristic peaks of the substrate (such as  $\text{Ti}^+$  and  $\text{TiO}_2^-$ ) show higher intensities, associated with a significant decrease of polysiloxane detection. Furthermore, the slight increasing of  $\text{TiO}^+/\text{Ti}^+$  ratio and of  $\text{Ti}_2\text{O}_5\text{H}^-$  ion detection could indicate a slight chemical oxidation of surface and presence of Ti–OH sites on PiTi sample [44].

Characteristic positive and negative fragments of APTES selected from Table 2 were investigated after the silanization step by two ToF-SIMS analysis modes: surface spectroscopy and 2D surface imaging (Figs. 3 and 4). Despite presence of PDMS corresponding partly to the silicon detected in ToF-SIMS (data not shown) and XPS, significant increase of APTES fragments is observed (Fig. 3a and b). It is confirmed by 2D surface images (Fig. 4a and c), that show the relatively good homogeneity of the silane layer with an homogeneous  $\text{Si}^+$  ion repartition, mainly attributed to the silane. The image



**Fig. 5.** Average normalized intensity of positive and negative fragments of APiTi and SAPiTi.

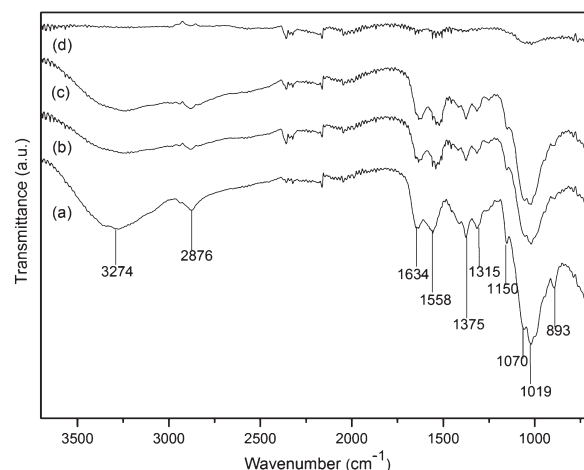
of  $Si_2HO_4^-$  fragment indicates formation of cross-polymerization through Si–O–Si bonds, with a homogeneous repartition. Monitoring of the  $TiSiHO_5^-$  fragment permits to track the binding between the silane and titanium. However, this fragment is not significantly detected on APiTi sample, which suggests a thick silane layer; confirming XPS results (see Section 3.1.1). In addition, absence of characteristic fragments of chitosan such as  $C_2H_6NO^+$  in 2D surface images (Fig. 4) and the spectra (data not shown) proves that no confusion can be done during the detection of the biopolymer [45]. Furthermore, absence of fragments corresponding to aminopropyl silane associated with ethoxy group such as  $SiC_5H_{12}NO^+$  and  $SiC_7H_{18}NO_2^+$  (data not shown), and the homogeneous  $Si_2HO_4^-$  ion repartition are in agreement with two possible types of reaction. Indeed, condensation reaction can occur either between ethoxy-silane groups (Si–OEt) and the substrate leading to Ti–O–Si bond or between two silanol of two APTES molecules during the silanization step [46]. The Si–O–Si bond obtained by this latter cross-polymerization [26] can strengthen the film and improve further the retention of the entire coating. Studies of these two reaction types were performed on APTES film deposit on substrates using immersion technique or chemical vapor deposition [40,47].

Reaction with SA leads to significant surface modification (Figs. 4b, d and 5). Compared to APiTi samples, signals of titanium fragments on SAPiTi in both negative and positive modes are increased in some areas, as in the periphery, suggesting partial degradation of the silane layer. Indeed, silane fragments are localized in the middle of the sample where no titanium peaks are detected. An intensity decrease of  $Si_2HO_4^-$  and  $Si^+$  is also noted and  $SiHO_5Ti^-$  fragments, indicator of Ti–O–Si bond, are detected on the periphery of the wafer, in agreement with silane degradation. In order to highlight the reaction between amino groups of grafted silane and the succinic anhydride,  $C_4H_5O_3^+$ ,  $C_3H_3O^-$ ,  $C_5H_6NO_2^-$  and  $C_4H_3O_3^-$  negative and positive fragments characteristic of amide bonding were investigated in APTES-SA film (see Fig. S1 in supplementary data) as well as in SAPiTi and APiTi (Fig. 5). After SA treatment, intensity of these fragments significantly increases confirming reaction of SA with APTES to form amide group. This reaction has been largely employed in the literature [48–50], but none deals with deposit on titanium.

### 3.2. Control of biopolymer deposit on titanium samples and resistance of the coating after immersion in acidic solutions

#### 3.2.1. XPS analysis

The surface atomic composition changes of chitosan coated samples before and after acidic exposure were determined by



**Fig. 6.** FT-IR/ATR spectra of CSAPiTi (a); CSAPiTi-pH 5 (b); CSAPiTi-pH 3 area 1 (c); CSAPiTi-pH 3 area 2 (d).

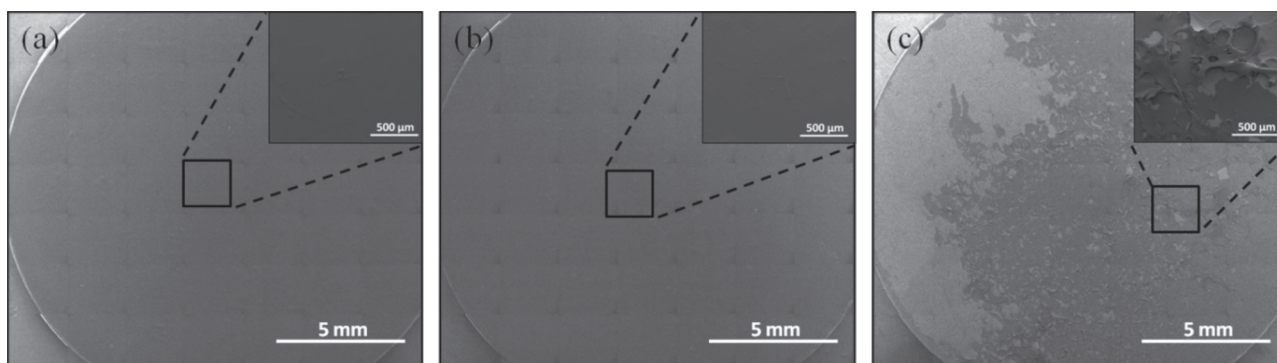
XPS analysis (Table 3). Following chitosan deposition, a significant increasing of C 1s and N 1s peak intensities and a decrease of Si 2p peak are observed. Absence of titanium suggests a chitosan thickness superior to 10 nm (XPS detection limit). The deconvoluted peaks of C 1s and O 1s of CSAPiTi sample gave four and two peaks, respectively (see Table S1 in supplementary data): peaks at 284.6 eV ( $30.4 \pm 4.0\%$ ), at 286.1 eV ( $51.5 \pm 2.4\%$ ), at 287.8 eV ( $15.7 \pm 1.5\%$ ), and at 289 eV ( $1.9 \pm 0.1\%$ ) were assigned to  $C-C/C-H$ ,  $C-N/C-O$ ,  $O-C-O/C=O$  and  $N-C=O$ , respectively, for C 1s signal [29,51] and peaks at 531.5 eV ( $99.2 \pm 0.1\%$ ) and at 532.5–533 eV ( $0.8 \pm 0.1\%$ ) which were assigned to  $O=C-N$  and  $O-C$ , respectively [52,53]. The deconvoluted N 1s signal gave two peaks at 399.3 and at 401.5 eV corresponding to  $-NH_2$  and  $-NH_3^+$ , respectively. These results confirm the success of chitosan deposit and suggest the peptide bond formation. Gadenne et al. used also this type of covalent binding in order to graft polysaccharide via a silane onto titanium surface [54]. In the literature, chitosan grafting on Ti can be performed via imide bond formation using TESBA [22] or APTES associated with glutaraldehyde [25].

Study of the biopolymer coating retention in saliva media is primordial for future applications in oral implantology. pH variation tests in similar conditions appear as a relevant way to evaluate dental material resistance according to previous studies [24,34]. Two pH values (3 and 5) were chosen arbitrarily in order to simulate acidic condition of saliva medium according to previous work in our group [24]. Following pH immersion, no significant changes about surface atomic composition are observed by XPS analysis on CSAPiTi-pH 3 and CSAPiTi-pH 5 (Table 2), proving the presence of chitosan on both samples. Note that an increasing of other elements corresponding to saliva media composition is observed. Moreover, hypothesis of no impact of acidic pH treatments chitosan coated sample can be done according to this analysis.

#### 3.2.2. FTIR-ATR analysis

Following FTIR-ATR analysis, spectra presented in Fig. 6 show equivalent signature and the characteristic bands of chitosan [23], except for one recorded from CSAPiTi-pH 3 (Fig. 6d). Overlapped peaks of N–H stretching and O–H stretching vibrations visible around  $3274\text{ cm}^{-1}$  indicate the presence of hydroxyl and amine groups [55]. Weaker band intensity is noted for CSAPiTi-pH 5 (Fig. 6b) and CSAPiTi-pH 3 at area 1 (Fig. 6c) compared to CSAPiTi (Fig. 6a). The weak band at  $2876\text{ cm}^{-1}$  corresponds to  $(-CH_2-)$





**Fig. 7.** SEM micrographs in secondary electron (SE) mode of CSAPiTi (a); CSAPiTi-pH 5 (b); CSAPiTi-pH 3 (c).

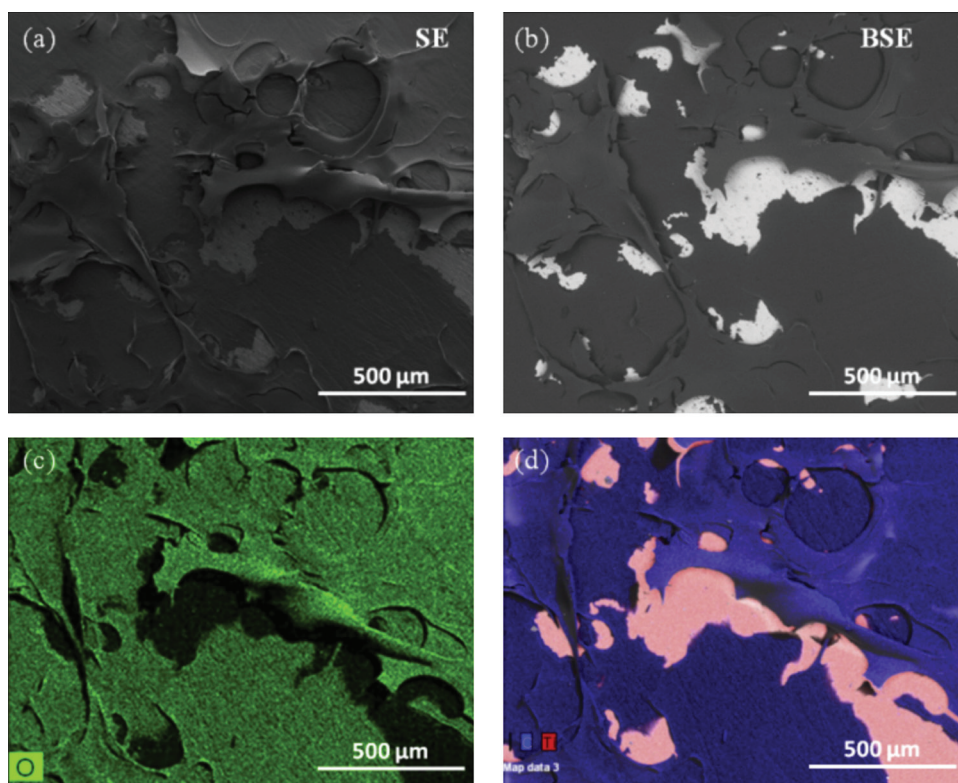
stretching while bands at  $1634$ ,  $1558$ ,  $1375$  and  $1315\text{ cm}^{-1}$  are attributed to  $\text{C=O}$  of amide,  $-\text{NH}_2$  stretching vibration,  $-\text{NHCO}$  of amide and  $-\text{C-N}$ , respectively [51,56]. The bands at  $1150$ ,  $1070$ ,  $1019$  and  $893\text{ cm}^{-1}$  are characteristics of chitosan structure [51,56,57].

As above-mentioned, spectrum recorded on sample CSAPiTi-pH 5 shows all expected bands for chitosan signature proving its presence on the entire Ti surface even after the longest acidic immersion. Besides, CSAPiTi-pH 3 gives ambivalent results, since analyses of two different areas do not lead to reproducible spectra. Actually, the chitosan is not remained on the entire surface (Fig. 6d), suggesting its partial deterioration and partial lift off. However as noted in previous studies [24], all signal intensities on CSAPiTi-pH 5 and CSAPiTi-pH 3 are weaker, possibly attributable to loss of biopolymer material. It should be pointed out that IR remains here a qualitative analysis and no information about degradation mechanism could be extracted because of non-detection of silane on titanium surface.

### 3.2.3. SEM analysis

The morphology of chitosan-coated samples before and after immersion in acidic solutions was observed using SEM technique (Fig. 7a–c). An overview of the sample surface was shown as well as for each of them, a zoom of one pertinent area is presented. In the case of CSAPiTi (Fig. 7a) and CSAPiTi-pH 5 samples (Fig. 7b), no chemical or topographic contrast is observed regardless of the magnification. Therefore we can conclude that the chitosan coating is homogeneous and uniform and that the acid treatment at pH 5 of chitosan-coated sample does not change its surface morphology.

On the contrary and in good accordance with the previous IR conclusions, after immersion at pH 3 for 24 h of chitosan-coated sample, strong chemical and topographic contrasts are observed (Figs. 7c and 8a and b). At low magnification, observation of a quarter of substrate suggests partial degradation of the biopolymer and lift of at the disk periphery. At high magnification, contrasts are even more obvious with the substrate exposed in some areas (Fig. 8b). Folding and retraction of the film seems also to occur



**Fig. 8.** SEM micrographs of CSAPiTi-pH 3 in secondary electron (SE) (a) and back-scattering electron (BSE) (b) modes; EDS mapping of O element in green code (c); C and Ti in blue and red code (d) of CSAPiTi-pH 3.

**Table 4**

Evolution of surface parameters of CSAPiTi, CSAPiTi-pH 5, CSAPiTi-pH 3.

	$S_a$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_{dr}$ (%)	Coating thickness ( $\mu\text{m}$ )	DSIMS sputtering rate ( $\mu\text{m/s}$ )
CSAPiTi	1.17	1.06	$15.95 \pm 1.13$	0.017
CSAPiTi-pH 5	0.77	0.16	$9.56 \pm 0.11$	0.021
CSAPiTi-pH 3	0.85	2.51	$11.40 \pm 2.90$	0.019

during the acid immersion. Oxygen, carbon and titanium mapping of CSAPiTi-pH 3 are shown in Fig. 8c and d. The intensity of O and C is correlated to the biopolymer amount, rich of these two elements. In the same manner, the Ti intensity increases where the amount of carbon and oxygen is low. These results support previous findings of partial detachment and retraction of chitosan at pH 3.

### 3.2.4. ToF-SIMS analysis

It was demonstrated above, that chitosan deposition leads to the decrease of  $\text{Ti}^+$ ,  $\text{TiO}^+$ ,  $\text{Si}^+$ ,  $\text{SiHO}^+$ ,  $\text{SiO}_2^-$  and  $\text{SiHO}_2^-$  fragment intensities due to a thick coating (Fig. 3c and d). Characteristic positive and negative chitosan fragments shown in Table 2 are fully detected after chitosan deposition highlighting the grafting efficiency like in a previous study [23]. After acidic exposure, different results are observed depending on the pH. No significant difference is observed between the three samples; however it should be pointed out a noticeable standard deviation value was observed in the case of CSAPiTi-pH 3 attributed to the chitosan deterioration in some areas. Indeed at these damage zones, the substrate is clearly observed with detection of  $\text{Ti}^+$  ions in a lower intensity than pristine titanium. Presence of silicon fragments mainly attributed to silane and characteristic fragments of CS are also proved here but in a few amounts than reference deposit sample. Two-dimensional surface imaging of positive fragments of CSAPiTi, CSAPiTi-pH 3 and

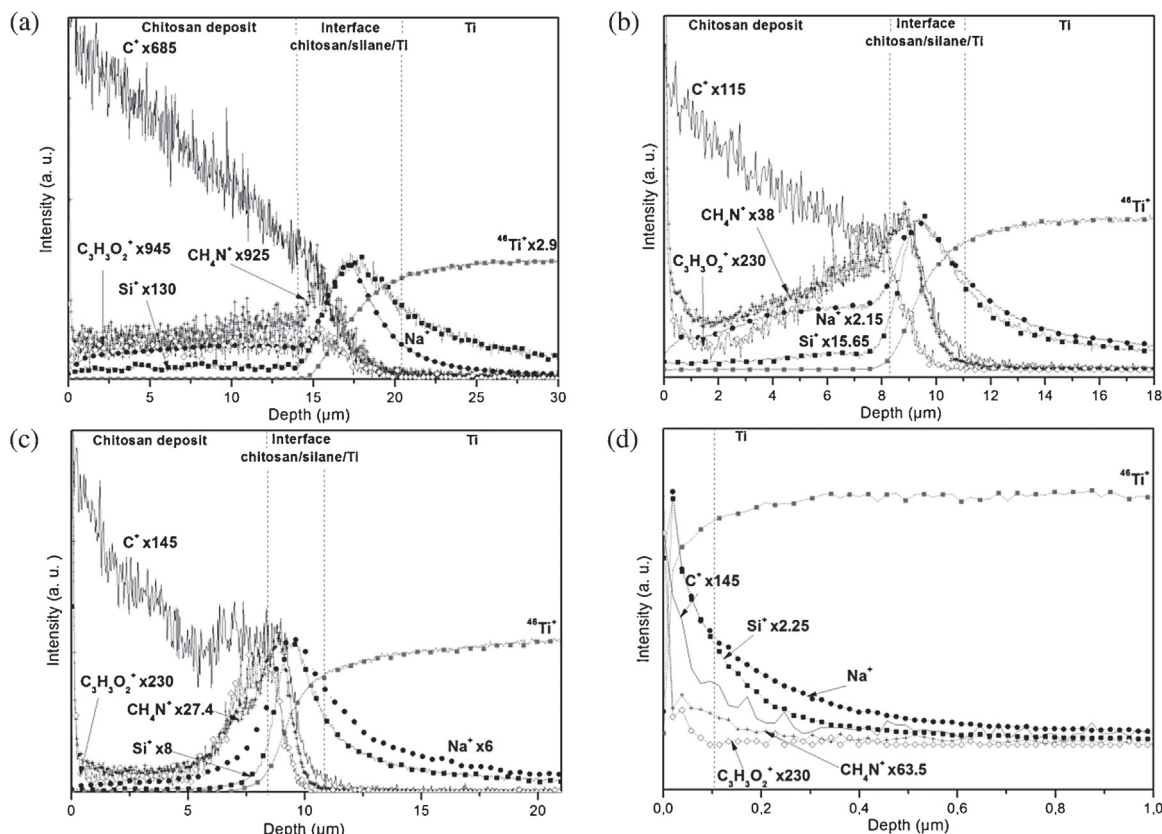
CSAPiTi-pH 5 confirms these findings with detection of Ti and less chitosan after pH 3 treatment (see Fig. S2 in supplementary data). Analysis of negative ions assigned to chitosan film shows a slight decrease of normalized intensity after exposure to acidic solutions, attributable to loss of biopolymer material. These results provide a possible indication of mechanisms leading to the partial degradation following exposure to acidic solution. Indeed, two mechanisms can occur at pH 3 with the rupture of the covalent bond between chitosan and coupling agent and/or the rupture of covalent bond between silane and titanium substrate.

### 3.2.5. Thickness and area roughness of the coating

Optical profilometry is one of the techniques used to precise an implant surface [58]. It is used to characterize the surface roughness:  $S_a$ ,  $S_{dr}$  and the coating thickness (see Fig S3 in supplementary data) permitting to get interesting insights on the DSIMS sputtering rate (Table 4). Although, SEM detected no coating change before and after immersion at pH 5, profilometry shows important modifications in terms of roughness and thickness for all samples. Indeed, in the case of CSAPiTi-pH 5 sample a smoothing effect of saliva media probably due to a minor loss of chitosan is suggested as the observed roughness parameters decrease.

In the case of CSAPiTi-pH 3 at 24 h, the smoothing effect of saliva media is still present according to a lower  $S_a$  value, but the augmentation of  $S_{dr}$  value observed may be related to the heterogeneity of the film formation (Fig. 8a).

After both acidic solutions, the biopolymer layer decreases in agreement with the latter results and a noticeable standard deviation is noted in the case of CSAPiTi-pH 3. The latter film folded on itself which explains higher thickness and  $S_{dr}$  values than CSAPiTi-pH 5. The sputtering rates obtained from the various organic layers are very close: according to internal observations, the sputtering rate is significantly lower (about 10–20 times) for a silica-based



**Fig. 9.** ToF-SIMS depth profiles of positive fragments recorded from CSAPiTi (a), CSAPiTi-pH 5 (b), and two different areas of CSAPiTi-pH 3 (c and d).



layer. The slight difference observed are thus not significant and could be due to matrix effects, i.e. change of film composition, especially in this case with the presence or not of alkaline ions.

### 3.2.6. Dynamic-mode secondary ion mass spectrometry (DSIMS)

Using depth profiling, DSIMS method provides a clear indication on the thickness of the remaining film before and after immersion [59] and information about the stacking of the deposited layer. ToF-SIMS positive ion depth profiles were recorded on chitosan-coated samples before and after 24 h exposure (Fig. 9). The depth distribution of  $^{46}\text{Ti}^+$  (saturation on  $^{48}\text{Ti}^+$ ),  $\text{C}^+$ ,  $\text{Si}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$ ,  $\text{CH}_4\text{N}^+$  and  $\text{Na}^+$  ion intensities is profiled. In order to study composition and stack of layers, fragment intensities are reported in Fig. 9 using a linear scale. In agreement with previous results and ion evolution, CSAPiTi sample can be divided in three regions. A first layer corresponds to the chitosan film with presence of  $\text{C}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  and  $\text{CH}_4\text{N}^+$  attributed to the polymer (Fig. 9a). The organic layer with  $\text{C}^+$  as characteristic signal gradually decreases until a second area assigned to the chitosan/coupling agent/substrate interface with the appearance of  $\text{Si}^+$  ion that is ascribed to the silane layer, in agreement with ToF-SIMS analyses on SAPiTi and APiTi samples. Enrichment and then disappearance of  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions are localized at the interface of the substrate with the organic layer before Si maximum detection. Hypothesis of the bond formation between chitosan amino group and the coupling agent can be assumed according to this result. The last detected region is assigned to the support presenting rising  $^{46}\text{Ti}^+$  ion amount with the depth analysis. Contamination with alkaline elements such as  $\text{Na}^+$  was detected in the organic layer and mainly in the intermediate one.

After acidic exposure (Fig. 9b and c), intensity of alkaline elements in chitosan layer decreases, confirming hypothesis of its contamination. The polymer thickness decreases after 24 h of exposure in both acidic saliva media. Therefore in both cases,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  ions followed the  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions evolution in CSAPiTi sample, with enrichment and then disappearance at the interface chitosan/silane/substrate before Si detection. This result could be a consequence of acidic exposure which damages CS deposit. On the area of deterioration of chitosan,  $\text{C}^+$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^+$  and  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ions are quickly eliminated, sign of an almost complete film deterioration (Fig. 9d). Therefore, in the same area,  $\text{Si}^+$  ions, characteristic of the intermediate silane layer, were partially present. It can be noticed that beyond the chitosan–silane interface area, the thickness is biased due to the chemical difference of the different layers. These findings, in agreement with profilometry results, complete the results obtained with ToF-SIMS. Indeed, following exposure to acidic solution, besides the two mechanisms suggested by ToF-SIMS, coating thickness reduction can be also observed.

## 4. Conclusions

In this work, a covalent grafting of chitosan to titanium was performed using a three-step reaction procedure. It involves the use of two coupling agents: 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) as silane to react on titanium previously treated during the piranha step, and succinic anhydride used to ensure the formation of a double peptide bond between both amino groups from APTES and chitosan. Accurate monitoring of the resistance of chitosan-coated samples in saliva media at pH 3 and 5 for 24 h was performed. A decrease of thickness and surface roughness were the only changes observed after pH 5 immersion. In the case of pH 3, heterogeneity of the surface has been demonstrated with no trace of CS in some area even if silane was detected. The use of surface characterization technique was necessary to evaluate the production process of a bioactive coating. These analysis methods are permitted also to follow and understand precisely the matrix modification

of coating following immersion in biological solutions. This study allowed providing reference fragments for products used in the coating production (CS and APTES); these results might be a key factor in the selection of bioactive coating in dental implantology applications but also in other applications using these products. The combination of these techniques appears here necessary to clearly characterize the coating production. Efforts are occurring in our group to improve both the grafting step and the resistance of chitosan-coated titanium at pH 3. The next challenge will be the study of its biocompatibility and antibacterial properties of this new procedure to graft chitosan.

## Acknowledgments

This work was partially supported by the Rhône-Alpes Region, DGCIS, the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), Global D and the Fonds Unique Interministériel program through the research project “Plastipolis”. The authors would like to thank Dr. Philippe Sainsot for the 3D profilometry measurements.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.11.185>.

## References

- [1] B.M. Holzapfel, J.C. Reichert, J.-T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, D.W. Hutmacher, *Adv. Drug Delivery Rev.* 65 (2013) 581–603.
- [2] L. Mishnaevsky Jr., E. Levashov, R.Z. Valiev, J. Segurado, I. Sabirov, N. Enikeev, S. Prokoshkin, A.V. Solov'yov, A. Korotitskiy, E. Gutmanas, I. Gotman, E. Rabkin, S. Psakh'e, L. Dluhoš, M. Seefeldt, A. Smolin, *Mater. Sci. Eng. R: Reports* 81 (2014) 1–19.
- [3] M. Geetha, A.K. Singh, R. Asokamani, A.K. Gogia, *Progress Mater. Sci.* 54 (2009) 397–425.
- [4] A.D. Pye, D.E. Lockhart, M.P. Dawson, C.A. Murray, A.J. Smith, *J. Hosp. Infect.* 72 (2009) 104–110.
- [5] K. Subramani, R.E. Jung, A. Molenberg, C.H. Hammerle, *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 24 (2009) 616–626.
- [6] J. Mouhyi, D.M. Dohan Ehrenfest, T. Albrektsson, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 14 (2012) 170–183.
- [7] B. Klinge, M. Hultin B.T., *Dent. Clin. North Am.* 49 (2005) 661–676.
- [8] A. Pelaez-Vargas, D. Gallego-Perez, M. Magallanes-Perdomo, M.H. Fernandes, D.J. Hansford, A.H. De Aza, P. Pena, F.J. Monteiro, *Dental Mater.* 27 (2011) 581–589.
- [9] T. Hanawa, *Jap. Dental Sci. Rev.* 46 (2010) 93–101.
- [10] A. Michiardi, G. Helary, P.C. Nguyen, L.J. Gamble, F. Anagnostou, D.G. Castner, V. Migonney, *Acta Biomater.* 6 (2010) 667–675.
- [11] R. Tejero, E. Anitua, G. Orive, *Progress Polym. Sci.* 39 (2014) 1406–1447.
- [12] C. Jin, L.-f. Ren, H.-z. Ding, G.-s. Shi, H.-s. Lin, F. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 100B (2012) 2167–2177.
- [13] H. Ao, Y. Xie, H. Tan, X. Wu, G. Liu, A. Qin, X. Zheng, T. Tang, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 102 (2014) 204–214.
- [14] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, *Progress Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [15] G. Ikinci, S. Senel, H. Akincibay, S. Kas, S. Ercis, C.G. Wilson, A.A. Hincal, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 121–127.
- [16] M. Kong, X.G. Chen, K. Xing, H.J. Park, *Int. J. Food Microbiol.* 144 (2010) 51–63.
- [17] M. Rinaudo, *Progress Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632.
- [18] J. Vázquez, I. Rodríguez-Amado, M. Montemayor, J. Fraguas, M. González, M. Murado, *Marine Drugs* 11 (2013) 747–774.
- [19] Z. Wang, X. Zhang, J. Gu, H. Yang, J. Nie, G. Ma, *Carbohydr. Polym.* 103 (2014) 38–45.
- [20] H. Marie, A. Barrere, F. Schoenstein, M.H. Chavanne, B. Grosgeat, L. Mora, *PLoS One* 7 (2012) 30.
- [21] Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, C. Poh, W. Wang, *J. Biomed. Mater. Res. A* 86 (2008) 865–872.
- [22] H.J. Martin, K.H. Schulz, J.D. Bumgardner, K.B. Walters, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2008) 4599–4605.
- [23] P. Renoud, B. Toury, S. Benayoun, G. Attik, B. Grosgeat, *PLoS One* 7 (2012) 31.
- [24] D. Campos, B. Toury, M. D'Almeida, G. Attik, A. Ferrand, P. Renoud, B. Grosgeat, *Odontology* (2014) 1–8.
- [25] H.J. Martin, K.H. Schulz, J.D. Bumgardner, K.B. Walters, *Langmuir* 23 (2007) 6645–6651.
- [26] X. Xu, L. Wang, S. Guo, L. Lei, T. Tang, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 10520–10528.

- [27] N.S.K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur, S.K. Mitra, *Appl. Surf. Sci.* 305 (2014) 522–530.
- [28] Z. Ma, Z. Mao, C. Gao, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 60 (2007) 137–157.
- [29] A. Héquet, V. Humblot, J.-M. Berjeaud, C.-M. Pradier, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 84 (2011) 301–309.
- [30] H.S. Lee, S. Tsai, C.C. Kuo, A.W. Bassani, B. Pepe-Mooney, D. Miksa, J. Masters, R. Sullivan, R.J. Composto, *J. Colloid. Interface Sci.* 385 (2012) 235–243.
- [31] B. Toury, B. Grosgeat, P. Renoud, C. Desroches, Substrate on which chitosan or collagen is grafted via a covalent bond, PCT process in press Feb 2013, Inventors (2013) UCBL CNRS, France, January 2012.
- [32] F. Kari, *Toxic. Rep. Ser.* 25 (1993), 1-E10.
- [33] A. Nanci, J.D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, M.D. McKee, *J. Biomed. Mater. Res.* 40 (1998) 324–335.
- [34] N. Schiff, B. Grosgeat, M. Lissac, F. Dalard, *Biomaterials* 23 (2002) 1995–2002.
- [35] G. Zorn, J.E. Baio, T. Weidner, V. Migonney, D.G. Castner, *Langmuir* 27 (2011) 13104–13112.
- [36] J.F. Moulder, W.F. Stickle, P.E. Sobol, K.D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, 1992.
- [37] C. Boulmer-Leborgne, J. Hermann, B. Dubreuil, P. Brault, M.L. DeGiorgi, G. Leggieri, A. Luches, M. Martino, A. Perrone, I.N. Mihailescu, I. Ursu, G. Blondiaux, J.L. Debrun, H. Estrade, B. Rousseau, *Appl. Surf. Sci.* 54 (1992) 349–352.
- [38] Z. Xin, J. Hou, J. Ding, Z. Yang, S. Yan, C. Liu, *Appl. Surf. Sci.* 279 (2013) 424–431.
- [39] D. Tsiourvas, A. Tsetsekou, M. Arkas, S. Diplas, E. Mastrogrianni, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 22 (2011) 85–96.
- [40] G. Tan, L. Zhang, C. Ning, X. Liu, J. Liao, *Thin Solid Films* 519 (2011) 4997–5001.
- [41] Y.-Y. Song, H. Hildebrand, P. Schmuki, *Surf. Sci.* 604 (2010) 346–353.
- [42] N.M. Bahadur, T. Furusawa, M. Sato, F. Kurayama, I.A. Siddiquey, N. Suzuki, *J. Colloid Interface Sci.* 355 (2011) 312–320.
- [43] C.A. Prestidge, T.J. Barnes, W. Skinner, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 251–259.
- [44] P. Dubruel, E. Vanderleyden, M. Bergadà, I. De Paepe, H. Chen, S. Kuypers, J. Luyten, J. Schrooten, L. Van Hoorebeke, E. Schacht, *Surf. Sci.* 600 (2006) 2562–2571.
- [45] S. Al-Qadi, A. Grenha, C. Remuñán-López, *Carbohydrate Polym.* 86 (2011) 25–34.
- [46] M.-L. Abel, J.F. Watts, *J. Adhesion* 84 (2008) 847–871.
- [47] F. Zhang, K. Sautter, A.M. Larsen, D.A. Findley, R.C. Davis, H. Samha, M.R. Linford, *Langmuir* 26 (2010) 14648–14654.
- [48] Y. Niu, G. Jin, *Appl. Surf. Sci.* 281 (2013) 84–88.
- [49] K.-A. Kwak, Y.-H. Kim, M. Kim, B.-T. Lee, H.-Y. Song, *Appl. Surf. Sci.* 279 (2013) 13–22.
- [50] L. Wu, Y. Xu, L. Cai, X. Zang, Z. Li, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 832–840.
- [51] L.F. Zemljič, T. Tkavc, A. Vesel, O. Šauperl, *Appl. Surf. Sci.* 265 (2013) 697–703.
- [52] F. Kara, E.A. Aksoy, Z. Yuksekdog, N. Hasirci, S. Aksoy, *Carbohydrate Polym.* 112 (2014) 39–47.
- [53] R.S. Vieira, M.L.M. Oliveira, E. Guibal, E. Rodríguez-Castellón, M.M. Beppu, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 374 (2011) 108–114.
- [54] V. Gadenne, L. Lebrun, T. Jouenne, P. Thebault, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 112 (2013) 229–236.
- [55] G. Li, L. Zhang, C. Wang, X. Zhao, C. Zhu, Y. Zheng, Y. Wang, Y. Zhao, Y. Yang, *Carbohydrate Polym.* 101 (2014) 718–726.
- [56] Z. Aiping, C. Tian, Y. Lanhua, W. Hao, L. Ping, *Carbohydrate Polym.* 66 (2006) 274–279.
- [57] J. Kurmiriska, M. Czerwicka, Z. Kaczynski, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming, P. Stepnowski, *Marine Drugs* 8 (2010) 1567–1636.
- [58] D.M. Dohan Ehrenfest, L. Vazquez, Y.J. Park, G. Sammartino, J.P. Bernard, *J. Oral Implantol.* 37 (2011) 525–542.
- [59] S. Zanna, C. Saulou, M. Mercier-Bonin, B. Despax, P. Raynaud, A. Seyeux, P. Marcus, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6499–6505.